

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SABINA STARIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SABINA STARIČ

**VPLIV SESTAVE IN PROCESNIH PARAMETROV NA STABILNOST
GELA KSANTANA**

**THE INFLUENCE OF COMPOSITION AND PROCESS PARAMETERS
ON THE STABILITY OF XANTHAN GEL**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

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

Zahvala

Zahvaljujem se staršem, sestri Sari, Luki in vsem prijateljem, ki ste mi stali ob strani tekom šolanja, študija in pri pisanju magistrske naloge. Vsak na svoj način ste mi omogočili, da so bila ta leta nepozabna.

Iskreno pa se zahvaljujem tudi mentorju ter dr. Mihi Homarju, mag. farm., in vsem ostalim sodelavcem, ki so mi pomagali in delili z menoj svoje znanje ter nasvete med praktičnim delom in pisanjem magistrske naloge.

Izjava

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

Sabina Starič

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl

Mentor: prof. dr. Janez Kerč

Somentor: dr. Miha Homar

Član komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
1 UVOD	1
1.1 Suspenzije.....	1
1.2 Testiranje stabilnosti suspenzij	3
1.3 Ksantan	4
1.4 Reologija.....	5
1.5 Vpliv mehanske obremenitve na reologijo ksantana	10
1.6 Vpliv ionov na reologijo ksantana	11
1.7 Načrtovanje eksperimentov	13
1.8 Nefelometrija	14
2 NAČRT ZA DELO	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17
3.2 Aparature	19
3.3 Metode	20
3.3.1 Izdelava preliminarних vzorcev pred načrtovanjem eksperimentov.....	20
3.3.2 Izdelava vzorcev z načrtovanjem eksperimentov.....	23
3.3.3 Reološka metoda	26
3.3.4 Nefelometrija.....	28
3.3.5 Testiranje stabilnosti	28

4 REZULATI IN RAZPRAVA.....	30
4.1 Rezultati preliminarних testov pred načrtovanjem eksperimentov	30
4.2 Postavitev modela na osnovi reoloških in nefelometričnih meritev	40
4.3 Testiranja stabilnosti.....	46
5 SKLEP.....	54
6 LITERATURA.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Flokuliran in deflokuliran sistem v različnih časovnih točkah (prirejeno po 1)	3
Slika 2: Primarna struktura ponavljajoče se enote ksantana (prirejeno po 4)	4
Slika 3: Sekundarna struktura ksantana s prikazanim vplivom temperature in ionske moči na konformacijske spremembe (prirejeno po 4)	5
Slika 4: Shematski prikaz odvisnosti strižne napetosti od strižne hitrosti za različne reološke sisteme (prirejeno po 10).....	7
Slika 5: Nefelometer z označenimi sestavnimi deli (prirejeno po 18)	15
Slika 6: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od časa pri istem nastavku in vseh ostalih enakih pogojih	31
Slika 7: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti časa pri istem nastavku in vseh ostalih enakih pogojih.....	31
Slika 8: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od vrste nastavka pri vseh ostalih enakih pogojih.....	31
Slika 9: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od količine vzorca pri vseh ostalih enakih pogojih (nastavek S25G-25N).....	32
Slika 10: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od premera uporabljene čaše pri vseh ostalih enakih pogojih	32
Slika 11: Vrednosti G' , G'' in η v odvisnosti od časa homogenizacije pri 5000 o/min ob dodatku 0,1 M NaCl.....	33
Slika 12: Vrednosti povprečnih modulov s standardnimi odkloni v odvisnosti od koncentracije dodanega CaCl_2	34
Slika 13: Vrednosti povprečnih modulov s standardnimi odkloni v odvisnosti od koncentracije dodanega NaCl	35
Slika 14: Slep vzorec (Xan_S9, 3 paralelke – prve tri epice z leve) in homogeniziran vzorec (Xan_S2_2, 3 paralelke – prve tri epice z desne) po 30 min centrifugiranju pri 14000 o/min	36
Slika 15: Po vrsti od leve slepa (Xan_S8, Xan_S9) in homogenizirani vzorci (Xan_S2_1, Xan_S1_1B, Xan_S2_2, Xan_S1_3A, Xan_S1_5A), centrifugirani 30 min pri 7000 o/min..	36
Slika 16: Vrednosti modulov v odvisnosti od količine dodanega sladkorja	37
Slika 17: Sediment vzorca Xan_S9	38
Slika 18: Sedimen vzorca Xan_S1_1B	38
Slika 19: Sediment vzorca Xan_S2_2	38

Slika 20: Sediment vzorca Xan_S1_5A	38
Slika 21: Primerjava vzorcev takoj in po enem mesecu.....	39
Slika 22: Grafični prikaz parametrov (elastični oz. viskozni modul, razlika obeh modulov, viskoznost, razlika elastičnega oz. viskoznega modula med slepim in preiskovanim vzorcem, nefelometer po centrifugiranju vzorcev, količnik rezultatov nefelometra pred in po centrifugiranju).....	42
Slika 23: Grafični prikaz parametrov (za hitrost pri G' in viskoznosti izberemo kvadratni člen namesto linearnega).....	43
Slika 24: Grafični prikaz parametrov (dodane dodatne meritve iz preliminarne vzorcev in vzorcev za testiranje stabilnosti)	43
Slika 25: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na G'	44
Slika 26: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na G''	44
Slika 27: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na viskoznost	45
Slika 28: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na nefelometrične meritve	45
Slika 29: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na razliko nefelometričnih meritev.....	46
Slika 30: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N1	48
Slika 31: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N1	48
Slika 32: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N2	48
Slika 33: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N2	49
Slika 34: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N13	49
Slika 35: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N13	49
Slika 36: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N14	50
Slika 37: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N14	50
Slika 38: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N20	50

Slika 39: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N20	51
Slika 40: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N21	51
Slika 41: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N21	51

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Osnovne lastnosti reoloških sistemov	7
Preglednica II: Prikaz priprave osnovnega vzorca gela ksantana (300 mL)	20
Preglednica III: Lastnosti uporabljenih ULTRA-TURRAX nastavkov	21
Preglednica IV: Izvedeni poizkusi pri preučevanju vpliva homogenizacije na strukturo ksantana (hitrost homogenizacije je bila pri vseh poskusih 24000 o/min).....	22
Preglednica V: Faktorji za DoE in njihova območja.....	24
Preglednica VI: Načrt izvedbe eksperimentov	25
Preglednica VII: Pogoji merjenja z rotacijskim reometrom.....	28
Preglednica VIII: Izvedeni poizkusi in vrednosti parametrov pri preučevanju vpliva homogenizacije na strukturo ksantana (hitrost homogenizacije je bila pri vseh poskusih 24000 o/min)	30
Preglednica IX: Reološke meritve vzorcev testiranih na stabilnost 1 mesec	39
Preglednica X: Rezultati meritev, ki smo jih uporabili pri načrtovanju modela.....	41
Preglednica XI: Vzorci za testiranje stabilnosti	47
Preglednica XII: P vrednosti pri izvedbi t-testa	52

POVZETEK

Suspenzije sodijo med grobo disperzne sisteme, kjer so netopni trdni delci (dispergirana faza) porazdeljeni v tekočini (disperznem mediju). Glavna težava pri izdelavi suspenzij je njihova fizikalna nestabilnost in tendenca po sedimentaciji, kar lahko onemogoča enakomerno odmerjanje.

V magistrski nalogi smo proučili vpliv sestave (količina sladkorja, ionov) ter procesnih parametrov (izbira čaše, hitrost in čas homogenizacije ter vrsta nastavka homogenizatorja) na fizikalne lastnosti gela ksantana (s poudarkom na reoloških lastnostih) kot nosilnega sistema za suspenzijo z zdravilno učinkovino. Najprej smo izdelali preliminarne vzorce in tako pridobljena spoznanja uporabili za načrtovanje nadaljnjih eksperimentov. Izdelane vzorce smo vrednotili z reometrom, jim določili stabilnost po centrifugiranju, vzorce pred in po centrifugiranju proučili z nefelometrom in jih optično vrednotili. Posamezne vzorce smo pogledali pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. Spremljali smo stabilnost vzorcev gela ksantana v različnih časovnih točkah (1, 3 in 6 mesecev) pri 40 °C in 75 % relativni vlažnosti ter pomerili njihove reološke parametre in supernatant pred ter po centrifugiranju ovrednotili z nefelometrom. Nato smo izdelali model in vrednotili vpliv posameznih parametrov. Vrednosti reoloških parametrov z dodajanjem NaCl in CaCl₂ so naraščale (močnejša struktura gela), z večanjem intenzivnosti homogenizacije pa padale (porušitev gelske strukture). Z eksperimentalnim načrtom smo ugotovili, da je imela največji vpliv na proučevane lastnosti gela ksantana hitrost homogenizacije, sledila je izbira nastavka homogenizatorja, manjši vpliv smo lahko pripisali tudi dodatku NaCl. Reševanje je dobro uspelo, prepoznali smo ključne faktorje in dobili dokaj dober končni model.

S testiranjem stabilnosti smo ugotovili, da so pri malo obremenjenih vzorcih s časom vrednosti reoloških parametrov padale, prav tako tudi razlika med elastičnim in viskoznim modulom (šibkejša struktura gela), vrednosti nefelometričnih meritev so naraščale. Pri močno obremenjenih vzorcih so s časom vrednosti reoloških parametrov padale, razlika med elastičnim in viskoznim modulom se je le malo zmanjševala. Predvidevamo, da so bile zaradi (ireverzibilne) porušitve gelske strukture v različnem obsegu nefelometrične meritve variabilne. Zelo pomembno je, da striktno sledimo postopkom izdelave suspenzije, saj lahko v nasprotnem primeru privede do popolnoma drugačnih fizikalnih lastnosti in posledično do neenakomernega odmerjanja.

Ključne besede: ksantan, reologija, stabilnost, eksperimentalni načrt, procesni parametri.

ABSTRACT

Suspensions belong to coarse dispersion systems where the insoluble particles (disperse phase) are distributed in a liquid (dispersive medium). The main problem in the preparation of suspensions is their physical instability and the tendency to sediment, which can prevent uniform dosing.

In the master's thesis, the influence of the composition (the amount of sugar and ions) and process parameters (selection of the beaker, speed and homogenization time and type of homogenizer) on the physical properties of xanthan gel (with the emphasis on rheological properties) was studied. First, preliminary samples were prepared and analysed and obtained findings were used to design additional experiments. The samples were evaluated by rheological methods and stability after centrifugation was determined. Samples were evaluated before and after centrifugation using a nephelometer, and also by optical characterisation. Some individual samples were also analysed under the scanning electron microscope. The stability of xanthan gel samples at different time points (1, 3 and 6 months) at 40 °C and 75% relative humidity was monitored using the measurement of their rheological parameters, and supernatant before and after centrifugation was evaluated with a nephelometer. A model was then created and the impact of all individual parameters evaluated. The values of rheological parameters increase (stronger gel structure) with the addition of NaCl and CaCl₂ and decrease with the intensity of homogenization (disruption of the gel structure). With the experimental plan, we found out that the most important effect on xanthan gel is the rate of homogenization followed by the choice of the homogenizer. The addition of NaCl also shows some influence. The screening was successful and we recognized the main factors to build a fairly good final model.

By stability testing, it was found out that in the case of low homogenized samples, the values of the rheological parameters decreased over time, as well as the difference between the elastic and the viscous module (weaker gel), however, the values of the nephelometric measurements increase. In heavily homogenized samples, the values of the rheological parameters decreased over time, the difference between the elastic and the viscous modulus was only slightly reduced, the breakdown of the gel structure was not reversible and due to this effect, the results of the nephelometer measurements were variable. It is very important that we strictly follow the manufacturing procedure of the suspension, otherwise it can lead to completely different physical properties and consequently to unequal dosing.

Key words: Xanthan, rheology, stability, design of experiments, process parameters.

SEZNAM OKRAJŠAV

DoE	Design of Experiments (načrtovanje eksperimentov)
G'	elastični modul oz. modul akumulacije energije
G''	viskozni modul oz. modul energijskih izgub
MLR	multipla linearna regresija
o/min	obradi na minuto
RH	relativna vlažnost
SD	standardna deviacija
SEM	vrstični elektronski mikroskop
$\dot{\gamma}$	strižna hitrost
γ	strižna deformacija
η	viskoznost
τ	strižna napetost

1 UVOD

1.1 Suspenzije

Skupaj z emulzijami sodijo suspenzije med grobo disperzne sisteme (dispergirani delci večji od 0,5 μm). Groba suspenzija je disperzija grobo uprašenih, netopnih trdnih delcev (dispergirana faza) v tekočini (disperzni medij ali kontinuirana faza). Večina farmacevtskih suspenzij ima vodni disperzni medij, poznamo pa tudi nekaj izjem z organsko ali oljno fazo. Dobro formulirane suspenzije ostanejo ustrezno homogenizirane vsaj med tresenjem vsebnika in odvzemom ustrezne količine pripravka, nastali sediment pa se lahko enostavno redispergira z zmernim pretresanjem vsebnika. Suspendirani delci morajo biti majhni in enakomerno veliki, da dajo gladek, eleganten produkt. Suspenzija ne sme biti preveč viskozna, da jo je možno odstraniti iz vsebnika in jo nanesti na mesto aplikacije (1, 2).

Suspenzije so namenjene peroralni, topikalni aplikaciji na kožo in mukozno membrano, lahko jih damo tudi parenteralno z injekcijo. Mnogi imajo težave s požiranjem trdnih farmacevtskih oblik, zato je v takem primeru zaželeno, da je učinkovina dispergirana v ustreznem vehiklu. Za suspenzijo se odločimo tudi takrat, ko je učinkovina netopna ali slabo topna v določenem topilu, v primeru, da učinkovina v stiku z vodo razpade, pa lahko sintetiziramo netopen derivat učinkovine, ki ga lahko formuliramo kot suspenzijo. Z njimi lahko priкрijemo neprijeten okus, ki ga lažje zaznamo v raztopinah kot suspenzijah (1, 2).

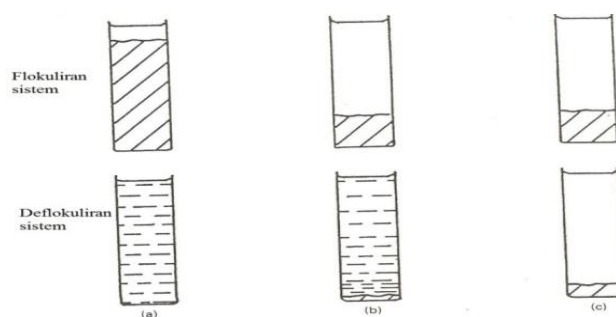
Pri izdelovanju suspenzije je pomembno, da imajo suspendirani delci primerno porazdelitev velikosti, saj s tem zagotovimo ustrezne biofarmacevtske lastnosti in minimalno sedimentacijo. Pri večjih količinah je primerno najprej izdelati koncentrirano disperzijo suspendirajočega sredstva, ki jo pripravimo tako, da material počasi med mešanjem dodajamo topilu. Ta stopnja je ključna, z njo zagotovimo, da so aglomerati suspendirajočega sredstva popolnoma razpadli, saj lahko v nasprotnem primeru najprej gelira površina vsakega aglomerata in povzroči, da ostane sprva prašek znotraj neomočen. Zelo intenzivno mešanje lahko uniči polimerno strukturo suspendirajočega sredstva, zato je bolje uporabiti srednje intenzivno mešanje in nato pustiti disperzijo stati do polne hidratacije, ki je lahko dosežena takoj ali pa v nekaj urah. Pri zelo hidrofobnih učinkovinah je lahko omočenje pospešeno z mešanjem pod znižanim tlakom, kar povzroči odzračevanje produkta in s tem izboljššan videz. Nato dodamo ostale sestavine, ki jih lahko prej raztopimo v delu vehikla. Na koncu sledi homogenizacija, ki zagotovi dispergirano učinkovino, gladek in eleganten izdelek. Za mešanje srednje velike količine najpogosteje uporabljamo propelerski tip mešala, ki ima

lopaticice nameščene pod pravim kotom, kar povzroči cirkulacijo tekočine v aksialni in radialni smeri. Pri izbiri mešalnega sistema je zelo pomembno razmerje med premerom propelerja in premerom mešalne posode, ki je v idealnem primeru 1 : 3, sprejemljivo pa je tudi med 1 : 5 (če je manj, je propeler premajhen in ne more proizvesti zadostnega toka za enakomerno mešanje) ter 3 : 5 (če je več, je propeler prevelik za izbrano mešalno posodo, zgornji in spodnji del mešanice nista v stiku, saj se ne moreta prosto gibati med steno posode in mešalom). Pomembna je tudi višina nameščenega mešala v mešalni posodi, ki naj bo na 1/3 višine od spodaj. V primeru, da mešalo namestimo prenizko, lahko pod njim ostaja del slabo premešane mešanice, če pa mešalo namestimo previsoko, navadno pride do vrtinčenja. Do slednjega lahko pride tudi pri povečani hitrosti vrtenja, pri čemer se lahko skupaj z vrtincem v suspenzijo vmešava zrak, kar lahko povzroči penjenje. Mešanje je odvisno tudi od zadostnega aksialnega in radialnega toka, ki nista možna, če je tekočina preveč viskozna, ampak le, če je tok tekočine skozi mešalo dovolj hiter (tekočina mora biti dovolj mobilna). (1, 2, 3)

Večina netopnih delcev izkazuje različno hidrofobnost in ni zlahka omočena, zato uporabljamo močila. Ta zmanjšajo medfazno napetost med trdnimi delci in tekočino, zato je na trdnih delcih adsorbiran zrak nadomeščen s tekočino. Vedno uporabimo najmanjšo učinkovito koncentracijo močila, med katere uvrščamo površinsko aktivne snovi (polisorbati, estri sorbitana), hidrofilne koloide (akacija, bentonit, tragakant, alginati, gumi ksantana, celulozni derivati) in topila (glicerol, alkohol, glikoli) (1, 2).

Delci imajo svoj naboj, nanje se vežejo nasprotno nabiti ioni – prvi sloj imenujemo interni ali fiksni, okrog njega pa se nahaja eksterni ali difuzni sloj. Zeta potencial je elektrokinetični potencial v koloidnih disperzijah, ki je povezan s sloji okrog nabitega delca, odvisen je od raztopine, ni definiran na snov in je indikator stabilnosti disperzij. Potencialno energijo koloidnih sistemov lahko delimo na dva dela: privlačne van der Waalsove in odbojne elektrostatske sile. Katere sile bodo izražene je odvisno od razdalje med delci – če so delci blizu skupaj, prevladujejo močne privlačne sile (najnižje energijsko stanje – primarni minimum, tvorba pogače), ki delujejo tudi na velikih razdaljah (šibke sile – sekundarni minimum, flokulacija), na vmesnih razdaljah pa delujejo odbojne sile (primarni maksimum). Primarni maksimum predstavlja aktivacijsko bariero, ki mora biti presežena, da lahko pride do agregacije. Ko najdemo ustrezno močilo, je nujno določiti, ali je suspenzija flokulirana ali deflokulirana. Pri deflokulirani suspenziji dispergirani delci ostanejo posamezne diskretne enote, stopnja sedimentacije pa je odvisna od velikosti posamezne enote. Sile med delci omogočijo drsenje delcev drug ob drugem med sedimentacijo. Urejanje je počasno, sediment je kompakten in ga je težko redispergirati (caking). Aglomeracija delcev v flokuliranem

sistemu vodi v hitrejšo sedimentacijo, saj je vsaka enota sestavljena iz več individualnih delcev, stopnja urejanja je odvisna od poroznosti aglomerata, pri čemer lahko disperzni medij teče skozi in med poroznimi aglomerati ali flokuli sedimenta. Aglomeracija v primarnem minimumu povzroči kompaktne flokule, v sekundarnem minimumu pa bolj porozne flokule, sedimenta je več in ga je enostavno dispergirati s stresanjem. V deflokuliranem sistemu supernatant ostane moten dlje časa po stresanju zaradi majhne stopnje urejanja majhnih delcev v suspenziji, supernatant flokuliranega sistema pa kmalu postane bister, saj so delci vseh velikosti in se hitro uredijo. Deflokuliran sistem zaradi počasnega sedimentiranja omogoča odvzem enakomernega odmerka pripravka, vendar pa je po ureditvi sediment kompakten in se ga težko redispergira. Flokuliran sistem pa je lahko redispergirati, sedimentacija je hitra, zato je možnost odvzema netočnega odmerka večja in pripravek izgleda neustrezno. Idealno bi bilo imeti deflokuliran sistem z zadostno viskoznostjo, ki bi preprečila sedimentacijo, vendar pa je navadno dosežen kompromis, pri čemer je suspenzija delno flokulirana s kontrolirano viskoznostjo, tako da je sedimentacija minimalna. Disperzijo lahko stabilizirano z dodatkom sredstev za suspendiranje: močila, flokulanti in zaščitni koloidi ali zgoščevala (1, 2). Na Sliki 1 predstavlja točka (a) začetno stanje, (b) vmesno stanje, (c) pa končno stanje po daljšem časovnem obdobju.



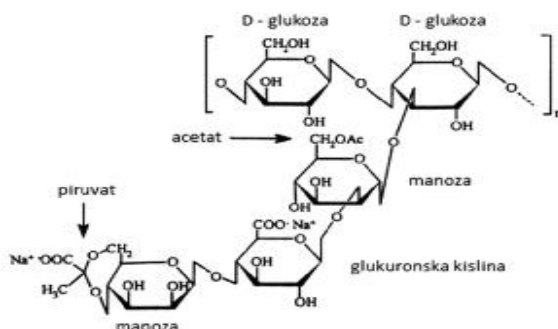
Slika 1: Flokuliran in deflokuliran sistem v različnih časovnih točkah (prirejeno po 1)

1.2 Testiranje stabilnosti suspenzij

Kemijska stabilnost suspenzij je ponavadi neproblematična, saj suspendirana učinkovina razpade šele v raztopini, pomembna pa je fizikalna nestabilnost, ki je navadno ocenjena z merjenjem sedimentacije, končnega volumna ali višino sedimenta in enostavnostjo redispergiranja produkta. Prva dva podatka lahko pridobimo z merjenjem celotnega začetnega volumna ali višine suspenzije (V_0) in volumna ali višine sedimenta (V). Lahko narišemo vrednost V/V_0 (faktor sedimentacije) v odvisnosti od časa za serijo različnih formulacij in iz naklona premice ocenimo, katera suspenzija najpočasneje sedimentira. Ko vrednost V/V_0

postane konstantna, je to znak končane sedimentacije. Stopnja redispergiranja produkta je lahko ocenjena s stresanjem vzorca v njegovem vsebniku, pri čemer uporaba mehanskega mešala lahko zmanjša variacijo mešanja. Suspenzijo lahko centrifugiramo in ponazorimo procese Stokesovega zakona ter s tem povečamo stopnjo sedimentacije suspenzije, vendar tako ni vedno možno predvideti točnega obnašanja sistema pri hranjenju pri običajnih pogojih. S centrifugiranjem lahko uničimo strukturo flokuliranega sistema, ki bi pri običajnih pogojih sicer ostal intakten. Tako nastali sediment bi se težko redispergiral ne glede na to, ali je suspenzija flokulirana ali ne, vendar pa je ta način vseeno relativno uporaben. Merjenje navidezne viskoznosti je prav tako način za ocenitev fizikalne stabilnosti, a visok strig lahko uniči strukturo suspenzije. Uporabimo lahko tudi metodo s spreminjanjem temperature tako, da nekaj ur pustimo suspenzijo pri 40 °C, nato jo zamrznemo ali pa časovne intervale ekstremnih temperatur skrajšamo na samo nekaj minut. Ta metoda je zelo uporabna za testiranje stabilnosti za spremljanje rasti kristalov. Velikost delcev lahko merimo mikroskopsko, z lasersko difrakcijo ali uporabo Coulter Counterja. Pomembno je, da zagotovimo deflokulirano suspenzijo, saj tako merimo vsak posamezen delec in ne flokula (1).

1.3 Ksantan

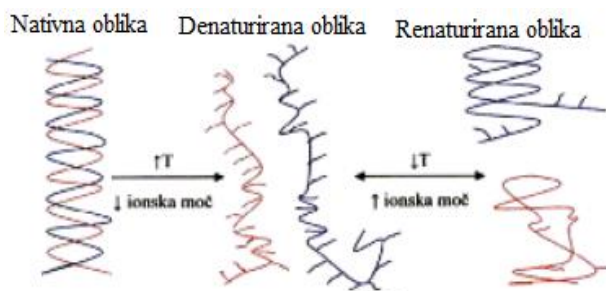


Slika 2: Primarna struktura ponavljajoče se enote ksantana (prirejeno po 4)

Gumi ksantana (Slika 2) je visokomolekularni polisaharidni gumi, pridobljen z aerobno fermentacijo ogljikovodikov iz rastlinske patogene bakterije *Xanthomonas campestris*, čemur sledi čiščenje s propan-2-olom, sušenje in mletje. Sestoji iz ponavljajoče se enote petih sladkornih ostankov – dveh glukoz, dveh manoz in ene glukuronske kisline, ki je lahko prisotna v obliki natrijeve, kalijeve ali kalcijeve soli. Poleg glukuronske kisline daje anionski značaj tudi na mestu 4 in/ali 6 s piruvično kislino substituirana končna manoz. Notranja manoz je navadno O-acetilirana (4, 5).

Polimerne verige lahko v vodnih raztopinah odvisno od pogojev v mikrookolju (temperatura, ionska moč, valenca nasprotnega iona, topilo, temperaturna zgodovina vzorca in pH) zavzamejo različne konformacije. Ksantan se nahaja v urejeni obliki (rigidna dvojna

vijačnica), ki ji pravimo tudi nativna, predpostavljajo pa, da naj bi obstajal tudi v obliki enojnih vijačnic (neurejena, denaturirana oblika), saj so z NMR spektroskopijo, mikrokalorimetrijo in cirkularnim dihroizmom s spreminjanjem mikrookolja dokazali delno ali popolno disociacijo dvojne vijačnice v enojni verigi (Slika 3). Z rentgensko difrakcijo so dokazali prehod iz fleksibilne (denaturirane) oblike v na novo urejene (renaturirane) polimerne verige. Na omenjeni prehod vplivajo koncentracija ksantana, temperatura in koncentracija ter sestava ionov mikrookolja (4, 6, 7).



Slika 3: Sekundarna struktura ksantana s prikazanim vplivom temperature in ionske moči na konformacijske spremembe (prirejeno po 4)

Ksantan se uporablja kot gelirno in suspendirajoče sredstvo, stabilizator, omogoča zadržano sproščanje, povečuje viskoznost itn. Pogosto ga najdemo v oralnih in parenteralnih farmacevtskih pripravkih ter tudi v kozmetični in prehrabni industriji. Uporablja se za pripravo matriks tablet z zadržanim sproščanjem, oftalmoloških tekočih pripravkov, kot matriks sistem za transdermalno aplikacijo, gelirno sredstvo za topikalno aplikacijo, povečuje lahko bioadhezijo v vaginalnih formulacijah, uporaben je kot pomožna snov pri sušenju z razprševanjem in liofilizaciji. Je netoksičen, kompatibilen z večino farmacevtskih surovin, njegove vodne raztopine so stabilne v širokem območju pH (pH 3–12), maksimalno stabilnost imajo v območju pH 4–10 in pri temperaturi 10–60 °C. Izkazuje enako gostoto, stabilnost in suspendirajoče lastnosti tekom dalj časa trajajočega shranjevanja pri povišani temperaturi in tudi pri spremenjeni relativni vlažnosti (4, 5).

1.4 Reologija

• Osnovni pojmi

Reologijo uvrščamo med interdisciplinarne vede in proučuje predvsem tokovno obnašanje in deformacijo materiala. V 17. stoletju so na osnovi teorije elastičnosti izpeljali Hookov zakon, po katerem je strižna napetost linearno sorazmerna strižni deformaciji, njun proporcionalni faktor pa je elastični strižni modul (G) (8). Reologija je zelo pomembna tudi v farmaciji, z njo

lahko razložimo notranjo strukturo farmacevtskih sistemov, izberemo primerne vhodne surovine, spremljamo vpliv temperature na snov, opazujemo fizikalno stabilnost vhodnih materialov in tudi končnih farmacevtskih oblik, pomaga pa tudi optimizirati in kontrolirati kakovost vhodnih surovin ter končnih izdelkov (9).

Osnovne reološke parametre lahko razložimo s preprostim modelom dveh vzporednih plošč. Plastni laminarni tok ustvarimo, če zgornjo ploščo premikamo z določeno silo F [N] in hitrostjo v [m/s], spodnja plošča pa medtem miruje. Dve sosednji tekočinski plasti se gibljeta z različnima hitrostma (razlika dv) in sta razmaknjeni za dx prečno na smer gibanja (9). Vzrok za spremenjeno obliko telesa je strižna sila, ki deluje v smeri ploskve. Pride do premika plasti, ki mu rečemo **strižna deformacija** (strig, γ) (enačba 1):

$$\gamma = \frac{dy}{dx} = \tan\theta \cong \theta \text{ (za majhne strižne deformacije), } y\text{-premik, } x\text{-debelina} \quad \text{Enačba 1}$$

O elastični deformaciji (razteg kemijskih vezi med atomi) govorimo, ko se po prekinutvi delovanja mehanske sile molekule (atomi) vrnejo na prvotno mesto. Polimerne molekule se lahko elastično raztezajo v širokem območju, trdne snovi pa zelo težko. Poznamo tudi plastično (trajno) deformacijo, ko se atomi med obremenitvijo preveč razmaknejo in zaradi prekinitve kemijske vezi ne pride do povrnitve. Na vrsto deformacije vplivajo zgradba sistema, trajanje in velikost deformacije.

Kvocient sile (F), ki deluje v smeri ploskve (strižna sila), in površine (S) imenujemo **strižna napetost** (τ) [$\text{Pa} = \text{N/m}^2$] (enačba 2).

$$\tau = F/S \quad \text{Enačba 2}$$

Mehanska napetost je pri elastičnem obnašanju linearno sorazmerna z deformacijo in **Hookov zakon** (enačba 3) predstavlja to premosorazmerje za trdne snovi.

$$\tau = \frac{F}{S} = G \times \theta = G \times \gamma \quad \text{Enačba 3}$$

Strižna napetost povzroči strižno deformacijo, ki jo podamo s kotom zasuka (θ). V Hookovem zakonu je G premosorazmernostni parameter, ki mu rečemo tudi strižni modul in predstavlja merilo odpornosti (rigidnosti telesa) proti spremembi oblike. Kot zasuka lahko pri majhnih strižnih deformacijah izrazimo s strižno deformacijo. O Hookovem zakonu lahko govorimo le v območju premosorazmernosti mehanske napetosti in deformacije, saj v primeru, da majhno povečanje zunanje sile povzroči veliko deformacijo (in ne napetosti), govorimo o plastični deformaciji.

Kvocient (enačba 4) med diferencialom hitrosti in razmikom med sosednjima tekočinskima plastema imenujemo **strižna hitrost** ($\dot{\gamma}$) [s^{-1}].

$$\dot{\gamma} = dv/dx \quad \text{Enačba 4}$$

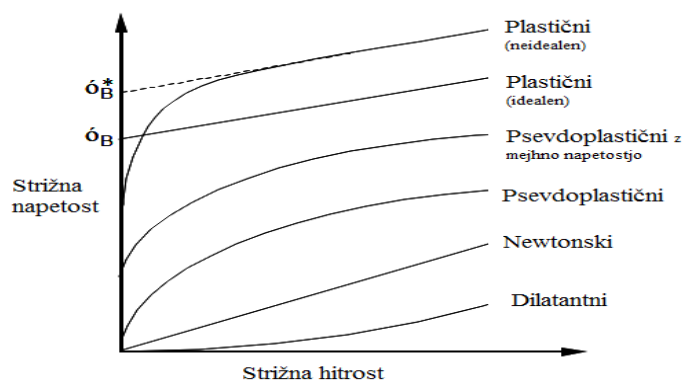
Pri poltrdnih in trdnih sistemih lahko strižno hitrost opišemo kot odvod deformacije po času (enačba 5).

$$\dot{\gamma} = d\gamma/dt \quad \text{Enačba 5}$$

Poznamo Newtonske (idealne) in Nenewtonovske (realne) sisteme. Pri prvih viskoznost (η) pri določeni temperaturi in tlaku ni odvisna od časa delovanja, smeri in jakosti striga. **Viskoznost** je po Newtonovem zakonu določena kot proporcionalnostni faktor med strižno napetostjo in strižno hitrostjo (odvod strižne deformacije po času) (enačba 6) (8).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \tau / \dot{\gamma} \quad [\text{Pa.s}] \quad \text{Enačba 6}$$

Kompleksnejši so Nenewtonovski sistemi (trdni, poltrdni sistemi, realne kapljevine), saj je njihova viskoznost odvisna od obremenitve (jakosti, smeri delovanja strižne sile, za nekatere tudi od časa delovanja le-te). Med časovno neodvisne sisteme uvrščamo psevdoplastične, dilatantne in plastične, med časovno odvisne pa tiksotropne, reopeksne in viskoelastične (8, 9). Sistemi so prikazani na Sliki 4, njihove lastnosti pa v Preglednici I.



Slika 4: Shematski prikaz odvisnosti strižne napetosti od strižne hitrosti za različne reološke sisteme (prirejeno po 10)

Preglednica I: Osnovne lastnosti reoloških sistemov (8, 9)

	Vrsta sistema	Lastnosti
Časovno neodvisni sistemi	psevdoplastični	Viskoznost s strižno obremenitvijo pada.
	dilatantni	Viskoznost z večanjem strižne obremenitve narašča.
	plastični	Potrebna mejna (plastična) napetost, da snov steče.
Časovno odvisni sistemi	tiksotropni	Viskoznost pri danih strižnih pogojih upada s časom delovanja striga.
	reopektični	Viskoznost s časom delovanja striga pri določenih strižnih pogojih narašča.
	viskoelastični	Ob konstantni strižni sili kažejo viskozno in elastično obnašanje hkrati.

• Viskoelastične lastnosti snovi

Tekoče in trdne snovi imajo dve osnovni lastnosti – elastičnost in viskoznost, ki sta posledici delovanja strižnih, nateznih ali tlačnih sil. Realne tekočine večinoma izkazujejo viskozne in elastične lastnosti odvisno od časa delovanja striga in strižnih pogojev. Del energije, ki vstopa v sistem, lahko shranijo, po odvzemu napetosti pa del deformacije povrnejo (viskoelastične tekočine). Za kateri postopek, merilno tehniko in tip reometra se bomo odločili pri merjenju mehanskih lastnosti, je največkrat odvisno od razpoložljive opreme ter namena samih rezultatov. Za enolično določitev viskoelastičnih lastnosti je pomembno, da meritve izvajamo pri pogojih majhnih strižnih deformacij, saj tako zagotovimo linearen odziv na strižno silo, reološke količine pa je dokaj enostavno izmeriti. Želimo določiti delež viskoznega in elastičnega doprinosa, meritve izvajamo pri nedestruktivnih strižnih pogojih (območje linearnega viskoelastičnega odziva). Mednje sodita dve merilni tehniki: dinamični (oscilatorni) in statični (lezenje in obnova) testi. Pri oscilatornih strižnih pogojih se strižna deformacija s časom spreminja sinusno z določeno frekvenco in amplitudo. Viskoelastične lastnosti so odvisne od časovnega poteka strižne deformacije v določenem frekvenčnem intervalu, zato lahko s spreminjanjem frekvence oscilacije enostavno spreminjamo časovni potek strižne deformacije. Viskozna tekočina se odzove zamaknjeno za 90° (izven faze) s sinusno spreminjajočo se strižno deformacijo, elastično trdno telo pa v fazi z njo. Doprinos posamezne komponente (elastične/viskozne) določimo, če poznamo fazni zamik med inducirano strižno deformacijo in nastalo strižno napetostjo. Kompleksen modul G^* določa odpor snovi na sinusno deformacijo (enačba 6) (8).

$$|G^*| = \tau_a / \gamma_a \quad \text{Enačba 6}$$

Kompleksni strižni modul lahko vektorsko (enačba 7) zapišemo z elastičnim in viskoznim modulom.

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{Enačba 7}$$

Modul akumulacije energije [Pa] (elastični modul) je v fazi z vsiljeno strižno deformacijo (enačba 8).

$$G' = (\tau_a / \gamma_a) \cdot \cos \delta \quad \text{Enačba 8}$$

Modul energetskih izgub [Pa] (viskozni modul) je izven faze z vsiljeno strižno deformacijo (enačba 9).

$$G'' = (\tau_a / \gamma_a) \cdot \sin \delta \quad \text{Enačba 9}$$

Fazni zamik je tangens razmerja viskoznega in elastičnega modula (enačba 10) in zavzema vrednosti med 0 in 90° .

$$\tan \delta = G'' / G' \quad \text{Enačba 10}$$

- **Reologija in suspenzije**

Idealna farmacevtska suspenzija bi imela visoko navidezno viskoznost pri nizkem strigu, zato bi se pri shranjevanju delci urejali zelo počasi ali bi ostali permanentno suspendirani, pri višji strižni sili (stresanju pripravka) pa bi navidezna viskoznost ustrezno padla in bi pripravek lahko enostavno odvzeli iz vsebnika. Reološke značilnosti suspenzij so odvisne od stopnje flokulacije. Razlog za to je, da je količina proste kontinuirane faze zmanjšana, ko se ujame v difuzne flokule. Posledično je navidezna viskoznost flokulirane suspenzije navadno višja kot deflokulirane. Ko je disperzni sistem močno flokuliran, se pojavi možnost interakcij med flokuli in rezultat je strukturiran sistem. Med flokuli delujejo sile, ki držijo flokule skupaj in če se te zoperstavljajo šibki obremenitvi, potem je potrebno preseči mejni tlak, saj se pod njim suspenzija obnaša kot trdna snov. Ko presežemo mejno obremenitev, je z naraščajočim tlakom večja tudi porušitev strukture. Flokulirane suspenzije izražajo plastično, še pogosteje pa psevdoplastično obnašanje. Če je prekinitev in reformacija vezi med flokuli časovno odvisna, potem je lahko prisotno tudi tiksotropno obnašanje. Deflokuliran sistem izkazuje Newtonovo obnašanje. Lahko uporabimo suspendirajoče sredstvo za povečanje navidezne viskoznosti. Primerne snovi so hidrofilni polimeri, ki učinkujejo tako, da ujamejo trdne dispergirane delce v svojo gelsko mrežo in tako preprečijo sedimentacijo. V nizkih koncentracijah so suspendirajoča sredstva uporabljena za kontrolirano flokulacijo, v višjih pa povečajo viskoznost in lahko spremenijo stopnjo flokulacije. Za modificiranje viskoznosti se navadno uporabljajo polisaharidi (akacijev gumi, tragakant, alginati, škrob, metilceluloza, hidroksietilceluloza, mikrokristalinična celuloza ...). Veliko farmacevtskih izdelkov, predvsem tistih za otroke, je v obliki suspenzije, zato so njihove reološke lastnosti še toliko bolj pomembne. Z njimi namreč lahko prilagodimo težavnost jemanja (jo poenostavimo), preprečimo sedimentacijo, jo zadržimo, poenostavimo redispergiranje in poskrbimo za ustrezen videz produkta (1, 2).

- **Reologija in ksantan**

Reološke lastnosti raztopine ksantana so posledica nekovalentnih medmolekulskih povezav. Najverjetneje so prisotne vodikove vezi, elektrostatske in hidrofobne interakcije. Nenavadne reološke značilnosti ksantanskih raztopin pri koncentracijah nad 1 % so posledica tvorbe tekočih kristaliničnih domen, ki se porušijo s strižnimi silami nad 0,1 1/s (6). Disperzije ksantana izkazujejo tudi pri nizki koncentraciji visoko viskoznost in psevdoplastično obnašanje, zaradi česar so tudi primerne kot suspendirajoče in stabilizirajoče sredstvo. Pri visoki ionski moči so disperzije ksantana bolj viskozne, saj imajo molekule v urejeni

konformaciji večjo hidrodinamsko velikost (7). Temperatura, koncentracija in ionska moč vplivajo predvsem na relaksacijski čas raztopine, vpliv na visokostrižnostne module pa je precej manjši (11).

Pri merjenju fizikalnih značilnosti raztopin ksantana pod majhnimi deformacijskimi pogoji (majhna amplitudna oscilacija) prevladujejo značilnosti trdnih snovi (G') nad lastnostmi tekočih (G''). Oba modula pa kažeta spremembe s frekvenco, kar je bolj značilno za gele kot za raztopine. Za močne gele velja, da je G' vedno višji od G'' in je relativno neodvisen od strižne frekvence v širokem območju. O močnih gelih govorimo, ko polimerne enote vežejo ireverzibilne kemijske vezi, ki se v primeru prekinitve (zaradi deformacije) ne morejo povrniti v prvotno stanje. Na drugi strani pa poznamo šibke gele (mednje sodi tudi ksantan – biopolimer), pri katerih lahko pride do prekinitve notranjih vezi in do povrnitve prvotne strukture po koncu deformacije.

Pri nižji temperaturi in višji koncentraciji se raztopine ksantana obnašajo kot geli, saj imajo G' višji kot G'' . Frekvenčna odvisnost strižnih modulov je univerzalna za vodne raztopine ksantana neodvisno od temperature (5–90 °C), koncentracije (3–20 g/L) in ionske moči (3–100 mM) (11).

1.5 Vpliv mehanske obremenitve na reologijo ksantana

O vplivu mehanske obremenitve na reologijo ksantana je bilo opravljenih precej raziskav. V eni izmed njih so vodno raztopino ksantana homogenizirali pod visokim tlakom (0–300 MPa, 5 zaporednih ciklov). V vodi suspendiran ksantan je pred homogenizacijo izkazoval psevdoplastično obnašanje zaradi svoje precej rigidne konformacije, po enem homogenizacijskem ciklu pri 40 MPa pa se je zmanjšala navidezna viskoznost in ksantan se je začel obnašati newtonsko. Veliko začetno zmanjšanje viskoznosti pri relativno nizkih tlakih kaže, da je homogenizacija pod velikimi tlaki učinkovita za depolimerizacijo visoko razvejanih polisaharidov (13).

Strukturna mreža ksantanske raztopine je lahko postopoma porušena, odvisno od intenzivnosti homogenizacije pod visokim pritiskom. Zmanjšanje v molekulski masi in povečanje polidisperznosti polimera sta pričakovan povod reoloških sprememb. Reološke in strukturne karakteristike biopolimera so ireverzibilne, saj signifikantna povrnitev ni opažena v daljšem časovnem obdobju (11 tednov) (14).

Z mikrofluidizacijo (npr. z 1, 4 ali 12 cikli pri 75 MPa) zmanjšamo zgoščevalne in stabilizirajoče lastnosti, saj pride do zmanjšanja intrinzične viskoznosti, psevdoplastičnih lastnosti, stopnje hidratacije in privzema vode. Agregacija ksantana se zmanjša že po prvem

ciklu, molekulska integriteta pa ostane nespremenjena. Visok strig, turbulentna in kavitacija v mikrofluidizaciji povzročijo prehod konformacije med urejeno in neurejeno obliko (dvojna vijačnica preide v enojni verigi) ter razgradnjo polimera, ki ni popolnoma reverzibilna. Najprej pride do odprtja molekule, čemur sledi razgradnja polimera kot posledica mehanskega stresa. Z naraščanjem moči obremenitve pride do relativno majhne razgradnje glavne verige, stranske verige pa ostanejo nespremenjene. Vzorci z visoko ionsko močjo so bolj občutljivi na mehansko razgradnjo, najverjetneje zato, ker imajo toge molekule v urejeni konformaciji večjo izpostavljeno površino in tako nanje deluje večji stres. Mehanski stres razbije agregate in če je presežen mejni strig, specifičen za vsak polimer, se prekinejo kovalentne vezi velikih molekul. Dvojno vijačna struktura ksantana se čez čas po prekinitvi obremenitve v določeni meri povrne (6, 7).

Proučevali so tudi kombiniran efekt koncentracije in mehanske obremenitve (visokega tlaka) na reološke lastnosti ksantana in ugotovili, da ima različna koncentracija ksantana večji vpliv kot mehanska obremenitev (15).

1.6 Vpliv ionov na reologijo ksantana

V vodi so stranske verige ksantana ionizirane. Med njimi prihaja do odboja, večje hidratacije in obsežnega nabrekanja. Ob dodatku kalcijevih ionov ksantanu ne pride do pričakovanega ionskega premreženja ksantana, ampak do senčenja negativnih nabojev na stranskih polimernih verigah, zato te niso tako hidratirane, privlak med ksantanskimi verigami pa je večji (4).

Gel ksantana je zaradi anionskega značaja inkompatibilen s kationskimi površinsko aktivnimi snovmi, polimeri in konzervansi, saj pride do precipitacije. Anionske in amfoterne površinsko aktivne snovi povzročijo pri koncentraciji nad 15 % (masno/volumsko) precipitacijo gumija ksantana iz raztopine. Pod visoko alkalnimi pogoji večvalentni kovinski ioni (npr. kalcijevi) povzročijo geliranje ali precipitacijo, ki ju lahko inhibiramo z dodatkom glukohaptata. Tudi prisotnost boratov (<300 ppm) lahko povzroči tvorbo gela (5).

Amplitudni profil je pokazal, da ima gel ksantana z dodanimi železovimi ioni magnitudo G' približno tri rede višjo kot gel brez dodanih ionov in 2,5-krat višjo kot gel v prisotnosti kalcija ali natrija, saj železovi ioni povzročijo tvorbo zelo čvrstega gela. Natrijevi in kalcijevi ioni povzročijo povišanje G' za približno pol magnitudo, med njima pa ni bilo razlike. Dodatek kalcija, natrija in železa poveča moč gela in njegovo rigidnost. Dodani ioni morda zmanjšajo intermolekularni odboj in povzročijo tvorbo mreže. Frekvenčni profil obnašanja gela ksantana

v prisotnosti dodanega Na^+ in Ca^{2+} je pokazal, da je magnituda G' do približno 10-krat višja kot brez dodane soli, ob dodatku železa pa se magnituda poviša za faktor 1000. Vzrok za povišanje G' ob dodatku Na^+ in Ca^{2+} je lahko nekovalentno prečno premreženje z različnimi vezmi (Coulombove, dipol-dipol, van der Waalsove, prenos naboja, hidrofobne in vodikove). Prisotnost železovih ionov pa najverjetneje povzroči trajne kemijske kovalentne interakcije, saj tak gel gelira zelo hitro, termoreverzibilno in močno. Dodatek Na^+ in Ca^{2+} poveča elastično relaksacijo, elastično komponento viskoelastičnosti gela in rigidnost gela. Gel ksantana z železovimi ioni ima magnitudo G' približno tri do štiri rede višjo kot gel z dodanimi kalcijevimi in natrijevimi ioni (12).

Pri koncentraciji NaCl 10 mM se vrednosti modulov niso razlikovale od raztopine brez dodane soli. Z naraščajočo ionsko močjo se točka križanja obeh modulov pojavi pri nižji frekvenci in malo nižji vrednosti modulov. Ugotovili so, da je efekt dodatka soli pri določeni koncentraciji ksantana pomemben, vendar precej manjši od efekta variacije koncentracije ksantana. Dodatek soli ima večji efekt pri višji temperaturi, pri kateri pride do spremembe konformacije. Ionska moč ni imela vpliva na amplitudo strižnih modulov. Strižni moduli naraščajo z naraščajočo temperaturo, naraščajoča koncentracija dodane soli in koncentracija ksantana pa imata skoraj zanemarljiv vpliv. Moč gela ksantana je le šibko odvisna od ionske moči, življenjska doba vezi pa je od nje močno odvisna (11).

Gel ksantana je dosegel maksimalne (G' najvišji, gelske lastnosti) oz. minimalne (G' najnižji, lastnosti polisaharidne raztopine) lastnosti gela pri 100 % oz. 200 % stehiometričnem razmerju Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}:\text{COO}^- = 1 : 2$ oz. $1 : 1$). Povišanje gelskih lastnosti do stehiometrične koncentracije lahko pripišemo vezavi kalcijevih ionov med pare karboksilnih skupin dveh individualnih verig, s tem se povečajo intermolekularne povezave. V vmesnem območju se gelske lastnosti zmanjšajo zaradi dveh možnih razlag. Zmanjšanje negativnega naboja polimerne verige lahko povzroči precipitacijo polimera, ko kalcij doseže stehiometrično razmerje. Drugi možen vzrok pa je, da se intermolekularne povezave s kalcijevimi ioni zamenjajo z vezavo kalcija na posamezne karboksilne skupine, kar povzroči maksimalno kompleksacijo. To bi pomenilo, da je neto naboj ksantanske verige v stehiometričnem razmerju približno 0 in nato postane pozitiven pri višji koncentraciji, ko se kalcij veže na posamezne karboksilne skupine. Pri višjih koncentracijah je nato vrednost elastičnega modula postopno zopet naraščala. Tudi G'' se obnaša tako kot G' z naraščajočo koncentracijo, vendar so spremembe manjše. Šibke gelske lastnosti vključujejo supramolekularne asociacije, ki so inhibirane s sečnino in promovirane s solmi. Asociacijo promovirajo ioni v vrstnem redu $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Ca}^{2+}$. Kalcij se veže specifično na karboksilne skupine polimera. Pri koncentraciji

CaCl₂ 100 mM so bile gelske lastnosti bolj izražene in vrednost obeh modulov je bila višja kot brez dodanih soli (16).

V prisotnosti visoke koncentracije monovalentnih soli naj bi le redko prišlo do geliranja, večina dvovalentnih ionov zanj potrebuje alkalno okolje, trivalentni ioni pa povzročijo tvorbo gela že pod nevtralnimi ali celo kislimi pogoji, odvisno od reaktivnosti kovinskega iona. Na reaktivnost vplivata predvsem kovinski ion in izbrani gumi ksantana, vrsta aniona v soli ima zelo majhen ali pa sploh nima vpliva. Sekvestranti (npr. borati) imajo običajno višjo afiniteto do dvovalentnih ter trivalentnih kationov kot gumi ksantana in zato lahko kontrolirajo ali preprečijo geliranje z ioni (17).

1.7 Načrtovanje eksperimentov

Eksperimentalni načrt (DoE – Design of Experiments) pomeni načrtovati in voditi poskuse z namenom pridobiti maksimalno količino informacij iz zbranih podatkov. Osnovna ideja je sočasno spreminjati vse relevantne faktorje tekom načrtovanih poskusov in nato povezati rezultate v matematični model, ki je uporabljen za interpretacijo, napovedovanje in optimizacijo.

DoE se uporablja pri razvoju novih produktov in procesov, optimizaciji kakovosti produkta in obstoječega postopka proizvodnje, reševanju pomembnih faktorjev, minimizaciji stroškov proizvodnje, testiranju robustnosti produktov in procesov ... Prisoten je v različnih panogah, npr. v kemični, polimerni, avtomobilski, farmacevtski, prehrabni, telekomunikacijski industriji ... Namen DoE je reševanje posameznih faktorjev (kateri faktorji so pomembni in njihov razpon), optimizacija (kakšne so optimalne vrednosti faktorjev) in testiranje robustnosti (kako je odziv občutljiv na majhne spremembe faktorjev). Izbrati moramo eksperimentalni načrt glede na cilj, ki ga želimo doseči. Izbiramo lahko med familiarizacijo, reševanjem, iskanjem optimalne regije, optimizacijo, testiranjem robustnosti in mehanističnim modeliranjem. Najpogosteje uporabljeni so reševanje, optimizacija in testiranje robustnosti. Familiarizacijo izberemo, ko se ukvarjamo s popolnoma novo aplikacijo ali opremo, uporabimo omejen del dosegljivih sredstev, načrt je enostaven, naš cilj pa je preveriti, če so za ponovljene eksperimente rezultati enaki in za različne eksperimente različni. Reševanje je uporabno, ko želimo izvedeti malo več o faktorjih, saj z njim razkrijemo pomembne faktorje in njihova območja, linearnost ali nelinearnost. Iskanje optimalne regije je uporabno, ko želimo eksperimentalno območje predstaviti tako, da vključuje maksimum. Optimizacijo izberemo, ko potrebujemo podrobno znanje o faktorjih, saj se ne vprašamo, ali je posamezen faktor relevanten (reševanje), ampak, kako relevanten je. Cilj optimizacije je najti kombinacijo

faktorjev, pri kateri dosežemo želeni odgovor. Testiranje robustnosti nam pomaga razumeti, kako urediti faktorje, da so spremembe v odgovorih minimalne, mehanistično modeliranje pa skuša dokazati nov model ali ovreči konkurenčne modele. S pomočjo DoE izdelamo set reprezentativnih eksperimentov, v katerih so vsi relevantni faktorji variirani simultano. Najprej definiramo faktorje in odzive, nato naredimo eksperimentalni načrt in izvedemo eksperimente. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko postavimo model, ga interpretiramo in nadaljnje tudi uporabimo za napovedovanje odzivov. V primeru, da pri načrtovanju eksperimentov spreminjamo le en faktor, ne dobimo pravega optimuma, izvesti moramo veliko eksperimentov, dobimo malo informacij, ni možno kvantificirati interakcij, vsaka meritev in eksperiment vsebujeta šum ... Z DoE dobimo več uporabnih informacij kljub manjšemu številu izvedenih eksperimentov, vidimo lahko vpliv vseh faktorjev skupaj, saj jih sočasno variiramo. Faktorje lahko delimo na kontrolirane oz. nekontrolirane, procesne ali mešane ter kvantitativne oz. kvalitativne. Glede na število faktorjev, ki jih preučujemo, se lahko odločimo za popoln, delni ali sestavljeni faktorski načrt. Popoln faktorski načrt predstavlja osnovo v klasičnem eksperimentalnem načrtu in je ustrezna izbira, kadar imamo 2–4 faktorje, kadar želimo oceniti glavni učinek faktorja in interakcije dveh faktorjev. Za delni faktorski načrt se odločimo pri testiranju robustnosti in reševanju faktorjev, za sestavljeni faktorski načrt pa, ko imamo opravka z optimizacijo. Računalniški program MODDE (MODeling and DEsign) upošteva število faktorjev, njihove stopnje in naravo (kvantitativen, kvalitativen ...) ter predlaga načrt, ustrezen za reševanje dotičnega problema (18).

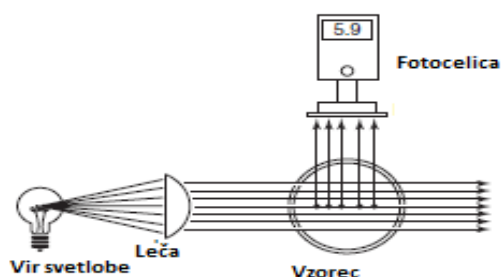
1.8 Nefelometrija

Motnost je optična lastnost medija, ki povzroči, da se svetloba razprši in absorbira, namesto da bi prešla naravnost skozi vzorec in je torej nasprotje čistosti. Medij je navadno tekočina (lahko tudi trdna snov), v kateri je svetloba razpršena zaradi majhnih netopnih delcev, ki so suspendirani na poti svetlobnega žarka. Merjenje motnosti je lahko uporabno za določanje masne koncentracije suspendiranih delcev v vzorcu ali pa za porazdelitev velikosti delcev in jo lahko merimo s pomočjo turbidimetrije ali nefelometrije. Pri turbidimetriji merimo nerazpršeno svetlobo pod kotom 180° , pri nefelometriji pa direktno ovrednotimo stopnje razpršenosti svetlobe v mediju (običajno pod pravim kotom glede na svetlobni vir). Nefelometrija je v primerjavi s turbidimetrijo bolj točna in občutljiva ter veliko bolj primerna za medij z manjšo motnostjo (koncentracijo). Obe metodi sta v primerjavi z gravimetrijo

veliko hitrejši in nedestruktivni za določanje koncentracije. Široko sta uporabljeni v farmacevtski, kemijski in živilski industriji (19).

Svetloba se pri prehodu skozi tekoči medij lahko razprši ali absorbira zaradi nehomogenosti na poti svetlobnega žarka. Svetloba se razprši, ko delec z njo interagira tako, da absorbira energijo svetlobe in jo nato razprši v vse smeri. Povezava med motnostjo in koncentracijo suspendiranih delcev je oslABLJENA s kompleksno interakcijo energije svetlobe s suspendiranimi delci, ki je močno odvisna od mnogih faktorjev: koncentracije suspendiranih delcev v mediju, porazdelitve velikosti delcev, oblike, orientacije in površine delcev, refrakcijskega indeksa medija ter valovne dolžine svetlobnega vira (19).

Sodobne merilne naprave uporabljajo fotosenzitivne celice, ki kvantificirajo razpršeno in transmitirano svetlobo. Večina instrumentov (Slika 5) ima običajno pet osnovnih komponent: vir svetlobe z znano, konstantno intenziteto in določeno valovno dolžino, lečo, celico z vzorcem, fotosenzorje ter prikazovalnik signalov iz fotosenzorja (19).



Slika 5: Nefelometer z označenimi sestavnimi deli (prirejeno po 18)

Nefelometer direktno meri intenziteto razpršene svetlobe po prehodu skozi vzorec, ki je premo sorazmerna koncentraciji suspendiranih delcev, čeprav je pomemben tudi vpliv velikosti, oblike in refrakcijskega indeksa medija. Senzor je običajno postavljen pod kotom 90° glede na svetlobni vir, pri nekaterih sodobnejših izvedbah nefelometra pa je ta kot lahko različen (19).

2 NAČRT ZA DELO

V magistrski nalogi bomo proučili vpliv sestave (količina sladkorja, ionov) ter procesnih parametrov (homogeniziranje) na fizikalne lastnosti gela ksantana (s poudarkom na reoloških lastnostih). Najprej bomo izdelali preliminarne vzorce gela za določitev vpliva ionov (dodatki Ca^{2+} in Na^+ ionov ter sladkorja v različnih koncentracijah) in procesnih parametrov (izbira čaše in mešala, hitrost obratov, časa homogenizacije). Izdelane vzorce bomo vrednotili z reološkimi metodami, določili stabilnost izdelanih vzorcev pri centrifugiranju, centrifugirane vzorce pregledali z nefelometrom in jih optično vrednotili. Nekatere vzorce bomo pogledali tudi pod SEM mikroskopom. Za načrtovanje eksperimentov bomo uporabili DoE in po njegovem načrtu izdelali vzorce, ki jih bomo vrednotili na enak način kot preliminarne vzorce. Spremljali bomo tudi stabilnost vzorcev gela v različnih časovnih točkah (1, 3 in 6 mesecev) pri pogojih 40 °C in 75 % RH ter pomerili njihove reološke parametre in supernatant pred in po centrifugiranju ovrednotili z nefelometrom. Nato bomo izdelali DoE model in vrednotili vpliv procesnih parametrov na fizikalne lastnosti gela ksantana.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

- **Ksantan**

Gumi ksantana je droben rumenkasto bel ali bel prah brez vonja in ima dobre pretočne lastnosti. V vodi daje zelo viskozno raztopino. Uporablja se kot zgoščevalo, stabilizator za pripravo emulzij in suspenzij, pomožna snov za pripravo ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem, za dermalno in peroralno aplikacijo ter v kozmetičnih izdelkih. Gre za zmes polisaharidov, pridobljenih iz *Xanthomonas campestris*. Sestavljen je iz D-glukoze, D-glukuronske kisline in D-manoze v razmerju 2 : 1 : 2 ter različnega števila piruvatnih in O-acetilnih skupin, glukoza in anhidroglukoza, povezani z 1,4- β -glikozidno vezjo, pa se izmenjujeta v osnovni verigi (5, 21).

- **Polisorbat 80**

Polisorbat 80 je oljna tekočina rumene barve z maščobnim vonjem, kemijsko je zmes delnih estrov oleinske kisline s približno dvajsetimi oksietilenskimi skupinami substituiranega sorbitola. Pogosto se uporablja v farmacevtskih oblikah in kozmetičnih izdelkih kot emulgator ali solubilizator (5, 20, 21).

- **Simetikon emulzija**

Glavna uporaba simetikona je kot protipenilo v koncentracijah 1–50 ppm, terapevtsko se uporablja kot antiflatulent v številnih peroralnih farmacevtskih oblikah kljub njegovi vprašljivi učinkovitosti. V vodnih formulacijah mora biti emulgiran, da se zagotovi kompatibilnost z vodnim sistemom, saj je zelo slabo topen v polarnih topilih. Gre za prosojno, inertno, sivkasto belo, opalescentno viskozno tekočino ali poltrdno snov, ki je pravzaprav zmes silikagela in linearnega polidimetilsiloksana (5, 20).

- **Citronska kislina monohidrat**

Citronska kislina monohidrat z molekulsko maso 210,14 g/mol ima empirično formulo $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$. Široko je uporabljena v farmacevtskih oblikah in tudi v prehrabni industriji kot sredstvo za uravnavanje pH, korigens okusa, kelator in antioksidant. Po videzu gre za brezbarvne ortorombske kristale, zrnca ali bel kristaliničen prah brez vonja, je pa močno kislega okusa (5, 20).

- **Natrijev citrat dihidrat**

Molekulska masa znaša 294,10 g/mol, empirična formula natrijevega citrata dihidrata pa je $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$. Uporablja se kot sredstvo za uravnavanje kislosti, korigens okusa in kelator. Gre za bele kristale, zrnca ali prah brez vonja ali bel kristaliničen prah s slanim, hladnim okusom (5, 20).

- **Natrijev benzoat**

Natrijev benzoat z molekulsko maso 144,1 g/mol in empirično formulo C_7H_6NaO se uporablja kot konzervans za parenteralne in peroralne farmacevtske oblike in kozmetične izdelke, v kapsulah in tabletah pa ga lahko najdemo kot drsilo. Je rahlo higroskopen, bel, zrnat ali kristaliničen prah ali kosmiči z rahlim vonjem po benzoinu in neprijetnim, adstringentnim okusom (5, 20).

- **Titanov dioksid**

Titanov dioksid (TiO_2) z molekulsko maso 79,87 g/mol je pigment, ki se ga dodaja v tabletah s sladkorno oblogo, v disperzije za filmsko oblaganje in v želatinske kapsule. Uporablja se tudi kot UV-filter v pripravkih za zaščito pred sončenjem in drugih kozmetičnih izdelkih. Gre za bel, amorfen, nehigroskopen prah brez vonja in okusa (5, 20). V našem primeru je uporabljen kot barvilo in hkrati kot modelna netopna snov, ki jo uporabimo za simulacijo netopne zdravilne učinkovine.

- **Glicerol**

Glicerol ali propan-1,2,3-triol ($C_3H_8O_3$) je vlažilo in emolient v dermalnih izdelkih v farmaciji in kozmetologiji, uporablja se tudi v parenteralnih farmacevtskih oblikah, kot sladilo, zgoščevalo in topilo v raztopinah, mehčalo v filmskih oblogah, pri pripravi mehkih želatinskih kapsul in globul, v vodnih in brezvodnih gelih ter kot dodatek v obližih. Je brezbarven, bister, higroskopen, sladkega okusa (60 % sladkosti saharoze) in zelo viskozen (5, 20).

- **Maltodekstrin**

Maltodekstrin z empirično formulo $(C_6H_{10}O_5)_n$ je zmes oligosaharidov, glukoze in polisaharidov iz D-glukoznih enot, povezanih z 1,4- α in 1,6- α glikozidnimi vezmi, ki ga pridobijo s hidrolizo škroba. Uporablja se kot korigens okusa, polnilo v kapsulah in tabletah, zgoščevalo v raztopinah, vezivo v tabletah in za preprečevanje kristalizacije v sirupih. Je brez vonja, topen v vodi, bel ali kremno bel higroskopen prah ali zrnca sladkega okusa (5, 20).

3.2 Aparature

- 250 mL, 600 mL in 1000 mL čaše
- 100 mL steklen merilni valj
- tehtalni čolnički
- kovinske žličke
- tehtnica VIBRA AJP, Shinko Denshi, Japonska
- analitska tehtnica METTLER TOLEDO AX205 DR, Mettler Toledo, Švica
- propellersko mešalo EUROSTAT power-b, IKA-WERKE, Nemčija
- homogenizator ULTRA-TURRAX T25, Ika, Nemčija
- rotacijski reometer Haake Rheostress RS75, Thermo Scientific, ZDA
- 1,5 mL epice Eppendorf, Nemčija
- centrifugirke 15 mL Sarstedt, Nemčija
- magnetno mešalo YELLOW LINE MST, IKA, Nemčija
- centrifuga SIGMA 3-30 K, Sigma, Nemčija
- vrstični elektronski mikroskop (SEM) JOEL JSM-7001F, Joel, Japonska
- nefelometer NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Nemčija

3.3 Metode

3.3.1 Izdelava preliminarних vzorcev pred načrtovanjem eksperimentov

Gel ksantana smo pripravili po vnaprej predpisanem postopku tako, da smo natehtali ustrezne količine surovin in jih postopoma dodajali v 600 mL čašo po vrstnem redu, navedenem v Preglednici II. Medtem smo suspenzijo mešali s propelerskim mešalom predviden čas in pri ustreznih obratih. Zelo pomembno je, da ksantan dobro dispergiramo v mediju, saj tako dobimo viskozno disperzijo. Titanov dioksid predstavlja v formulaciji netopne delce (suspenzija), ksantan pa tvori gelsko strukturo.

Preglednica II: Prikaz priprave osnovnega vzorca gela ksantana (300 mL)

	Priprava vzorcev v 600 mL čaši				
Surovina	Funkcija	Količina [g]	Tip mešanja	Čas [min]	Hitrost mešanja [o/min]
Demi voda	topilo	192,221	/	/	/
Polisorbat 80	močilo	2,691	propelerski	3	300
Simetikon emulzija	protipenilo	0,807	propelerski	5	300
Gumi ksantan	zgoščevalo, stabilizator	0,807	propelerski	5	300
Nabrekanje	/	/	/	30	/
Na benzoat	konzervans	0,538	propelerski	1	300
Na citrat	uravnavanje pH,	0,161	propelerski	1	300
Citronska kislina	korigens okusa	0,404	propelerski	5	300
Glicerol	del vehikla, zgoščevalo	26,906	propelerski	5	300
Maltodekstrin	korigens okusa, zgoščevalo	74,395	propelerski	5	300
Titanov dioksid	barvilo, simulacija netopne učinkovine	1,076	propelerski	5	300

- **Vpliv mehanske obremenitve**

Najprej smo preverili vpliv mehanske obremenitve na gel ksantana s homogenizacijo vzorcev s homogenizatorjem. V 250 mL (oz. 600 mL) čašo z zunanjim premerom 6 cm smo nalili 100 mL vzorca, ULTRA-TURRAX nastavek namestili približno 1,5 cm od dna posode in

homogenizirali, pri čemer smo variirali različne parametre (izbira čaše, nastavek homogenizatorja, hitrost obratov, čas homogenizacije).

Vzorci smo homogenizirali od 15 min do dve uri, kot srednjo vrednost, pri kateri je razlika med moduloma (reološko vrednotenje) dovolj velika, smo vzeli 1 uro. Uporabili smo tri različne širine čaše z zunanjimi premeri 6 cm (250 mL), 8 cm (600 mL) in 10 cm (600 mL). Menjavali smo tudi ULTRA-TURRAX nastavke, katerih lastnosti so navedene v Preglednici III. Nastavki se razlikujejo predvsem v premeru statorja, rotorja, v periferni hitrosti pri določenem številu obratov in v delovnem območju.

Preglednica III: Lastnosti uporabljenih ULTRA-TURRAX nastavkov

Nastavek	Stator [mm]	Rotor [mm]	Periferna hitrost pri 24000 o/min [m/s]	Delovno območje [mL]
S 25 N-10 G	10	7,5	9,8	1 – 100 mL
S 25 N-18 G	18	12,7	16,6	10 – 1500 mL
S 25 N-25 G	25	17	22,2	50 – 2000 mL

Najprej smo reološko preverili spremembo strukture ksantana po obremenitvah pri nižjih hitrostih in jo višali do 24000 o/min. Povečali smo tudi količino vzorca s 100 mL na 200 oz. 400 mL. Med homogeniziranjem smo na 15 minut merili temperaturo vzorca ter čašo z vzorcem ves čas hladili z ledom v vpeti večji čaši tako, da je temperatura variirala za največ 10 °C med približno 20 °C in 30 °C. Glede na literaturne podatke smo predvidevali, da ima tako nihanje temperature na vrednosti reoloških parametrov precej manjši vpliv kot intenzivna mehanska homogenizacija. V Preglednici IV so navedeni pripravljene vzorci in kako smo spreminjali parametre. Vsi vzorci so izdelani po enakem postopku, navedenem v Preglednici II, nato smo spreminjali le procesne parametre.

Preglednica IV: Izvedeni poizkusi pri preučevanju vpliva homogenizacije na strukturo ksantana (hitrost homogenizacije je bila pri vseh poskusih 24000 o/min)

Vzorec	Čas [min]	Količina vzorca [mL]	Nastavek	Premer čaše [cm]
Xan_S1_3A (1meritev)	60	100	S25N-10G	6
Xan_S1_1A, Xan_S2_3A (2 meritvi)	60	100	S25N-18G	6
Xan_S1_4A (1meritev)	15	100	S25N-25G	6
Xan_S2_1 (1meritev)	60	200	S25N-25G	10
Xan_S1_2A (1meritev)	30	100	S25N-25G	6
Xan_S2_3B, Xan_S1_1B (2 meritvi)	120	100	S25N-18G	6
Xan_S2_2 (1meritev)	60	400	S25N-25G	10
Xan_S1_2B (1meritev)	60	100	S25N-25G	6
Xan_S1_5A (1meritev)	60	100	S25N-25G	8
Xan_S1_2C (1meritev)	120	100	S25N-25G	6
Xan_S1_6A (1meritev)	60	100	S25N-25G	10
Xan_S2_3C (1meritev)	180	100	S25N-18G	6
Xan_S2_3D (1meritev)	240	100	S25N-18G	6

• Določanje vpliva ionov (Na^+ in Ca^{2+})

Pri določanju vpliva ionov na gelsko strukturo gela ksantana smo v 250 mL čašo nalili 100 mL suspenzije, dodali natehtano količino posamezne soli (NaCl oz. CaCl_2) in nato homogenizirali 30 min pri 5000 o/min. Iz proučevanja vpliva homogenizacije na strukturo ksantana vemo, da je ta hitrost dovolj nizka, da še nima vpliva na strukturo in zato lahko morebitna odstopanja opazovanih parametrov (G' in G'') v primerjavi s slepim vzorcem pripišemo vplivu kationov. Približno potrebno količino dodane soli smo poiskali v literaturi, kjer so proučevali vpliv dodatka ionov na strukturo gela ksantana (npr. 0–100 mM NaCl).

• Sedimentacija

Preliminarne vzorce smo optično vrednotili (spremljali pojav morebitnih posebnosti in razlik med njimi).

Želeli smo ugotoviti stabilnost vzorcev (oz. kakšna je gelska struktura) pri centrifugiranju, ko se pod vplivom centrifugalne sile prosti delci titanovega dioksida posedajo na dno. Predvidevali smo, da homogenizirani vzorci v primerjavi z nehomogeniziranimi bolj sedimentirajo. Pod vplivom centrifugalne sile sedimentirajo tisti delci, ki niso ujeti v gelsko strukturo. Med njimi so lahko tudi delci aktivne substance, kar pomeni nezmožnost odvzema enakomernega odmerka.

- **Različni gumiji ksantana**

Med pripravo farmacevtskih izdelkov pogosto posegamo po različnih serijah ekscipientov, vendar pa ni vedno vseeno, za katerega se odločimo. Zanimalo nas je, kakšen vpliv na reologijo ima izbira drugega gumija ksantana, zato smo izbrali takega s precej višjo viskoznostjo.

- **Različna količina dodanega sladkorja**

V sestavi suspenzije je velika količina dodanega sladkorja in zato smo v preliminarnih testih preverili tudi to.

- **Vrednotenje vzorcev s SEM mikroskopom**

Razlike med slepimi in homogeniziranimi vzorci smo želeli tudi optično preveriti, zato smo posušen in zdrobljen sediment nekaj vzorcev po centrifugiranju pogledali pod SEM mikroskopom.

- **Testiranje stabilnosti**

Poleg tega smo vzorce Xan_S4 (slepi vzorec), Xan_S1_4A, Xan_S1_2C in Xan_S1_6A dali za en mesec testirati na stabilnost pri pogojih 40 °C ter 75 % RH.

3.3.2 Izdelava vzorcev z načrtovanjem eksperimentov

Pri pripravi vzorcev smo si pomagali z DoE, natančneje z računalniškim programom MODDE 10.1. Procesni faktorji niso del mešanice ali formulacije, izraženi so kot količina ali nivoji, lahko jih spreminjamo neodvisno drug od drugega. Na podlagi rezultatov iz testiranja preliminarnih vzorcev smo se odločili, katere faktorje bomo spremljali z metodo rešetanja, definirali odzive in v program vnesli tudi minimalne ter maksimalne vrednosti faktorjev (Preglednica V). Želeli smo določiti dejavnike z največjim vplivom in njihovo območje. Odločili smo se za delni faktorski načrt in linearni model z resolucijo V, pri čemer dvofaktorske interakcije niso združene niti z glavnim učinkom niti med seboj, ampak je načrt

skoraj tako dober kot popolni faktorski. Pri dvonivojskem popolnem faktorskem načrtu bi morali s 5 različnimi faktorji izvesti 32 (2^5) poskusov, z delnim faktorskim načrtom pa lahko zmanjšamo število opravljenih poskusov, saj namesto določenih interakcij iz popolnega načrta uvedemo nove dejavnike. Resolucija V omogoča 16 (2^{5-1}) poskusov, številka ena v eksponentu pomeni, koliko interakcij lahko nadomestimo z novimi dejavniki. Eksperimentalni načrt si lahko predstavljamo kot (hiper)kocko, pri čemer je prvih 16 poskusov robnih, zadnji trije pa predstavljajo centralno točko in so enaki, z njimi pa ugotovimo variabilnost meritev ter ponovljivost poskusa.

Preglednica V: Faktorji za DoE in njihova območja

Faktor	Območje merjenja
Dodatek CaCl_2	DA; NE
Dodatek NaCl	DA; NE
Čas homogenizacije	10 min; 60 min
Hitrost homogenizacije	3400 o/min; 24000 o/min
ULTRA-TURRAX nastavek	S 25N-10G; S 25N-25G

Program nam je izdelal eksperimentalni načrt in predlagal naključni vrstni red priprave vzorcev, saj se z randomizacijo izognemo vplivu napak in zunanjih dejavnikov, ki se lahko med izvajanjem eksperimentov razlikujejo (Preglednica VI).

Preglednica VI: Načrt izvedbe eksperimentov

VZOREC	Vrstni red	Ca ²⁺ [M]	Na ⁺ [M]	ČAS [min]	HITROST [o/min]	NASTAVEK
Xan_S_N1	19	0	0	10	3400	S25N-25G
Xan_S_N2	2	0,01	0	10	3400	S25N-10G
Xan_S_N3	3	0	0,05	10	3400	S25N-10G
Xan_S_N4	4	0,01	0,05	10	3400	S25N-25G
Xan_S_N5	6	0	0	60	3400	S25N-10G
Xan_S_N6	9	0,01	0	60	3400	S25N-25G
Xan_S_N7	14	0	0,05	60	3400	S25N-25G
Xan_S_N8	1	0,01	0,05	60	3400	S25N-10G
Xan_S_N9	12	0	0	10	24000	S25N-10G
Xan_S_N10	5	0,01	0	10	24000	S25N-25G
Xan_S_N11	18	0	0,05	10	24000	S25N-25G
Xan_S_N12	7	0,01	0,05	10	24000	S25N-10G
Xan_S_N13	13	0	0	60	24000	S25N-25G
Xan_S_N14	10	0,01	0	60	24000	S25N-10G
Xan_S_N15	8	0	0,05	60	24000	S25N-10G
Xan_S_N16	16	0,01	0,05	60	24000	S25N-25G
Xan_S_N17	11	0,005	0,025	35	12050	S25N-25G
Xan_S_N18	15	0,005	0,025	35	12050	S25N-25G
Xan_S_N19	17	0,005	0,025	35	12050	S25N-25G

S programom MOODE dobimo za vsak preiskovan parameter štiri grafe, ki nam pomagajo ugotoviti relevantnost posameznega parametra.

Prvi graf je Replicate plot, ki nam pokaže, kakšna je variacija med ponovljenimi eksperimenti (poskusi 17, 18, 19) v povezavi z variacijo vseh eksperimentov (reproducibilnost). V primeru, da je variacija znotraj enega eksperimenta veliko manjša od variacije vseh, je model dober in ta napaka ne bo imela velikega vpliva nanj. S tem grafom lahko najdemo tudi izstopajoče vrednosti, za kar je največkrat vzrok nepravilen vnos podatkov, nepravilno izveden eksperiment ali pa je eksperiment izveden pravilno, vendar izstopajoči rezultat ne ustreza modelu (18, 22).

Drugi graf je Summary of Fit, iz katerega lahko razberemo vrednosti štirih parametrov: R^2 , Q^2 , reproducibilnost (ponovljivost) in veljavnost modela. V graf so zajete meritve vseh preiskovanih parametrov. R^2 nam pove, kako se ujemajo naši podatki z modelom. Dosega vrednosti med 0 (slab model) in 1 (odličen model, vse točke ležijo na premici grafa opazovanih vrednosti v odvisnosti od pričakovanih). Q^2 nam pove, kako dobro lahko napovemo nove eksperimente, variira med minus neskončno in ena ter je najboljši in najboljčutljivejši kazalec uporabnosti modela. Signifikanten model ima vrednost Q^2 nad 0,1, dober nad 0,5, odličen nad 0,9, R^2 pa ne sme presegati Q^2 za več kot 0,2 oz. 0,3. Naslednji stolpec v grafu predstavlja veljavnost modela, ki je nad 0,25 pri dobrem modelu, manjša vrednost pa kaže na pomanjkljivost (npr. izstopajoče vrednosti, napačen model, težave s transformacijo). V primeru, da so ponovljivi eksperimenti skoraj identični (čista napaka je zelo majhna), je lahko veljavnost modela nizka, kljub temu da je model dober in dovršen. Zadnji stolpec grafa predstavlja ponovljivost in vrednost pod 0,5 pomeni veliko napako ter slabo kontrolo med izvajanjem eksperimentov (18, 22).

Grafični prikaz pogojev modela z namenom določitve njihove signifikantnosti omogoča tretji graf (Coefficients). Kadar stopnja negotovosti ne prehaja čez $Y = 0$ in je vrednost dovolj oddaljena ne glede na smer od $Y = 0$, je model značilen, neznačilen pa je v primeru, ko je vrednost blizu in prečka $Y = 0$ (18, 22).

Četrti graf (Residuals normal probability) prikazuje na kumulativni normalni lestvici verjetnosti narisane rezidualne (ostanke), iz njega pa lahko razberemo izstopajoče vrednosti in normalno porazdeljene rezidualne. Če eksperimenti ležijo na premici, potem so reziduali porazdeljeni normalno, točke izven ± 4 SD (standardna deviacija) dojemamo kot izstopajoče vrednosti in jih obravnavamo kot možno napako. Kadar eksperimenti ležijo na ukrivljeni krivulji, smo najverjetneje napačno transformirali odzive ali pa gre za nemodeliran kvadratni odnos (18, 22).

3.3.3 Reološka metoda

Za proučevanje reologije tekočin lahko uporabljamo različne instrumente (viskozimetre in reometre), izbira ustreznega pa je odvisna od namena proučevanja (določanje procesnih parametrov, kontrola kakovosti, proučevanje strukture) in lastnosti tekočine. Uporabili smo rotacijski reometer, ki sodi med absolutne instrumente, saj lahko z njim vrednosti strižnih hitrosti oziroma strižnih napetosti izračunamo s pomočjo merljivih in nastavljivih količin ter s pomočjo geometrijskih karakteristik izbranega senzorskega sistema. Pri absolutnih

instrumentih je potrebno biti pozoren, da med meritvijo zagotovimo izotermne pogoje, saj je viskoznost tekočin zelo odvisna od temperature. Rotacijske reometre pogosto uporabljamo za preučevanje reologije nenewtonskih tekočin. En del merilnega sistema rotira, drugi pa miruje, lahko pa tudi oba rotirata. Po načinu merjenja ločimo dva tipa: rotacijski reometer z nastavljivo strižno napetostjo (neodvisna spremenljivka – strižna napetost, merimo strižno hitrost), in rotacijski reometer z nastavljivo strižno hitrostjo (neodvisna spremenljivka – strižna hitrost, merimo strižno napetost). Oba omogočata izračun istih dinamičnih količin (G' , G'' , G^* , η^* -kompleksna viskoznost, η' -dinamična viskoznost) v območju linearnega viskoelastičnega odziva. Pri realnih snoveh so te vrednosti odvisne od frekvence oscilacije. Uporabili smo senzorski sistem stožec – ploščica, pri čemer se vzorec nahaja vmes v reži, katere velikost lahko spreminjamo. Strižna hitrost se pri uporabljenem sistemu spreminja po celotnem vzorcu. Z njim merimo visoko viskozne tekočine in poltrdne snovi, lahko pa tudi koncentrirane suspenzije z večjimi delci (8).

Vzorci smo vrednotili z merjenjem reoloških parametrov z rotacijskim reometrom z oscilacijsko amplitudnim ter oscilacijsko frekvenčnim testom. Najprej smo izvedli amplitudno metodo, pri kateri se ob konstantni frekvenci spreminja amplituda in omogoča določitev linearnega območja viskoelastičnosti, ki je veliko pri dobro dispergiranih in stabilnih sistemih. Reološke lastnosti do kritične vrednosti niso odvisne od amplitude strižne deformacije (oz. amplitude strižne napetosti), nad njo pričnejo vrednosti dinamičnih količin z naraščajočo amplitudo deformacije padati (fazni zamik pa narašča). Reološko obnašanje testirane snovi takrat preide v nelinearen viskoelastičen odziv. Določitev viskoelastičnih lastnosti kot funkcijo časa brez rušenja notranje strukture testirane snovi pa omogoča frekvenčna metoda, s katero meritve izvajamo v linearnem območju pri različnih frekvencah oscilacije. Hitri gibi pri visokih frekvencah prikažejo kratkoročne lastnosti, počasni gibi pri nižjih frekvencah pa dolgoročne lastnosti. Pred merjenjem smo vsak vzorec premešali (ne preveč, da ni bilo prisotnih zračnih mehurčkov) in na ploščo dodali ustrezno količino, da smo zapolnili prostor med zgornjo in spodnjo ploskvijo reometra. Ta nam je sam določil režo (0,095 mm), merili smo pri 23 °C in spremljali parametre G' (elastični modul oz. modul akumulacije energije), G'' (viskozni modul oz. modul energijskih izgub) ter kompleksno viskoznost (8). Pogoji merjenja so prikazani v Preglednici VII.

Preglednica VII: Pogoji merjenja z rotacijskim reometrom

Oscilacijski amplitudni test	0,05000 Pa–100,0 Pa (strižna napetost)	1,000 Hz (kotna frekvenca)	50 (št. točk)	T = 23,00 °C
Oscilacijski frekvenčni test	0,01000 Hz–20,00 Hz (kotna frekvenca)	0,2500 Pa (strižna napetost)	6 (št. točk)	T = 23,00 °C
Nastavljena temperatura	t < 300,00 s (čas temperiranja) T = 23,00 °C < +/-0,20 °C			

Poleg tega smo ugotovili, da je izbrana reološka metoda zelo občutljiva že na najmanjše spremembe v vzorcu oz. način priprave vzorca za merjenje (npr. prisotnost zračnega mehurčka zaradi mešanja), zato smo vsak vzorec pomerili vsaj trikrat in za nadaljnje vrednotenje pri vsaki meritvi vzeli povprečje 10 točk (od $\tau = 0,1086$ Pa do $\tau = 0,4387$ Pa) s konstantno vrednostjo modulov.

3.3.4 Nefelometrija

V 1,5 mL epice smo odpipetirali slep vzorec in vse vzorce iz DoE ter jih centrifugirali pri pogojih: 14000 o/min, 30 min, 22 °C, RCF 14243*g. Na ploščo za meritev smo nanegli supernatant vseh vzorcev pred in po centrifugiranju v dveh paralelah, v petih časovnih točkah (0 s, 56 s, 112 s, 168 s, 225 s) izvedli meritev, rezultate dobljenih desetih meritev povprečili in delili povprečno vrednost centrifugiranega vzorca z necentrifugiranim. Tudi te vrednosti smo vnesli v program MOODE in nam služijo za ocenjevanje sedimentacije suspenzij. Nefelometer meri intenziteto razpršene svetlobe pri prehodu skozi vzorec, ki je premosorazmerna količini suspendiranih delcev.

3.3.5 Testiranje stabilnosti

Za testiranje stabilnosti suspenzije smo (ponovno) naredili nekatere vzorce, jim takoj pomerili reološke parametre in jih dali hraniti pri pogojih 40 °C in 75 % RH za 1, 3 in 6 mesecev. S povišano temperaturo in relativno vlažnostjo smo pospešili morebitne spremembe (pospešeni testi stabilnosti). V posamezni časovni točki smo vzorcem pomerili reološke parametre in jih ovrednotili z nefelometrom.

3.3.6 Statistično vrednotenje

Razlike med posameznimi vzorci smo statistično vrednotili s t-testom oz. s testom ANOVA. Uporabili smo t-test za neodvisne vzorce, kjer smo ugotavljali, ali obstajajo statistično pomembne razlike med dvema neodvisnima vzorcema. S testom ANOVA pa smo primerjali povprečja več vzorcev med seboj. V vsakem primeru smo postavili ničelno in alternativno hipotezo s stopnjo tveganja α 0,05.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

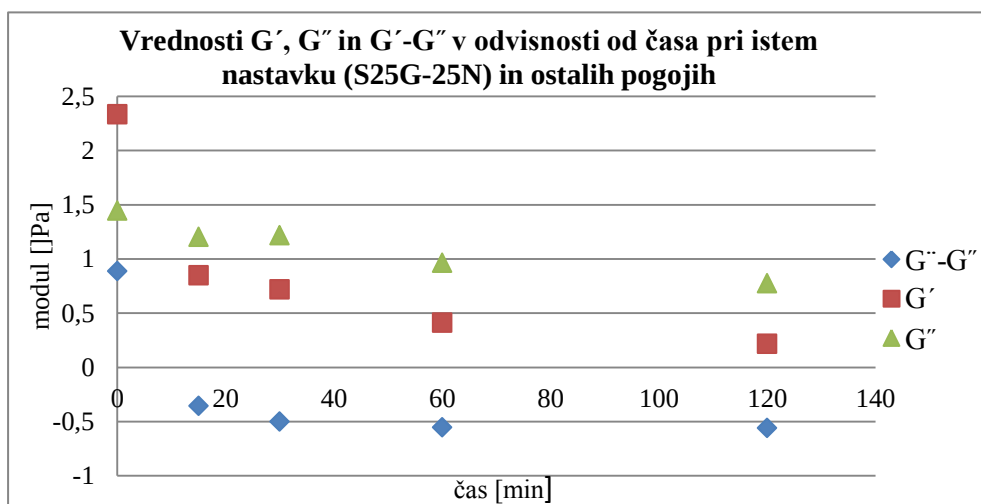
4.1 Rezultati preliminarnih testov pred načrtovanjem eksperimentov

- **Vpliv mehanske obremenitve**

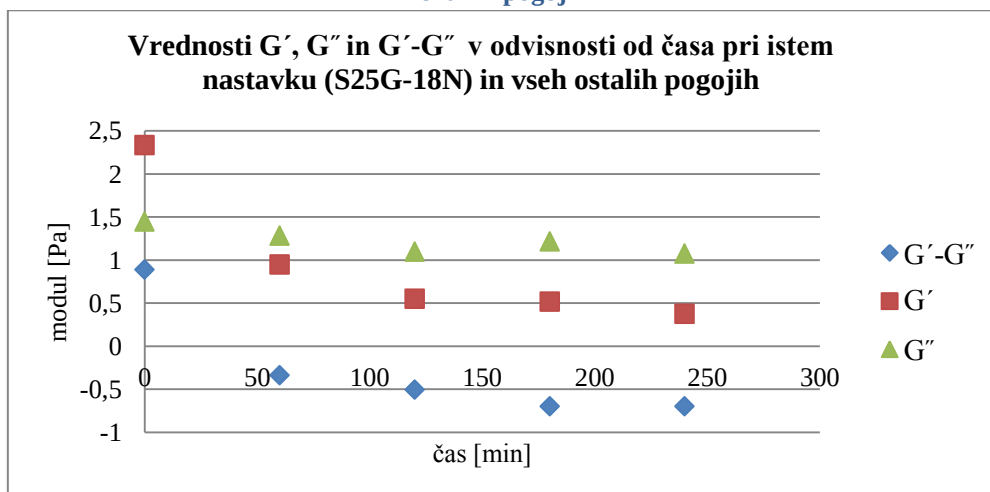
Preglednica VIII in Slike 6-10 prikazujejo rezultate proučevanja mehanske obremenitve na strukturo gela.

Preglednica VIII: Izvedeni poizkusi in vrednosti parametrov pri proučevanju vpliva homogenizacije na strukturo ksantana (hitrost homogenizacije je bila pri vseh poskusih 24000 o/min)

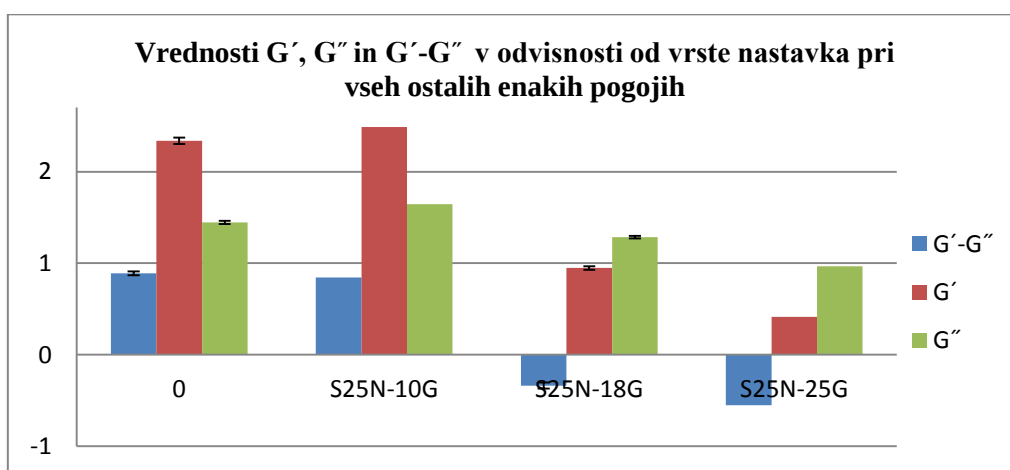
Vzorec	Čas [min]	Količina vzorca [mL]	Nastavek	Premier čaše [cm]	G' [Pa]	G'' [Pa]	$G' - G''$ [Pa]
Povprečje slepih: Xan_S2 (1 meritev) Xan_S4 (3 meritve) Xan_S6 (3 meritve) Xan_S8 (3 meritve) Xan_S9 (3 meritve)	/	/	/	/	2,3366 (SD=0,0347)	1,4460 (SD=0,0172)	0,8906 (SD=0,0203)
Xan_S1_3A (1meritev)	60	100	S25N-10G	6	2,4893	1,6465	0,8428
Xan_S1_1A, Xan_S2_3A (2 meritvi)	60	100	S25N-18G	6	0,9477 (SD=0,0186)	1,2843 (SD=0,0137)	-0,3366 (SD=0,0323)
Xan_S1_4A (1meritev)	15	100	S25N-25G	6	0,8501	1,2048	-0,3547
Xan_S2_1 (1meritev)	60	200	S25N-25G	10	1,0141	1,5072	-0,4931
Xan_S1_2A (1meritev)	30	100	S25N-25G	6	0,7222	1,2202	-0,4980
Xan_S2_3B, Xan_S1_1B (2 meritvi)	120	100	S25N-18G	6	0,5947 (SD=0,0337)	1,0980 (SD=0,0114)	-0,5034 (SD=0,0223)
Xan_S2_2 (1meritev)	60	400	S25N-25G	10	0,8214	1,3500	-0,5285
Xan_S1_2B (1meritev)	60	100	S25N-25G	6	0,4149	0,9664	-0,5514
Xan_S1_5A (1meritev)	60	100	S25N-25G	8	0,4680	1,0254	-0,5574
Xan_S1_2C (1meritev)	120	100	S25N-25G	6	0,2183	0,7772	-0,5589
Xan_S1_6A (1meritev)	60	100	S25N-25G	10	0,9472	1,6451	-0,6979
Xan_S2_3C (1meritev)	180	100	S25N-18G	6	0,5182	1,2170	-0,6988
Xan_S2_3D (1meritev)	240	100	S25N-18G	6	0,3765	1,0760	-0,6995



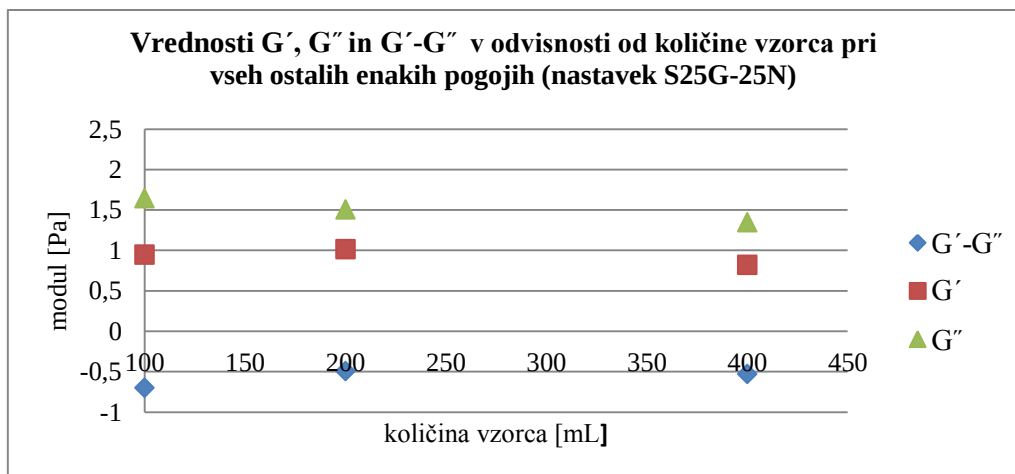
Slika 6: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od časa pri istem nastavku in vseh ostalih enakih pogojih



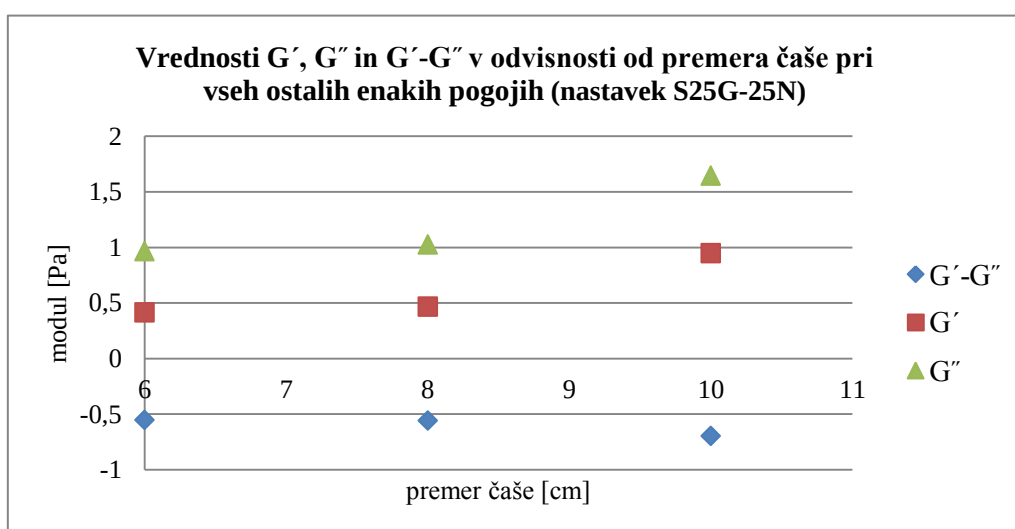
Slika 7: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti časa pri istem nastavku in vseh ostalih enakih pogojih



Slika 8: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od vrste nastavka pri vseh ostalih enakih pogojih



Slika 9: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od količine vzorca pri vseh ostalih enakih pogojih (nastavek S25G-25N)



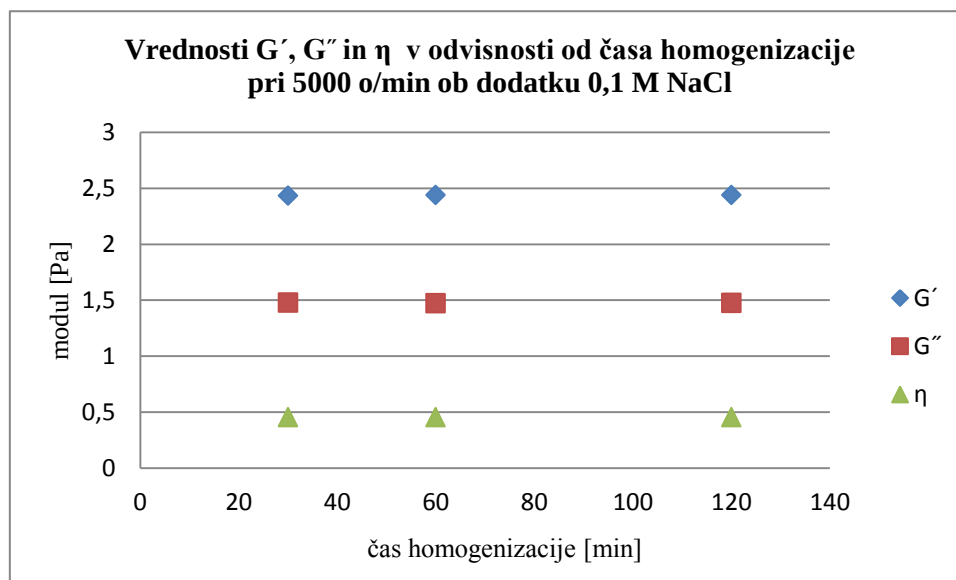
Slika 10: Vrednosti G' , G'' in $G'-G''$ v odvisnosti od premera uporabljene čaše pri vseh ostalih enakih pogojih

Na zgornjih slikah lahko vidimo, da imata največji vpliv na vrednosti modulov od vseh procesnih parametrov čas homogenizacije in vrsta nastavka, zato smo v DoE nadaljevali z njima. Nastavki S25N-10G, S25N-18G, S25N-25G se med seboj razlikujejo v premeru statorja v milimetrih (števila 10, 18, 25) in zato tudi v maksimalnem volumnu homogeniziranja (Preglednica III). Premer čaše in količina vzorca nista imela večjega vpliva, zato se v eksperimentalnem načrtu nista spreminjala (uporabili smo čašo s premerom 6 cm ter 100 mL vzorca). Pred homogenizacijo je bila vrednost G' višja kot G'' (gelska struktura), z mehansko obremenitvijo pa smo uspeli porušiti gelsko strukturo ksantana (G' manjši kot G'').

Znižala sta se tako elastični kot viskozni modul, a G' veliko bolj kot G'' . Vsi homogenizirani vzorci (Preglednica VIII) se statistično razlikujejo od nehomogeniziranih vzorcev (ANOVA, za G' , G'' in viskoznost je p vrednost veliko manjša kot 0,05).

- **Določanje vpliva ionov (Na^+ in Ca^{2+})**

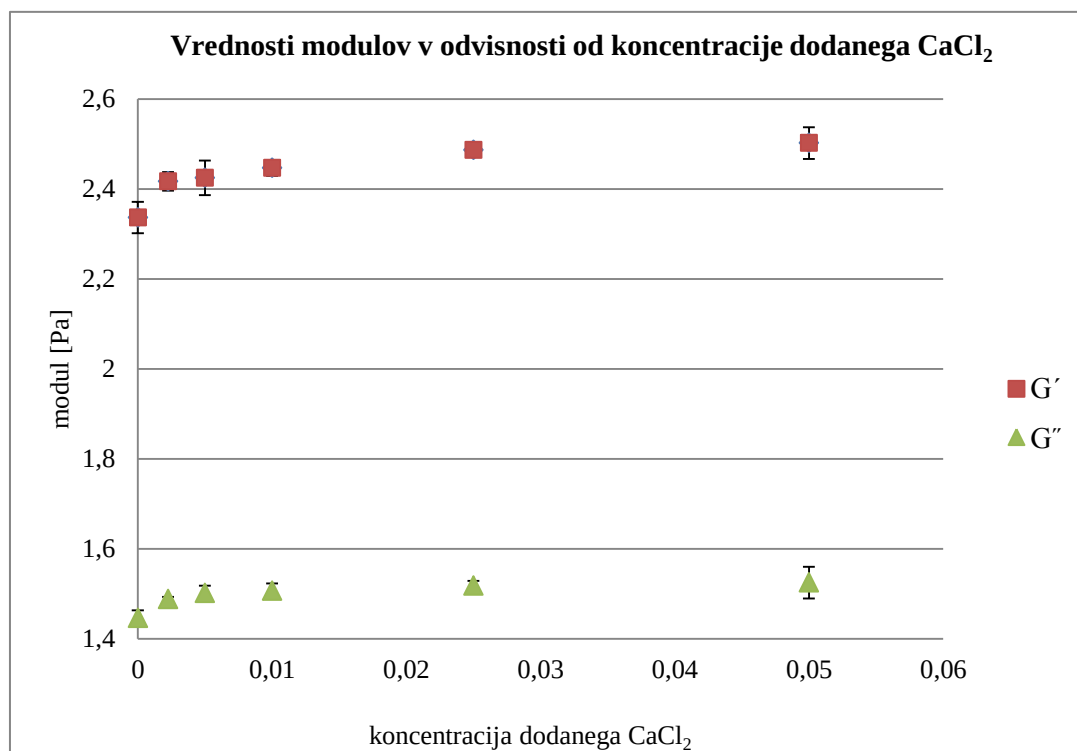
Najprej smo pripravili 0,1 M, 0,2 M in 0,5 M CaCl_2 oz. NaCl in homogenizirali z nastavkom S25N-25G pri 5000 o/min pol ure, 1 uro ter 2 uri in ugotovili, da ni bistvenih razlik, če vzorce homogeniziramo dlje kot pol ure, saj se kationi v tem času najverjetneje že vgradijo v strukturo (Slika 11).



Slika 11: Vrednosti G' , G'' in η v odvisnosti od časa homogenizacije pri 5000 o/min ob dodatku 0,1 M NaCl

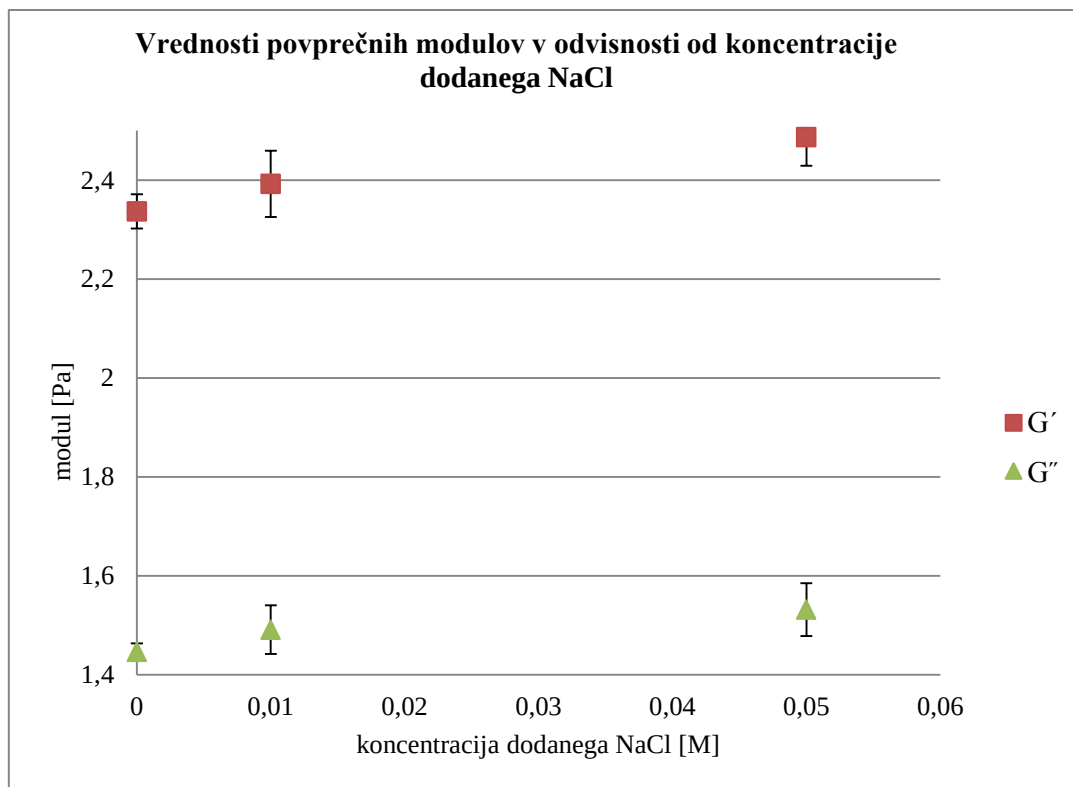
Hitrost 5000 o/min smo izbrali zato, ker pri njej še ne pride do sprememb v vrednostih parametrov zaradi mehanske obremenitve, kar je razvidno iz Preglednice X. Ugotovili smo, da so dodane količine soli precej visoke, želeli pa smo poiskati najmanjšo količino, ki bi signifikantno pokazala vpliv na reološke lastnosti gela ksantana. V eni od raziskav so ugotovili, da povzroči maksimalno vrednost G' in G'' koncentracija CaCl_2 , ko je razmerje $\text{Ca}^{2+} : \text{COO}^-$ (kislinski ostanki na ksantanu) = 1 : 2 (100 % stehiometrično razmerje) (16), vendar smo za našo suspenzijo ugotovili, da je takšna količina dodane soli premajhna (0,0023 M CaCl_2), da bi se tako pripravljeni vzorci signifikantno razlikovali od slepega vzorca. Zato smo količino CaCl_2 povečali ter testirali koncentracije 0,005 M, 0,01 M, 0,025 M in 0,05 M, pri dodatku NaCl pa koncentracije 0,01 M ter 0,05 M. Ob dodajanju CaCl_2 (Slika 12) smo že pri 0,005 M koncentraciji opazili statistično signifikantno razliko (t-test $p=0,0011$ za G' in

$p=0,010$ za G'') v primerjavi s slepimi vzorci. Vrednosti obeh modulov med različnimi ponovitvami vzorcev so nihale, kar lahko verjetno pripišemo rokovanju z vzorcem pred izvedbo meritve. Zato smo v DoE raje vključili koncentracijo 0,01 M CaCl_2 , saj je signifikantna razlika s slepimi vzorci bila prisotna ($p=2,70 \cdot 10^{-6}$ za G' in $p=1,63 \cdot 10^{-6}$ za G''), meritve pa so bile bolj ponovljive.



Slika 12: Vrednosti povprečnih modulov s standardnimi odkloni v odvisnosti od koncentracije dodanega CaCl_2

Pri dodajanju NaCl (Slika 13) pri koncentraciji 0,01 M statistično signifikantne razlike ni bilo (t-test $p=0,16$ za G' in $p=0,21$ za G''), pri koncentraciji 0,05 M pa je prišlo do statistično signifikantne razlike ($1,76 \cdot 10^{-6}$ za G' in $0,0097$ za G''), zato smo v DoE vključili to koncentracijo.



Slika 13: Vrednosti povprečnih modulov s standardnimi odkloni v odvisnosti od koncentracije dodanega NaCl

• Sedimentacija

Pri optičnem vrednotenju preliminarne vzorcev pri nobenem vzorcu ni bilo opaznih posebnosti (npr. pojava grudic).

Želeli smo ugotoviti stabilnost vzorcev po centrifugiranju in razviti metodo, s katero bi lahko pokazali kvantitativno razliko med vzorci. Stehtali smo prazne epice, v katere smo nato odpipetirali 1 mL vzorca, ki smo ga predhodno pomešali z magnetnim mešalom in potem ponovno stehtali maso epice z vzorcem. Postopek smo ponovili za vsak vzorec trikrat in centrifugirali pri 22 °C 30 min pri 28000 o/min. Pri 28000 o/min optično ni bilo razlik med posameznimi vzorci, supernatant je bil pri vseh bister, tudi razlike v količini sedimenta na prvi pogled ni bilo videti. Zato smo hitrost centrifugiranja razpolovili na 14000 o/min in opazili, da slepi vzorci sedimentirajo manj kot mehansko obremenjeni. Supernatant je bil pri slepih vzorcih moten, pri homogeniziranih pa skoraj bister (Slika 14). Vidna je bila tudi razlika med vzorcema, pripravljenima z najmanjšim in največjim nastavkom homogenizatorja.



Slika 14: Slepí vzorec (Xan_S9, 3 paralelke – prve tri epice z leve) in homogeniziran vzorec (Xan_S2_2, 3 paralelke – prve tri epice z desne) po 30 min centrifugiranju pri 14000 o/min

Hitrost smo še enkrat razpolovili na 7000 o/min in razlike med slepimi ter mehansko obremenjenimi vzorci so bile še vedno vidne (Slika 15), vendar manj kot pri 14000 o/min.



Slika 15: Po vrsti od leve slepa (Xan_S8, Xan_S9) in homogenizirani vzorci (Xan_S2_1, Xan_S1_1B, Xan_S2_2, Xan_S1_3A, Xan_S1_5A), centrifugirani 30 min pri 7000 o/min

Po odlitju supernatanta smo stene epic trikrat sprali z demineralizirano vodo, epice smo nato pustili odprte, da se je sediment posušil, nakar smo epice s sedimentom stehali. Že na začetku smo določili maso prazne in polne epice ter tako dobili maso vzorca. Iz mase sedimenta in vzorca smo izračunali delež sedimenta v posameznem vzorcu, vendar pa smo ugotovili, da je metoda zelo variabilna. Pri spiranju sten epic z demineralizirano vodo smo vsakič sprali tudi del sedimenta, zato s t-testom nismo mogli pokazati signifikantne razlike med slepimi in homogeniziranimi vzorci. S podobnimi težavami so se srečali tudi v predhodni magistrski nalogi o vplivu sestave in procesnih parametrov na reologijo gela ksantana, kjer so skušali najti ustrezno metodo za vrednotenje sedimentacije (23). Ker smo želeli optično razliko med vzorci vseeno kvantificirati, smo na centrifugi spremenili nastavek in povečali količino vzorca. 14 mL slepega (nehomogeniziranega) in homogeniziranega vzorca smo nalili v centrifugirke, ki smo jih pred tem stehali, nato smo stehali centrifugirko z vzorcem ter centrifugirali 30 min pri 7000 o/min. Med vzorcema vizualno skoraj nismo opazili razlike,

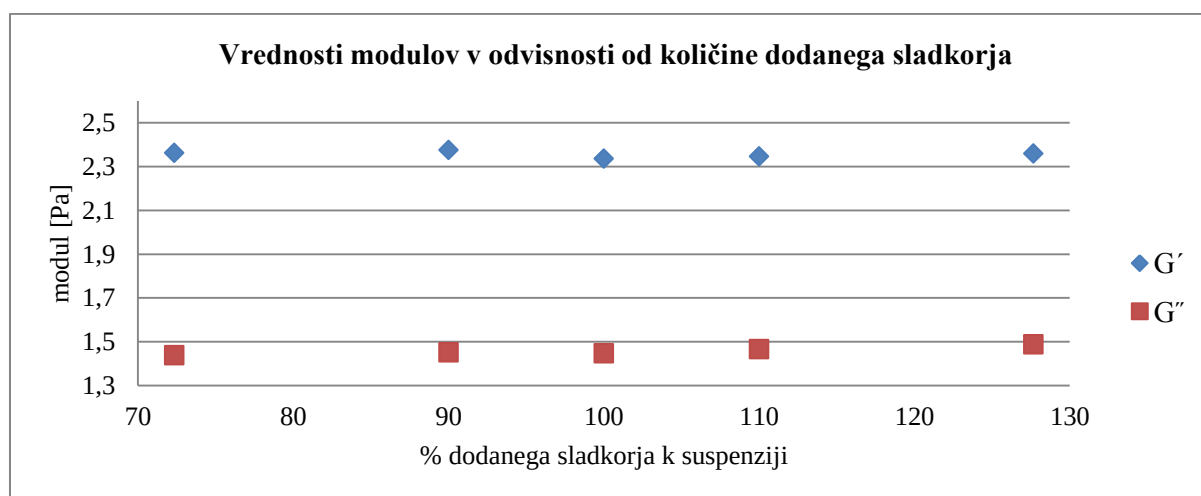
zato smo povečali hitrost na 10000 o/min za 20 min, vendar razlika tudi v tem primeru ni bila vidna, zato smo hitrost povečali na 14000 o/min in centrifugirali 10 min. Oba vzorca sta sedimentirala, supernatant homogeniziranega je bil v primerjavi s slepim vzorcem skoraj bister, razlika je bila vidna tudi v količini sedimenta. Supernatant smo odlili, stene centrifugirke trikrat sprali z demineralizirano vodo, centrifugirke s sedimentom posušili ter stehtali. Razlika v količini sedimenta je bila vseeno premajhna, da bi jo lahko kvantificirali in dokazali razliko s t-testom na zgoraj opisan način. Dodatno povečevanje hitrosti centrifugiranja na 16000 o/min tudi ni prineslo izboljšanja v smislu variabilnosti meritev.

• Različen gumi ksantana

Pri pripravi vzorcev za DoE je zelo pomembno, da ves čas uporabljamo isti gumi ksantana, saj smo pri pripravi suspenzije s ksantanom s precej višjo viskoznostjo ugotovili, da se vrednosti reoloških parametrov signifikantno razlikujejo. Pri ksantanu z $\eta=0,44$ Pa.s sta bila $G'=2,34$ Pa, $G''=1,45$ Pa, pri ksantanu z $\eta=0,56$ Pa.s pa $G'=3,11$ Pa in $G''=1,65$ Pa (t-test $p=1,94 \cdot 10^{-13}$ za G' , $p=5,87 \cdot 10^{-10}$ za G'').

• Različna količina dodanega sladkorja

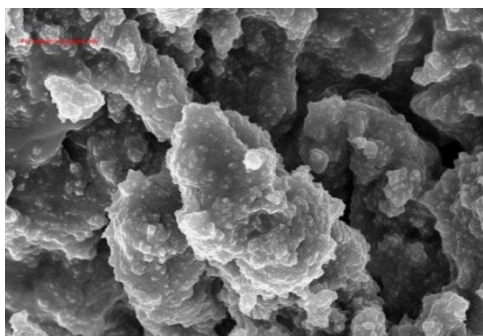
Preverili smo vpliv različne količine dodanega sladkorja (maltodekstrin) k suspenziji (Slika 16) na reološke parametre in ugotovili, da 10 % in 27 % več oz. manj dodanega sladkorja nima velikega vpliva na vrednosti modulov (signifikantno razliko smo ugotovili le v G'' pri 10 % ($p=0,04$) in 27 % ($p=0,0013$) več sladkorja). Ostale p vrednosti so bile 0,28 za G' pri 27 % več sladkorja, 0,22 za G' ter 0,41 za G'' pri 27 % manj sladkorja, 0,66 za G' pri 10 % več sladkorja ter 0,08 za G' in 0,60 za G'' pri 10 % manj sladkorja.



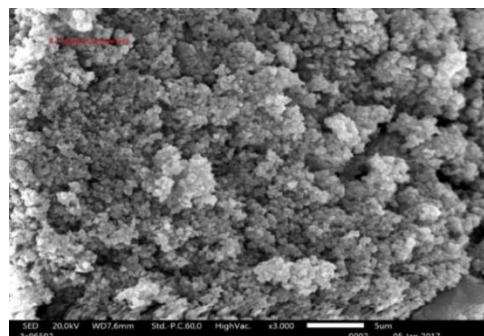
Slika 16: Vrednosti modulov v odvisnosti od količine dodanega sladkorja

- **Vrednotenje vzorcev s SEM mikroskopom**

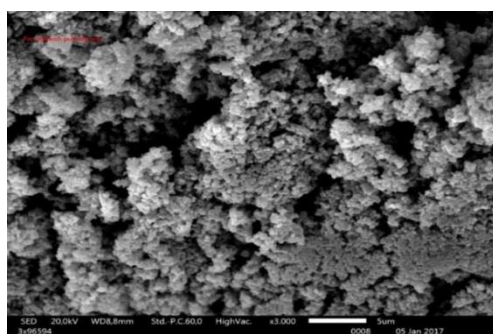
Posušen sediment vzorcev Xan_S9 (slepi vzorec), Xan_S1_1B (2 uri homogenizacije z nastavkom S25G-18N), Xan_S1_5A (1 ura homogenizacije z nastavkom S25G-25N) in Xan_S2_2 (1 ura homogenizacije z nastavkom S25G-25N) smo ovrednotili pod SEM mikroskopom.



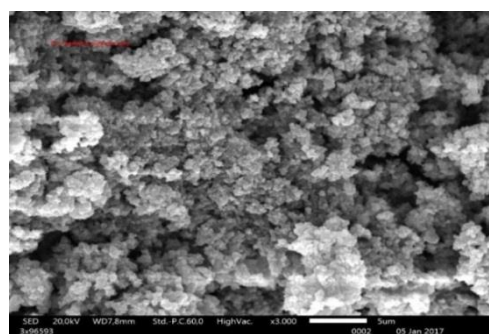
Slika 17: Sediment vzorca Xan_S9



Slika 18: Sedimen vzorca Xan_S1_1B



Slika 19: Sediment vzorca Xan_S2_2



Slika 20: Sediment vzorca Xan_S1_5A

Na vseh slikah pod 3000-kratno povečavo sedimenta vidimo majhne delce – to je titanov dioksid, ki je pri slepem vzorcu zalit s polimerom, v ostalih primerih pa polimera ni opaziti. Do razlike pride zato, ker je pri mehansko obremenjenih vzorcih porušena gelska struktura ksantana.

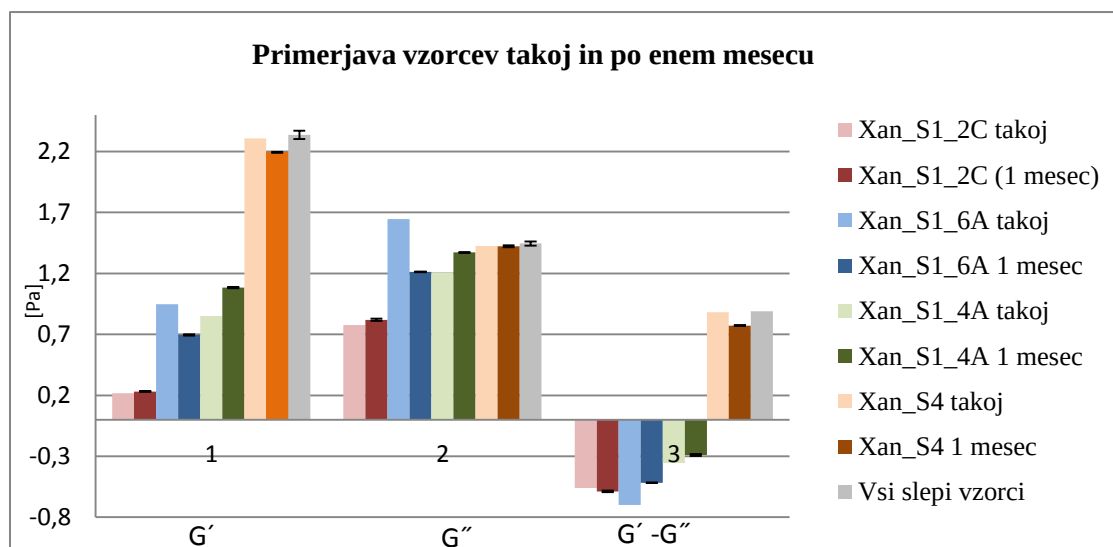
- **Preliminarno testiranje stabilnosti**

Vzorci Xan_S4 (slepi vzorec), Xan_S1_4A, Xan_S1_2C in Xan_S1_6A smo en mesec starali pri pogojih 40 °C ter 75 % RH. Iz dobljenih reoloških meritev (Preglednica IX in Slika 21) nismo opazili enotnih sprememb v merjenih vrednostih, zato smo pri vzorcih iz DoE spremljali stabilnost tudi v daljših časovnih obdobjih in opazovali, ali se morda vrednosti homogeniziranih vzorcev povrnejo nazaj proti vrednostim preučevanih parametrov slepih

vzorcev. Na Sliki 21 so v zadnjem stolpcu (vsi slepi vzorci) dodane povprečne vrednosti vseh meritev izdelanih preliminarnih slepih (neobdelanih) vzorcev.

Preglednica IX: Reološke meritve vzorcev testiranih na stabilnost 1 mesec

VZOREC	ČAS MERITVE	G'	G''	$G' - G''$
Xan_S1_2C (1 meritev)	takoj	0,2183	0,7772	-0,5589
Xan_S1_2C (2 meritvi)	1 mesec	0,2313	0,8191	-0,5878
Xan_S1_6A (1 meritev)	takoj	0,9472	1,6451	-0,6979
Xan_S1_6A (2 meritvi)	1 mesec	0,6955	1,2125	-0,5170
Xan_S1_4A (1 meritev)	takoj	0,8501	1,2048	-0,3547
Xan_S1_4A (2 meritvi)	1 mesec	1,0798	1,3724	-0,2926
Xan_S4 (1 meritev)	takoj	2,3072	1,4253	0,8819
Xan_S4 (2 meritvi)	1 mesec	2,1938	1,4219	0,7719



Slika 21: Primerjava vzorcev takoj in po enem mesecu

4.2 Postavitev modela na osnovi reoloških in nefelometričnih meritev

Analiza podatkov DoE je sestavljena iz več korakov. Najprej ovrednotimo osnovne podatke tako, da ocenimo njihovo pravilnost, posebnost in razumemo ter odstranimo nepravilnosti. Nato skušamo najti najboljši možen regresijski model, ga interpretirati, uporabiti in se odločiti, ali bomo naredili novo raziskavo ali preverili pravilnost eksperimentov.

Preden smo postavili model, smo vse podatke (Preglednica X) transformirali z negativnim logaritmom (asimetrične porazdelitve v levo (negativne) transformiramo z negativnim logaritmom, desne asimetrije (pozitivne) pa z logaritmom), tako smo iz nenormalne distribucije dobili normalno, kar je potrebno za pravilno postavitev modela.

V Preglednici X lahko vidimo, da tudi pri vzorcih po eksperimentalnem načrtu vrednosti G' , G'' in $|\eta^*|$ z dodajanjem NaCl in CaCl_2 naraščajo (tvorba močnejšega gela), z večanjem intenzivnosti homogenizacije pa padajo (šibkejši gel ali celo porušitev gelske strukture). Po dodatku soli pride do zmanjšanja medmolekulskega odboja in posledične povečane tvorbe mreže. Tudi v raziskavah so ugotovili, da se vrednosti G' in G'' ob dodatku natrijevih in kalcijevih soli povečajo. Spreminjanje vrednosti bi lahko preverili še z dodajanjem železovih ionov, ki po podatkih iz literature povzročijo tvorbo še bolj čvrstega gela kot natrijevi in kalcijevi ioni.

Vrednosti merjenja z nefelometrom so višje po centrifugiranju vzorca kot pred njim, višajo pa se tudi z dodatkom posameznih soli in s homogenizacijo (velik porast). Višja kot je izmerjena vrednost nefelometra, bolj se je suspenzija posedla, kar je z vidika fizikalne stabilnosti nezaželeno. Povprečen količnik vrednosti po/pred centrifugiranjem za vse eksperimente iz DoE je 2,44. Nefelometrija je bolj primerna metoda za vrednotenje vzorcev z nižjo koncentracijo, merimo pa količino svetlobe, ki preide skozi vzorec pod določenim kotom.

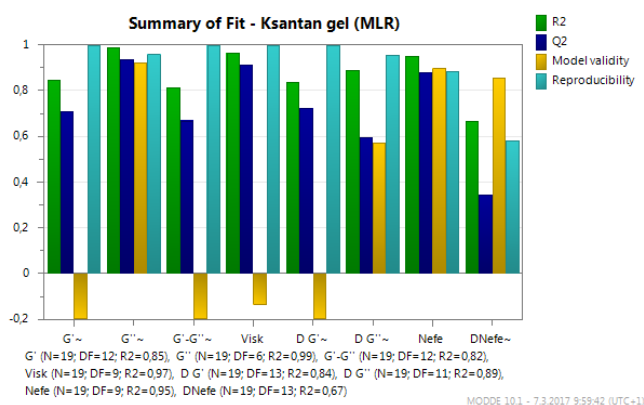
Pri nobenem od izdelanih vzorcev po eksperimentalnem načrtu pri optičnem vrednotenju s prostim očesom nismo opazili nikakršnih razlik ali posebnosti v smislu nehomogenosti ali prisotnosti grudic.

Preglednica X: Rezultati meritev, ki smo jih uporabili pri načrtovanju modela

VZOREC	Vrstni red	Ca ²⁺ [M]	Na ⁺ [M]	ČAS [min]	HITROST [o/min]	NASTAVEK	G' [Pa]	G'' [Pa]	G'-G'' [Pa]	η* [Pas]	G' sl-vz [Pa]	G'' sl-vz [Pa]	Nefelo po cent.	Razlika po/pred cent.	Količnik po/pred cent.
Slepi vzorci	/	0	0	0	0	0	2,3338	1,4505	0,8833	0,4373	0	0	20314,9	8809	1,7656
Xan_S_N1	19	0	0	10	3400	S25N-25G	2,3299	1,4520	0,8779	0,4369	0,0039	-0,0015	21652,1	9529	1,7861
Xan_S_N2	2	0,01	0	10	3400	S25N-10G	2,4046	1,4812	0,9233	0,4495	-0,0708	-0,0307	21772,7	9581	1,7859
Xan_S_N3	3	0	0,05	10	3400	S25N-10G	2,4207	1,4784	0,9423	0,4515	-0,0869	-0,0279	33107	18645	2,2892
Xan_S_N4	4	0,01	0,05	10	3400	S25N-25G	2,4644	1,4989	0,9655	0,4591	-0,1306	-0,0484	31813,3	15084	1,9016
Xan_S_N5	6	0	0	60	3400	S25N-10G	2,3376	1,4490	0,8886	0,4377	-0,0038	0,0015	25891,6	10167	1,6466
Xan_S_N6	9	0,01	0	60	3400	S25N-25G	2,4218	1,4850	0,9368	0,4521	-0,0880	-0,0345	31469,3	17180	2,2022
Xan_S_N7	14	0	0,05	60	3400	S25N-25G	2,4357	1,4851	0,9506	0,4540	-0,1019	-0,0346	31999,8	16108	2,0136
Xan_S_N8	1	0,01	0,05	60	3400	S25N-10G	2,4577	1,4974	0,9603	0,4568	-0,1239	-0,0469	27984,7	11616	1,7096
Xan_S_N9	12	0	0	10	24000	S25N-10G	2,2097	1,4522	0,7575	0,4208	0,1241	-0,0017	34625,5	20518	2,4544
Xan_S_N10	5	0,01	0	10	24000	S25N-25G	1,2700	1,3548	-0,0847	0,2955	1,0638	0,0957	51648,7	35813	3,2615
Xan_S_N11	18	0	0,05	10	24000	S25N-25G	1,2992	1,3669	-0,0677	0,3001	1,0346	0,0836	72621,2	56548	4,5182
Xan_S_N12	7	0,01	0,05	10	24000	S25N-10G	2,3806	1,4895	0,8911	0,4469	-0,0468	-0,0390	37147,3	22933	2,6134
Xan_S_N13	13	0	0	60	24000	S25N-25G	0,3815	0,9309	-0,5494	0,1601	1,9523	0,5196	69634,4	38673	2,2491
Xan_S_N14	10	0,01	0	60	24000	S25N-10G	2,2404	1,4701	0,7703	0,4265	0,0934	-0,0196	28919,7	15227	2,1120
Xan_S_N15	8	0	0,05	60	24000	S25N-10G	2,2423	1,4724	0,7699	0,4269	0,0915	-0,0219	38069,2	24653	2,8375
Xan_S_N16	16	0,01	0,05	60	24000	S25N-25G	0,3569	0,9902	-0,6333	0,1743	1,9769	0,4603	68630,7	45323	2,9445
Xan_S_N17	11	0,005	0,025	35	12050	S25N-25G	1,9511	1,4673	0,4837	0,3885	0,3827	-0,0168	36867,7	22995	2,6575
Xan_S_N18	15	0,005	0,025	35	12050	S25N-25G	1,9798	1,4819	0,4980	0,3936	0,3540	-0,0314	44783	31994	3,5017
Xan_S_N19	17	0,005	0,025	35	12050	S25N-25G	1,9825	1,4722	0,5102	0,3930	0,3513	-0,0217	34725,2	21421	2,6101

S programom MOODE (uporabili smo metodo multiple linearne regresije – MLR) lahko za vsak preiskovan parameter naredimo štiri grafe, ki nam pomagajo ugotoviti relevantnost posameznega parametra.

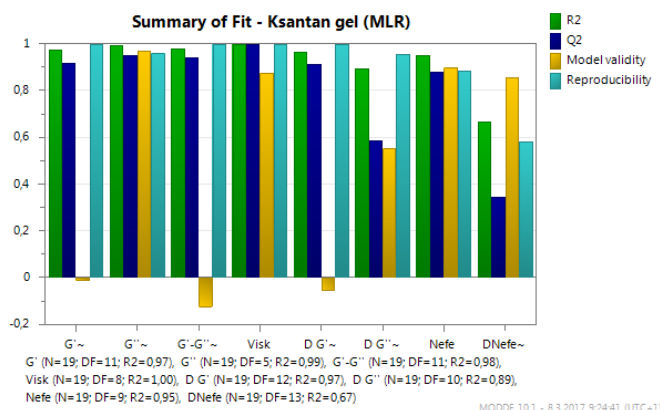
Graf 'Summary of Fit' (Slika 22) pokaže vrednosti štirih parametrov: R^2 , Q^2 , reproducibilnost (ponovljivost) in veljavnost modela. Iz grafičnega prikaza (slika spodaj) preiskovanih parametrov lahko vidimo, da so modeli dobri, saj so vrednosti R^2 precej visoke (0,85 za G' , 0,99 za G'' , 0,82 za $G'-G''$, 0,97 za viskoznost, 0,95 za nefelometer), Q^2 je nad 0,5 za vse parametre, razen za količnik rezultatov nefelometra pred in po centrifugiranju vzorca, dobra je tudi ponovljivost. Vidimo pa, da je veljavnost modela v več primerih slaba, saj je za G' , razliko modulov in viskoznost manjša od 0,25. Do tega je prišlo zaradi majhnih razlik med ponovitvami (so precej podobne), zato ima model večjo napako. Veljavnost modela je v vsakem primeru dobra, če so vrednosti R^2 in Q^2 dovolj visoke, kot je to v našem primeru.



Slika 22: Grafični prikaz parametrov (elastični oz. viskozni modul, razlika obeh modulov, viskoznost, razlika elastičnega oz. viskoznega modula med slepim in preiskovanim vzorcem, nefelometer po centrifugiranju vzorcev, količnik rezultatov nefelometra pred in po centrifugiranju)

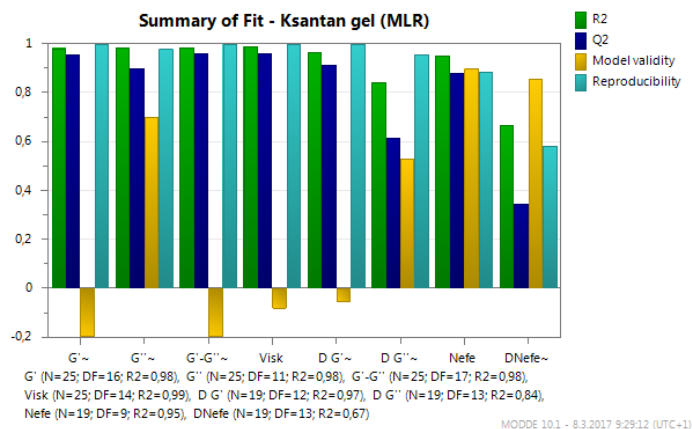
Reševanje je običajno prva stopnja preiskovanja, ki smo jo uporabili tudi mi v našem modelu. Cilj tega je zmanjšati število faktorjev tako, da identificiramo pomembne faktorje, ki ob variiranju povzročijo bistvene spremembe v odzivu. Optimizacijo pa izberemo takrat, ko pomembne faktorje že poznamo, prav tako velikost regije, želimo pa se približati odzivom s pomočjo matematičnega modela z namenom napovedovanja, optimizacije ali poiskati območje delovanja modela. V našem primeru ne moremo narediti boljšega modela, ker zaradi zasnove ne moremo evalvirati kvadratnih členov, ki so najverjetneje prisotni. Naš model sicer lahko prilagodimo (Slika 23) s kvadratnim členom za hitrost pri G' in vrednosti vseh štirih

statističnih parametrov se pomaknejo višje. Vendar so to le naša ugibanja na podlagi predhodnih izkušenj, ki ne izhajajo iz tega modela in zato niso nujno pravilna.



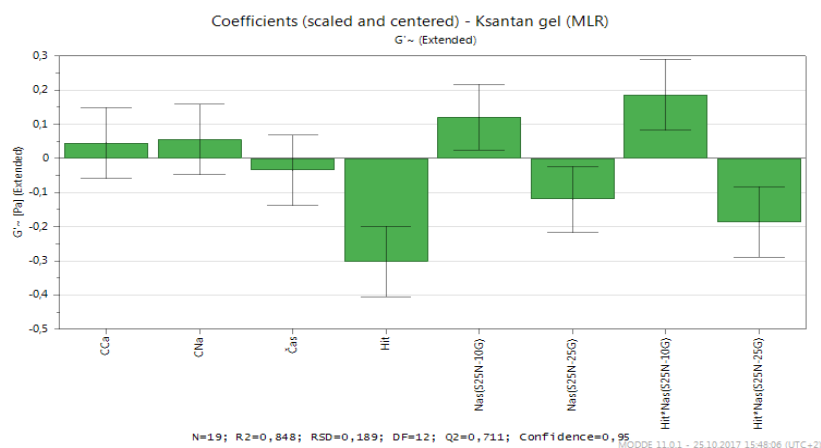
Slika 23: Grafični prikaz parametrov (za hitrost pri G' in viskoznosti izberemo kvadratni člen namesto linearnega)

Poleg eksperimentov iz DoE med podatke lahko dodamo tudi meritve iz preliminarne testov in vzorcev za testiranje stabilnosti (izberemo vzorce, ki imajo iste faktorje: čašo (premer 6 cm), količino vzorca (100 mL) in nastavek (S 25N-25G ali S 25N-10G) kot eksperimenti v DoE). Na Sliki 24 vidimo, da se vrednosti niso bistveno spremenile, kar kaže na to, da je model robusten in najverjetneje pravilen.



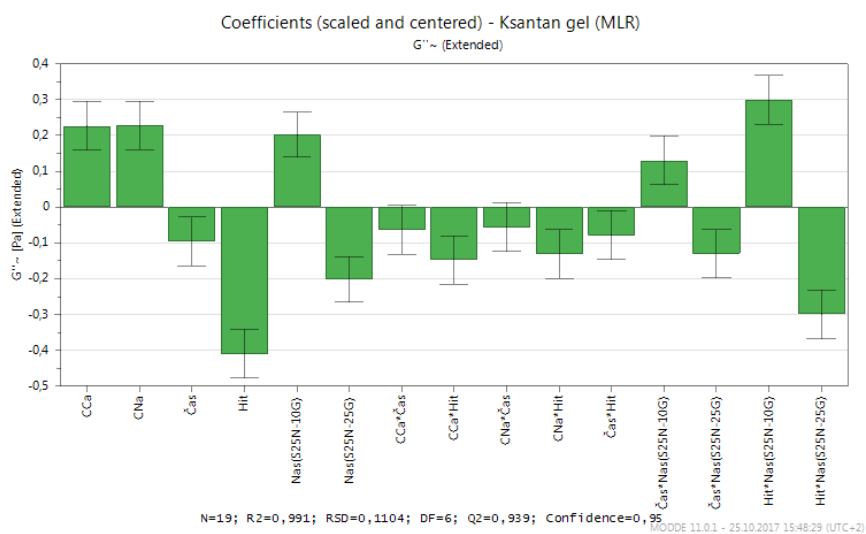
Slika 24: Grafični prikaz parametrov (dodane dodatne meritve iz preliminarne vzorcev in vzorcev za testiranje stabilnosti)

Na Slikah 25-29 'Coefficients' lahko ugotovimo signifikantnost posameznih proučevanih parametrov. Parameter je statistično signifikanten, kadar interval zaupanja ne zajema ničle in je od nje dovolj oddaljen ne glede na smer. V nasprotnem primeru, ko interval zaupanja zajema y=0, je parameter statistično nesignifikanten.



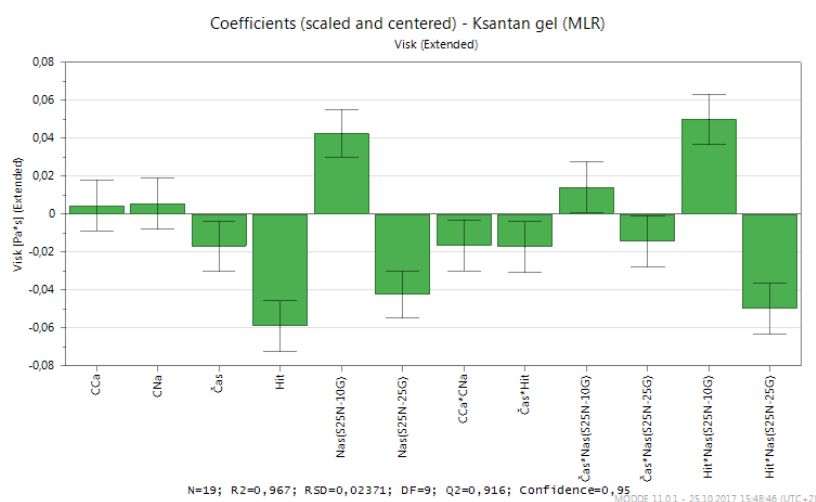
Slika 25: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na G'

Na Sliki 25 lahko vidimo, da ima največji vpliv na G' med vsemi faktorji hitrost homogenizacije, sledi izbira nastavka, ostali faktorji nimajo signifikantnega vpliva. Interakcija hitrost – nastavek ima tudi vpliv na izbrani faktor, kar je tudi pričakovano, saj se s spremembo nastavka pri isti hitrosti homogenizacije spreminja obodna hitrost.



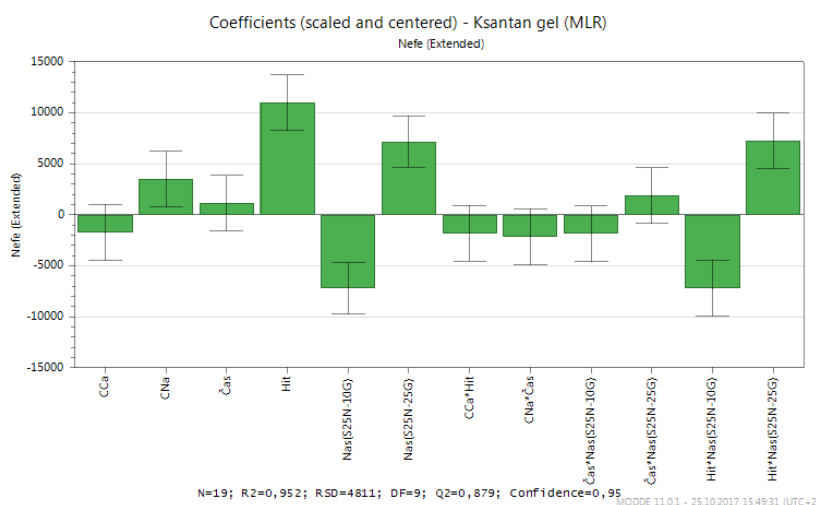
Slika 26: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na G''

Na Sliki 26 vidimo, da ima tudi na G'' največji vpliv hitrost homogenizacije, sledita nastavka, pomembna pa sta tudi dodatek soli (tvorba močnejšega gela) in čas homogenizacije. Spet se pričakovano kot pomembna pokaže interakcija hitrost – nastavek.



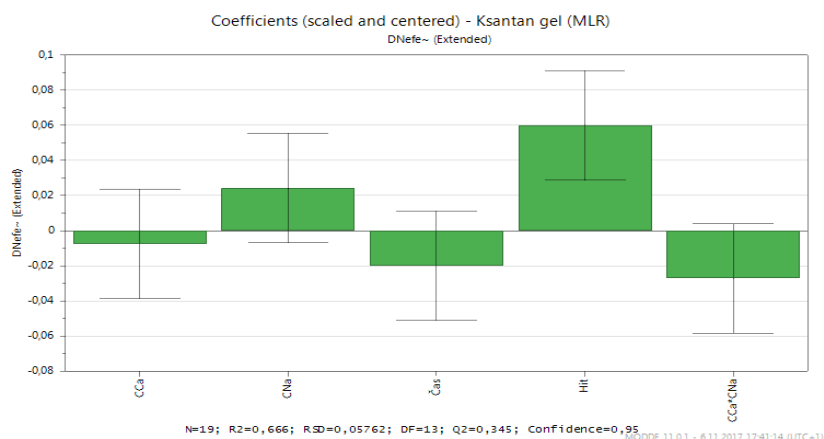
Slika 27: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na viskoznost

Največji vpliv na viskoznost ima hitrost, sledita nastavka in čas homogenizacije (Slika 27). Spet se pričakovano kot pomembna pokaže interakcija hitrost – nastavek.



Slika 28: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na nefelometrične meritve

Za nefelometrične meritve sta najbolj pomembna faktorja hitrost in nastavek pri homogenizaciji, manjši vpliv ima tudi dodatek NaCl (Slika 28). Spet se pričakovano kot pomembna pokaže interakcija hitrost – nastavek.



Slika 29: Grafični prikaz vpliva proučevanih parametrov na razliko nefelometričnih meritev

Model za razliko nefelometričnih meritev po in pred centrifugiranjem suspenzije je nekoliko slabši, vidimo samo vpliv hitrosti (Slika 29). Razlog za to je najverjetneje preveč intenzivno centrifugiranje, pri katerem se je večina delcev posedla in so bile zato razlike med vzorci premajhne. Tudi pri teh meritvah dobimo potrditev, da je vpliv hitrosti največji.

Najpomembnejši vpliv na gel ksantana ima hitrost homogenizacije – višja je, bolj delci sedimentirajo oz. bolj se struktura gela podira. Naslednji pomemben faktor je izbira nastavka homogenizatorja, kar je nekoliko povezano tudi s hitrostjo in potrjuje njen vpliv. Določen vpliv lahko pripišemo tudi dodatku NaCl, ki povzroči tvorbo močnejšega gela. Zaključimo lahko, da je reševanje dobro uspelo, saj smo prepoznali ključne faktorje, četudi ne moremo natančno napovedati njihove moči vpliva. Ne moremo postaviti odličnega modela, saj nam začetni načrt tega ne dovoljuje, a lahko na podlagi izkušenj in prilagajanja dobimo dokaj zadovoljiv končni model.

4.3 Testiranja stabilnosti

- **Vizualna kontrola sedimentacije na močno homogeniziranem vzorcu**

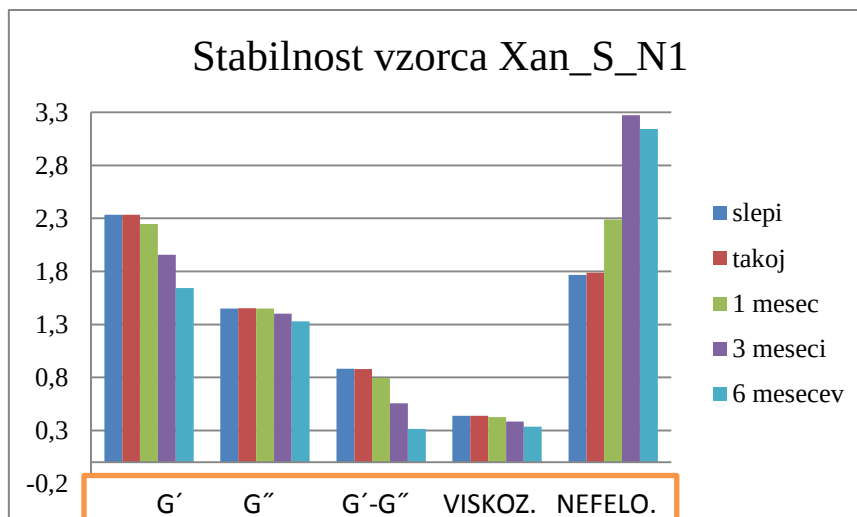
Na močno homogeniziranem vzorcu (Xan_S1_2C, 2 uri homogenizacije pri 24000 o/min z nastavkom S25N-25G) smo opravili vizualno kontrolo sedimentacije. Vzorec smo nalili v merilni valj, odmerili količino vzorca 87 mL in ga pustili stati na pultu v laboratoriju pri sobnih pogojih. Po 2 mesecih sedimentacije smo odčitali količino vzorca 77 mL, po 6 in 8 mesecih pa 75 mL. Sedimentacija je bila v prvih dveh mesecih bolj intenzivna kot pozneje, po približno pol leta pa se je ustavila, saj je bila enaka tudi po osmih mesecih.

- **Pospešeno testiranje stabilnosti**

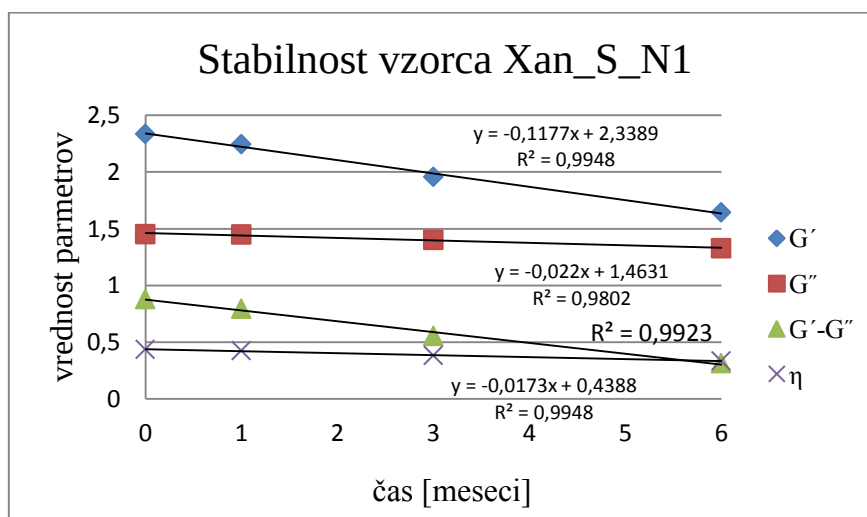
Za testiranje stabilnosti suspenzije z reometrom in nefelometrom smo (ponovno) naredili nekatere vzorce (Preglednica XI). Ovrednotili smo jih v različnih časovnih točkah hranjenja pri pogojih 40 °C in 75 % RH (takoj, čez 1 mesec, 3 mesece in 6 mesecev) ter s tem preverjali njihovo stabilnost. Vrednosti so prikazane na Slikah 30-41. Za primerjavo so na slikah dodane tudi vrednosti (prvi stolpec pri vsakem parametru) vseh slepih pomerjenih vzorcev iz preliminarne testiranja.

Preglednica XI: Vzorca za testiranje stabilnosti

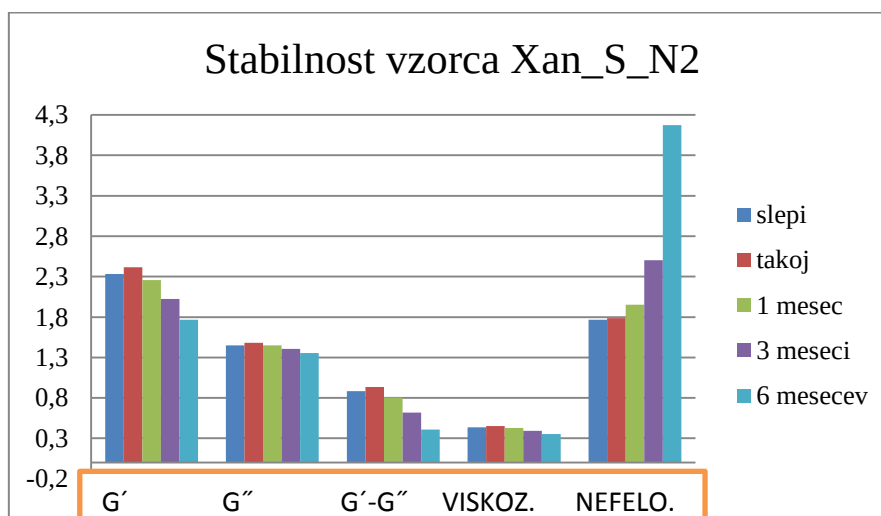
VZOREC	Ca ²⁺ [M]	ČAS [min]	HITROST [o/min]	NASTAVEK
Xan_S_N1	0	10	3400	S25N-25G
Xan_S_N2	0,01	10	3400	S25N-10G
Xan_S_N13	0	60	24000	S25N-25G
Xan_S_N20	0,01	60	24000	S25N-25G
Xan_S_N21	0	60	24000	S25N-10G
Xan_S_N14	0,01	60	24000	S25N-10G



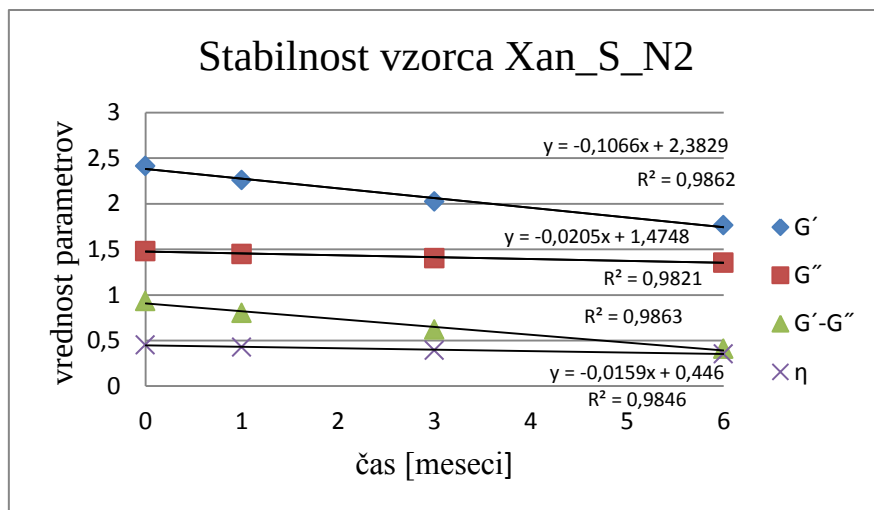
Slika 30: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N1



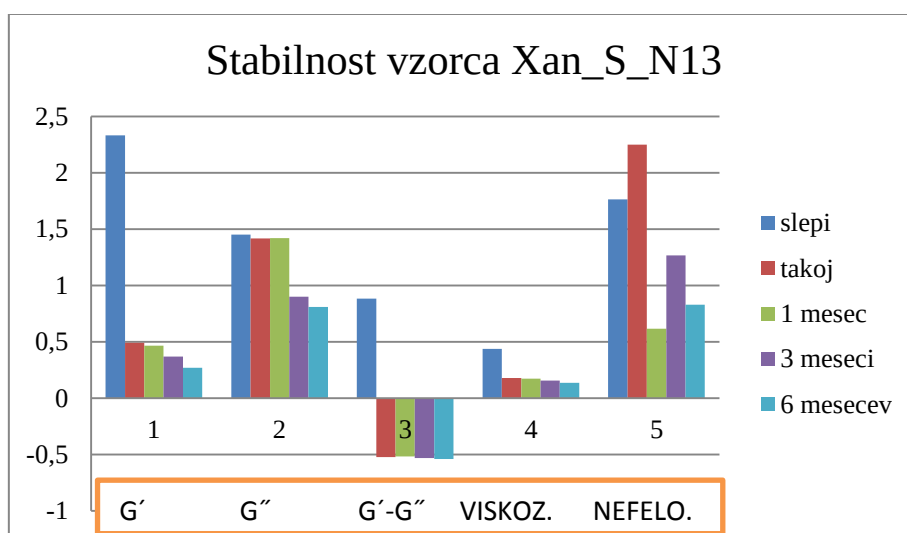
Slika 31: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N1



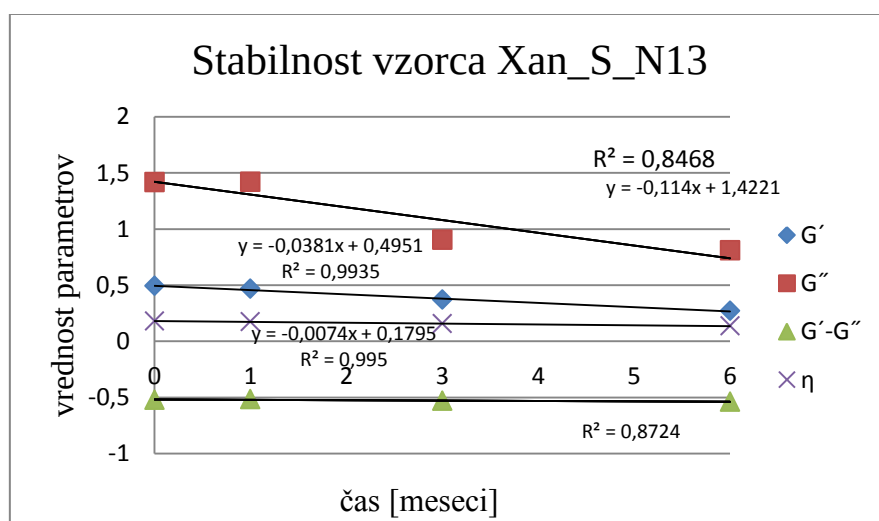
Slika 32: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N2



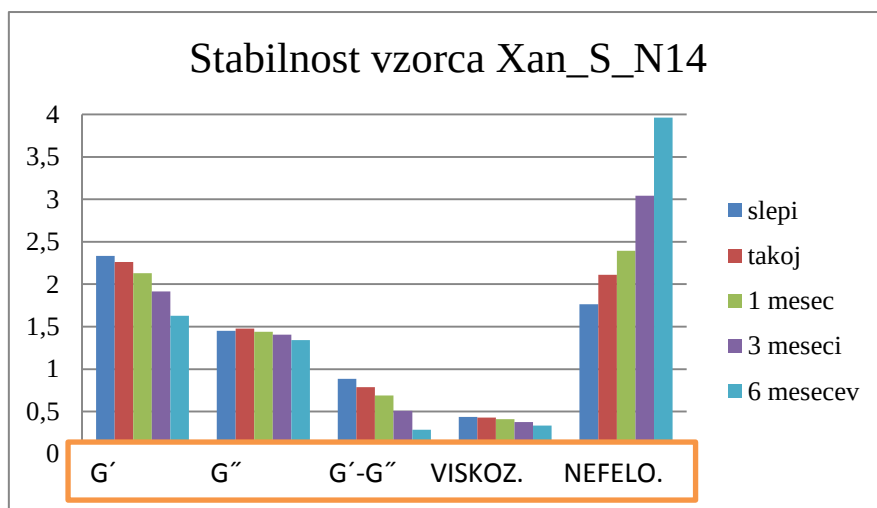
Slika 33: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N2



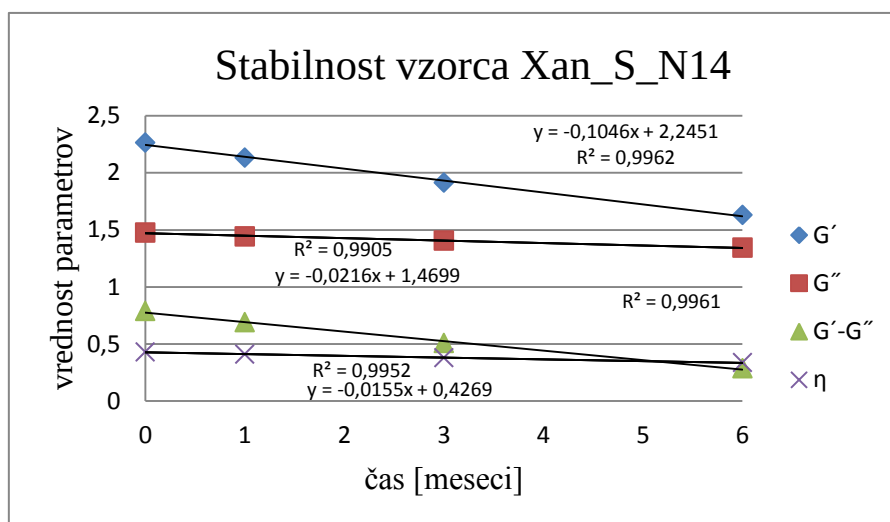
Slika 34: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N13



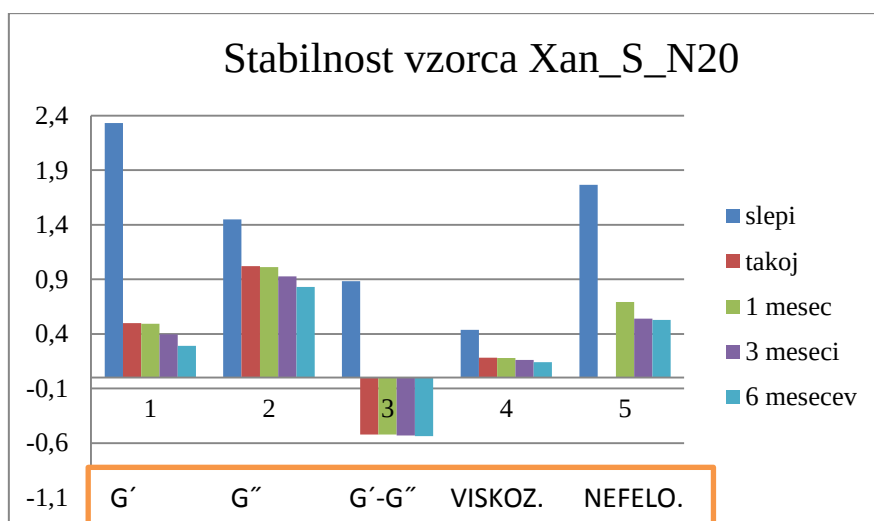
Slika 35: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N13



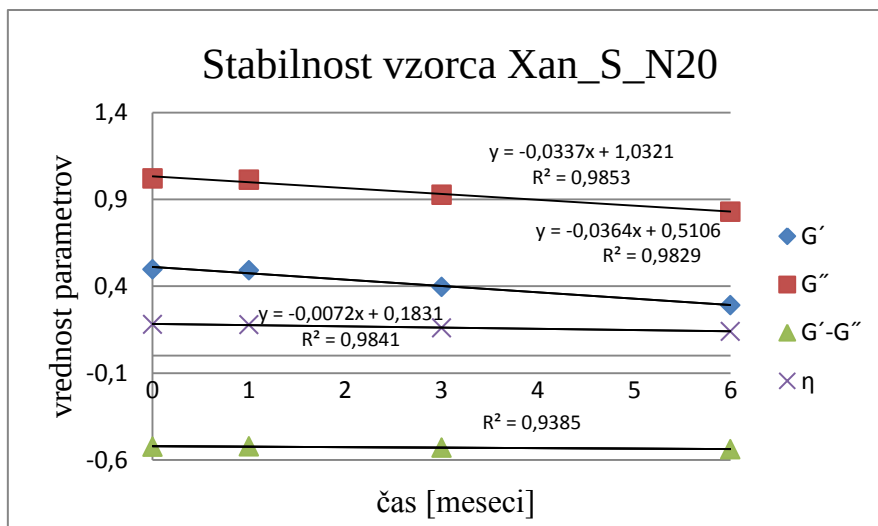
Slika 36: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N14



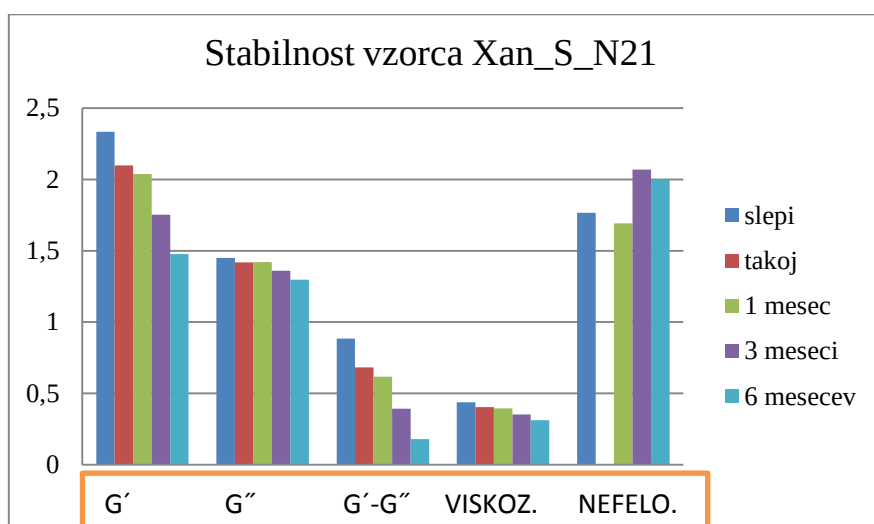
Slika 37: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N14



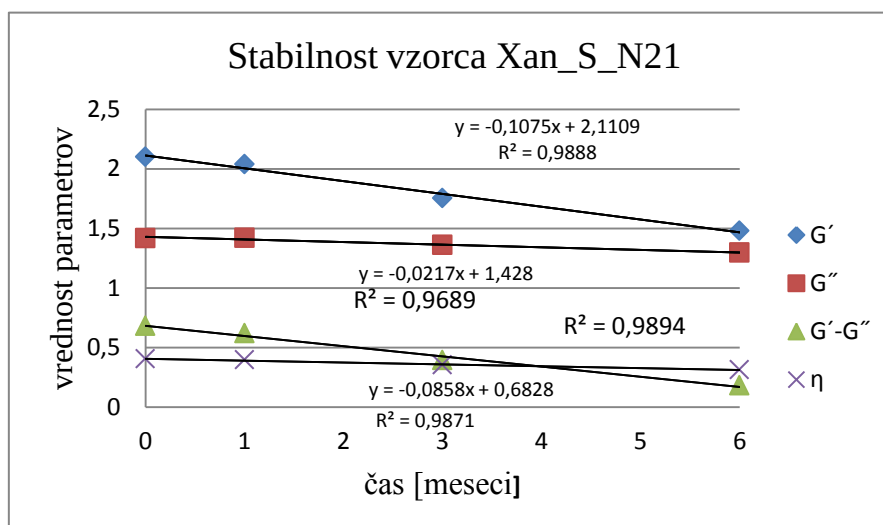
Slika 38: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N20



Slika 31: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N20



Slika 40: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N21



Slika 32: Vpliv časa shranjevanja na reološke parametre in nefelometrične meritve vzorca Xan_S_N21

Na zgornjih slikah lahko vidimo, da vrednosti izmerjenih parametrov G' , G'' , $G'-G''$ in η skozi čas padajo linearno, saj je povprečna vrednost R^2 (koeficient determinacije) za vse vzorce za izbrane parametre v vseh časovnih točkah 0,9755. Vzorce lahko glede na mehansko obremenitev razdelimo v tri skupine: močno (Xan_S_N13 in Xan_S_N20), srednje (Xan_S_N14 in Xan_S_N21) in manj (Xan_S_N1, Xan_S_N2) mehansko obremenjene. Pri manj obremenjenih vzorcih vrednosti obeh modulov (padec (naklon premice bolj strm) G' skozi mesece večji kot G'') in viskoznosti padajo, vrednosti nefelometra pa naraščajo. Pri bolj obremenjenih vzorcih je večji padec G'' kot G' , struktura je najverjetneje že v začetku porušena, zato so rezultati nefelometra variabilni. Naredili smo t-test za vse vzorce, saj smo želeli preveriti, ali so razlike v reoloških meritvah takoj in po šestih mesecih signifikantne. V Preglednici XII lahko vidimo, da vsi trije reološki parametri za vse vzorce iz testiranja stabilnosti signifikantno padajo.

Preglednica XII: P vrednosti pri izvedbi t-testa

	p vrednost		
VZOREC	G'	G''	η
Xan_S_N1	$4,29 \cdot 10^{-6}$	$9,56 \cdot 10^{-5}$	$1,19 \cdot 10^{-6}$
Xan_S_N2	0,00041	0,0010	0,00046
Xan_S_N13	0,00075	$2,25 \cdot 10^{-5}$	$1,63 \cdot 10^{-5}$
Xan_S_N14	0,0021	0,0097	0,0028
Xan_S_N20	0,0029	0,0050	0,0044
Xan_S_N21	$8,87 \cdot 10^{-7}$	$7,13 \cdot 10^{-6}$	$1,22 \cdot 10^{-6}$

Izračunali smo tudi spremembo razlike obeh modulov ($G'-G''$) v šestih mesecih $((G'-G'')_{\text{takoj}} - (G'-G'')_{\text{6mesecev}})$ in dobili vrednosti za manj obremenjena vzorca 0,56 (Xan_S_N1) in 0,53 (Xan_S_N2), za srednje obremenjena 0,50 (Xan_S_N14) in 0,50 (Xan_S_N21) ter za močno obremenjena 0,017 (Xan_S_N13) in 0,015 (Xan_S_N20). Pri manj homogeniziranih vzorcih so spremembe podobne, vrednosti G' in G'' se skozi mesece za vsak vzorec vse bolj približujeta, kar pomeni, da struktura gela postaja vse šibkejša. Pri obeh močno homogeniziranih vzorcih je sprememba v razliki modulov podobna in precej manjša kot pri manj homogeniziranih. Razlika $G'-G''$ je pri mehansko bolj obremenjenih vzorcih skozi mesece približno konstantna, kar pomeni, da gelska struktura ostaja porušena (G' pod G'').

Pred izvedbo testiranja stabilnosti in pred prebiranjem literature smo domnevali, da bi se vrednosti pri homogeniziranih vzorcih morda lahko približale vrednosti slepega vzorca, kar bi

pomenilo, da so strukturne spremembe po homogenizaciji reverzibilne, vendar do tega ni prišlo. Ravno nasprotno, saj so opazovane vrednosti reološko izmerjenih parametrov pri vseh šestih testiranih vzorcih skozi mesece padale. Ob mehanski obremenitvi pride najprej do zmanjšane agregacije, nato do razprtja dvojne vijačnice in celo do razgradnje polimera (6, 7). Ireverzibilnost sprememb po mehanski obremenitvi so dokazali v eni od raziskav, kjer so spremljali obdobje 11 tednov (11), v drugih dveh raziskavah pa so ugotovili, da je povrnitev strukture (dvojne vijačnice) le delna (6, 7). Presenetljivo je predvsem padanje reoloških vrednosti za mehansko neobremenjene vzorce. Rezultati reologije in nefelometrije so torej podobni in najverjetneje tudi pravilni.

5 SKLEP

Naš cilj v tej magistrski nalogi je bil proučiti vpliv sestave (količina sladkorja in ionov) ter procesnih parametrov (homogenizacija) na fizikalne lastnosti (predvsem reologijo) gela ksantana. Najprej smo izdelali preliminarne vzorce, s katerimi smo ugotovili, da bistveno bolj kot količina sladkorja na reologijo ksantana vpliva dodatek soli (NaCl in CaCl_2) in določili potrebno količino za prisotnost signifikantne razlike. Pri proučevanju vpliva procesnih parametrov smo opazovali vpliv izbire različne čaše, količine vzorca, nastavka, časa in hitrosti homogeniziranja. Izdelane vzorce smo reološko vrednotili in ugotovili, da največje spremembe povzročajo dodatek soli (poviša vrednosti reoloških parametrov), vrsta nastavka, hitrost in čas homogeniziranja (večji nastavek, daljše in hitrejša homogeniziranja – večji padec reoloških parametrov). Ugotovili smo, da je zelo pomembno ves čas uporabljati isti ksantan, saj v primeru uporabe več različnih ksantanov (z različno viskoznostjo) rezultatov ne moremo primerjati med seboj. Pod SEM mikroskopom smo opazili razliko med homogeniziranimi in slepimi vzorci. Poleg tega smo na nekaj vzorcih iz preliminarne vrednotenja izvedli pospešeni test stabilnosti (1 mesec pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $75\text{ \% RH}$), a nismo opazili enotnega spreminjanja. Izdelane vzorce smo centrifugirali in že vizualno opazili, da homogenizirani vzorci bistveno bolj sedimentirajo, vendar pa s tehtanjem sedimenta razlike nismo uspeli kvantificirati, zato smo razvili boljšo metodo s pomočjo nefelometra.

Z računalniškim programom MODDE smo izdelali eksperimentalni načrt in s tem zmanjšali število eksperimentov ter bistveno hitreje pridobili ustrezne informacije za napoved modela. Za glavne faktorje v DoE smo izbrali dodatek CaCl_2 , NaCl , čas in hitrost homogenizacije ter različna ULTRA-TURRAX nastavka. Izdelane vzorce smo ovrednotili z reometrom in nefelometrom (pred in po centrifugiranju). Najpomembnejši vpliv na fizikalne lastnosti gela ksantana ima hitrost homogenizacije (lahko poruši gelsko strukturo), sledi izbira nastavka, manjši vpliv lahko pripišemo tudi dodatku NaCl (tvorba močnejšega gela).

Nekaj vzorcev smo ponovno izdelali in z njimi izvedli pospešeni test stabilnosti. Hranili smo jih 1, 3 in 6 mesecev pri pogojih $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter $75\text{ \% RH}$, jih ovrednotili reološko in z nefelometrom ter ugotovili, da s časom vrednosti G' , G'' ter η padajo za vse testirane vzorce (močno in malo mehansko obremenjene). Podrta gelska struktura pri obremenjenih vzorcih ni bila reverzibilna, presenetljivo pa smo ugotovili, da so vrednosti padale tudi pri skoraj neobdelanih vzorcih. Razlika $G'-G''$ se je pri njih skozi mesece manjšala, vrednosti modulov so postajale vse bližje, kar pomeni, da je gel postajal vse šibkejši. Pri manj homogeniziranih

vzorcih so vrednosti nefelometra naraščale, pri bolj obremenjenih pa je bila struktura že na začetku porušena, zato so bili rezultati nefelometra variabilni. Reološke in nefelometrične meritve so se medsebojno potrjevale.

Ugotovili smo, da je pri pripravi suspenzij gela ksantana zelo pomembno, da striktno sledimo postopkom izdelave, saj preveč intenzivna homogenizacija ali dodatek prevelike količine soli lahko privede do popolnoma drugačnih fizikalnih lastnosti gela ksantana. Vprašljiva je lahko tudi fizikalna stabilnost suspenzije in posledično npr. težavno odmerjanje pravilne količine farmacevtskega pripravka. Trdimo lahko, da je osnovni postopek izdelave suspenzije robusten.

6 LITERATURA

1. Aulton M: *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, Crunchill Livingstone, Edinburgh, 1988: 269–279.
2. Aulton M: *The design and manufacture of medicines*, Crunchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 165, 384–390.
3. <http://blog.mixerdirect.com/blog/mixer-basics-tank-to-impeller-ratios/>, dostopno maj 2017.
4. Pavli M, Kogej K, Vrečer F: Hidrofilne ogrodne tablete s prirejenim sproščanjem na osnovi izbranih naravnih polimerov. *Farmacevtski vestnik* 2016; 67: 257–264.
5. <https://www.slideshare.net/mftrj1993/handbookofpharmaceuticalexcipients6thedition-57685846>, dostopno februar 2017.
6. Lagoueyte N, Paquin P: Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. *Food Hydrocolloids* 1998; 12: 365–371.
7. Laneuville S, Turgeon S, Paquin P: Changes in the physical properties of xanthan gum induced by a dynamic high-pressure treatment. *Carbohydrate Polymers* 2013; 92: 2327–2336.
8. Zupančič Valant A: Uvod v reologijo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2007: 7–11, 29–64.
9. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.
10. <http://fire.nist.gov/bfrlpubs/build00/PDF/b00111.pdf>, dostopno maj 2017.
11. Choppe E, Puaud F, Nicolai T, Benyahia L: Rheology of xanthan solutions as a function of temperature, concentration and ionic strength. *Carbohydrate Polymers* 2010; 82: 1228–1235.
12. Ma L, Barbosa-Canovas G V: Viscoelastic Properties of Xanthan Gels Interacting with Cations. *Journal of food science* 1997; 62: 1124–1128.
13. Harte F, Venegas R: A model for viscosity reduction in polysaccharides subjected to high-pressure homogenization. *Journal of Texture Studies* 2010; 41: 49–61.
14. Eren N M, Santos P, Campanella O: Mechanically modified xanthan gum: Rheology and polydispersity aspects. *Carbohydrate Polymers* 2015; 134: 475–484.
15. Ahmed J, Ramaswamy H S: Effect of high-hydrostatic pressure and concentration on rheological characteristics of xanthan gum. *Food Hydrocolloids* 2004; 18: 367–373.

16. Mohammed Z H, Haque A, Richardson R K, Morris E R: Promotion and inhibition of xanthan 'weak gel' reology by calcium ions. Carbohydrate Polymers 2007; 70: 38–45.
17. [http://www.bisi.cz/cmsres.axd/get/cms\\$7CVwRhc3USVqgzxkKF96gI\\$2BChNrXcTq\\$2BOUdiEtz5TfYA\\$2B1dJUbBlKfluXdoDfiqojVRVU\\$2FkQ343xA\\$3D](http://www.bisi.cz/cmsres.axd/get/cms$7CVwRhc3USVqgzxkKF96gI$2BChNrXcTq$2BOUdiEtz5TfYA$2B1dJUbBlKfluXdoDfiqojVRVU$2FkQ343xA$3D), dostopno oktober 2017.
18. http://www.metabolomics.se/Courses/MVA/DOE_Handouts_Exercises_Solutions_Wed.pdf, dostopno februar 2017.
19. https://www.researchgate.net/publication/244575279_Spectrophotometry_Turbidimetry_and_nephelometry, dostopno marec 2017.
20. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/Pomozne_snovi.pdf, dostopno februar 2017.
21. <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9926645>, dostopno februar 2017.
22. https://serviceshop.sartorius.com/fileadmin/media/global/products/Manual_BioPAT_MODDE_10.1.pdf, dostopno april 2017.
23. Turk I: Vpliv pomožnih snovi in procesnih parametrov na reološke lastnosti gela ksantana. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko tehnologijo, Ljubljana, 2016.