

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA ŠEGA

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA ŠEGA

**RAZVOJ IN VREDNOTENJE TEMPERATURNO ODZIVNIH HIDROGELOV IZ
HITOSANA IN GLICEROFOSFATA**

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF TEMPERATURE RESPONSIVE
HYDROGELS FROM CHITOSAN AND GLYCEROPHOSPHATE**

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc.dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag.farm.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc.dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Kazalo

1	Uvod.....	1
1.1	Hitosan	2
1.1.1	Topnost hitosana.....	3
1.1.2	Viskoznost raztopin hitosana.....	3
1.2	Glicerofosfat.....	3
1.3	Hidrogeli.....	4
1.4	Temperaturno odzivni hidrogeli iz hitosana in glicerofosfata.....	5
1.4.1	Mehanizem geliranja	5
1.4.2	Čas in temperatura geliranja	6
1.4.3	pH-Vrednosti	10
1.5	Reologija	13
1.5.1	Reološke osnove.....	13
2	Namen dela.....	15
3	Materiali in metode	16
3.1	Materiali	16
3.1.1	Hitosani	16
3.1.2	Katalizator sol-gel prehoda.....	18
3.1.3	Reagenti in topila.....	18
3.2	Aparature	18
3.3	Izdelava hidrogelov	18
3.3.1	Priprava raztopin	18
3.3.2	Izdelava hidrogelov	19
3.3.3	Preizkus geliranja	21
3.3.4	Reologija	21
4	Rezultati in razprava.....	23
4.1	Izbira hitosanov za izdelavo hidrogelov.....	23
4.2	Hidrogeli iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich).....	27
4.2.1	Čas geliranja pri 50 °C in 40 °C	27
4.2.2	Vpliv pH disperzije hitosana in β -GP na čas geliranja.....	32
4.2.3	Vpliv temperature na čas geliranja	37
4.2.4	Čas geliranja vzorcev pri večji koncentraciji hitosana (2,2 % m/m)	38

4.3	Hidrogeli iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka) in hitosana iz lupin kozic	40
4.4	Časi geliranja vzorcev pri temperaturi 37°C	42
4.5	Hidrogeli iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500	43
4.5.1	Vpliv stopnje deacetilacije na pH vzorcev	43
4.5.2	Čas geliranja vzorcev	46
4.6	Reologija	47
4.6.1	Izbira vzorcev za izvedbo reoloških meritev	47
4.6.2	Ugotavljanje temperature geliranja z rotacijsko viskozimetrijo	48
4.6.3	Ugotavljanje časa geliranja z reometrijo	51
4.6.4	Primerjava časov geliranja, ugotovljenih po 3 metodah	58
5	Sklep	61
6	Literatura	62

Povzetek

V farmacevtski industriji se v zadnjem času iščejo preproste rešitve za parenteralno aplikacijo zdravilnih učinkovin. Vstavev implantatov zahteva operacijo, zato so raziskovalci začeli raziskovati temperaturno odzivne *in situ* gelske formulacije. Znano je, da nekateri polimeri v vodnih raztopinah omogočajo reverzibilen sol-gel prehod v odvisnosti od temperature. Pri temperaturi nižji od sol-gel prehoda se ti sistemi lahko injicirajo v telo in se ob stiku s telesno temperaturo spremenijo v gel. Najbolj znani temperaturno odzivni polimeri so poloksameri, cilj našega raziskovalnega dela pa je bil razvoj temperaturno odzivnih hidrogelov iz hitosana in glicerofosfata. Iskali smo ustrezno kombinacijo hitosana in β -glicerofosfata, ki omogoča, da disperzija gelira pri telesni temperaturi v ustreznem času (10 min).

V magistrski nalogi smo izdelali hidrogele iz 12 različnih hitosanov in β -glicerofosfata ter jim ugotovili čas in temperaturo geliranja. Iz hitosanov smo pripravili raztopine, jim ugotovili organoleptične lastnosti in se na njihovi podlagi odločili, s katerimi hitosani bomo nadaljevali delo. Pripravili smo raztopine hitosanov v različnih koncentracijah, jih združili z raztopino β -glicerofosfata v različnih razmerjih ter dobljenim disperzijam izmerili pH. Disperzije smo nato segrevali v vodni kopeli pri 50 °C, nato pa še pri 40 in 37 °C. Izmed vseh pripravljenih hidrogelov smo izbrali štiri najustreznejše in jim z reometrom ugotovili temperaturo in čas geliranja. Primerjali smo dobljene rezultate časa geliranja, ugotovljene s tremi metodami.

Ugotovili smo, da na čas geliranja vzorcev vplivajo lastnosti raztopin hitosana in β -glicerofosfata. S povečevanjem razmerja med raztopino hitosana in β -glicerofosfata se čas geliranja daljša. Na čas geliranja vplivata tudi koncentracija hitosana in β -glicerofosfata. S povečevanjem koncentracije raztopine hitosana se pri istem masnem razmerju med raztopinama in isti koncentraciji raztopine β -glicerofosfata čas geliranja krajša. Tudi pri povečanju koncentracije raztopine β -glicerofosfata se pri istem masnem razmerju med raztopinama in pri isti koncentraciji raztopine hitosana čas geliranja skrajša.

Čas geliranja je močno odvisen od stopnje deacetilacije hitosana. Višja je stopnja deacetilacije hitosana, krajši je čas geliranja. Ugotovili smo, da sta za razvoj termoodzivnih hidrogelov iz hitosana in β -glicerofosfata potencialno ustrezna samo hitosana z visoko

stopnjo deacetilacije (>90 %). Iz takih hitosanov smo uspeli pripraviti vzorce, ki so pri telesni temperaturi gelirali v času, krajšem od 5 minut.

Abstract

In the pharmaceutical industry, simple solutions for the parenteral application of active substances have been sought in recent times. Insertion of implants requires surgery, therefore researchers began to explore the temperature-responsive in-situ gel formulations. It is known that some polymers in aqueous solutions allow reversible sol gel transition depending on the temperature. At a temperature lower than the sol-gel transition, these systems can be initiated into the body and in contact with body temperature are converted into a gel. The most well-known temperature-response polymers are poloxamers, and our research part was the development of temperature-responsive hydrogels from chitosan and glycerophosphate. We searched for an appropriate combination of chitosan and β -glycerophosphate, which allows the dispersion to become gel at body temperature at the appropriate time (10 min).

In the master thesis we prepared hydrogels from 12 different chitosans and β -glycerophosphate and determined the time and temperature of gelation. From the chitosans we prepared solutions, determined their organoleptic properties and on their basis decided with which chitosans we will continue our work. We prepared chitosans solutions at different concentrations; they are combined with a solution of β -glycerophosphate in various properties and determined the pH value of dispersion. The dispersions were then heated in a water bath at 50 °C, and then at 40 and 37 °C. Among the prepared hydrogels we selected four most suitable ones and determined the temperature and the time of gelation with the rheometer. We compared the results obtained by the gelation time by three methods.

We found that the gel time of the samples is affected by the properties of chitosan and β -glycerophosphate solutions. By increasing the ratio between chitosan and β -glycerophosphate solution, the gelation time is longer. The concentration of chitosan and β -glycerophosphate affects the time of gelation. By increasing the concentration of the chitosan solution, at the same mass ratio between the solutions and at the same concentration of the β -glycerophosphate solution, the gelling time is shorter. Moreover, when increasing the concentration of the β -glycerophosphate solution, at the same mass

ratio between the solutions and at the same concentration of the chitosan solution, the gelation time is shorter.

Gelation time is strongly dependent on the degree of deacetylation of chitosan. The higher is the degree of deacetylation of chitosan, the shorter is the gelation time. We found out that only chitosan with high degree of deacetylation (>90 %) is potentially suitable for the development of thermosetting hydrogels from chitosan and β -glycerophosphate. From such chitosans we succeeded to prepare the samples which were converted to gel in less than 5 minutes at body temperature.

Ključne besede: Hidrogeli, hitosan, glicerofosfat, čas geliranja, temperatura geliranja

Key words: Hydrogels, chitosan, glycerophosphate, gelation time, temperature of gelation

Seznam okrajšav

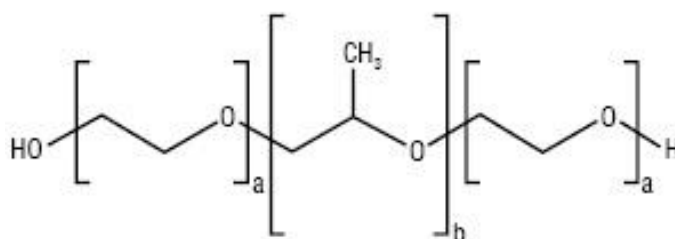
GP	glicerofosfat
DDA	stopnja deacetilacije
H2O	deionizirana voda
H1	hitosan s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich)
H3	hitosan iz lupin kozic
H5	hitosan s srednjo molekulsko maso (Fluka)
H90/500	hitosan 90/500
H95/500	hitosan 95/500
ZU	zdravilna učinkovina

1 Uvod

Napredek v biotehnologiji je v preteklih letih prinesel razvoj novih aktivnih molekul, zlasti rekombinantnih peptidov in proteinov. Najučinkovitejša aplikacija makromolekul je parenteralna. Za parenteralno aplikacijo zdravilnih učinkovin se uporabljajo zlasti polimerni sistemi, kot so mikrosfere ali implantati. Vgrajevanje ZU v te sisteme navadno zahteva uporabo organskih topil ali izpostavitve visokim temperaturam, kar lahko privede do znižanja aktivnosti. Poleg tega vstavitve implantatov zahteva operacijo, kar močno zviša stroške zdravljenja ter tveganje. Omenjene pomanjkljivosti so vzrok, da so raziskovalci začeli raziskovati temperaturno odvisne *in situ* gelske formulacije (1).

Znano je, da nekateri polimeri v vodnih raztopinah omogočajo reverzibilen sol-gel prehod v odvisnosti od temperature. Pri temperaturi nižji od sol-gel prehoda lahko injiciramo polimerne raztopine, ki se v stiku s telesno temperaturo spremenijo v gel (1).

Najbolj proučevani temperaturno odzivni polimeri so poloksameri, ki so poli(etilen oksid)-poli(propilen oksid)-poli(etilen oksid) blok kopolimeri (slika 1). Pri nižjih temperaturah so v obliki viskoznih tekočin, ob zvišanju temperature pa tvorijo rigidne poltrdne gele. Slaba stran poloksamernih hidrogelov je nujna velika koncentracija polimerov (20 do 30 %) ter njihova hitra razpadnost. Poloksameri tudi niso biorazgradljivi ter lahko povzročajo hiperlipidemijo, kar so dokazali pri podganah (1, 2, 3).

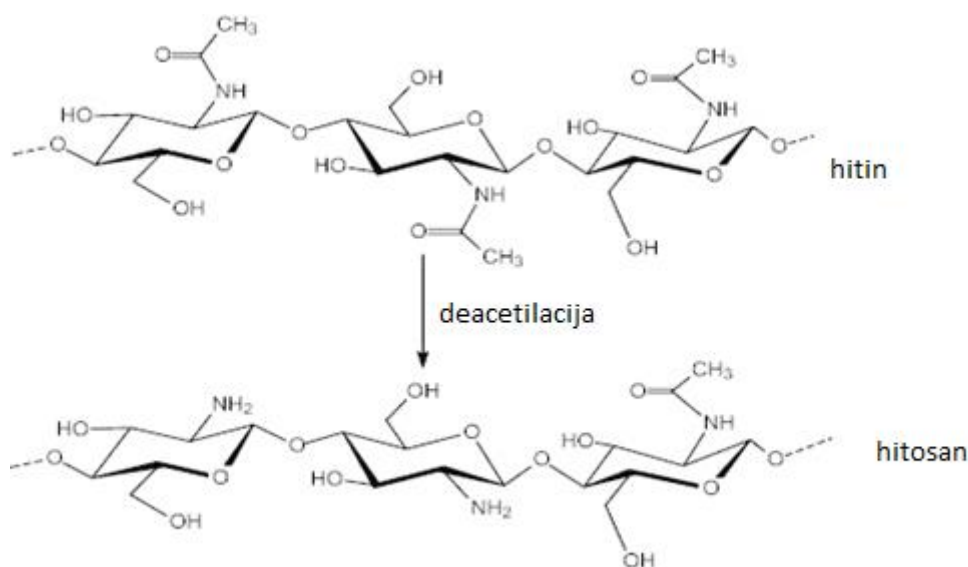


Slika 1: Strukturna formula poloksamerov (2).

V zadnjih letih se intenzivno proučujejo temperaturno odzivni hidrogeli iz hitosana in glicerofosfata. Raztopina hitosana, ki je nevtralizirana z glicerofosfatom, ima velik potencial za uporabo kot *in situ* gelirni dostavni sistem (4).

1.1 Hitosan

Hitosan je netoksičen, biokompatibilen in biorazgradljiv polimer. Je naravni kationski polimer in linearni kopolimer glukozamina in *N*-acetilglukozamina (slika 2). Nastane z delno deacetilacijo hitina, katerega glavni vir so rakove lupine ter celične stene nekaterih gliv in zunanje ogrodje žuželk. Zaradi njegovih različnih bioaktivnosti se uporablja v medicinskih, kozmetičnih, farmacevtskih in nutricevtskih aplikacijah. Uporablja se lahko v različnih fizikalnih stanjih, njegove lastnosti so odvisne od koncentracije, stopnje deacetilacije, pH, ionske moči in temperature. Termin hitosan označuje vrsto polimerov, ki se med seboj razlikujejo v lastnostih. Glavno fizikalno lastnost predstavlja stopnja deacetilacije hitina (DDA), ki je lahko od 40 do 98 %. Na splošno je polimer uvrščen med hitosane, ko je stopnja deacetilacije hitina višja od 50 %. Poleg tega se hitosani razlikujejo v molekularni masi in viskoznosti. Navadne molekulske mase so med 50 in 2000 kDa (1, 3, 5, 6, 7, 8).



Slika 2: Delna deacetilacija hitina v hitosan in strukturna formula hitosanov (9).

Hitosan v kombinaciji z glicerofosfatom (GP) v razredčenih kislinah postane termoodziven in lahko gelira v bližini telesne temperature. Ta lastnost omogoča obetaven razvoj materialov, ki temeljijo na hitosanu za izdelavo dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine, za celično enkapsulacijo in tkivno inženirstvo (10).

1.1.1 Topnost hitosana

Hitosan je netopen v nevtralnih in alkalnih topilih. Z anorganskimi in organskimi kisljinami, kot so glutaminska kislina, klorovodikova kislina, mlečna kislina in očetna kislina, tvori soli. Ob raztapljanju se aminska skupina polimera protonira in rezultat je topen polisaharid, ki ima pozitiven naboj. Najpogosteje se izmed soli hitosana uporablja hitosan klorid in hitosan glutamat (6).

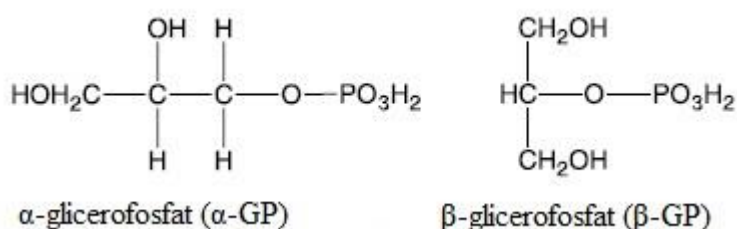
Soli hitosana so topne v vodi, topnost pa je v glavnem odvisna od stopnje deacetilacije in s tem od pKa vrednosti hitosana ter od pH. Hitosani z nizko stopnjo deacetilacije, to je okrog 40 %, so topni pri pH-vrednostih do 9, medtem ko so hitosani s stopnjo deacetilacije okrog 85 % topni le do pH 6,5. Na topnost hitosana vpliva tudi dodatek soli v raztopino. Večja kot je ionska moč, nižja je topnost hitosana (6).

1.1.2 Viskoznost raztopin hitosana

Druga pomembna lastnost hitosana je viskoznost njegovih raztopin. Ta je odvisna od koncentracije hitosana v raztopini in od temperature. Z naraščanjem koncentracije narašča tudi viskoznost, prav tako z naraščanjem temperature. Tudi z naraščanjem stopnje deacetilacije narašča viskoznost raztopine hitosana. To je posledica različne konformacije molekul pri zelo in malo deacetiliranih hitosanih (6).

1.2 Glicerofosfat

Glicerofosfat je organska snov, ki je naravno prisotna v telesu. Navadno se uporablja kot vir fosfatov pri zdravljenju neuravnovešene presnove fosfata. Njegovo uporabo je odobrila FDA. Glicerofosfat je lahko v α -, β - ali $\alpha\beta$ -konfiguraciji. α -glicerofosfat ima linearne verige in zato manj steričnih ovir kot β -glicerofosfat (slika 3). $\alpha\beta$ -glicerofosfat je zmes α - in β -glicerofosfata. Glicerofosfat se uporablja kot katalizator, ki povzroči sol-gel prehod pri raztopinah hitosana pri fiziološkem pH in fiziološki temperaturi (11, 12).



Slika 3: α - in β -glicerofosfat (13).

1.3 Hidrogeli

Gel je farmacevtska oblika, ki je lahko v poltrdnem ali trdnem stanju. Značilnost gela je, da neka snov ali več teh tvori ogrodje oziroma tridimenzionalno strukturo, v katero so ujete manjše molekule ene ali več tekočin. Geli so definirani kot razredčeni navzkrižno povezani sistemi, ki v mirujočem stanju ne tečejo. Tridimenzionalna premreženost jim daje obliko in trdnost ter prispeva k njihovi lepljivosti. Preko šibkih medmolekulskih interakcij so v strukturo gela vezane molekule tekočine, ki lahko tridimenzionalno strukturo gela zapustijo ob ustreznih razmerah (14, 15).

Glede na sestavo gelov jih delimo v več skupin. Poznamo hidrofilne gele/ hidrogеле, lipofilne gele/ oleogele, organogele, kserogele in nanokompozitne/hibridne hidrogеле. V naši magistrski nalogi bomo pripravljali hidrogеле (16).

Hidrogeli so sestavljeni iz tridimenzionalnih polimernih mrež, ki imajo veliko število hidrofilnih skupin. Sestavljeni so iz vode, ustreznega vlažilca, ki preprečuje izhlapevanje vode ter snovi, ki tvori gel. Voda je disperzni medij, v katerega dodamo snovi, ki tvorijo gel, ki v vodi nabrekajo in tvorijo tridimenzionalno rešetko. Voda, ki jo je običajno med 80 in 90 %, se ujame v prostoru rešetke. Popolnoma nabrekli hidrogeli so mehki in imajo majhno medfazno napetost z vodo in biološkimi tekočinami. Velika vsebnost vode v hidrogelih omogoča, da so združljivi z večino živih tkiv. Njihova viskoelastičnost omogoča implantacijo v gostitelja z minimalno poškodbo okoliškega tkiva. Omenjene lastnosti prikazujejo hidrogеле kot idealne kandidate za biomedicinsko aplikacijo pri poškodovanem tkivu. Poleg tega lahko hidrogeli služijo kot nosilni sistemi za celice med regeneracijo tkiva ter za dostavne sisteme za zdravilne učinkovine. Hidrogeli so namreč tako po sestavi kot mehansko podobni zunajceličnemu matriksu (12).

Hidrogeli se odzivajo na okoljsko stimulacijo. Signali, na katere se odzivajo, so lahko temperatura, pH, biomolekule, električno in magnetno polje, svetlobni žarki itd. Ko se njihovo okolje spremeni, pride pri hidrogelih do faznega prehoda, kar je posledica spremenjenih molekulskih vezi, kar se kaže kot spremembe v tridimenzionalni mreži v obliki nabrekanja, razpada ali sol-gel prehoda (12).

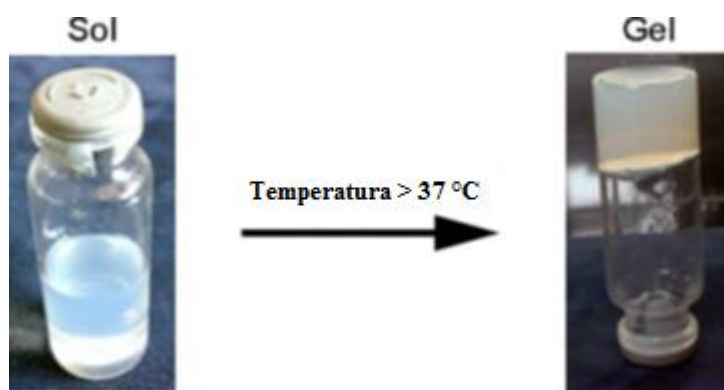
1.4 Temperaturno odzivni hidrogeli iz hitosana in glicerofosfata

Na lastnosti in strukturo hitosan/GP hidrogelov vplivajo naslednje fizikalno-kemijske lastnosti:

- pH-vrednost sistema hitosan/GP,
- koncentracija GP,
- stopnja deacetilacije hitosana,
- molekulska masa hitosana,
- koncentracija hitosana,
- kislota raztopina, uporabljena za raztapljanje hitosana (17).

1.4.1 Mehanizem geliranja

Hitosan se raztopi v kislem mediju s protoniranjem aaminskih skupin. Ko je hitosan raztopljen, ostane takšen do pH-vrednosti 6,2. Pri pH večjih od 6,2 se raztopina spremeni v gelu podobno oborino. Prvi so o spremembi raztopine hitosana pri pH večjem od 6,2 poročali Chenite in sod (18). Ugotovili so, da dodatek raztopine GP k raztopini hitosana dvigne pH raztopine zaradi nevtralizacijskega učinka fosfatnih skupin. V prisotnosti teh soli (GP) ostane raztopina hitosana v tekočem agregatnem stanju pri temperaturah nižjih od sobne temperature tudi v fiziološko sprejemljivem nevtralnem pH območju med 6,8 in 7,2. Ob segrevanju pa se raztopina hitosana in GP v pH nevtralnem območju hitro spremeni v gel. Sistem ob združenju raztopine hitosana in raztopine GP postane temperaturno občutljiv. Pri sobni temperaturi je v obliki raztopine, ob zvišanju temperature na telesno temperaturo pa se strdi (slika 4) (12, 18, 19).



Slika 4: Sprememba disperzije hitosana in GP pri dvigu temperature na telesno (37 °C) (19).

β -glicerofosfat ima tri glavne vloge v sistemu hitosan/GP:

- zviša pH do fizioloških vrednosti med 7,0 in 7,4,
- prepreči takojšnje obarjanje ali geliranje ter
- omogoča kontrolirano tvorbo gela pri zviševanju temperature (12).

Molekulski mehanizem geliranja lahko vključuje več različnih interakcij med hitosanom, glicerofosfatom in vodo. Učinkovite interakcije, ki so odgovorne za sol-gel prehod vključujejo:

- povečanje medverižnih vodikovih vezi pri hitosanu kot posledica zmanjšanja elektrostatskega odboja zaradi osnovnega delovanja soli,
- elektrostatske povezave med hitosanom in glicerofosfatom preko amonijevih in fosfatnih skupin ter
- hidrofobne interakcije hitosan-hitosan, ki pa jih je treba okrepiti s strukturiranim delovanjem glicerola na vodo (1, 8, 12).

Vedenje hidrogela hitosan/GP je odvisno od koncentracije hitosana in glicerofosfata. Pri povečanju koncentracije β -GP se poveča pH raztopine hitosana zaradi nevtralizacije fosfatnih skupin. Zvišanje pH pri večji koncentraciji β -GP je posledica porabe H^+ ionov pri protoniranju prostih aaminskih skupin (12).

1.4.2 Čas in temperatura geliranja

Čas geliranja hidrogela je odvisen od več parametrov. To so stopnja deacetilacije hitosana, koncentracija raztopine hitosana, vsebnost glicerofosfata in pH-vrednost končne raztopine (19).

Razmerje med temperaturo geliranja in koncentracijo hitosana ter koncentracijo β -GP so raziskovali Cho in sod. Ugotovili so, da se temperatura geliranja postopoma znižuje z višanjem koncentracije hitosana in β -GP. Vendar pa sinergistični učinek pri velikih koncentracijah vodi v nenadni padec temperature geliranja in fazni prehod, ki je na meji med temperaturno in koncentracijsko povzročenim geliranjem (12).

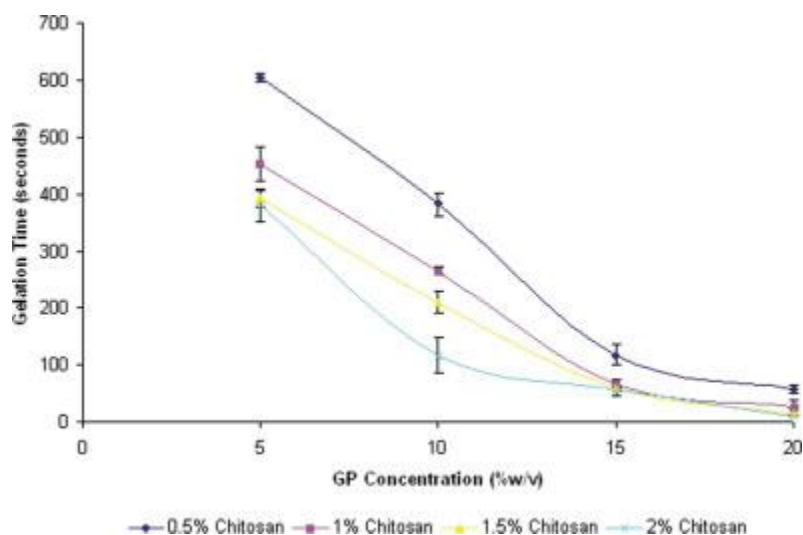
Ruel-Gariépy in sod. so pripravili termoodzivne hidrogele iz hitosana s srednjo molekulsko maso ter dveh hitosan kloridov. Za izdelavo hidrogela s hitosanom so uporabili α - β -GP, za hidrogel s hitosan kloridom pa β -GP, saj je α - β -GP inkompatibilen s hitosan kloridom. Cilj raziskave je bil ovrednotiti fizikalne lastnosti temperaturno odvisnih hitosanskih hidrogele. Pripravili so 1,8-odstotno (m/m) raztopino hitosana v 0,1 M očetni kislini ali

deionizirani vodi. Raztopina GP, ki so jo hladno dodajali v hladno raztopino hitosana je vsebovala 45 % (m/m) GP. Končne pripravljene raztopine so vsebovale 7,27 % (m/m) GP. Poleg vpliva temperature na vedenje hidrogelov hitosana in GP so vrednotili tudi reologijo, stabilnost sistemov, *in vitro* sproščanje in izgubo mase. Ugotovili so, da imajo hitosan/GP raztopine pri nizki temperaturi pH okrog 7 in se ne pretvorijo takoj v gel. Do geliranja pride s povišanjem temperature. Ta ugotovitev kaže, da so nekatere odbojne sile med verigami hitosana stabilizirane pri nizkih temperaturah in oslABLjene pri višjih temperaturah. Glede na predhodne raziskave so predvidevali, da poliolni del GP prepreči oziroma upočasni geliranje pri nizki temperaturi. Predvidevali so, da dodatek GP v raztopino hitosana spodbuja zaščitno hidratacijo verig hitosana. Zato pri nizkih temperaturah preprečuje tvorbo gela celo pri nevtralnem pH. Dvig temperature pa poveča hidrofbne interakcije hitosan-hitosan, za kar so predvidevali, da igra pomembno vlogo pri geliranju hitosan/GP raztopin. Ugotovili so, da v odvisnosti od stopnje deacetilacije, lahko poteče geliranje tudi pri relativno nizkih temperaturah. Pri raztopini hitosana s 95-odstotno deacetilacijo in GP je prišlo do geliranja že po 8 do 10 urah pri 4 °C. Po dodatku raztopine hitosana s 84-odstotno deacetilacijo pa se je ta čas znatno povečal. Kljub temu pa je tudi pri raztopini hitosana s 84-odstotno deacetilacijo in GP prišlo do geliranja po 3 mesecih na sobni temperaturi. S tem so dokazali, da se lahko raztopine hitosana/GP počasi pretvorijo v gel stanje tudi pri nižji temperaturi od 37 °C. Ugotovili so, da se sol-gel prehod ne pojavi pri določeni temperaturi, vendar se začne takoj po dodatku poliolne soli. Te ugotovitve se razlikujejo od tistih, ki so jih predhodno ugotovili pri poloksamernih ali ksiloglukanskih raztopinah, kjer pride do geliranja samo pri dvigu temperature nad njihovo temperaturo faznega prehoda (1).

R. Ahmedi in J.D. de Bruijn sta pripravila 16 različnih kombinacij raztopin hitosana z GP. Raztopine so se razlikovale tako v (m/v) koncentraciji raztopine hitosana kot tudi v (m/v) koncentraciji GP. Spremljala sta pH in čas geliranja vsake posamezne kombinacije. Čas geliranja sta merila z reometrom s sistemom plošča-plošča. Uporabljeni hitosan je imel 80-odstotno stopnjo deacetilacije in molekulsko maso 1000 kDa. Pripravila sta 4 različne koncentracije raztopine hitosana in 4 različne koncentracije raztopine GP. Končne koncentracije so prikazane v tabeli I (10).

Tabela I: Različne kombinacije hitosan/GP in njihovi časi geliranja (10).

Raztopina hitosana (m/v) + raztopine GP (m/v)			
(čas geliranja [s])			
0,5 % + 5 % (~ 600 s)	1,0 % + 5 % (~ 450 s)	1,5 % + 5 % (~ 400 s)	2,0 % + 5 % (~ 380 s)
0,5 % + 10 % (~ 420 s)	1,0 % + 10 % (~ 280 s)	1,5 % + 10 % (~ 220 s)	2,0 % + 10 % (~ 130 s)
0,5 % + 15 % (~ 150 s)	1,0 % + 15 % (~ 90 s)	1,5 % + 15 % (~ 80 s)	2,0 % + 15 % (~ 70 s)
0,5 % + 20 % (~ 80 s)	1,0 % + 20 % (~ 50 s)	1,5 % + 20 % (~ 40 s)	2,0 % + 20 % (~ 30 s)



Slika 5: Graf časov geliranja za vzorce pripravljene v različnih kombinacijah raztopin hitosana in GP (10).

Raztopine hitosan/GP so bile pri sobni temperaturi (22 °C) v tekočem agregatnem stanju, pri zvišanju temperature na telesno temperaturo, to je 37 °C, so se spremenile v gele (slika 6). Pri sobni temperaturi so bile raztopine transparentne, pri zviševanju temperature pa so postale motne, netransparentne. Med študijo sta R. Ahmedi in J. D. de Bruijn ugotovila, da je pri vseh kombinacijah različnih koncentracij hitosana in GP prišlo do geliranja v okolici telesne temperature, vendar je čas, ko pride do geliranja različen (tabela I in slika 5). Na sliki 5 so prikazani časi geliranja vzorcev pripravljenih v različnih kombinacijah med hitosanom in GP. Raztopine hitosana v kombinaciji s 15-20 % (m/v) GP so gelirale v manj kot 2 minutah, tiste v kombinaciji s 5-10 % (m/v) GP pa v okrog 10 minutah. Ugotovila sta, da večja koncentracija GP vodi v krajši čas geliranja. Koncentracija hitosana tudi

vpliva na hitrost geliranja, saj večja koncentracija hitosana pri isti koncentraciji GP vodi do skrajšanja časa do geliranja. Ugotovila sta, da se pri isti koncentraciji hitosana in različnih koncentracijah GP časi geliranja bistveno razlikujejo med seboj. Nižja koncentracija hitosana ima v primerjavi z večjo koncentracijo hitosana pri večji koncentraciji GP daljši čas geliranja. Čas geliranja se zmanjšuje z višanjem koncentracije GP. Pri dodatku 15-20 % (m/v) GP k raztopini hitosana s koncentracijo 1-2 % (m/v) se čas geliranja zmanjša na manj kot 1 minuto, vendar nižje koncentracije GP vodijo v podaljšanje tega časa. Velike koncentracije GP (15 oz. 20 % (m/v)) v kombinaciji s hitosanom z 1- ali 2-odstotno (m/v) koncentracijo kažejo podobne stopnje geliranja, medtem ko kombinacija hitosana z 0,5-odstotno (m/v) koncentracijo in GP s 15- ali 20-odstotno (m/v) koncentracijo kaže nižjo stopnjo geliranja. Za nas najbolj pomemben zaključek študije je, da je čas geliranja odvisen od koncentracije GP, večja, kot je koncentracija GP, krajši je čas geliranja (10).



Slika 6: Disperzija hitosana (1 % (m/v)) in glicerofosfata (20 % (m/v)) pred geliranjem (a) in po geliranju (b) na 37 °C (10).

E. Khodaverdi in sod. so raziskovali lastnosti hidrogelov iz hitosana s 85-odstotno stopnjo deacetilacije in β -GP brez dodatkov pomožnih snovi ter z dodatki pomožnih snovi oziroma snovi, ki tvorijo gel. Pripravili so posamezne raztopine snovi, jih združili in izmerili pH ter čas do geliranja pri 37 °C (tabela II). Ugotovili so, da je čas geliranja 2 % (m/v) hitosana s 85-odstotno stopnjo deacetilacije in 0,65 mol/L GP okrog 90 s (vzorec 1). Vzorec z istimi koncentracijami hitosana in GP, vendar z nižjo stopnjo deacetilacije (75 %) potrebuje za geliranje pri 37 °C okrog 310 s (vzorec 2). Zaključili so, da uporaba hitosana z višjo stopnjo deacetilacije vodi v povečanje gostote navzkrižnih povezav med fosfatnimi skupinami GP in amonijevimi skupinami hitosanskih verig ter posledično v krajši čas

geliranja. Na čas geliranja vpliva tudi koncentracija hitosana, kar lahko vidimo pri primerjavi vzorcev 2 in 3. Raztopine z večjo koncentracijo hitosana gelirajo hitreje kot raztopine z nižjo koncentracijo hitosana. Vzorec 2 ima koncentracijo 2 % (m/v), vzorec 3 pa 1 % (m/v). Drugi parametri so enaki, različen pa je čas geliranja, ki se razlikuje za skoraj 7 min. Na čas geliranja vpliva tudi koncentracija GP. Pri primerjavi vzorca 1 z vzorcem 4 vidimo, da so vsi parametri razen koncentracija GP nespremenjeni. Pri znižanju koncentracije GP iz 0,65 mol/L na 0,16 mol/L se čas geliranja podaljša iz 90 s na 180 s. Ugotovili so, da bi bil čas geliranja lahko obratno sorazmeren s koncentracijo GP (19).

Tabela II: Čas geliranja hidrogelov hitosan/GP pri 37 °C (19).

Ime vzorca	Hitosan (% (m/v))	Deacetilacija (%)	GP (mol/L)	pH	Čas geliranja (s)
1	2	85	0,65	7,6	90
2	2	75	0,65	7,6	310
3	1	75	0,65	7,6	720
4	2	85	0,16	7,6	180
5	2	85	0,65	7	360

1.4.3 pH-Vrednosti

R. Ahmedi in J.D. de Bruijn sta med študijo poleg časa geliranja 16 različnih kombinacij hitosana in GP spremljala tudi pH-vrednosti posameznih kombinacij. pH-Vrednosti vseh kombinacij so bile v fiziološkem območju. Kot je vidno v tabeli III, so pH-vrednosti za posamezno koncentracijo hitosana naraščale z višanjem koncentracije GP. Večja koncentracija GP in posledično večji pH raztopine pomenita hitrejše geliranje in potrebo po manjšem dodatku toplotne energije, da pride do geliranja (10).

Tabela III: pH-Vrednosti raztopin hitosan/GP (10).

GP (m/v)	Koncentracija hitosana (m/v)			
	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
5 %	7,1	6,9	6,9	6,9
10 %	7,4	7,3	7,1	7,3
15 %	7,6	7,4	7,3	7,4
20 %	7,7	7,6	7,5	7,6

Kot je vidno v tabeli II v prejšnjem podpoglavju, so E. Khodaverdi in sod. pripravili vzorec 5, ki je imel nižji pH kot drugi vzorci. V primerjavi z vzorcem 1, s katerim se razlikujeta le v pH-vrednosti vidimo, da se je čas geliranja spremenil iz 90 s na 360 s pri nižjem pH. To kaže na pomemben vpliv števila vezanih amonijevih skupin v hitosanski verigi na proces geliranja (19).

K. Song in sod. so vrednotili pH-vrednost in čas geliranja vzorcev pripravljenih v različnih volumskih razmerjih med raztopino hitosana in raztopino β -GP. Pripravili so 2,2-odstotno (v/v) raztopino hitosana s 93-odstotno stopnjo deacetilacije v 0,1 M očetni kislini in 50-odstotno (m/m) raztopino β -GP. Hladni raztopini so združili v različnih volumskih razmerjih. Končnim raztopinam so izmerili pH ter ugotovili čas geliranja (tabela IV) (20).

Tabela IV: pH in čas geliranja pri različnih razmerjih med raztopinama hitosana in β -GP (20).

Volumsko razmerje med hitosanom in GP	pH	čas geliranja (min)
0:1	9,13	-
4:1	7,23	7
5:1	7,16	10
7:1	7,12	12
8:1	7,05	12
16:1	6,81	60
1:0	5,3	-

Ugotovili so, da se z nižanjem vsebnosti β -GP v hidrogelu znižuje pH-vrednost in posledično podaljšuje čas do geliranja. Poleg tega so ugotovili, da se ob dodatku raztopine šibke baze, kot je natrijev hidrogenfosfat, pojavi bela oborina pri pH-vrednostih nižjih od 6,3 in lahko pride do geliranja pri sobni temperaturi. To nakazuje na pomembno vlogo glicerolnih skupin v glicerofosfatu v procesu geliranja. Osnovni mehanizem, po katerem deluje β -GP je naslednji: poli-alkoholna skupina β -GP prekine hitosansko verigo, pospeši nastanek hidrofilne ovojnice okrog hitosanske molekule in tako izboljša zaščitno hidratacijo hitosanske molekule, ki preprečuje asociativen učinek pri nizkih temperaturah in nevtralnem pH. Kljub temu je zvišanje temperature glavni razlog za geliranje, saj pri zvišanju temperature hidrofilne interakcije in vodikove vezi začnejo igrati pomembno vlogo v celotni raztopini, saj sprožijo navzkrižne povezave v celotni raztopini (20).

Kot najustreznejša kombinacija se je izkazala kombinacija z volumskim razmerjem 5:1. pH-Vrednost je bila 7,16 in čas geliranja pri 37 °C je bil 10 minut. Slednji rezultati ustrezajo zahtevam za biomateriale za injiciranje (20).

V raziskavi so najprej pripravili hidrogel v različnih volumskih razmerjih in določili optimalno razmerje. Hidrogel z volumskim razmerjem 5:1, ki so ga izbrali kot najustreznejšega, so uporabili v nadaljevanju študije, kjer so v sistem dodali kolagen. Ugotovili so, da ima prisotnost kolagena v sistemu zanemarljiv učinek na pH in čas geliranja (20).

J. Cho in sod. so pripravili raztopine hitosana v 1-odstotni (m/v) očetni kislini in glicerofosfata v različnih koncentracijah. Uporabili so α - in β -GP ter hitosan s 93-odstotno stopnjo deacetilacije. Raztopine so združili v različnih razmerjih in jim izmerili pH-vrednosti. Rezultati so prikazani v tabeli V (13).

Tabela V: pH-Vrednosti vzorcev z različnimi kombinacijami raztopin hitosana in GP (13).

Vz.	Konc. hitosana [M]	Konc. GP [M]	pH	Vz.	Konc. hitosana [M]	Konc. GP [M]	pH
5-33	0,05	0,33	6,3	10-66	0,10	0,66	6,9
10-33	0,10	0,33	6,4	15-66	0,15	0,66	7,0
15-33	0,15	0,33	6,5	20-66	0,20	0,66	7,2
20-33	0,20	0,33	6,6	5-83	0,05	0,83	7,0
5-69 (α)	0,05	0,69	6,7	10-83	0,10	0,83	7,1
5-69 (β)	0,05	0,69	6,7	15-83	0,15	0,83	7,2
5-66	0,05	0,66	6,7	20-83	0,20	0,83	7,4

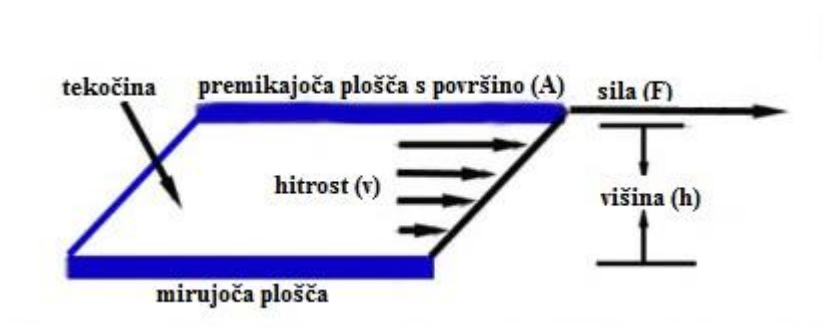
Ugotovili so, da se z višanjem koncentracije β -GP zvišuje pH zaradi nevtralizacijskega učinka fosfatnih skupin GP. Z višanjem koncentracije hitosana se pH-vrednost raztopin tudi počasi zvišuje. Vzrok je poraba H^+ ionov v raztopini zaradi protoniranja prostih aminskih skupin. Razlike med pH-vrednostmi raztopine z α - oziroma β -GP ni bilo (13).

1.5 Reologija

Reologija je veda, ki proučuje deformacijo in tok snovi. Opisuje pretok tekočih snovi in deformacijo trdnih snovi. Reologija nam omogoča ovrednotenje mehanskih lastnosti tekočin in poltrdnih snovi. Pri strižni obremenitvi snovi so lahko te tekoče kot idealno viskozne tekočine ali se deformirajo kot idealno elastične trdne snovi ter so lahko v vseh stanjih med tema dvema skrajnostma (21).

1.5.1 Reološke osnove

Osnovni reološki parametri so strižna deformacija oziroma strig (γ), strižna napetost (τ), strižna hitrost (D) in viskoznost (η). Predstavimo jih s preprostim modelom, kjer med dve vzporedni plošči s površino A [m²] in medsebojno razdaljo h [m] vstavimo preiskovano tekočino. Spodnja plošča miruje, na zgornjo pa delujemo z določeno silo F [N] in hitrostjo v [m/s]. Zgornja plošča se pod delovanjem sile in hitrosti premika, pri čemer nastane plastni laminarni tok (slika 7) (22, 23).



Slika 7: Model osnovnih reoloških parametrov (23).

Strižna deformacija ali strig (enačba 1) predstavlja določen premik plasti, do česar pride zaradi delovanja strižne sile. Posledica delovanja strižne sile je sprememba oblike telesa (22).

$$\gamma = \frac{dy}{dx} = \tan \theta$$

Enačba 1: Strižna deformacija.

Po prenehanju delovanja strižne sile se lahko telo vrne v prvotno obliko ali ostane v spremenjeni obliki. V primeru, da se povrne v prvotno obliko, govorimo o prožni oziroma elastični deformaciji. Če pa telo ostane v spremenjeni obliki govorimo o plastični oziroma trajni deformaciji. Vrsta deformacije je odvisna tako od zgradbe sistema kot tudi od velikosti in trajanja deformacije (22).

Strižna napetost [Pa] (enačba 2) je kvocient strižne sile in površine S (22).

$$\tau = \frac{F}{S}$$

Enačba 2: Strižna napetost.

Strižna hitrost [s⁻¹] (enačba 3) je mera za tekočinsko deformacijo. Je kvocient med diferencialom hitrosti dv in razmikom med sosednjima tekočinskima plastema dx (22).

$$D = \frac{dv}{dx}$$

Enačba 3: Strižna hitrost.

Viskoznost (enačba 4) je lahko dinamična ali kinematična. Dinamična viskoznost predstavlja notranjo upornost tekočin pri pretakanju. Kinematična viskoznost (ν) [m²/s] pa je kvocient med dinamično viskoznostjo η in gostoto sistema ρ pri točno določeni temperaturi (22).

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}$$

Enačba 4: Viskoznost.

2 Namen dela

Namen magistrske naloge je razvoj in vrednotenje temperaturno odzivnih hidrogelov iz različnih vrst hitosanov in β -glicerofosfata, ki bi jih lahko aplicirali subkutano z injiciranjem, na mestu injiciranja pa bi v kratkem času (manj kot 10 min) gelirali pri telesni temperaturi in omogočali podaljšano sproščanje zdravilnih učinkovin.

Pripravili bomo raztopine različnih hitosanov v različnih koncentracijah in vrednotili njihov videz. Uporabili bomo 12 različnih vrst hitosanov, ki se bodo med seboj razlikovali po molekulski masi in stopnji deacetilacije. Iz raztopin hitosanov, ki bodo imele primerno viskoznost, bomo izdelali hidrokele z β -glicerofosfatom. Hidrogelom bomo izmerili pH-vrednost in čas geliranja. Najprej bomo vrednotili čas geliranja pri temperaturi 50 °C. Vzorcem, ki bodo gelirali pri 50 °C, bomo ugotovili čas geliranja še pri 40 °C in 37 °C (telesni temperaturi).

Izmed vzorcev, ki bodo gelirali pri 37 °C, bomo izbrali najobetavnejše za razvoj temperaturno odzivnih hidrogelov za subkutano aplikacijo in na njih izvedli reološke meritve. Z reometrom jim bomo ugotovili temperaturo geliranja in čas geliranja.

Čas geliranja bomo izbranim vzorcem ugotovili s tremi metodami. Pri prvi metodi bomo ugotovili čas geliranja s segrevanjem vzorcev v vodni kopeli. Druga in tretja metoda ugotavljanja časa geliranja bosta temeljili na reoloških meritvah, ki se bosta razlikovali v časovnem intervalu med posameznimi točkami meritve. Primerjali bomo dobljene rezultate in na podlagi teh ugotovili ustreznost formulacij.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Hitosani

- Hitosan s srednjo molekulsko maso (*Chitosan – medium molecular weight*, Sigma-Aldrich, Nemčija) (Š: 448877-50G; K.Š.: MKBF1336V).

Je bel do bež ali rjav do svetlo rjav prašek v obliki majhnih kosmičev. Topen je v razredčenih kislinah. Stopnja deacetilacije je 75-85 %. Viskoznost 1-odstotne masne raztopine v 1-odstotni očetni kislini je 200-800 mPas (24).

- Hitosan z majhno molekulsko maso (*Chitosan – low molecular weight*, Sigma-Aldrich, Nemčija) (Š: 448869-250G; K.Š.: MKBK4182V).

Je bel do bež sipek prašek z molekulsko maso med 50 in 190 kDa. Stopnja deacetilacije je 75-85 %. Viskoznost 1-odstotne masne raztopine v 1-odstotni očetni kislini je 20 do 300 mPas (24).

- Hitosan z majhno molekulsko maso (*Chitosan (low molecular weight)*, Fluka, Nemčija) (Š: 22741; K.Š.: 317568/1 792).

Je v obliki belo-rumenih majhnih kosmičev z vidnimi nečistotami. Ima neprijeten vonj. Pripravljen je iz lupin rakov. Njegova molekulska masa je približno 150 kDa, viskoznost 1-odstotne masne raztopine v 1-odstotni očetni kislini pa je približno 100 mPas (24).

- Hitosan iz lupin kozic (*Chitosan from shrimp shells*, Sigma-Aldrich, Nemčija) (Š: 50494-100G-F; K.Š.: BCBD8191V).

Je belo-rumeno-siv prah. Viskoznost 1-odstotne raztopine v očetni kislini je manjša od 200 mPas (24).

- Hitosan iz lupin rakov (*Chitosan, from crab shells*, Sigma-Aldrich, Nemčija) (Š: 48165-100G; K.Š.: 0001440883).

Je bel prah z večjimi delci. Viskoznost njegove 1-odstotne raztopine v očetni kislini je večja od 400 mPas (24).

- Hitosan s srednjo molekulsko maso (*Chitosan (medium molecular weight)*, Fluka, Nemčija) (Š: 22742; K.Š.: 296606 491).

Ima luskaste delce rahlo rumene barve z vidnimi nečistotami. Njegov vonj je neprijeten. Hitosan je pridobljen iz rakovih lupin. Molekulska masa ima približno 400 kDa. Njegova 1-odstotna raztopina v očetni kislini ima viskoznost približno 200 mPas (24).

- Hitosan z veliko molekulska maso (*Chitosan (high molecular weight)*, Fluka, Nemčija) (Š: 22743; K.Š.: 317641/1 1092).

Hitosan je pridobljen iz rakovih lupin. Ima rumenkaste kosmičaste delce, neprijeten vonj in vidne nečistote. Njegova molekulska masa je približno 600 kDa, viskoznost 1-odstotne raztopine v očetni kislini pa je približno 400 mPas (24).

- Srednje viskozen hitosan (*Chitosan middle-viscous*, Fluka, Nemčija) (Š: 28191; K.Š.: 440698/1).

Hitosan je v obliki rumenih kosmičastih delcev, z vidnimi nečistotami in neprijetnim vonjem. Pridobljen je iz rakovih lupin. Viskoznost 1-odstotne raztopine v očetni kislini ima med 200 in 400 mPas (24).

- Hitosan z veliko viskoznostjo (*Chitosan highly-viscous*, Fluka, Nemčija) (Š: 48165; K.Š.: 1240798).

Hitosan je v obliki večjih, belih kosmičastih delcev. Viskoznost 1-odstotne raztopine v očetni kislini je večja od 400 mPas (24).

- Hitosan klorid (*Chitosan hydrochloride*, Kraeber & co GMBH, Nemčija) (Š: 5313008900; K.Š.: 312-140411-01).

Je bel sipek prah.

- Hitosan 90/500 (*Chitosan 90/500*, HMC+, Nemčija) (Š: 23606, K.Š.: 212-050615-01).

Je bel do svetlo rumen prah. Drobnji delci imajo velik volumen. Stopnjo deacetilacije ima med 87,6 in 92,5 %, naš vzorec jo ima 92,4 %. Viskoznost 1-odstotne raztopine v 1-odstotni očetni kislini ima med 351 in 750 mPas, v našem primeru 498 mPas (25).

- Hitosan 95/500 (*Chitosan 95/500*, HMC+, Nemčija) (Š: 23706, K.Š.: 212-270616-02).

Je v obliki belega do svetlo rumenega prahu, ki ima velik volumen. Delci so lebdeči. Stopnjo deacetilacije ima višjo od 92,6 %, v našem primeru 95,2 %. Viskoznost 1-odstotne raztopine v 1-odstotni očetni kislini ima med 351 in 750 mPas, v našem primeru 367 mPas (25).

3.1.2 Katalizator sol-gel prehoda

- β -glicerofosfat (*β -glycerophosphate disodium salt hydrate*, Sigma-Aldrich, Nemčija).

Je bel prašek, brez vonja. Pri izdelavi temperaturno odzivnih hidrogelov se uporablja kot katalizator. Je šibka baza, ki vsebuje manj kot 1,0 mol % L- α -izomera in manj kot 0,1 % anorganskega fosfata (24).

3.1.3 Reagenti in topila

- *Prečiščena in bidestilirana voda*: pripravljena na Fakulteti za farmacijo Ljubljana.
 - Očetna kislina 100 % (*acetic acid (glacial)*, Merck, Nemčija).
- Je bistra tekočina, ostrega vonja.

3.2 Aparature

- Precizna tehtnica XS205 DualRange (Mettler Toledo, Švica)
- Magnetno mešalo IKA RO 15 power (IKA Werke GmbH & Co. KG, Nemčija)
- Vortex vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- pH meter SevenCompact (Mettler Toledo, Švica)
- vodna kopel GFL (Electra bema d.o.o., Slovenija)
- pipeta Biohit m200, m1000, m5000 (Sartorius AG, Nemčija)
- Rotor-stator homogenizator Omni PDH (Omni International, Združene države Amerike)
- reometer Physica MCR 301 (Anton Paar GmbH, Avstrija)

3.3 Izdelava hidrogelov

3.3.1 Priprava raztopin

Za izdelavo hidrogelov smo potrebovali termoodzivni polimer, katalizator, topilo za polimer in prečiščeno vodo. Kot termoodzivni polimer smo uporabili hitosane, katalizator sol-gel prehoda je bil β -glicerofosfat, kot topilo za polimer pa smo uporabili 0,1 M očetno kislino. Uporabili smo hitosane z majhni, srednjo in veliko molekulsko maso, hitosana z

visoko stopnjo deacetilacije, poleg tega pa še hitosan iz lupin kozic in hitosan iz rakovih lupin.

Za izdelavo hidrogelov smo potrebovali raztopino hitosana in raztopino β -GP. Predhodno smo pripravili raztopino 0,1 M očetne kisline. V eno čašo smo natehtali 0,1 M očetno kislino in hitosan ter mešali na magnetnem mešalu vsaj eno uro oziroma dokler se hitosan ni raztopil. Ves čas mešanja smo imeli čašo pokrito s parafilmom, da ne bi prišlo do izhlapevanja vode iz raztopine. V drugo čašo smo natehtali vodo in β -GP, pokrili s parafilmom in mešali na magnetnem mešalu, dokler nismo dobili bistre raztopine. Pripravljeni raztopini smo na ledu ohlajali vsaj 15 minut.

0,1 M raztopino očetne kisline smo pripravili iz 1 M očetne kisline, to pa iz 100-odstotne očetne kisline po naslednjih recepturah:

- 1 M očetna kislina (1 M CH_3COOH)
5,7 mL 100-odstotne očetne kisline / 100 mL H_2O
- 0,1 M očetna kislina (0,1 M CH_3COOH)
10 mL 1 M CH_3COOH / 100 mL H_2O

Za izdelavo hidrogelov smo predhodno pripravili 1,0 %, 1,6 %, 1,8 %, 2,0 % in 2,2 % (m/m) raztopine hitosana v 0,1 M očetni kislini ter 40 %, 45 % in 50 % (m/m) raztopine β -GP v prečiščeni vodi.

3.3.2 Izdelava hidrogelov

Hladni raztopini hitosana in β -GP smo združili. Ker smo iskali optimalen postopek za izdelavo hidrogelov, smo za združevanje uporabili več postopkov.

V prvem postopku smo hladno raztopino hitosana natehtali v čašo ter po kapljicah med mešanjem na magnetnem mešalu dodajali hladno raztopino β -GP. Po celotnem dodatku smo vzorec mešali še nekaj minut. Izdelan vzorec smo do nadaljevanja postopka hranili v ledeni kopeli.

V drugem postopku smo zmanjšali količino vzorca in ga pripravili v eppendorf epruvetki. V eppendorf epruvetko smo natehtali hladno raztopino hitosana in med mešanjem na stresalniku po kapljicah dodajali hladno raztopino β -GP. Po izdelavi smo vzorec hladili na ledeni kopeli.

V tretjem postopku pa smo za mešanje uporabili homogenizator. Združili smo hladni raztopini hitosana in β -GP ter s homogenizatorjem mešali najprej 5 min pri 10000 rpm in ker ni bilo dobro zmešano, smo vsebino ohladili na ledu in ponovno mešali 5 min pri 15000 rpm. Ker se je pri homogeniziranju vzorec segreval in je posledično geliral, smo postopek izločili iz izbire.

Hidrogele hitosan/ β -GP smo pripravili po naslednjih recepturah:

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 3:2

Raztopina hitosana	60 %
--------------------	------

Raztopina β -GP	40 %
-----------------------	------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 2:1

Raztopina hitosana	66,7 %
--------------------	--------

Raztopina β -GP	33,3 %
-----------------------	--------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 3:1

Raztopina hitosana	75 %
--------------------	------

Raztopina β -GP	25 %
-----------------------	------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 4:1

Raztopina hitosana	80 %
--------------------	------

Raztopina β -GP	20 %
-----------------------	------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 5:1

Raztopina hitosana	83,3 %
--------------------	--------

Raztopina β -GP	16,7 %
-----------------------	--------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 6:1

Raztopina hitosana	85,7 %
--------------------	--------

Raztopina β -GP	14,3 %
-----------------------	--------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 7:1

Raztopina hitosana	87,5 %
--------------------	--------

Raztopina β -GP	12,5 %
-----------------------	--------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 8:1

Raztopina hitosana	88,9 %
--------------------	--------

Raztopina β -GP	11,1 %
-----------------------	--------

- (m/m) razmerje raztopine hitosana in raztopine β -GP 16:1

Raztopina hitosana	94,1 %
--------------------	--------

Raztopina β -GP	5,9 %
-----------------------	-------

Pripravili smo hidrogelne v različnih razmerjih raztopin hitosanov in β -GP, saj smo iskali idealno kombinacijo, ki bo pri telesni temperaturi gelirala v nekaj minutah.

3.3.3 Preizkus geliranja

Pripravili smo vodno kopel, ki smo jo segreli na testno temperaturo. Čas geliranja smo začeli ugotavljati pri temperaturi, višji od telesne. Prve vzorce smo testirali pri temperaturi 50 °C, kasneje pri 40 °C in na koncu še pri telesni temperaturi, torej 37 °C. Vzorcem, izdelanim po prvi metodi, smo izmerili pH. Nato smo jih prelili v 15 mL centrifugirke. Vstavili smo jih v vročo vodno kopel in spremljali čas, ki je nujen za geliranje. Vsaki 2 minuti smo vzorce vzeli iz vodne kopeli, jih obrnili in preverili, ali so še vedno tekoči. Čas, ko vzorec ni več tekkel po centrifugirki in je bil v trdnem stanju, smo ugotovili za čas geliranja.

Vzorce, ki smo jih pripravili po drugi metodi, nismo prelili v centrifugirke, ampak smo jih pustili v eppendorf epruvcakah. Tudi te vzorce smo segrevali v vodni kopeli na 50 °C, 40 °C in 37 °C ter merili čas, ko ni bilo več prisotno pretakanje vzorca v eppendorf epruvetki.

3.3.4 Reologija

Z reološkimi meritvami smo ugotavljali temperaturo geliranja in čas geliranja vzorcev. Pripravili smo 4 vzorce, ki so se izkazali kot najbolj obetavni in na njih izvedli reološke meritve. Meritve smo izvajali na reometru Physica MCR 301. Uporabili smo merilni sistem stožca s prisekano konico in ploščico CP50-2.

Lastnosti merilnega sistema:

- Premer: 50 mm,
- Kot: 2°,
- Stožec prisekan za 210 μ m

Pripravili smo vzorce in jih hranili na ledeni kopeli oziroma v hladilniku. Pred meritvami smo vzorec nanesti na ploščico merilnega sistema, ki smo ga predhodno uravnali na želeno temperaturo, spustili stožec na merilno pozicijo, obrisali odvečno količino vzorca in začeli z meritvami. Meritve rotacijske viskozimetrije smo izvajali na sveže pripravljenih vzorcih, medtem ko smo meritve časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula izvajali naslednji dan, na vzorcih, ki smo jih čez noč shranili v hladilniku. Ob meritvah vzorci niso bili starejši od 24 ur.

Temperaturo geliranja smo ugotovili z rotacijsko viskozimetrijo, kjer smo določali viskoznost vzorcev v odvisnosti od temperature. Kot temperaturo geliranja smo določili temperaturo po nenadnem skoku viskoznosti, pri kateri viskoznost preneha naraščati. Razmere, pri katerih smo izvajali rotacijsko viskozimetrijo, so naslednje:

- Temperaturni interval: 20-40 °C,
- Število meritev: 60,
- Hitrost segrevanja: 1 °C/min,
- Strižna hitrost: 10 s⁻¹.

Čas geliranja smo ugotovili z merjenjem časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula. Določili smo ga kot prvo točko po presečišču elastičnega in viskoznega modula. Merilni sistem smo uravnali na temperaturo 20 °C, nanj nanesti vzorec in obrisali odvečni vzorec. Po začetku meritve smo nastavili temperaturo merilnega sistema na 37,5 °C in izvajali meritve. Časovni interval med posameznima točkama smo nastavili na 5 oziroma 10 s.

Razmere meritev časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula:

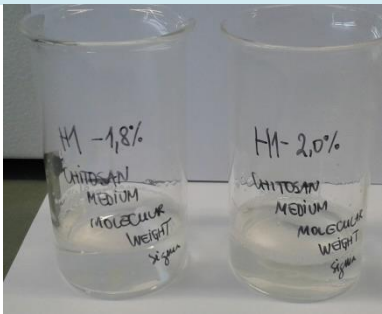
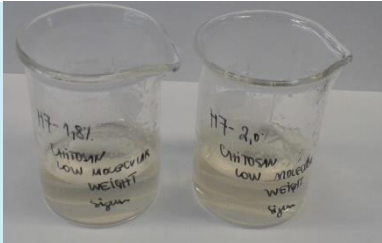
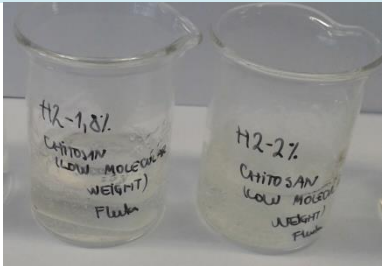
- Začetna temperatura merilnega sistema: 20 °C,
- Temperatura meritev: 37,5 °C,
- Časovni intervali med posameznima točkama: 10 s oziroma 5 s,
- Število merilnih točk: 60 oziroma 80,
- Strižna deformacija: 0,2 %,
- Frekvenca: 1 Hz.

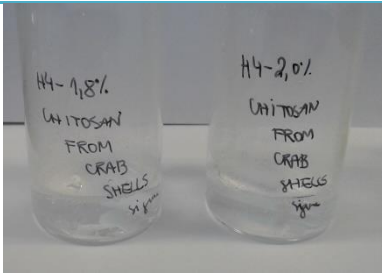
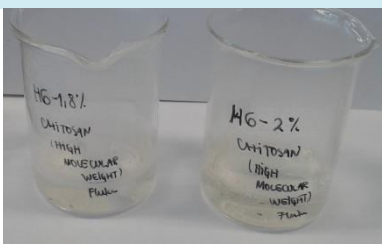
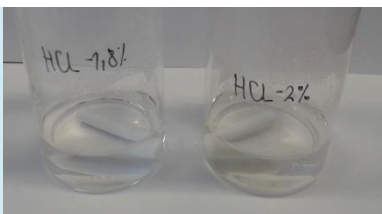
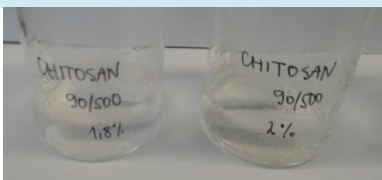
4 Rezultati in razprava

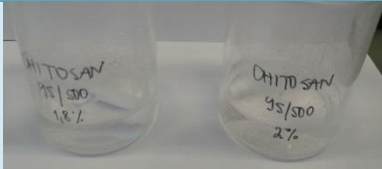
4.1 Izbira hitosanov za izdelavo hidrogelov

Prvi korak pri našem eksperimentalnem delu je bila izbira primernih hitosanov za izdelavo hidrogelov. Na izbiro smo imeli hitosane, ki so prikazani v tabeli VI. Najprej smo iz naštetih hitosanov pripravili raztopine in iz tistih, ki niso bile previskozne nato pripravili hidrogele.

Tabela VI: Opisi videzov 1,8-odstotnih (m/m) in 2,0-odstotnih (m/m) raztopin različnih hitosanov in njihove slike.

Vrsta hitosana	Videz raztopine hitosana		Slika 1,8 in 2,0 % raztopine hitosana
	1,8 % (m/m)	2,0 % (m/m)	
Hitosan srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich)	Bistra, tekoča, malo viskozna	Bistra, tekoča, malo viskozna – rahlo bolj kot 1,8 % (m/m)	
Hitosan majhno molekulsko maso (Sigma-Aldrich)	Rahlo rumenkasta, tekoča	Rahlo rumenkasta, tekoča	
Hitosan majhno molekulsko maso (Fluka)	Rahlo rumenkasta – motna, viskozna, vendar še rahlo teče, vidne nečistote	Rahlo rumenkasta – motna, viskozna bolj kot 1,8 % (m/m), še rahlo teče, vidne nečistote	
Hitosan iz lupin kozic	Tekoča, rahlo rumenkasta, malo viskozna	Tekoča, rahlo rumenkasta, malo bolj viskozna kot 1,8 % (m/m)	

Hitosan iz lupin rakov	Bistra, zelo viskozna, preveč viskozna za uporabo	Bistra, še bolj viskozna kot 1,8 % (m/m), preveč viskozna za uporabo	
Hitosan srednje molekulsko maso (Fluka)	Malo viskozna, rahlo rumena, vidne nečistote, tekoča	Rahlo rumena, malo viskozna, vidne nečistote, manj tekoča kot 1,8 % (m/m)	
Hitosan z veliko molekulsko maso	Bistra, viskozna, veliko nečistot	Bistra, še bolj viskozna kot 1,8 % (m/m), veliko nečistot	
Srednje viskozen hitosan	Rahlo rumena, viskozna, še teče	Rahlo rumena, bolj viskozna kot 1,8 % (m/m), še vedno teče	
Hitosan z veliko viskoznostjo	Rahlo rumena, viskozna	Rahlo rumena, še bolj viskozna kot 1,8 % (m/m)	
Hitosan klorid	Bistra, tekoča	Bistra, tekoča	
Hitosan 90/500	Bistra, tekoča, malo viskozna, po 1 h raztapljanja še nekaj neraztopljenih delov	Bistra, po 1 h raztapljanja neraztopljeni delci – več jih je kot pri 1,8 % (m/m), malo viskoznejša od 1,8 % (m/m)	

Hitosan 95/500	Bistra, tekoča, po 1 h raztapljanja še neraztopljeni delci, malo viskozna	Bistra, po 1 h raztapljanja še niso raztopljeni vsi delci, malo bolj viskozna kot 1,8 % (m/m)	
----------------	---	---	---

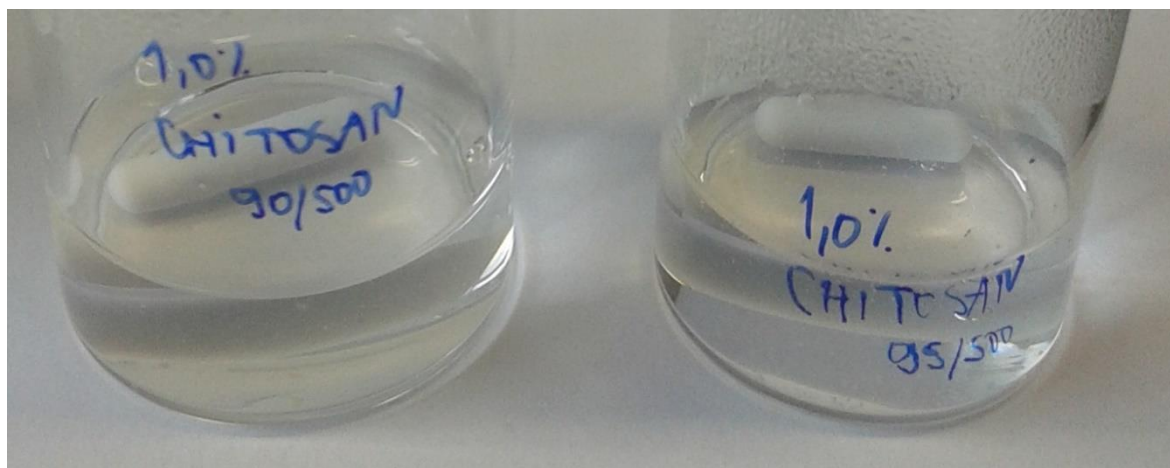
V tabeli VI so prikazani opisi in slike raztopin hitosanov v 1,8- in 2,0-odstotnih (m/m) koncentracijah. Glede na videz raztopin smo se odločili, da so primerni za nadaljnje testiranje hitosan s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich), hitosan iz lupin kozic in hitosan s srednjo molekulsko maso (Fluka). Omenjeni hitosani so dajali v obeh koncentracijah malo viskozne raztopine. Bistre, neviskozne raztopine so nastale tudi iz hitosana z majhno molekulsko maso (Sigma-Aldrich) in iz hitosan klorida, vendar smo predvidevali, da bi vzorci pripravljeni iz takih raztopin za geliranje potrebovali preveč časa. Iz hitosana z majhno molekulsko maso (Fluka), hitosana iz lupin rakov, hitosana z veliko molekulsko maso, srednje viskoznega hitosana in hitosana z veliko viskoznostjo so nastale preveč viskozne raztopine, ki so bile le rahlo tekoče ali sploh netekoče. Prevelika viskoznost raztopin hitosanov ni primerna, saj smo potrebovali vzorce, ki so pri sobni temperaturi tekoči in gelirajo pri povišanju temperature na telesno temperaturo. Za rešitev tega problema bi lahko zmanjšali koncentracijo raztopin hitosanov, vendar so nekatere izmed zgoraj omenjenih raztopin vsebovale tudi nečistote, kar ni primerno za subkutano aplikacijo, zato smo jih že na podlagi tega izločili. Tudi raztopina hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka) je vsebovala nekaj nečistot. Kljub temu smo se odločili, da jo izberemo za pripravo hidrogelov in preizkus geliranja, saj je raztopina imela primerno viskoznost. Če bi se ta hitosan izkazal kot primeren, bi po pripravi raztopine hitosana to prefiltrirali in s tem odstranili nečistote.

Iz hitosana 90/500 in hitosana 95/500 tudi po večurnem mešanju na magnetnem mešalu nismo uspeli pripraviti raztopin. Še najbližje temu smo bili pri pripravi 1,8-odstotne (m/m) raztopine hitosana 90/500, kjer je po raztopini plavalo še nekaj neraztopljenih delcev. Pri drugih treh vzorcih je bilo neraztopljenih delcev občutno več. Zato smo se glede na podatek, ki ga je posredoval proizvajalec hitosana, da so viskoznost ugotovili pri 1-odstotni raztopini hitosana v 1-odstotni očetni kislini, odločili, da pripravimo 1,0-odstotne (m/m)

raztopine omenjenih dveh hitosanov. Opisa videzov raztopin sta podana v tabeli VII in prikazana na sliki 8.

Tabela VII: Videz raztopin izbranih vrst hitosana v različnih koncentracijah (% m/m).

Vrsta hitosana	Koncentracija raztopine [% (m/m)]	Videz raztopine hitosana
Hitosan s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich)	1,6	Bistra, tekoča, malo viskozna
Hitosan s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich)	2,2	Bistra, tekoča, bolj viskozna kot 1,6; 1,8 in 2,0 % (m/m)
Hitosan 90/500	1,0	Bistra, tekoča, malo viskozna
Hitosan 95/500	1,0	Tekoča, bistra, malo viskozna



Slika 8: Videz raztopin hitosana 90/500 in hitosana 95/500 v 1,0-odstotni (m/m) koncentraciji.

V tabeli VII sta poleg opisov videza raztopin hitosana 90/500 in hitosana 95/500 v 1,0-odstotni (m/m) koncentraciji tudi opisa videzov raztopin hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) v 1,6- in 2,2-odstotni (m/m) koncentraciji. Ker smo iz vseh drugih hitosanov pripravili raztopine v 1,8- in 2,0-odstotni (m/m) koncentraciji, smo iz hitosana, ki se nam je zdel najobetavnejši pripravili tudi malo manjšo in malo večjo, torej 1,6- in 2,2-odstotno (m/m) raztopino. S tem smo preizkusili, kako se spreminja videz in viskoznost s spreminjanjem koncentracije hitosana. Iz primerjave vidimo, da se z večanjem koncentracije hitosana v raztopini povečuje viskoznost (6), vendar to povečanje ni veliko. Če bi naredili meritve z viskozimetrom, bi bile razlike verjetno opazne, pri organoleptični ocenitvi pa te razlike niso toliko opazne. Največjo razliko pri primerjavi viskoznosti

vidimo med 1,6- in 2,2-odstotno (m/m) raztopino hitosana, med drugimi so te razlike majhne.

Na podlagi ocenjene viskoznosti raztopin hitosanov in izdelanih hidrogelov, smo se odločili, katerim vzorcem bomo poskušali ugotoviti čas geliranja. Začeli smo ugotavljati čas geliranja pri višji temperaturi od telesne. Najprej smo merili čas geliranja pri temperaturi okrog 50 °C. Nato smo vzorcem, ki so pri višjih temperaturah gelirali, postopoma zmanjševali temperaturo testiranja do končne temperature, ki je bila v okolici telesne temperature, torej 37 °C ± 2 °C.

4.2 Hidrogeli iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich)

4.2.1 Čas geliranja pri 50 °C in 40 °C

Glede na molekulsko maso hitosanov, viskoznost, stopnjo deacetilacije in videz raztopin hitosanov, smo se odločili, da damo na prvi stopnji največji poudarek razvoju hidrogela s hitosanom s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich). Pripravljene vzorce smo segrevali v vodni kopeli na okrog 50 °C in vrednotili čas do geliranja. V tabeli VIII so prikazani časi geliranja vzorcev pri najvišji temperaturi testiranja, torej pri temperaturi okrog 50 °C.

Tabela VIII: Časi geliranja vzorcev z različnimi (1,6-; 1,8- in 2,0-odstotnimi m/m) koncentracijami raztopin hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) in enako (40-odstotno m/m) koncentracijo raztopine β -GP pri temperaturi 50 °C.

Oznaka vzorca	koncentracija hitosana [% (m/m)]	koncentracija β -GP [% (m/m)]	Masno razmerje obeh raztopin	T testiranja [°C]	Čas geliranja
H1-1,6 %-40 %-(2:1)	1,6	40	2:1	50	4 min
H1-1,6 %-40 %-(3:1)	1,6	40	3:1	50	>1 h
H1-1,6 %-40 %-(4:1)	1,6	40	4:1	50	>1 h
H1-1,8 %-40 %-(3:2)	1,8	40	3:2	50	2 min
H1-1,8 %-40 %-(2:1)	1,8	40	2:1	50	6 min 15 s
H1-1,8 %-40 %-(3:1)	1,8	40	3:1	50	36 min
H1-1,8 %-40 %-(4:1)	1,8	40	4:1	50	51 min
H1-1,8 %-40 %-(5:1)	1,8	40	5:1	50	1h 50 min
H1-1,8 %-40 %-(6:1)	1,8	40	6:1	50	>2 h
H1-2,0 %-40 %-(2:1)	2,0	40	2:1	50	5 min

Oznaka vzorca	koncentracija a hitosana [% (m/m)]	koncentracija β -GP [% (m/m)]	Masno razmerje obeh raztopin	T testiranja [°C]	Čas geliranja
H1-2,0 %-40 %- (3:1)	2,0	40	3:1	50	14 min 30 s
H1-2,0 %-40 %- (4:1)	2,0	40	4:1	50	26 min
H1-2,0 %-40 %- (5:1)	2,0	40	5:1	50	33 min
H1-2,0 %-40 %- (6:1)	2,0	40	6:1	50	50 min
H1-2,0 %-40 %- (8:1)	2,0	40	8:1	50	>1h 10 min

Rezultati v tabeli VIII prikazujejo koncentraciji raztopine hitosana in raztopine β -GP, masno-masno razmerje med raztopinama hitosana in β -GP, temperaturo, pri kateri smo preskušali geliranje in čas do geliranja. Čas geliranja je v vseh primerih najkrajši pri najnižjem masnem razmerju med raztopinama hitosana in β -GP.

Vzorci z 1,6-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP vsebujejo najmanjši koncentraciji tako hitosana kot tudi β -GP. Čas, ki je nujen za geliranje smo uspeli ugotoviti le pri najnižjem razmerju med raztopinama hitosana in β -GP, torej pri 2:1, kjer je bil 4 minute. Pri večjih razmerjih je bil čas geliranja že daljši od 1 ure, zato smo predvidevali, da bi se z znižanjem temperature ta čas še podaljšal. Le pri masnem razmerju 2:1 med raztopino hitosana in raztopino β -GP ima prej omenjeni vzorec najkrajši čas geliranja v primerjavi z vzorcema z 1,8- in 2,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP. Vzorec bi lahko predstavljal eno izmed možnosti za testiranje pri znižani temperaturi ter primeren čas geliranja pri 37 °C. Kot pa je razvidno iz tabele IX, se je čas geliranja z znižanjem temperature na 40 °C znatno podaljšal. Pri omenjeni temperaturi nam časa geliranja ni uspeli ugotoviti, saj je bil daljši od 1 ure, torej vzorec ni primeren za testiranje pri telesni temperaturi.

Tabela IX: Primerjava časov geliranja vzorcev z različnimi koncentracijami raztopin hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) in 40-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP pri temperaturi 50 °C in 40 °C.

Oznaka vzorca	Čas geliranja pri 50 °C	Čas geliranja pri 40 °C
H1-1,6 %-40 %-(2:1)	4 min	>1 h
H1-1,8 %-40 %-(3:2)	2 min	>30 min
H1-1,8 %-40 %-(2:1)	6 min 15 s	>1 h 10 min
H1-2,0 %-40 %-(2:1)	5 min	>50 min

Pri vzorcih z 1,8-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP imata dva vzorca čas geliranja pri 50 °C krajši od 10 min, kar bi lahko predstavljalo možnost za testiranje pri telesni temperaturi. To sta vzorca H1-1,8 %-40 %-(3:2), ki ima čas geliranja 2 minuti ter H1-1,8 %-40 %-(2:1), katerega čas geliranja je 6 min 15 s. Z znižanjem temperature na 40 °C se je pri obeh ta čas močno podaljšal, kar je razvidno iz tabele IX. V obeh primerih nam točnega časa geliranja ni uspelo ugotoviti, saj je čas, ki je daljši od 30 min, že predolg.

Vzorec z razmerjem 2:1 med 2,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP je imel čas geliranja pri 50 °C 5 minut in bi lahko bil primeren kandidat za testiranje pri nižjih temperaturah. Vendar kot je razvidno iz tabele IX, se je pri temperaturi 40 °C čas geliranja znatno podaljšal in vzorec smo lahko izločili iz nabora možnih primernih vzorcev.

Naraščanje razmerja med raztopinama hitosana in β -GP vpliva na čas geliranja. Večje, kot je razmerje, daljši je čas, ki ga vzorec potrebuje za geliranje. To je vidno v primeru vseh treh kombinacij, tako pri 1,6-odstotni (m/m) raztopini hitosana in 40-odstotni (m/m) raztopini β -GP, 1,8-odstotni (m/m) raztopini hitosana in 40-odstotni (m/m) raztopini β -GP ter pri 2,0-odstotni (m/m) raztopini hitosana in 40-odstotni (m/m) raztopini β -GP. V setih vzorcev z 1,8- in 2,0-odstotno (m/m) koncentracijo čas narašča postopoma, najkrajši je pri razmerju med raztopino hitosana in raztopino β -GP 2:1 ter se podaljšuje s povečevanjem razmerja. Pri setu vzorcev z 1,6-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana ne moremo govoriti o postopnem daljšanju časa geliranja s povečevanjem razmerja med raztopinama, saj so časi pri razmerjih, večjih od 3:1, predolgi in jih nismo ugotovili.

Iz zgoraj omenjenih dejstev lahko sklepamo in zaključimo, da na čas geliranja vpliva razmerje med raztopinama hitosana in β -GP. Krajši čas za geliranje je nujen pri nižjih razmerjih, z višanjem razmerja se čas, nujen za geliranje pri isti temperaturi, podaljšuje.

Tabela X: Časi geliranja vzorcev z enakimi (1,8- oziroma 2,0-odstotnimi m/m) koncentracijami raztopin hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) in različnimi (40-, 45- ali 50-odstotnimi m/m) koncentracijami raztopin β -GP pri temperaturi 50 °C.

Oznaka vzorca	koncentracija hitosana [% (m/m)]	koncentracija β -GP [% (m/m)]	Masno razmerje obeh raztopin	T testiranja [°C]	Čas geliranja
H1-1,8 %-40 %-(2:1)	1,8	40	2:1	50	6 min 15 s
H1-1,8 %-40 %-(3:1)	1,8	40	3:1	50	36 min
H1-1,8 %-45 %-(2:1)	1,8	45	2:1	50	3 min
H1-1,8 %-45 %-(3:1)	1,8	45	3:1	50	6 min
H1-2,0 %-40 %-(4:1)	2,0	40	4:1	50	26 min
H1-2,0 %-40 %-(5:1)	2,0	40	5:1	50	33 min
H1-2,0 %-40 %-(6:1)	2,0	40	6:1	50	50 min
H1-2,0 %-40 %-(8:1)	2,0	40	8:1	50	>1h 10 min
H1-2,0 %-50 %-(4:1)	2,0	50	4:1	50	12 min
H1-2,0 %-50 %-(5:1)	2,0	50	5:1	50	16 min
H1-2,0 %-50 %-(6:1)	2,0	50	6:1	50	19 min
H1-2,0 %-50 %-(8:1)	2,0	50	8:1	50	51 min

V tabeli X so zbrani podatki o času geliranja vzorcev v različnih razmerjih med enakimi koncentracijami raztopin hitosana in različnimi koncentracijami raztopin β -GP.

Pri vzorcih z 1,8-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana in različno koncentracijo raztopine β -GP smo ugotovili razlike v času, nujnem za geliranje. Pri razmerju med raztopino hitosana in raztopino β -GP 2:1 je čas geliranja vzorca s 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP samo 3 minute, pri 40-odstotni (m/m) raztopini β -GP pa 6 min 15 s. Razlika je še večja pri razmerju 3:1, kjer ima vzorec s 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP čas geliranja 6 min, z nižjo koncentracijo β -GP pa kar 36 min.

Vzorci z 2,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana lahko primerjamo pri razmerjih 4:1, 5:1, 6:1 in 8:1. V primeru razmerja 4:1 je čas geliranja vzorca z nižjo, torej 40-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP 26 minut, medtem ko je pri večji, 50-odstotni (m/m) koncentraciji β -GP, čas geliranja le 12 minut. Pri razmerju 5:1 ima vzorec H1-2,0 %-40 %-(5:1) čas geliranja 33 minut, vzorec H1-2,0 %-50 %-(5:1) pa 16 minut. Še večja razlika je pri vzorcih z razmerjem 6:1, kjer je razlika med časom geliranja vzorca z nižjo koncentracijo β -GP (50 min) in vzorca z večjo koncentracijo β -GP (19 min) kar 31 minut. Razlika v času geliranja pri istem razmerju med raztopinama hitosana in β -GP se povečuje z naraščanjem razmerja. Zato lahko sklepamo, da bi bila razlika v času geliranja med večjo in manjšo koncentracijo β -GP pri razmerju 8:1 še daljša od 30 minut, če bi vzorcu H1-2,0 %-40 %-(8:1) ugotovili končni čas, nujen za geliranje.

Iz prikazanih rezultatov lahko sklepamo, da so primernejše kombinacije tiste, ki imajo v primerjavi med seboj večjo koncentracijo β -GP. Večja koncentracija β -GP v disperziji spodbuja zaščitno hidracijo hitosanskih verig, zato je čas geliranja obratno sorazmeren s koncentracijo β -GP (19). Pri vzorcih z enako koncentracijo hitosana in različnimi koncentracijami β -GP imajo krajši čas geliranja vzorci z večjo koncentracijo β -GP. Hitreje pride do geliranja tudi pri vzorcih, kjer je razmerje med raztopinama hitosana in β -GP nižje. Hitrejše geliranje se je pojavilo tudi pri vzorcih, ki imajo koncentracijo hitosana večjo v primerjavi z drugimi vzorci, kar vidimo v tabeli XI. Vzorci, pripravljene z 2,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana, so gelirali hitreje kot vzorci pripravljene z 1,8-odstotno (m/m) raztopino hitosana v enakih razmerjih med obema raztopinama, kar so dokazali že Khodaverdi in sod. (19), ki so zaključili, da disperzija z večjo koncentracijo polimera gelira hitreje, kot disperzija z nižjo koncentracijo polimera. Čas geliranja in koncentracija polimera sta v obratnem sorazmerju (19). Sklepamo lahko, da tako koncentracija hitosana, kot tudi koncentracija β -GP vplivata na hitrost geliranja pri 50 °C. Poleg tega ima odločilni vpliv o času geliranja tudi razmerje med raztopinama. Pomembno je masno razmerje hitosana in β -GP v končni raztopini. Manjše, kot je razmerje, krajši je čas geliranja.

Tabela XI: Primerjava časov geliranja vzorcev pripravljenih z 1,8- in 2,0-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana. Vzorci so pripravljani s 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP in v enakih razmerjih med obema raztopinama.

Masno razmerje obeh raztopin	Čas geliranja vzorca z 1,8-odstotno koncentracijo hitosana (m/m)	Čas geliranja vzorca z 2,0-odstotno koncentracijo hitosana (m/m)
4:1	51 min	26 min
5:1	1 h 50 min	33 min
6:1	>2 h	50 min

4.2.2 Vpliv pH disperzije hitosana in β -GP na čas geliranja

Po združitvi raztopine hitosana in raztopine β -GP smo vzorcem izmerili pH. Rezultati pH-vrednosti disperzij, ki so nastale z združitvijo raztopine hitosana z 1,8-odstotno (m/m) koncentracijo in raztopine β -GP s 40-odstotno (m/m) oziroma 45-odstotno (m/m) koncentracijo so prikazani v tabeli XII. Iz tabele je razvidno, da se pH-vrednosti znižujejo s povečevanjem razmerja med raztopino hitosana in raztopino β -GP, posledično pa se podaljšuje čas, ki je nujen za geliranje pri 50 °C.

Tabela XII: pH-Vrednosti in časi geliranja pri 50 °C za disperzije hitosana in β -GP. Koncentracija hitosana je 1,8 % (m/m).

Masno razmerje raztopine hitosana in β -GP	Koncentracija β -GP [% (m/m)]	pH	Čas geliranja
3:2	40	7,38	2 min
2:1	40	7,37	6 min 15 s
3:1	40	7,16	36 min
4:1	40	6,99	51 min
5:1	40	6,83	1 h 50 min
6:1	40	6,79	> 2 h
3:2	45	7,49	2 min 30 s
2:1	45	7,30	3 min
3:1	45	7,22	6 min

pH-Vrednosti disperzij so bile v fiziološkem območju. Z naraščanjem razmerja se je pH-vrednost nižala. Pri 40-odstotni (m/m) koncentraciji β -GP je bil največji pH in najkrajši čas geliranja pri razmerju 3:2 med raztopino hitosana in raztopino β -GP. pH je bil 7,38 in je enakomerno padel do pH-vrednosti 6,79 pri razmerju 6:1. Časa geliranja pri razmerju 6:1 nismo ugotovili, saj je bil daljši kot 2 uri. pH-Vrednosti disperzije so se s spreminjanjem razmerja postopoma nižale v približno enakih intervalih.

Pri 45-odstotni (m/m) koncentraciji β -GP so se pH-vrednosti končne disperzije zniževale od začetne 7,49 pri razmerju 3:2 do 7,22 pri razmerju 3:1. V tem primeru so bile razlike med posameznimi pH-vrednostmi manjše kot pri 40-odstotni (m/m) raztopini β -GP. Najkrajši čas geliranja pri 45-odstotni (m/m) koncentraciji β -GP pa je bil 2 min 30 s, kar je tudi pri razmerju 3:2.

Tabela XIII: pH-Vrednosti in časi geliranja disperzij hitosana in β -GP. Koncentracija hitosana je 2,0 % (m/m).

Masno razmerje	Koncentracija β-GP	pH	Čas geliranja
raztopin hitosana in β-GP	[% (m/m)]		
2:1	40	7,46	5 min
3:1	40	7,30	14 min 30 s
4:1	40	7,13	26 min
5:1	40	6,98	33 min
6:1	40	6,91	50 min
8:1	40	6,74	> 1 h 10 min
4:1	50	7,12	12 min
5:1	50	7,05	16 min
6:1	50	7,01	19 min
7:1	50	6,94	21 min 30 s
8:1	50	6,85	51 min
16:1	50	6,55	> 1 h 20 min

V tabeli XIII so prikazane pH-vrednosti vzorcev z različnimi razmerji med 2,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40- oziroma 50-odstotno (m/m) raztopino β -GP ter njihovi časi geliranja. Tudi tu se enako kot pri 1,8-odstotni (m/m) raztopini hitosana pH znižuje s

povečevanjem razmerja med raztopinama. S povečevanjem razmerja med raztopinama se koncentracija β -GP v končni disperziji zmanjšuje. Večja, kot je koncentracija β -GP v končni disperziji, večji je pH končne disperzije zaradi nevtralizacije fosfatnih skupin. Zvečanje pH pri večji koncentraciji β -GP je posledica porabe H^+ ionov pri protoniranju prostih aaminskih skupin (12).

Pri vzorcih s 40-odstotni (m/m) raztopino β -GP se pH končne disperzije zmanjšuje od 7,46 pri razmerju 2:1 do 6,74 pri razmerju 8:1. Pri vzorcu z največjo vrednostjo pH je čas geliranja najkrajši (5 min) in se s povečevanjem razmerja daljša.

Pri vzorcih s 50-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP so razlike med pH-vrednostmi pri različnih razmerjih manjše. pH-Vrednost se zmanjšuje od 7,12 pri razmerju 4:1 do 6,55 pri razmerju 16:1. Razlike so v vseh primerih zelo majhne. Tudi pri teh vzorcih se čas geliranja s povečevanjem razmerja daljša.

Tako v primeru vzorcev z 2,0-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana in s 40- oziroma 50-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP, kot tudi pri vzorcih z 1,8-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana in 40-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP so najmanjše razlike v pH-vrednostih med razmerjem raztopin 5:1 in 6:1. Vzrok je v majhni razliki med vsebnostjo raztopine β -GP v končni disperziji. Pri razmerju 5:1 predstavlja raztopina β -GP 16,7 % končne mase disperzije, pri razmerju 6:1 pa predstavlja raztopina β -GP 14,3 % končne mase disperzije. Razlika med vsebnostjo raztopine β -GP v končni disperziji je 2,4 %.

Naši rezultati se ujemajo s podatki iz literature. K. Song in sod. (20) so s primerjavo pH-vrednosti glede na razmerje med raztopino hitosana in raztopino β -GP prišli do enakih zaključkov. Pripravili so 2,2-odstotno (v/v) raztopino hitosana v 0,1 M očetni kislini in 50-odstotno (m/m) raztopino β -GP. Iz pripravljenih raztopin so pripravili disperzije v različnih (v/v) razmerjih in jim izmerili pH. Ugotovili so, da se pH-vrednost znižuje s povečevanjem razmerja.

Pri primerjavi pH-vrednosti med istim razmerjem hitosan : β -GP in različno koncentracijo β -GP lahko opazimo, da je bila pH-vrednost večja pri večji koncentraciji β -GP. Če primerjamo pH pri vzorcih z 1,8-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana pri razmerju 3:2 ali 3:1 vidimo, da je pH z zvišanjem koncentracije β -GP narastel (tabela XII). Tako je imela končna disperzija v razmerju 3:2 s 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP pH 7,38,

medtem ko je imela disperzija s 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP pH-vrednost 7,49. Pri razmerju 3:1 je bila ta razlika manjša, pH-vrednost pri manjši koncentraciji β -GP je bila 7,16, medtem ko je bila pri večji koncentraciji 7,22. Tudi pri vzorcih z 2,0-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana je pri razmerjih 5:1, 6:1 ali 8:1 pH večji pri vzorcih s 50-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP (tabela XIII). Največja razlika je pri razmerju 8:1, kjer je 0,11 pH enote. Večji pH pri večji koncentraciji β -GP je v skladu z raziskavami raziskovalcev R.Ahmedi in J.D. de Bruijn (10), vendar so bile v njunem primeru razlike med vrednostmi pH večje. Večji pH pri večji koncentraciji β -GP je posledica porabe H^+ ionov pri protoniranju prostih aaminskih skupin (12).

Tabela XIV: pH-Vrednosti disperzije hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) in β -GP. Koncentracija β -GP je 40 % (m/m).

Masno razmerje raztopin hitosana in β-GP	Koncentracija hitosana [% (m/m)]		
	1,6	1,8	2,0
3:2	/	7,38	/
2:1	7,33	7,37	7,46
3:1	7,14	7,16	7,23

V tabeli XIV so prikazani rezultati pH meritev vzorcev s 40-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP in različnimi koncentracijami raztopin hitosanov v različnih razmerjih. Prikazana je primerjava vzorcev z 1,6-, 1,8- in 2,0-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana in 40-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP v masnem razmerju 2:1 in 3:1.

Pri primerjavi izmerjenih pH-jev vidimo, da se pH-vrednosti s povečevanjem koncentracije hitosana zvišujejo. V razmerju 2:1 in v razmerju 3:1 imata najnižji pH vzorca z 1,6 – odstotno (m/m) koncentracijo hitosana, največji pH pa imata vzorca z 2,0-odstotno (m/m) koncentracijo. Rezultati kažejo na trend naraščanja pH-vrednosti z naraščanjem koncentracije hitosana pri istem razmerju med raztopinama. Vendar so razlike med izmerjenimi vrednostmi majhne. Pri tako majhnih razlikah je vprašljiva ponovljivost meritev, zato bi bilo za natančnejše rezultate nujno meritve izvesti v več ponovitvah.

Iz dobljenih podatkov lahko zaključimo, da je pH-vrednost končne disperzije odvisna od koncentracije tako raztopine hitosana kot tudi raztopine β -GP in tudi od razmerja med

njima. Z večanjem razmerja med raztopinama se pH-vrednost končne disperzije zmanjšuje, navadno v majhnih intervalih. Pri istih koncentracijah raztopine hitosana imajo večjo pH-vrednost vzorci v kombinaciji z večjimi koncentracijami β -GP pri istih razmerjih. Pri isti koncentraciji raztopine β -GP in različnih koncentracijah hitosana imajo večji pH vzorci z večjo koncentracijo hitosana pri istih razmerjih. Raztopine hitosana z različno koncentracijo imajo različne pH-vrednosti, prav tako raztopine β -GP v različnih koncentracijah, kar je prikazano v tabeli XV. pH-Vrednost raztopine hitosana z nižjo koncentracijo je nižja kot pri raztopini hitosana z večjo koncentracijo. Tudi raztopina β -GP ima pri nižji koncentraciji nižji pH kot pri večji. Dodatek raztopine β -GP k raztopini hitosana dvigne pH raztopine, kar je vidno pri vseh vzorcih. Izmerjene pH-vrednosti raztopin hitosana so med 4,7 in 5,0, po dodatku β -GP pa se pH dvigne v fiziološko območje. Da pride do dviga pH v bližino fiziološkega pH, mora molarna koncentracija β -GP presegati molarno koncentracijo aaminskih skupin hitosanske verige (26). Do dviga pH v fiziološko območje pride zaradi nevtralizacijskega učinka fosfatnih skupin. Značilnost hitosanskih raztopin je, da se pri pH-vrednostih, večjih od 6,2, spremenijo v gelu podobno oborino, kar pa dodatek β -GP prepreči. Tako ostanejo raztopine hitosana v tekočem agregatnem stanju pri temperaturah nižjih od sobne tudi v fiziološko nevtralnem pH območju med 6,8 in 7,2. Ob segrevanju pa se disperzija hitosana in β -GP spremeni v gel (12, 18, 19). V disperziji hitosana in β -GP so v proces geliranja vključene tri vrste povezav, to so elektrostatske sile med amonijsko skupino v hitosanski verigi in fosfatno skupino v glicerofosfatu, vodikove vezi med hitosanskimi verigami kot posledica zmanjšane elektrostatske odbojnosti po nevtralizaciji hitosanske raztopine z glicerofosfatom ter hidrofobne interakcije med hitosanskimi verigami. Pri nižjih temperaturah imajo disperzije hitosana in glicerofosfata pH okrog 7 in se ne spremenijo takoj v gel. Do geliranja pride z zvišanjem temperature. To kaže na stabilizacijo nekaterih odbojnih sil med hitosanskimi verigami pri nižjih temperaturah, pri višjih temperaturah pa pride do oslabitve teh sil (1). Najhitreje pride do geliranja z zvišanjem temperature pri fizioloških pH-vrednostih. Pri nižjih vrednostih je čas, ki ga potrebuje sistem, da gelira daljši tudi pri višjih temperaturah od telesne. Glavni trend glede vpliva pH na čas geliranja je povsod enak, večji pH pomeni krajši čas geliranja in obratno, nižji pH pomeni daljši čas geliranja. Pri vzorcih, sestavljenih iz enakih vhodnih raztopin, se pH z večanjem razmerja zmanjšuje. Čas geliranja se podaljšuje z nižanjem pH-vrednosti sistema, kar pomeni, da

imajo ionizirane amonijske skupine v hitosanski verigi pomembno vlogo pri procesu geliranja (19).

Tabela XV: Izmerjene pH-vrednosti vstopnih raztopin.

Raztopina	Koncentracija vstopne raztopine [% (m/m)]	Izmerjena pH-vrednost vstopne raztopine
Hitosan s srednjo molekulsko maso	1,8	4,78
Hitosan s srednjo molekulsko maso	2,0	4,96
β-GP	40	9,3
βGP	50	9,8

4.2.3 Vpliv temperature na čas geliranja

Vzorci, ki smo jim pri temperaturi 50 °C ugotovili čas geliranja, krajši od 10 minut, smo naprej testirali pri temperaturi 40 °C. V tabeli IX so prikazani rezultati štirih pripravljenih hidrogelov, ki so se pri 50 °C izkazali kot potencialno primerni kandidati za testiranje pri nižjih temperaturah, vendar se je njihov čas geliranja pri testiranju pri 40 °C znatno podaljšal, zato ga nismo natančno ugotovili. Dva vzorca, ki sta prikazana v tabeli XVI, sta imela čas geliranja pri 50 °C krajši od 10 minut. Tudi pri testiranju pri 40 °C je bil čas krajši od 10 min, zato smo ju testirali tudi pri telesni temperaturi (tabela XVI).

Tabela XVI: Spreminjanje časa geliranja v odvisnosti od temperature.

Oznaka vzorca	Čas geliranja pri 50 °C	Čas geliranja pri 40 °C	Čas geliranja pri 37 °C
H1-1,8 %-45 %-(3:2)	2 min 30s	10 min	>30 min
H1-1,6 %-45 %-(3:2)	3 min	8 min	>30 min

Dva vzorca, pripravljena v razmerju 3:2 med raztopino hitosana in raztopino β-GP smo testirali pri temperaturah 50 °C, 40 °C in 37 °C. Koncentracija β-GP je bila v obeh primerih 45-odstotna (m/m). V prvem primeru je bila koncentracija hitosana 1,8-odstotna (m/m), v drugem pa 1,6-odstotna (m/m).

Pri vzorcu H1-1,8 %-45 %-(3:2) je bil čas geliranja pri 50 °C le 2 min 30 s. Pri temperaturi vodne kopeli 40 °C se je čas geliranja podaljšal na 10 min. Pri testiranju pri telesni temperaturi pa točnega časa nismo ugotovili, saj po 30 minutah testiranja vzorec še ni geliral. Kljub obetavni napovedi, da bo vzorec v ustreznem času geliral, pri telesni temperaturi do tega ni prišlo.

Tudi pri vzorcu H1-1,6 %-45 %-(3:2) je bila situacija podobna. Pri 50 °C smo vzorcu ugotovili čas geliranja 3 minute. Čas geliranja pri 40 °C je bil krajši kot pri vzorcu H1-1,8 %-45 %-(3:2), bil je 8 minut. Kljub temu pa je bil čas geliranja pri 37 °C oziroma telesni temperaturi daljši od 30 minut, kar je neustrezno.

Do geliranja pri temperaturi, višji od sobne temperature, pride, ker se pri segrevanju odstranijo vodni ovoji okrog hitosanskih verig. Pri tem pride do prenosa protonov iz protoniranih aminokislin na glicerofosfat. S tem se olajša nastanek hidrofobnih interakcij med hitosanskimi verigami in s tem se omogoči sol-gel prehod (3).

4.2.4 Čas geliranja vzorcev pri večji koncentraciji hitosana (2,2 % m/m)

Glede na podatke, ki smo jih dobili pri testiranju vzorcev z 1,6-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40- oziroma 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP, vzorcev z 1,8-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40- oziroma 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP ter vzorcev z 2,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana in 40- oziroma 50-odstotno (m/m) raztopino β -GP, noben vzorec ne ustreza zahtevi, da hidrogel gelira pri telesni temperaturi. Testirane vzorce smo pripravili po prvi metodi, torej smo pripravili večje količine vzorcev v čaši. Nadalje smo poskusili pripraviti vzorce še v drugačnih kombinacijah, zvišali smo koncentracijo raztopine hitosana. Za pripravo nekaterih vzorcev smo uporabili drugo metodo, pri kateri smo vzorce pripravili v manjši količini v eppendorf epruvetki. Vzorce smo testirali pri temperaturi 40 °C in tiste, ki so imeli primeren čas geliranja tudi pri 37 °C.

Tabela XVII: Čas geliranja vzorcev z 2,2-odstotno (m/m) koncentracijo raztopine hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) pri temperaturi 40 °C.

Oznaka vzorca	Koncentracija hitosana (m/m)]	Koncentracija β -GP [% (m/m)]	Masno razmerje obeh raztopin	Čas geliranja pri 40 °C
H1-2,2 %-40 %-(2:1)	2,2	40	2:1	10 min 30 s
H1-2,2 %-40 %-(3:1)	2,2	40	3:1	27 min
H1-2,2 %-45 %-(2:1)	2,2	45	2:1	6 min 30 s
H1-2,2 %-45 %-(3:1)	2,2	45	3:1	27 min 30 s
H1-2,2 %-45 %-(4:1)	2,2	45	4:1	>30 min
H1-2,2 %-50 %-(2:1)	2,2	50	2:1	5 min
H1-2,2 %-50 %-(3:1)	2,2	50	3:1	4 min

V tabeli XVII so prikazani rezultati ugotovljenih časov geliranja pri 40 °C za vzorce z 2,2-odstotno (m/m) koncentracijo raztopine hitosana in 40-, 45- ali 50-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP pri temperaturi vodne kopeli 40 °C. Primerjamo lahko vzorce z enako koncentracijo hitosana in enako koncentracijo β -GP v različnih razmerjih ter vzorce z enako koncentracijo hitosana in različnimi koncentracijami β -GP v enakih razmerjih.

Pri primerjavi vzorcev z 2,2-odstotno (m/m) koncentracijo hitosana in 40-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP v različnih razmerjih vidimo, da se z večanjem razmerja med raztopinama podaljšuje čas geliranja. Pri razmerju 2:1 je čas geliranja 10 min 30 s, medtem ko je pri razmerju 3:1 čas geliranja 27 min. Še boljše primerjalne rezultate imamo pri vzorcih s 45-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP, kjer smo pripravili vzorce v treh različnih razmerjih. Pri najmanjšem razmerju 2:1 je čas geliranja najkrajši in sicer 6 min 30 s. S povečanjem razmerja na 3:1 se je čas geliranja podaljšal na 27 min 30 s. Pri razmerju 4:1 pa časa geliranja nismo ugotovili, saj je bil daljši od 30 minut in torej najdaljši.

Najboljšo primerjavo vzorcev z enako koncentracijo hitosana in različnimi koncentracijami β -GP v istem razmerju lahko naredimo s primerjavo vzorcev v razmerju 2:1. Vzorec H1-2,2 %-40 %-(2:1) ima čas geliranja 10 min 30 s, vzorec H1-2,2 %-45 %-(2:1) 6 min 30 s in vzorec H1-2,2 %-50 %-(2:1) 5 min. S povečevanjem koncentracije raztopine β -GP se čas geliranja krajša.

Kot pri temperaturi geliranja 50 °C lahko tudi pri nižji temperaturi geliranja, torej pri 40 °C zaključimo, da se pri isti koncentraciji tako raztopine hitosana kot tudi raztopine β -GP s povečevanjem razmerja med raztopinama podaljšuje čas geliranja. Ta je pri istem razmerju med raztopinama odvisen od koncentracije β -GP, če je koncentracija hitosana enaka pri vzorcih, ki jih primerjamo. Rezultati so v skladu s prej omenjenimi dognanji raziskovalcev (19), v skladu s katerimi so bili tudi rezultati vzorcev, testiranih pri 50 °C. Zaključimo lahko, da nižja temperatura testiranja ne vpliva na značilno vedenje hidrogelov pri segrevanju na želeno temperaturo. Po določenem času pride do geliranja, če je vzorec primerno temperaturno občutljiv. Razmerje med raztopinama in koncentracije raztopin pa vplivajo na čas geliranja enako kot pri višji temperaturi testiranja.

4.3 Hidrogeli iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka) in hitosana iz lupin kozic

Ker se hidrogeli iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) niso izkazali za potencialno primerne kandidate za testiranje geliranja pri telesni temperaturi, smo poskusili pripraviti hidrokele iz drugih hitosanov, ki smo jih imeli na voljo in so bile njihove raztopine primerne tako po viskoznosti kot tudi po splošnem videzu.

Vzorci smo pripravili iz hitosana iz lupin kozic in iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka). Pripravili smo kombinacije vzorcev v 1,8- in 2,0-odstotni (m/m) koncentraciji raztopine hitosana skupaj s 40- oziroma 45-odstotno (m/m) koncentracijo raztopine β -GP. Pripravljene disperzije so bile v razmerju raztopin 2:1, 3:1 ali 4:1. Najprej smo testirali čas geliranja pri temperaturi 40 °C, rezultati česar so prikazani v tabeli XVIII.

Tabela XVIII: Časi geliranja pri 40 °C vzorcev pripravljenih iz hitosana iz lupin kozic (oznaka vzorcev H3) in iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka) (oznaka vzorcev H5).

Oznaka vzorca	koncentracija hitosana [% m/m]	koncentracija β -GP [% m/m]	Masno razmerje obeh raztopin	Čas geliranja pri 40°C
H3-1,8 %-40 %-(3:1)	1,8	40	3:1	28 min
H3-1,8 %-45 %-(2:1)	1,8	45	2:1	17 min
H3-1,8 %-45 %-(3:1)	1,8	45	3:1	26 min
H3-1,8 %-45 %-(4:1)	1,8	45	4:1	38 min
H3-2,0 %-40 %-(2:1)	2,0	40	2:1	10 min
H3-2,0 %-40 % (3:1)	2,0	40	3:1	14 min

Oznaka vzorca	koncentracija hitosana m/m]	koncentracija β -GP m/m]	Masno razmerje obeh raztopin	Čas geliranja pri 40°C
H3-2,0 %-40 %-(4:1)	2,0	40	4:1	>30 min
H3-2,0 %-45 %-(2:1)	2,0	45	2:1	10 min
H5-1,8 %-45 %-(2:1)	1,8	45	2:1	8 min
H5-1,8 %-45 %-(3:1)	1,8	45	3:1	22 min
H5-1,8 %-45 %-(4:1)	1,8	45	4:1	>45 min
H5-2,0 %-45 %-(2:1)	2,0	45	2:1	6 min
H5-2,0 %-45 %-(3:1)	2,0	45	3:1	12 min
H5-2,0 %-45 %-(4:1)	2,0	45	4:1	32 min

S primerjavo pripravljenih vzorcev opazimo, da se s povečevanjem razmerja med raztopinama hitosana in β -GP podaljšuje čas geliranja. To vidimo pri vzorcih iz hitosana iz lupin kozic z 1,8-odstotno (m/m) koncentracijo in 45-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP oziroma pri 2,0-odstotni raztopini omenjenega hitosana in 40-odstotni (m/m) raztopini β -GP. Tudi pri obeh setih vzorcev iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka) se čas geliranja podaljšuje s povečevanjem razmerja med raztopinama.

Časi geliranja vzorcev z isto koncentracijo β -GP in različno koncentracijo hitosana v enakem razmerju se med seboj razlikujejo. Pri hitosanu iz lupin kozic to vidimo pri vzorcih H3-1,8 %-40 %-(3:1), ki ima čas geliranja 28 min in H3-2,0 %-40 %-(3:1), ki ima čas geliranja 14 min. Tudi vzorca H3-1,8 %-45 %-(2:1) in H3-2,0 %-45 %-(2:1) se razlikujeta v časih geliranja, daljši je pri vzorcu z nižjo koncentracijo raztopine hitosana.

Pri primerjavi vzorcev z isto koncentracijo raztopine hitosana in različno koncentracijo raztopine β -GP vidimo, da se čas geliranja skrajša, če je vzorec pripravljen iz raztopine β -GP z večjo koncentracijo. To je vidno pri vzorcih H3-1,8 %-40 %-(3:1) (28 min) in H3-1,8 %-45 %-(3:1) (26 min). Razlika je sicer minimalna, vendar nakazuje, kakšno je vedenje vzorcev z različnimi koncentracijami komponent.

Iz dobljenih podatkov lahko zaključimo, da se tudi pri temperaturi 40 °C vzorci vedejo enako kot pri temperaturi 50 °C. S povečevanjem razmerja med raztopinama hitosana in β -GP se čas segrevanja, nujen za geliranje, daljša. Pri istem razmerju med raztopinama, pri

isti koncentraciji β -GP in pri različnih koncentracijah hitosana pa se čas geliranja z večanjem koncentracije hitosana krajša. Tudi s povečevanjem koncentracije raztopine β -GP in pri enaki koncentraciji hitosana se čas geliranja pri istem razmerju med raztopinama krajša.

4.4 Časi geliranja vzorcev pri temperaturi 37 °C

Vzorcem, ki smo jim pri 40 °C ugotovili primeren čas geliranja, v večini primerov krajši od 15 minut, smo poskusili ugotoviti čas geliranja pri temperaturi vodne kopeli 37 °C. Vzorci so bili pripravljene iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich) (2,2-odstotna (m/m) raztopina), iz hitosana iz lupin kozic in iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka).

Tabela XIX: Časi geliranja vzorcev pripravljenih iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Sigma-Aldrich), iz hitosana iz lupin kozic in iz hitosana s srednjo molekulsko maso (Fluka) pri temperaturi 40 °C in 37 °C.

Oznaka vzorca	Čas geliranja pri 40 °C	Čas geliranja pri 37 °C
H1-2,2 %-40 %-(2:1)	10 min 30 s	15 min
H1-2,2 %-45 %-(2:1)	6 min 30 s	11 min
H3-1,8 %-45 %-(2:1)	17 min	24 min
H3-2,0 %-40 %-(2:1)	10 min	11 min 15 s
H3-2,0 %-40 %-(3:1)	14 min	19 min
H3-2,0 %-45 %-(2:1)	10 min	14 min
H5-1,8 %-45 %-(2:1)	8 min	26 min
H5-1,8 %-45 %-(3:1)	22 min	36 min
H5-2,0 %-45 %-(2:1)	6 min	4 min
H5-2,0 %-45 %-(3:1)	12 min	25 min

V tabeli XIX so prikazani rezultati meritev časa geliranja pri temperaturi vodne kopeli 40 °C in 37 °C. Čas geliranja smo pri 37 °C ugotavljali vzorcem, ki so se pri 40 °C izkazali kot potencialni kandidati. Njihov čas geliranja pri 40 °C je bil v intervalu med 6 min in 22 min. Tak čas lahko nakazuje na dovolj kratek čas geliranja tudi pri 37 °C, zato smo tem vzorcem ugotovili čas geliranja.

Čas geliranja pri 37 °C se je pri preizkušanih vzorcih v večini primerov podaljšal v primerjavi s časi geliranja pri 40 °C. V nekaterih primerih je bilo to podaljšanje precejšnje, na primer pri vzorcu H5-1,8 %-45 %-(2:1) iz 8 minut pri 40 °C na 26 min pri 37 °C. V

nekaterih primerih pa se je čas geliranja pri 37 °C v primerjavi s časom geliranja pri 40 °C podaljšal le za nekaj minut. To je bilo na primer pri vzorcu H3-2,0%-40%-(2:1), kjer je bil čas geliranja pri višji temperaturi 10 min, pri nižji temperaturi pa 11 min 15 s.

Glede na dobljene rezultate časov geliranja pri telesni temperaturi smo kot primerne kandidate za merjenje reologije določili 5 vzorcev. To so vzorci H1-2,2 %-40 %-(2:1), H1-2,2 %-45 %-(2:1), H3-2,0 %-40 %-(2:1), H3-2,0 %-45 %-(2:1) in H5-2,0 %-45 %-(2:1). Pri 37 °C smo jim ugotovili dovolj kratke čase geliranja, to je krajše od 15 minut, da lahko predvidevamo, da bi se pri reoloških meritvah izkazali za primerne vzorce.

4.5 Hidrogeli iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500

4.5.1 Vpliv stopnje deacetilacije na pH vzorcev

V literaturi so večinoma podatki o časih geliranja hidrogelov s hitosani z visoko stopnjo deacetilacije, večjo od 90 %. Zato smo tudi mi poskusili pripraviti hidrokele iz hitosanov z visoko stopnjo deacetilacije in jim ugotovili čas geliranja. Iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500 zaradi slabe topnosti ni bilo mogoče pripraviti raztopin v 1,8- in 2,0-odstotni (m/m) koncentraciji. Zato smo pripravili 1,0-odstotni (m/m) raztopini in iz njiju pripravili hidrokele. Pred ugotavljanjem časa geliranja smo jim izmerili pH-vrednost.

Tabela XX: pH-Vrednosti vzorcev pripravljenih iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500.

Oznaka vzorca	Stopnja deacetilacije hitosana [%]	Koncentracija β -GP [% (m/m)]	Masno razmerje obeh raztopin	pH
H90/500-1,0 %-40 % (2:1)	92,4	40	2:1	7,25
H90/500-1,0 %-40 % (3:1)	92,4	40	3:1	7,05
H90/500-1,0 %-40 % (4:1)	92,4	40	4:1	6,96
H90/500-1,0 %-45 % (2:1)	92,4	45	2:1	7,28
H90/500-1,0 %-45 % (3:1)	92,4	45	3:1	7,11
H90/500-1,0 %-45 % (4:1)	92,4	45	4:1	6,99
H95/500-1,0 %-40 % (2:1)	95,2	40	2:1	7,27
H95/500-1,0 %-40 % (3:1)	95,2	40	3:1	7,09
H95/500-1,0 %-40 % (4:1)	95,2	40	4:1	6,94
H95/500-1,0 %-40 % (5:1)	95,2	40	5:1	6,69
H95/500-1,0 %-45 % (2:1)	95,2	45	2:1	7,30
H95/500-1,0 %-45 % (3:1)	95,2	45	3:1	7,18

Oznaka vzorca	Stopnja deacetilacije hitosana [%]	Koncentracija β -GP [% (m/m)]	Masno razmerje obeh raztopin	pH
H95/500-1,0 %-45 % (4:1)	95,2	45	4:1	7,00
H95/500-1,0 %-45 % (5:1)	95,2	45	5:1	6,93
H95/500-1,0 %-45 % (6:1)	95,2	45	6:1	6,90

V tabeli XX so prikazane izmerjene pH-vrednosti pripravljenih vzorcev iz hitosana 90/500 in hitosana 95/500. Prikazane so tudi stopnje deacetilacije hitosanov, koncentracija raztopine β -GP in masno razmerje med raztopinama hitosana in β -glicerofosfata. Vzorce smo pripravili v kombinacijah 1,0-odstotne (m/m) raztopine hitosana in raztopin β -GP s 40-, 45- ali 50-odstotno (m/m) koncentracijo. Dobljene rezultate lahko primerjamo med seboj glede na uporabljen hitosan, glede na enako koncentracijo raztopine β -GP in različna razmerja med raztopinama hitosana in β -GP ali glede na različno koncentracijo β -GP pri istem razmerju med raztopino hitosana in raztopino β -GP.

Rezultati meritev pH-vrednosti pri vzorcih z 1,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana 90/500 in 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP so v fiziološkem območju. pH-Vrednosti s povečevanjem razmerja padajo. Največji pH je pri razmerju 2:1 med raztopinama hitosana in β -GP, najmanjši pa pri razmerju 4:1. Pri razmerju 2:1 je pH 7,25, pri razmerju 3:1 7,05, pri razmerju 4:1 pa 6,96.

Tudi pri vzorcih z 1,0-odstotno (m/m) raztopino hitosana 90/500 in 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP izmerjena pH-vrednost pada s povečevanjem razmerja med raztopinama od 2:1 do 4:1.

Rezultati meritev pH-vrednosti pri vzorcih pripravljenih iz hitosana 95/500 se ujemajo z vsemi zgoraj naštetimi dejstvi. S povečevanjem razmerja med raztopino hitosana in raztopino β -GP se pH-vrednosti znižujejo. Največji pH je pri razmerju 2:1, kjer je pri vzorcu s 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP 7,27, pri vzorcu s 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP pa 7,30. Najmanjši pH pa je pri vzorcu s 40-odstotno (m/m) raztopino β -GP pri razmerju 5:1 (6,69) in pri vzorcu s 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP pri razmerju 6:1 (6,90).

Pri primerjavi rezultatov pH meritev vzorcev z različnima koncentracijama raztopin β -GP pri enakih razmerjih vidimo, da je v vseh primerih izmerjen pH večji pri vzorcih z večjo, torej 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP.

Tako v primeru vzorcev s 40-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP in kot tudi v primeru vzorcev s 45-odstotno (m/m) koncentracijo β -GP se vrednosti pH znižujejo s povečevanjem razmerja med raztopinama hitosana in β -GP. Te ugotovitve so v skladu z ugotovitvami raziskovalne skupine K. Song in sod. (20), ki so ugotovili, da se s povečevanjem razmerja med raztopinama znižuje pH-vrednost sistema. Tudi ugotovitev, da imajo vzorci z večjo koncentracijo β -GP pri istem razmerju večji pH je v skladu s predhodnimi raziskavami. Raziskovalca R.Ahmedi in J.D. de Bruijn (10) sta ugotovila, da imajo vzorci z večjo koncentracijo β -GP večji pH.

Hitosan 90/500 in hitosan 95/500 se razlikujeta v stopnji deacetilacije. Po literaturnih podatkih stopnja deacetilacije vpliva na pH-vrednost sistema in posledično na čas geliranja. Stopnja deacetilacije ustreza substituiranim aminskim skupinam v hitosanski verigi. Uporaba hitosana z večjo DDA povzroči povečanje gostote navzkrižnih povezav med fosfatnimi skupinami glicerofosfata in amonijevimi skupinami v hitosanski verigi, kar povzroči skrajšanje časa geliranja (19). Hitosan 90/500 ima 92,4-odstotno stopnjo deacetilacije, hitosan 95/500 pa 95,2-odstotno DDA. V tabeli XX je prikazana odvisnost pH-vrednosti sistema od stopnje deacetilacije hitosana in od % (m/m) koncentracije β -GP.

Vzorci pripravljene iz hitosana 95/500 imajo v posameznih razmerjih med raztopino hitosana in raztopino β -GP večji pH kot vzorci pripravljene iz hitosana 90/500. Pri razmerju 4:1 ima vzorec pripravljen iz hitosana z nižjo DDA in 40-odstotne (m/m) raztopine β -GP večji pH kot vzorec s hitosanom z večjo DDA, kar odstopa od drugih rezultatov in predhodnih ugotovitev raziskovalcev. Na pH vpliva tudi temperatura, pri kateri je bila meritev izvedena. Ker vzorce po izdelavi hladimo na vodni kopeli, se je temperatura, pri kateri smo izmerili ti dve pH-vrednosti razlikovala. Predvidevamo, da je za malo razliko v izmerjenem pH-ju odgovorna razlika v temperaturi, pri kateri smo merili pH.

V primeru obeh koncentracij β -GP so rezultati v skladu s predhodnimi raziskavami, saj je pH večji pri hitosanu z višjo stopnjo deacetilacije. Prav tako pH pada z naraščanjem razmerja med raztopinama. Če pa primerjamo rezultate pH glede na stopnjo deacetilacije

hitosana, koncentracijo β -GP in naraščajoče razmerje med raztopinama hitosana in β -GP vidimo, da se rezultati ujemajo z vsemi predhodno omenjenimi ugotovitvami raziskovalcev in prav tako z našimi ugotovitvami. Največji pH ima vzorec, ki je pripravljen iz hitosana z višjo stopnjo deacetilacije, iz raztopine β -GP v 45-odstotni (m/m) koncentraciji in v najnižjem razmerju med raztopinama. To je vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1). Izmerjen pH ima 7,30.

4.5.2 Čas geliranja vzorcev

Vzorcem pripravljenim iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500 smo ugotovili čas geliranja pri telesni temperaturi.

Tabela XXI: Časi geliranja vzorcev pripravljenih iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500 pri temperaturi 37 °C.

Oznaka vzorca	Masno razmerje obeh raztopin	Koncentracija β -GP [% (m/m)]	Čas geliranja
H90/500-1,0 %-40 % (2:1)	2:1	40	6 min
H90/500-1,0 %-40 % (3:1)	3:1	40	20 min
H90/500-1,0 %-40 % (4:1)	4:1	40	>30 min
H90/500-1,0 %-45 % (2:1)	2:1	45	4 min
H90/500-1,0 %-45 % (3:1)	3:1	45	12 min
H90/500-1,0 %-45 % (4:1)	4:1	45	>30 min
H95/500-1,0 %-40 % (2:1)	2:1	40	4 min
H95/500-1,0 %-40 % (3:1)	3:1	40	10 min
H95/500-1,0 %-40 % (4:1)	4:1	40	22 min
H95/500-1,0 %-40 % (5:1)	5:1	40	>30 min
H95/500-1,0 %-45 % (2:1)	2:1	45	3 min
H95/500-1,0 %-45 % (3:1)	3:1	45	4 min
H95/500-1,0 %-45 % (4:1)	4:1	45	12 min
H95/500-1,0 %-45 % (5:1)	5:1	45	>30 min
H95/500-1,0 %-45 % (6:1)	6:1	45	>30 min

V tabeli XXI so prikazani časi geliranja pri 37 °C. Vzorci so pripravljeni iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500 v kombinacijah s 40- ali 45-odstotno (m/m) raztopino β -GP. Koncentracija raztopin hitosanov je 1,0 % (m/m). Primerjamo lahko rezultate meritev časov geliranja med vzorci pripravljenimi iz iste raztopine hitosana in iste ali različne

raztopine β -GP ter vzorce pripravljene iz različnih raztopin hitosanov in enakih raztopin β -GP, vse v istih ali različnih razmerjih med raztopinama.

Vzorci pripravljene iz hitosana 90/500 in 40-odstotne (m/m) raztopine β -GP imajo najnižjo tako stopnjo deacetilacije kot tudi najnižjo koncentracijo raztopine β -GP. Časi geliranja teh vzorcev so v vseh pripravljenih kombinacijah daljši od drugih vzorcev. Pri razmerju 2:1 je čas geliranja 6 min, pri razmerju 3:1 20 minut in pri razmerju 4:1 je čas geliranja daljši od 30 minut.

Pri primerjavi vzorcev vidimo, da se čas geliranja v primeru obeh hitosanov podaljšuje s povečevanjem razmerja med raztopinama hitosana in β -GP. Časi geliranja so daljši pri vzorcih pripravljenih iz hitosana 90/500 kot iz hitosana 95/500 pri isti koncentraciji raztopine β -GP in enakem razmerju med raztopinama. Hitosan 95/500 ima višjo stopnjo deacetilacije kot hitosan 90/500. Stopnja deacetilacije hitosana ustreza substituiranim amskim skupinam v hitosanski verigi. Uporaba hitosana z večjo DDA povzroči povečanje gostote navzkrižnih povezav med fosfatnimi skupinami glicerofosfatnih soli in amonijevimi skupinami hitosanskih verig, kar vodi v skrajšanje časa geliranja (1,19). Pri različnih koncentracijah raztopine β -GP pa imajo daljši čas geliranja vzorci pripravljene iz 40-odstotne (m/m) raztopine β -GP pri istem razmerju med raztopinama hitosana in β -GP.

Vsi dobljeni rezultati vzorcev pripravljene iz novih hitosanov z višjimi stopnjami deacetilacije se ujemajo s predhodnimi dognanji raziskovalcev. Tako hitosan 90/500 kot tudi hitosan 95/500 sta se izkazala kot primerna kandidata za razvoj termoodzivnih hidrogelov za subkutano aplikacijo. Glede na dobljene rezultate smo pripravili 4 vzorce, ki smo jim s pomočjo reologije ugotovili temperaturo geliranja in čas geliranja. Odločili smo se za en vzorec, pripravljen iz hitosana 90/500, in 3 vzorce, pripravljene iz hitosana 95/500.

4.6 Reologija

4.6.1 Izbira vzorcev za izvedbo reoloških meritev

Glede na najboljše rezultate pri poskusih v vodni kopeli smo se odločili za pripravo 4 vzorcev, pri katerih smo izvedli reološke meritve. Vzorce smo pripravili iz hitosana 90/500 in iz hitosana 95/500 ter iz raztopine β -GP. Oznake posameznih vzorcev in vsebujočih sestavin v različnih koncentracijah in razmerjih so prikazane v tabeli XXII.

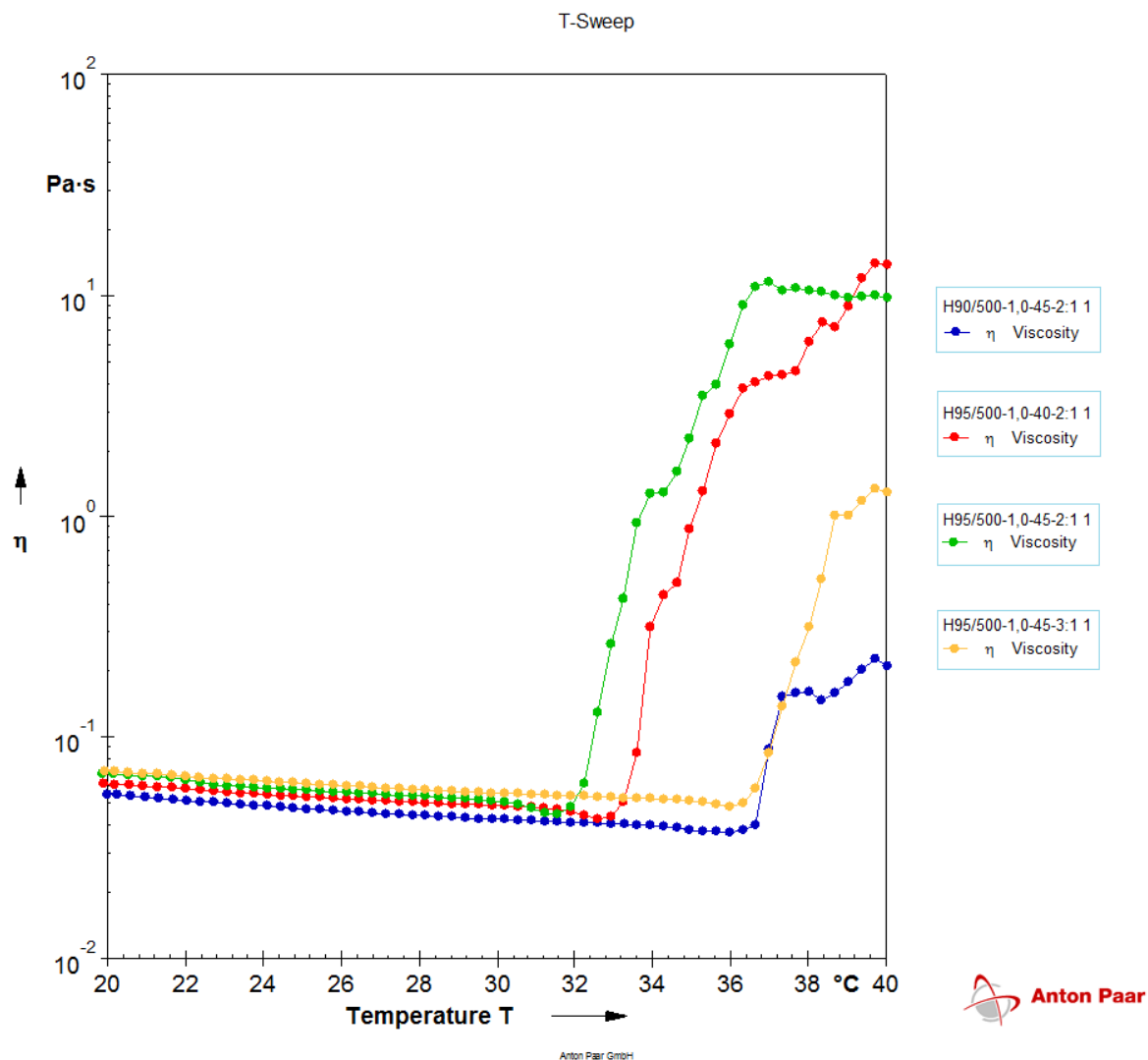
Tabela XXII: Sestava vzorcev za reološke meritve.

Oznaka vzorca	Masno razmerje raztopin	Hitosan obeh	Koncentracija β -GP [% (m/m)]
H90/500-1,0 %-45 % (2:1)	2:1	Hitosan 90/500	45
H95/500-1,0 %-40 % (2:1)	2:1	Hitosan 95/500	40
H95/500-1,0 %-45 % (2:1)	2:1	Hitosan 95/500	45
H95/500-1,0 %-45 % (3:1)	3:1	Hitosan 95/500	45

V tabeli XXII je prikazana sestava vzorcev, ki smo jih pripravili za opravljanje reoloških meritev. Poleg časov geliranja, ki smo jih ugotovili s segrevanjem vzorcev v vodni kopeli, smo pri izbiri vzorcev za nadaljnje meritve upoštevali tudi možnost primerjave vzorcev med seboj. Izbrali smo takšne vzorce, ki so imeli dovolj kratke čase geliranja v vodni kopeli in so primerni za posamezne primerjave. Tako lahko primerjamo vzorca H90/500-1,0 %-45 % (2:1) in H95/500-1,0 %-45 % (2:1), ki se razlikujeta v hitosanu; vzorca H95/500-1,0 %-40 % (2:1) in H95/500-1,0 %-45 % (2:1), ki se razlikujeta v koncentraciji β -GP ter vzorca H95/500-1,0 %-45 % (2:1) in H95/500-1,0 %-45 % (3:1), ki se razlikujeta v masnem razmerju med raztopinama.

4.6.2 Ugotavljanje temperature geliranja z rotacijsko viskozimetrijo

Z rotacijsko viskozimetrijo smo ugotavljali viskoznost vzorcev v odvisnosti od temperature. S pomočjo meritev smo ugotovili temperaturo, pri kateri vzorci gelirajo. Temperatura geliranja je določena kot temperatura po nenadnem skoku viskoznosti, pri kateri viskoznost preneha naraščati. Meritve smo izvajali pri hitrosti segrevanja $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ v temperaturnem intervalu od $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Strižna hitrost je bila 10 s^{-1} .



Slika 9: Meritve rotacijske viskozimetrije za ugotovitev temperature geliranja različnih vzorcev.

Na sliki 9 so prikazane meritve rotacijske viskozimetrije, s katerimi smo ugotovili temperaturo geliranja posameznih vzorcev. Modra krivulja predstavlja vzorec H90/500-1,0 %-45 % (2:1), rdeča krivulja vzorec H95/500-1,0 %-40 % (2:1), zelena krivulja vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1) in rumena krivulja vzorec H95/500-1,0 %-45 % (3:1).

Tabela XXIII: Viskoznost vzorcev pri posameznih temperaturah.

Oznaka vzorca	H90/500-1,0 %-45 % (2:1)	H95/500-1,0 %-40 % (2:1)	H95/500-1,0 %-45 % (2:1)	H95/500-1,0 %-45 % (3:1)
Viskoznost pri 20 °C [Pa·s]	0,0551	0,0621	0,0687	0,0704
Viskoznost pri 30 °C [Pa·s]	0,0425	0,0489	0,051	0,0558

Oznaka vzorca	H90/500-1,0 %- 45 % (2:1)	H95/500-1,0 %- 40 % (2:1)	H95/500-1,0 %- 45 % (2:1)	H95/500-1,0 %- 45 % (3:1)
Viskoznost pri 32 °C [Pa·s]	0,0411	0,0445	0,0619	0,0541
Viskoznost pri 34 °C [Pa·s]	0,04	0,316	1,26	0,0528
Viskoznost pri 36 °C [Pa·s]	0,0372	2,91	5,97	0,0483
Viskoznost pri 38 °C [Pa·s]	0,16	6,18	10,5	0,315
Viskoznost pri 40 °C [Pa·s]	0,209	13,7	9,73	1,28

Kot je razvidno na sliki 9 in v tabeli XXIII se začetne vrednosti viskoznosti med seboj ne razlikujejo veliko. S segrevanjem vzorca je viskoznost počasi padala od izmerjene pri 20 °C pri vseh vzorcih. Pri določenih temperaturah je viskoznost začela naraščati. Te temperature se med posameznimi vzorci razlikujejo. Kot je vidno na sliki 9, je najnižja temperatura, pri kateri je začela viskoznost naraščati pri vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (2:1), kjer je 32,6 °C. Viskoznost je skokovito narasla iz 0,0619 Pa·s pri 32,2 °C na 0,129 Pa·s. Višja temperatura, pri kateri je začela naraščati viskoznost je bila pri vzorcu H95/500-1,0 %-40 % (2:1), kjer je bila 33,9 °C. Tu je viskoznost narasla iz 0,0513 Pa·s pri 33,3 °C na 0,0855 Pa·s pri 33,6 °C ter potem skokovito do 0,316 Pa·s pri 33,9 °C. Pri vzorcih H90/500-1,0 %-45 % (2:1) in H95/500-1,0 %-45 % (3:1) je temperatura, pri kateri začne naraščati viskoznost okrog telesne temperature. Pri vzorcu H90/500-1,0 %-45 % (2:1) je viskoznost naraščala od 0,0402 Pa·s pri 36,7 °C preko 0,0879 Pa·s pri 37 °C do 0,154 Pa·s pri 37,3 °C. Pri vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (3:1) pa je bila viskoznost pri 36,7 °C 0,0589 Pa·s, pri 37 °C 0,0847 Pa·s in pri 37,3 °C 0,138 Pa·s.

Vzorcem smo želeli grafično ugotoviti temperaturo geliranja. Vzorcju H95/500-1,0 %-45 % (2:1) lahko ugotovimo temperaturo geliranja 37,0 °C. Po nenadnem skoku viskoznosti, ki se je začel pri temperaturi 32,2 °C, je viskoznost naraščala do temperature 37 °C. Pri tej temperaturi je viskoznost prenehala naraščati, kar pomeni, da jo lahko potrdimo kot temperaturo geliranja. Pri vzorcu H90/500-1,0 %-45 % (2:1) lahko predvidevamo, da je temperatura geliranja 38 °C. Viskoznost vzorca je začela naraščati pri 37 °C in se pri 38 °C

zaustavila. Vendar pri 39,4 °C viskoznost ponovno naraste. Zato bi bilo za natančno in zanesljivo napoved temperature geliranja nujno podaljšati temperaturni interval, v katerem smo izvajali meritve, da bi se prepričali, ali je naraščanje viskoznosti pri 39,4 °C le slučajni pojav ali pa se viskoznost vzorca s temperaturo še povečuje in je dejanska temperatura geliranja višja od ugotovljene. Tudi pri vzorcih H95/500-1,0 %-40 % (2:1) in H95/500-1,0 %-45 % (3:1) bi bilo nujno povečati temperaturni interval, pri katerem smo izvajali meritve rotacijske viskozimetrije. Pri vzorcu H95/500-1,0 %-40 % (2:1) bi lahko kot temperaturo geliranja določili temperaturo 36,7 °C, ko se krivulja viskoznosti zravna in viskoznost preneha naraščati. Vendar pa se pri temperaturi 38 °C viskoznost spet skokovito poveča in se povečuje do temperature 39,7 °C. Viskoznost pri temperaturi 40 °C je enaka kot pri 39,7 °C, vendar sta meritvi le dve, zato ne moremo zaključiti, ali se povečevanje viskoznosti tu konča ali se nadaljuje. Pri vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (3:1) pa viskoznost začne naraščati pri temperaturi 37 °C in se povečuje do temperature 38,7 °C. Po tej temperaturi viskoznost preneha skokovito naraščati, vendar narašča počasi do temperature 40 °C. Ker se meritve končajo pri 40 °C ne moremo zaključiti, ali je temperatura geliranja pri 38,7 °C ali pa je prenehanje naraščanja viskoznosti slučajno in se viskoznost še povečuje do višje temperature, kjer potem pride tudi do končnega prenehanja naraščanja viskoznosti.

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da ima vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1) temperaturo geliranja pri 37 °C. Vzorec gelira pri telesni temperaturi, kar je bil cilj celotnega našega preizkušanja različnih kombinacij vzorcev. Pri drugih treh vzorcih so se potencialne temperature geliranja tudi gibale okrog telesne temperature, vendar bi bilo nujno povečati temperaturni interval meritve rotacijske viskozimetrije, zaradi vzrokov, ki so opisani že zgoraj.

4.6.3 Ugotavljanje časa geliranja z reometrijo

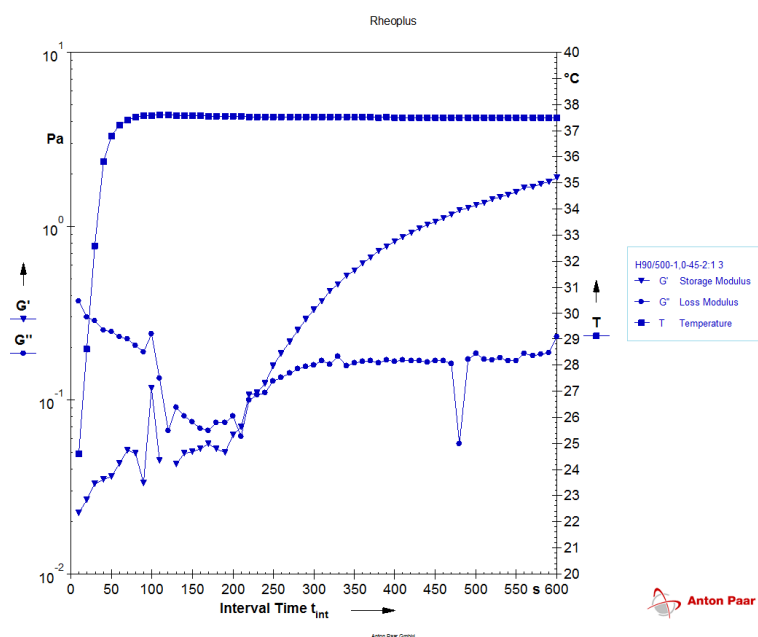
Vsem štirim vzorcem, ki smo jih pripravili za meritve reologije, smo želeli ugotoviti čas geliranja pri temperaturi 37,5 °C. Zato smo ugotovili časovno odvisnost elastičnega in viskoznega modula. Temperatura geliranja je definirana kot temperatura, pri kateri je elastični modul (G') večji kot viskozni modul (G'') (27). Merilni sistem smo uravnali na 20 °C, nanj nanesti zadostno količino vzorca, spustili merilni stožec na merilno pozicijo, obrisali odvečno količino vzorca in začeli z meritvijo. Po začetku meritve smo temperaturo nastavili na 37,5 °C. Vsem vzorcem smo ugotovili čas geliranja z vsaj dvema meritvama. V prvem primeru smo nastavili časovni interval med dvema meritvama na 10 s, izvedli

smo 60 meritev. Skupni čas meritve je bil torej 600 s. V drugem primeru pa smo časovni interval med dvema meritvama nastavili na 5 s in sicer smo izvedli 60 ali 80 meritev, skupni čas je bil 300 s ali 400 s. Čas geliranja smo ugotovili kot prvo točko po presečišču elastičnega in viskoznega modula.

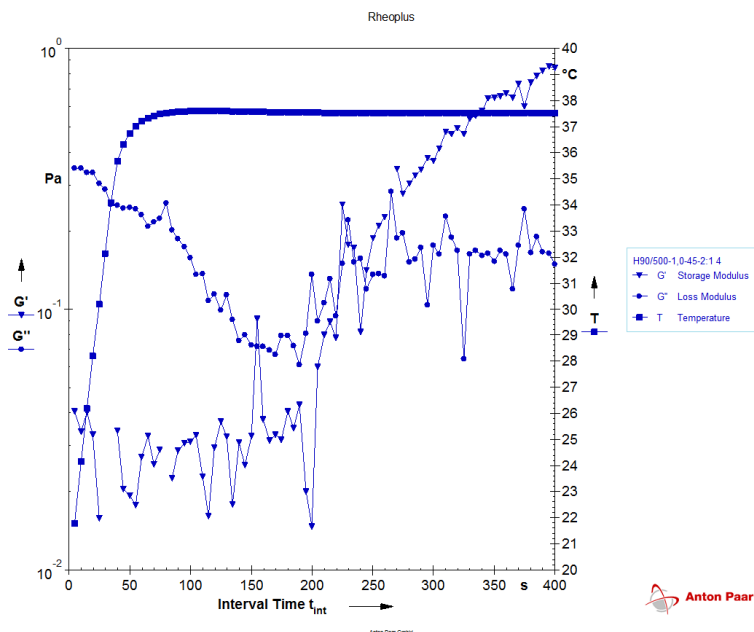
Čas geliranja smo najprej ugotavljali pri časovnem intervalu 10 s. Kasneje smo ugotavljali čas geliranja tudi pri časovnem intervalu 5 s, saj smo tako bolj natančno ugotovili čas geliranja.

4.6.3.1 Čas geliranja vzorca H90/500-1,0 %-45 % (2:1)

Na sliki 10 je prikazana meritev časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za vzorec H90/500-1,0 %-45 % (2:1) pri temperaturi 37,5 °C in pri časovnem intervalu 10 s med posameznima točkama. Na sliki 11 pa je prikazana meritev časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za isti vzorec pri časovnem intervalu 5 s.



Slika 10: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H90/500-1,0 %-45 % (2:1) pri časovnem intervalu 10 s.

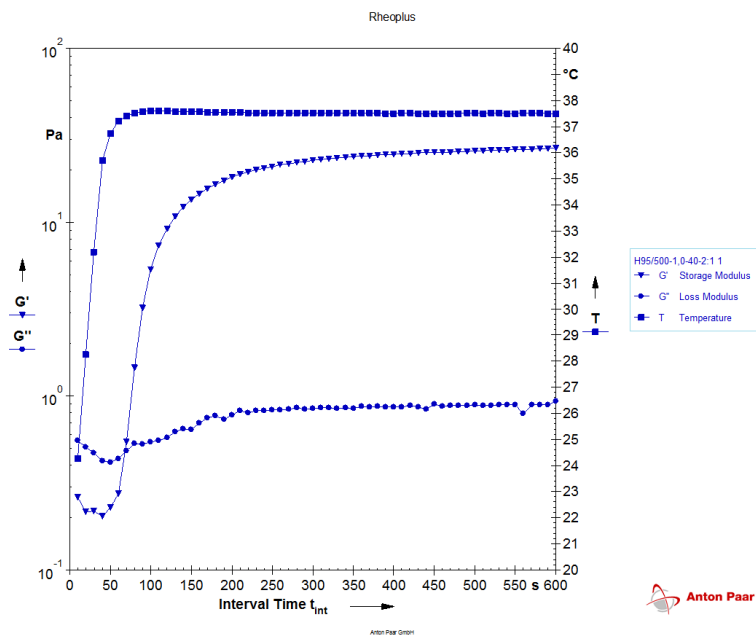


Slika 11: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H90/500-1,0 %-45 % (2:1) pri časovnem intervalu 5 s.

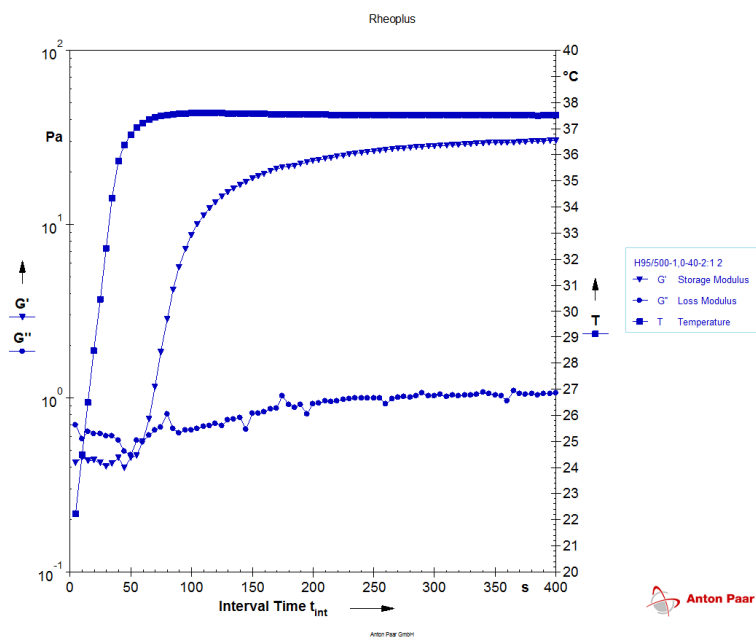
Kot je razvidno s slike 10 je prišlo do presečišča elastičnega in viskoznega modula med 20 in 21 točko, ki predstavljata časovno točko 200 s in 210 s. Kot čas geliranja vzorca smo ugotovili čas 210 s. Pri pogostejšem merjenju viskoznosti, to je pri meritvah pri časovnem intervalu 5 s, je prišlo do presečišča med elastičnim in viskoznim modulom med 44 in 45 merilno točko. Točki predstavljata 220 s in 225 s. Ugotovljen čas geliranja je 225 s. Na sliki 11 je razvidno, da pride okrog časa geliranja večkrat do presečišča med viskoznim in elastičnim modulom, kar je posledica tega, da vzorec ne gelira ves hkrati, ampak pride do geliranja postopoma.

4.6.3.2 Čas geliranja vzorca H95/500-1,0 %-40 % (2:1)

Na slikah 12 in 13 sta prikazani meritvi časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za vzorec H95/500-1,0 %-40 % (2:1). Na sliki 12 je časovni interval med posameznima točkama 10 s, na sliki 13 pa 5 s.



Slika 12: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H95/500-1,0 %-40 % (2:1) pri časovnem intervalu 10 s.



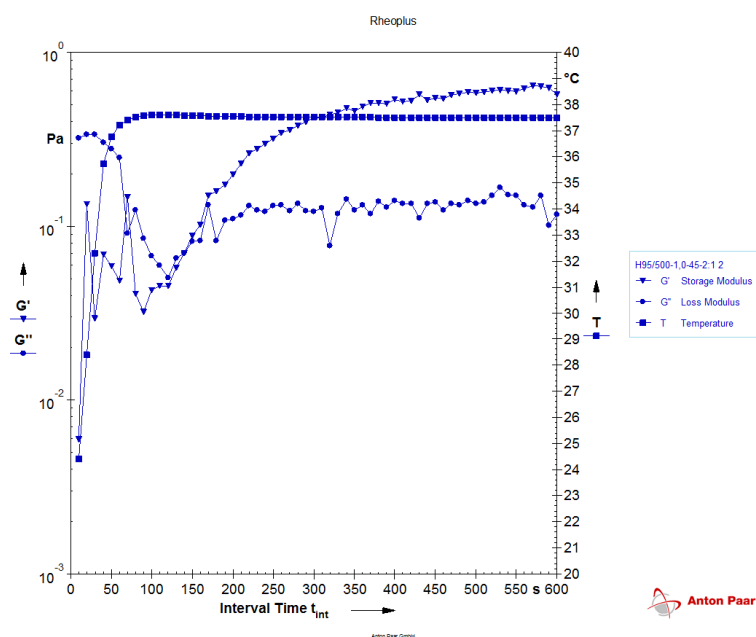
Slika 13: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H95/500-1,0 %-40 % (2:1) pri časovnem intervalu 5 s.

Pri meritvah časovne odvisnosti viskoznega in elastičnega modula z 10 sekundnim časovnim intervalom je prišlo do presečišča med elastičnim in viskoznim modulom med 6 in 7 časovno točko. Ti dve časovni točki predstavljata čas 60 in 70 s. Čas geliranja vzorca H95/500-1,0 %-40 % (2:1) je torej 70 s, kar je razvidno tudi na sliki 12. Pri pogostejših časovnih točkah, kar je prikazano na sliki 13, pa je prišlo do presečišča med viskoznim in

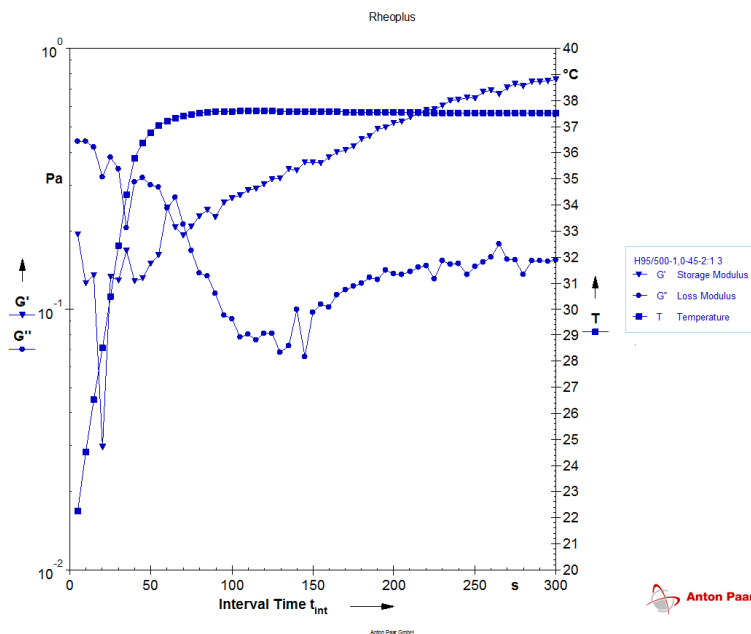
elastičnim modulom med 12 in 13 časovno točko, kar predstavlja 60 in 65 s. Ugotovljen čas geliranja je torej 65 s.

4.6.3.3 Čas geliranja vzorca H95/500-1,0 %-45 % (2:1)

Na slikah 14 in 15 so prikazani rezultati meritev časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1). Na sliki 14 so prikazani rezultati meritev z 10 sekundnim časovnim intervalom, na sliki 15 pa s 5 sekundnim časovnim intervalom.



Slika 14: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H95/500-1,0 %-45 % (2:1) pri časovnem intervalu 10 s.

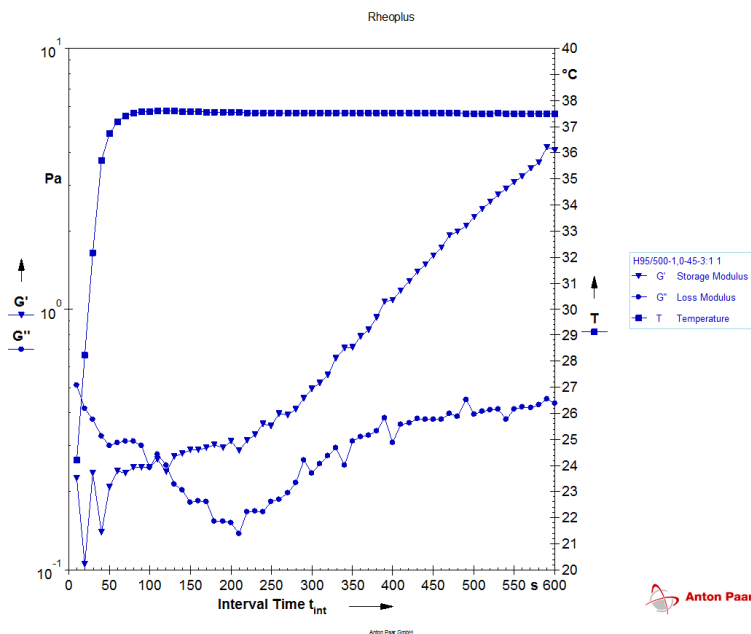


Slika 15: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H95/500-1,0 %-45 % (2:1) pri časovnem intervalu 5 s.

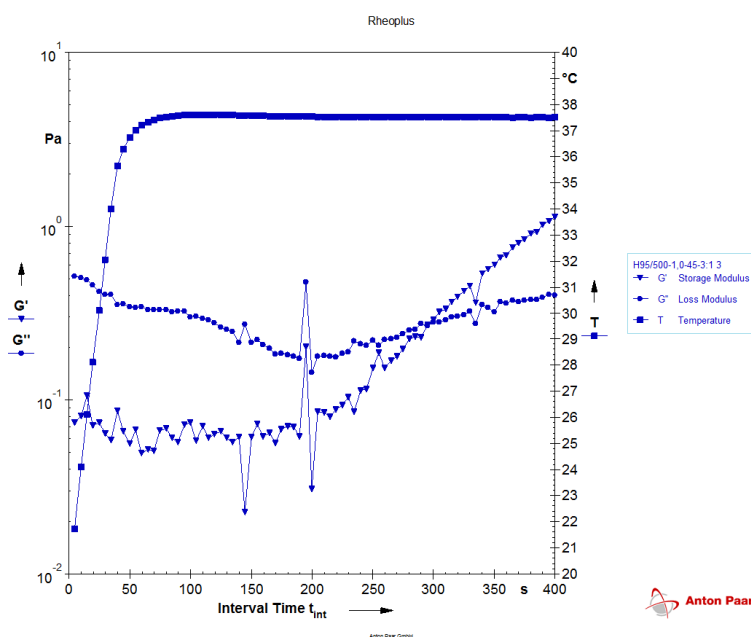
Glede na dobljene rezultate se časa geliranja, ugotovljena z reološkimi meritvami z različnima časovnima intervaloma, močno razlikujeta. Pri meritvah, opravljenih na 10 s, je prišlo do presečišča med elastičnim in viskoznim modulom med 14 in 15 časovno točko. To predstavlja čas geliranja 150 s. Pri meritvah na 5 s je tudi prišlo do presečišča med obema moduloma med 14. in 15. točko, kar pa v tem primeru predstavlja čas geliranja 75 s.

4.6.3.4 Čas geliranja vzorca H95/500-1,0 %-45 % (3:1)

Na slikah 16 in 17 sta prikazani meritvi časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula v dveh časovnih intervalih, in sicer 5 in 10 s. Do presečišča med elastičnim in viskoznim modulom je pri 10-sekundnem časovnem intervalu prišlo med 12 in 13 časovno točko, pri 5-sekundnem časovnem intervalu pa med 58 in 59 časovno točko. Tako smo ugotovili dva zelo različna časa geliranja, in sicer v prvem primeru 130 s, v drugem primeru pa 295 s.



Slika 16: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H95/500-1,0 %-45 % (3:1) pri časovnem intervalu 10 s.



Slika 17: Ugotavljanje časa geliranja vzorca H95/500-1,0 %-45 % (3:1) pri časovnem intervalu 5 s.

Glede na dobljene čase geliranja lahko predvidevamo, da sta najbolj primerna vzorca H90/500-1,0 %-45 % (2:1) in H95/500-1,0 %-40 % (2:1), saj smo pri njiju dobili ponovljive rezultate. Časi geliranja pri teh dveh vzorcih se med različnima meritvama niso bistveno razlikovali. Pri vzorcu H90/500-1,0 %-45 % (2:1) je bila razlika v ugotovljenih časih 15 s, pri vzorcu H95/500-1,0 %-40 % (2:1) pa le 5 s. Druga dva vzorca sta imela med meritvami z 10 sekundnim in 5 sekundnim časovnim intervalom velike razlike.

4.6.4 Primerjava časov geliranja, ugotovljenih po 3 metodah

Tabela XXIV: Primerjava časov geliranja za izbrane vzorce, ugotovljenih s tremi metodami.

Oznaka vzorca	Čas geliranja, ugotovljen z vodno kopeljo [s]	Čas geliranja, ugotovljen z reologijo pri časovnem intervalu 10 s [s]	Čas geliranja, ugotovljen z reologijo pri časovnem intervalu 5 s [s]
H90/500-1,0 %-45 % (2:1)	240	210	225
H95/500-1,0 %-40 % (2:1)	240	70	65
H95/500-1,0 %-45 % (2:1)	180	150	75
H95/500-1,0 %-45 % (3:1)	240	130	295

V tabeli XXIV so zbrani ugotovljeni časi geliranja za vzorce H90/500-1,0 %-45 % (2:1), H95/500-1,0 %-40 % (2:1), H95/500-1,0 %-45 % (2:1) in H95/500-1,0 %-45 % (3:1). Čase geliranja smo ugotavljali na tri načine. Najprej smo vzorce segrevali v vodni kopeli na 37 °C in ugotavljali čas, ko vzorec več ne teče po eppendorf epruvetki. Najobetavnejšim 4 vzorcem smo nato z reometrom ugotovili čas geliranja z dvema meritvama. V prvem primeru smo nastavili časovni interval med posameznima točkama na 10 s, v drugem primeru pa na 5 s. S 5 sekundnim časovnim intervalom med posameznima točkama smo čas geliranja ugotavljali bolj natančno.

Z vsemi tremi meritvami smo dobili najbolj ponovljive rezultate pri vzorcu H90/500-1,0 %-45 % (2:1). Čas geliranja, ugotovljen z uporabo vodne kopeli, je bil 240 sekund oziroma 4 minute. Z reološkimi meritvami smo pri prvi meritvi ugotavljali čas geliranja 210 sekund oziroma 3 minute in 30 sekund, pri drugi meritvi pa 225 sekund oziroma 3 minute in 45 sekund. Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da je vzorec najbolj ustrezen, saj se mu časi geliranja glede na izbrano metodo bistveno ne razlikujejo.

Pri primerjavi reoloških meritev vseh štirih vzorcev pri 10 sekundnem časovnem intervalu med posameznima točkama meritev vidimo, da ima najdaljši čas geliranja vzorec iz hitosana 90/500. Ta hitosan ima nižjo stopnjo deacetilacije kot hitosan 95/500, ki ga

vsebujejo drugi trije vzorci. Nižja stopnja deacetilacije je vzrok za najdaljši čas geliranja, kar je v skladu s predhodnimi ugotovitvami raziskovalcev. V primerjavi z vzorcem H95/500-1,0 %-45 % (2:1), ki se razlikuje le v hitosanu, se čas geliranja razlikuje za 60 s. Vzorec H90/500-1,0 %-45 % (2:1) ima čas geliranja 210 s, vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1) pa 150 s. Vzorec H90/500-1,0 %-45 % (2:1) je sestavljen iz hitosana 90/500, ki ima 92,4 % DDA, vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1) pa iz hitosana 95/500 s 95,2 % stopnjo deacetilacije. Višja stopnja deacetilacije hitosana predstavlja več substituiranih aaminskih skupin v hitosanski verigi, kar pri uporabi v hidrogelih poveča gostoto navzkrižnih povezav med fosfatnimi skupinami glicerofosfatnih soli in amonijevimi skupinami hitosanskih verig. Večja gostota navzkrižnih povezav pomeni krajši čas geliranja (19).

Pričakovali smo, da bo imel vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1) krajši čas geliranja kot vzorec H95/500-1,0 %-40 % (2:1), saj naj bi večje razmerje raztopine β -GP vplivalo na čas geliranja. Reološko ugotovljen čas geliranja pri 10 s časovnem intervalu se med vzorcema razlikuje za 80 s, kar v našem primeru predstavlja veliko razliko. Rezultati pridobljeni z meritvijo časa geliranja z vodno kopeljo in z drugo reološko meritvijo pri 5 sekundnem časovnem intervalu med posameznima časovnima točkama pa se bolj ujemajo z našimi predvidevanji. Pri ugotavljanju časa geliranja z vodno kopeljo smo dobili čas geliranja za vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1) 3 minute, za vzorec H95/500-1,0 %-40 % (2:1) pa 4 minute. Pri drugi reološki meritvi se časa geliranja med vzorcema razlikujeta za 10 sekund, vendar je čas krajši pri vzorcu H95/500-1,0 %-40 % (2:1).

Tudi pri primerjavi vzorcev H95/500-1,0 %-45 % (2:1) in H95/500-1,0 %-45 % (3:1) niso vsi rezultati v skladu s pričakovanji. Časa geliranja, ugotovljena s pomočjo vodne kopeli, sta 3 min za vzorec H95/500-1,0 %-45 % (2:1) in 4 min za vzorec H95/500-1,0 %-45 % (3:1). Pri ugotavljanju časa geliranja z reološkimi meritvami s časovnim intervalom 5 s smo vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (2:1) ugotovili čas geliranja 75 s, vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (3:1) pa 295 s. Opisani rezultati se ujemajo s pričakovanji, saj so časi geliranja vzorca H95/500-1,0 %-45 % (2:1) krajši kot pri vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (3:1). Vzorec z razmerjem 3:1 ima manjši delež raztopine β -GP in posledično daljši čas geliranja. Vendar pa pri reoloških meritvah s časovnim intervalom 10 s nismo dobili takšnega rezultata. Vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (2:1) smo ugotovili daljši čas geliranja (150 s) kot vzorcu H95/500-1,0 %-45 % (3:1) (130 s).

Načeloma so dobljeni rezultati v skladu s pričakovanji, vendar v vseh primerih vidimo, da je pri meritvah lahko prišlo do napake. Za večjo verodostojnost rezultatov bi bilo nujno izvesti več meritev za vsak posamezni vzorec, najboljše vsaj tri. Vendar pa kljub temu lahko zaključimo, da so vsi štirje vzorci primerni za nadaljnji razvoj termoodzivnih hidrogelov za subkutano aplikacijo zdravilnih učinkovin, saj je najdaljši ugotovljen čas geliranja 295 s oziroma slabih 5 minut.

5 Sklep

Na osnovi eksperimentalnih rezultatov smo ugotovili, da na organoleptične lastnosti, viskoznost, pH-vrednost, čas geliranja in temperaturo geliranja pripravljenih hidrogelov vplivajo lastnosti uporabljenih hitosanov in uporabljene koncentracije. Te lastnosti hitosanov so viskoznost, stopnja deacetilacije, molekulska masa, koncentracija in pH-vrednost raztopin. Rezultati kažejo, da ima glavni vpliv na lastnosti hidrogela stopnja deacetilacije uporabljenega hitosana.

Na pH-vrednost vzorcev vplivata stopnja deacetilacije hitosana in masno razmerje med raztopino hitosana in raztopino β -GP. Vzorci pripravljeni iz hitosana z višjo stopnjo deacetilacije imajo večjo pH-vrednost kot vzorci pripravljeni iz hitosana z nižjo stopnjo deacetilacije. Z večanjem masnega razmerja med raztopinama hitosana in β -GP se pH-vrednost vzorcev niža. Na pH-vrednost vpliva tudi koncentracija uporabljene raztopine β -GP. Večja je koncentracija raztopine β -GP, večji pH ima vzorec.

Čas geliranja je odvisen od stopnje deacetilacije hitosana, masnega razmerja med raztopino hitosana in raztopino β -GP ter od koncentracije β -GP. Vzorci pripravljeni iz hitosana z višjo stopnjo deacetilacije imajo krajši čas geliranja kot vzorci pripravljeni iz hitosana z nižjo stopnjo deacetilacije. Prav tako kot na pH, tudi na čas geliranja vpliva masno razmerje med raztopino hitosana in raztopino β -GP. Z večanjem razmerja se podaljšuje čas, ki je nujen za geliranje. Pri enakem masnem razmerju in vzorcih pripravljenih iz enakega hitosana z različno koncentracijo β -GP pa se čas geliranja z višanjem koncentracije β -GP krajša.

Za razvoj termoodzivnih hidrogelov za subkutano aplikacijo sta potencialno primerna le hidrogela z visoko stopnjo deacetilacije (večjo od 90 %). Le iz njiju nam je uspelo pripraviti 4 kombinacije vzorcev, ki so pri telesni temperaturi gelirali v primerno kratkem času, krajšem od 5 minut.

6 Literatura

- 1 Ruel-Gariepy E in sod.: Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drug. International Journal of Pharmaceutics 2000; 203: 89-98.
- 2 https://www.google.si/search?q=poloksamer&biw=1242&bih=566&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi08fCj6LPMAhVBFSwKHTF1DtMQ_AUICCGC#imgsrc=-NwAVCDr8TQoVM%3A (29.04.2016)
- 3 Aliaghaie M in sod.: Investigation of gelation mechanism of an injectable hydrogel based on chitosan by rheological measurements for a drug delivery application. Soft Matter 2012; 8: 3128-3137.
- 4 Ruel-Gariepy E in sod.: A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 57: 53-63.
- 5 <http://www.swicofil.com/products/055chitosan.html> (12.05.2016)
- 6 Illum L: Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharmaceutical Research 1998; 15:1326-1331.
- 7 Cho J in sod.: Physical gelation of chitosan in the presence of β -glycerophosphate: The effect of temperature. Biomacromolecules 2005;6: 3267-3275.
- 8 Ruel-Gariepy E, Leroux J-C: In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004; 58: 409-426.
- 9 <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6262/2/4/045004> (05.05.2017)
- 10 Ahmadi R, de Bruijn J D: Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2007; 824-832.
- 11 Sun J in sod.: Injectable chitosan-based hydrogel for implantable drug delivery: body response and induced variations of structure and composition. Journal of Biomedical Materials Research A 2010; 95A: 1019-1027.
- 12 Zhou H Y in sod.: Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. Carbohydrate Polymers 2015; 117: 524-536.

- 13 Cho J in sod.: Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry. Food Hydrocolloids 2006; 20: 936-945.
- 14 Ferry J D.: Viscoelastic Properties of Polymers, Willey, New York.
- 15 Obreza A in sod.: Farmacevtski terminološki slovar, Založba ZRC, Ljubljana, 2011.
- 16 <https://en.wikipedia.org/wiki/Gel> (20.05.2016)
- 17 Supper S in sod.: Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. Expert Opinion on Drug Delivery 2014; 11: 249-266.
- 18 Chenite A in sod.: Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. Biomaterials 2000; 21: 2155-2161.
- 19 Khodaverdi E in sod.: Effects of formulation properties on sol-gel behavior of chitosan/glycerolphosphate hydrogel. Iran Polymer Journal 2013; 22: 785-790.
- 20 Song K in sod.: Preparation, fabrication and biocompatibility of novel injectable temperature-sensitive chitosan/glycerophosphate/collagen hydrogels. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2010; 21: 2835-2842.
- 21 Mezger T G: The Rheology Handbook: For Users of Rotational and Oscillatory Rheometers 2nd edition, Vincentz Network, Hannover, 2006.
- 22 Material za vaje pri predmetu pojavi na mejnih površinah (UNI KOZ): 4.vaja: določanje viskoznosti newtonskih (idealnih) in nenewtonskih (neidealnih) sistemov
- 23 <http://www.snpinc.com/news-and-education/rheology-modifiers/> (09.06.2017)
- 24 <https://www.sigmaaldrich.com/european-export.html> (26.07.2017)
- 25 <https://www.gmp-chitosan.com/en/chitin-chitosan-shop/chitoscience/chitosan.html> (09.06.2017)
- 26 Chenite A in sod.: Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. Carbohydrate Polymers 2001; 46: 39-47.
- 27 Cheng Y-H in sod.: Thermosensitive chitosan-based hydrogel as a topical ocular drug delivery system of latanoprost for glaucoma treatment. Carbohydrate Polymers 2016; 144: 390-399.