

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA JANČAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA JANČAR

**KARAKTERIZACIJA POLIMERNIH POMOŽNIH SNOVI Z
VELIKOSTNO IZKLJUČITVENO KROMATOGRFIJO IN
DETEKCIJO NA OSNOVI SIPANJA SVETLOBE**

**CHARACTERIZATION OF POLYMER EXCIPIENTS BY
SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY AND LIGHT
SCATTERING BASED DETECTION**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Stanka Srčiča in v farmacevtski družbi Lek d.d., v Razvojnem centru Slovenija, na področju Analitske raziskave, pod somentorstvom dr. Simone Peterlin.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Stanku Srčiču, za vso potrpežljivost, dostopnost, hitro odzivnost, usmerjanje in svetovanje pri izdelavi magistrske naloge.

Iskrena zahvala gre somentorici dr. Simoni Peterlin. Zahvaljujem se vam za izjemno vodenje in pomoč pri nastajanju tega dela, za vse nasvete in popravke, za vso predano znanje in izkušnje, za potrpežljivost, spodbudo in prijaznost.

Najlepše se zahvaljujem podjetju Lek farmacevtska družba d.d. in celotnemu oddelku Analitske raziskave, ki so omogočili nastanek magistrske naloge in mi s svojimi idejami, strokovnimi nasveti, prijaznostjo in izkazanim zaupanjem pomagali pri izdelavi te naloge. Za strokovno oceno naloge se najlepše zahvaljujem prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in asist. dr. Meti Kokalj.

Hvala staršem in sestri, ki so mi študij omogočili, razumevajoče spremljali mojo študijsko pot, me spodbujali in verjeli vame tudi ob najtežjih trenutkih.

Hvala prijateljicam za ves optimizem, nesebično pomoč in podporo ter strpno razumevanje mojega pomanjkanja časa tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanka Srčiča in somentorstvom dr. Simone Peterlin.

Sandra Jančar

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Članica komisije: asist. dr. Meta Kokalj

Ljubljana, 2016

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	POLIMERI.....	1
1.1.1	Polimeri kot pomožne snovi.....	1
1.1.2	Hidroksipropilmetil celuloza.....	2
1.1.3	Polivinilpirolidon.....	4
1.1.4	Povprečja molskih mas in porazdelitev molske mase.....	5
1.2	VELIKOSTNO IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA.....	8
1.3	SIPANJE SVETLOBE.....	10
1.3.1	Statično sipanje svetlobe v teoriji.....	11
1.3.2	Statično sipanje svetlobe v praksi.....	14
2	NAMEN DELA.....	18
3	MATERIALI IN METODE.....	19
3.1	PRIPRAVA VZORCEV ZA SEC-MALS ANALIZO.....	19
3.1.1	HPLC analiza vzorcev.....	22
3.2	SEC-MALS ANALIZA.....	25
3.2.1	Določanje konstante dn/dc	27
3.2.2	Točnost in selektivnost SEC-MALS metode.....	28
3.2.3	Ponovljivost SEC-MALS metode.....	28
3.2.4	Analiza standardov in vzorcev.....	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	30
4.1	PRIPRAVA VZORCEV ZA SEC-MALS ANALIZO.....	30
4.2	SEC-MALS ANALIZA.....	35
4.2.1	Določitev dn/dc	35
4.2.2	Točnost in selektivnost SEC-MALS metode.....	39
4.2.3	Ponovljivost SEC-MALS metode in ponovljivost priprave vzorcev.....	41
4.2.4	Analiza standardov in vzorcev.....	42

5	SKLEP.....	54
6	LITERATURA.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula HPMC	3
Slika 2: Strukturna formula PVP	4
Slika 3: Odvisnost molske mase od masne frakcije polimera	6
Slika 4: Primera monodisperznega in polidisperznega sistema	7
Slika 5: Prikaz oddaljenosti monomerne enote m_i od centra mase makromolekule	13
Slika 6: Shema MALS detektorja: ¹ laser, ² polarizator, ³ volumen v katerem opazujemo sipanje in ⁴ detektor (fotodioda) (42).....	14
Slika 7: Shematski prikaz SEC-MALS sistema.....	16
Slika 8: RP-HPLC kromatogram topila (A), PVP K30, $c \approx 0,25$ mg/mL (B) in HPMC K15M, $c \approx 0,125$ mg/mL (C).....	31
Slika 9: RP-HPLC kromatogram PVP (A) izoliran iz vzorca SV ₁ (frakcija SV _{1A}) in kromatogram HPMC (B) v vzorcu SV ₁ (frakcija SV _{1B}).....	32
Slika 10: RP-HPLC kromatogram PVP (A) izoliran iz vzorca SV ₂ (frakcija SV _{2A}) in kromatogram HPMC (B) v vzorcu SV ₂ (frakcija SV _{2B}).....	33
Slika 11: RP-HPLC kromatogram PVP (A) izoliran iz vzorca TBL (frakcija TBL _A) in kromatogram HPMC (B) v vzorcu TBL (frakcija TBL _B)	34
Slika 12: Časovni prikaz meritve lomnega količnika	35
Slika 13: Umeritvena krivulja dn/dc meritev PVP K30	36
Slika 14: Umeritvena krivulja dn/dc meritev HPMC K15M	37
Slika 15: LS in RI kromatogram standarda PVP K30	43
Slika 16: LS in RI kromatogram raztopine PVP v frakciji TBL _A	44
Slika 17: Primerjava RI kromatogramov standardne raztopine PVP K30 in raztopine PVP iz frakcije TBL _A	45
Slika 18: Kumulativna porazdelitev molske mase PVP K25, PVP K30 in TBL _A	47
Slika 19: LS in RI kromatograma raztopine HPMC K15M	49
Slika 20: LS in RI kromatogram HPMC raztopine v frakciji TBL _B	49
Slika 21: Primerjava RI kromatogramov standardne raztopine HPMC K15M in raztopine HPMC iz frakcije TBL _B	50
Slika 22: Kumulativna porazdelitev molske mase HPMC K4M, HPMC K15M, HPMC K100M in TBL _B	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Standardizirane vrednosti masnega in številčnega povprečja molskih mas in polidisperznih indeksov dekstranov	25
Preglednica II: dn/dc konstanta za PVP K30	36
Preglednica III: dn/dc konstanta za HPMC K15M	38
Preglednica IV: Certificirane in določene povprečne vrednosti molskih mas in polidisperzni indeks dekstranov	40
Preglednica V: Povprečne vrednosti ($n = 4$) masnega in številčnega povprečja molske mase in polidisperzni indeks za PVP K30, HPMC K100 in HPMC K15M.....	41
Preglednica VI: Literaturne vrednosti masnih povprečij molskih mas za PVP in HPMC različnih tipov (18^a , 30 , 31^b).....	42
Preglednica VII: Analiza standardov PVP in analiza vzorcev (PVP frakcija).....	46
Preglednica VIII: Analiza standardov HPMC in analiza vzorcev (HPMC frakcija).....	51

POVZETEK

Vloga nekaterih polimerov v farmacevtskih oblikah je uravnavanje sproščanja učinkovine, kar je odvisno predvsem od fizikalno-kemijskih lastnosti polimera. Na tržišču je na voljo veliko različnih tipov istega polimera. Za razvoj optimalne formulacije je pomembno, da poznamo razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih posameznih tipov in tako izberemo najbolj primerne.

Velikostno izključitvena kromatografija z detekcijo na osnovi sipanja svetlobe (SEC-MALS) je ena izmed redkih absolutnih metod za karakterizacijo polimerov v raztopini. Metoda v kombinaciji s koncentracijskim detektorjem lomnega količnika (RI detektor) med drugim omogoča določitev masnega povprečja molske mase, polidisperznosti in porazdelitve molske mase.

V ogrodni tableti s funkcijo podaljšanega sproščanja učinkovine smo s SEC-MALS metodo analizirali hidroksipropilmetil celulozo (HPMC) in polivinilpirolidon (PVP). Polimera smo predhodno ločili z metodo selektivnega raztapljanja z izbiro primerne topila. Razvili smo kromatografsko metodo (reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) za sočasno analizo obeh polimerov. S tem smo preverili čistost (oz. uspešnost) ločbe posameznega izoliranega polimera in določili izkoristek ekstrakcije.

Preizkusili smo različne kombinacije stacionarnih in mobilnih faz za karakterizacijo obeh polimerov s SEC-MALS analizo. S tremi zaporedno vezanimi HSPgel AQ kolonami in fosfatnim pufrom z dodatkom metanola kot mobilno fazo smo dosegli optimalno elucijo. Polimeroma PVP K30 in HPMC K15M smo eksperimentalno določili inkrement lomnega količnika (dn/dc). Vrednosti smo uporabili pri obdelavi rezultatov SEC-MALS analize.

SEC-MALS metodo smo validirali. Ovrednotili smo točnost, selektivnost in ponovljivost metode.

Analizirali smo ogrodne tablete s poznano sestavo. Kot standarde smo analizirali več različnih tipov PVP in HPMC. Rezultate SEC-MALS analize tablet smo primerjali z rezultati analize standardov. Glede na eksperimentalne podatke smo potrdili, da se v tableti nahaja PVP tipa K25 ali K30. Ker je razlika med njunimi povprečnimi molskimi masami majhna, bi morali za določitev točnega tipa PVP v tableti izboljšati metodo ločevanja in optimizirati SEC-MALS metodo. HPMC, ki smo ga izolirali iz ogrodne tablete, se glede na določeno masno povprečje molske mase in porazdelitev molske mase najbolj ujema s HPMC K15M.

Ključne besede: polimeri, HPMC, PVP, podaljšano sproščanje, SEC-MALS, sipanje svetlobe, povprečna molska masa

ABSTRACT

The role of certain polymers in formulations is to regulate the release of the active ingredient which primarily depends on the physicochemical properties of the polymer. There are many different types of the same polymer on the market. In order to develop optimal formulations, it is important to know the differences in the physicochemical properties of each type and select the most appropriate one.

Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering (SEC-MALS) is one of the few absolute methods to characterize the polymers in solution. In combination with concentration refractive index detector (RI detector) the method also allows us to determine the weight average molecular weight, polydispersity and distribution of molecular weight.

Polyvinylpyrrolidone (PVP) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) were analysed in matrix tablets, whose property is extended release of the active ingredient, by using SEC-MALS method. Polymers had previously been separated by the method of selective dissolving where a suitable solvent has been selected. We have developed a chromatographic method (reversed-phase high-performance liquid chromatography) for the simultaneous analysis of both polymers. Purity (ie. performance) of separation of each polymer was verified with RP-HPLC method, which was also used to determine the efficiency of extraction.

We tested various combinations of stationary and mobile phases to characterize both polymers by SEC-MALS analysis. With three serially connected HSPgel AQ columns and phosphate buffer with the addition of methanol as the mobile phase, we reached the optimal elution. We experimentally determined the refractive index increments (dn/dc) for PVP K30 and HPMC K15M. Values were used in the processing of the results of SEC-MALS analysis.

The method was validated. We evaluated accuracy, selectivity and reproducibility of the SEC-MALS analysis.

We analysed matrix tablets with known composition. We analysed different types of PVP and HPMC as standards. The results of SEC-MALS analysis of the tablets were compared with the results of the analysis of standards. According to the experimental data we confirmed that PVP K25 or K30 is in tablets. To determine the exact type of PVP in the tablet we would have to improve the method of separation and SEC-MALS method since

the difference between their average molecular weight is small. HPMC, which was isolated from the matrix tablets, according to the M_w and molecular weight distribution most closely matches the HPMC K15M.

Keywords: polymers, HPMC, PVP, extended release, SEC-MALS, light scattering, average molar mass

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	Acetonitril
AmOAc	Amonijev acetat
BSA	Serum govejega albumina
CAD	Nabiti aerosol detektor (<i>Charged Aerosol Detector</i>)
DMSO	Dimetilsulfoksid
FO	Farmacevtska oblika
HPMC	Hidroksiipropilmetil celuloza
LS	Sipanje svetlobe
MALS	Sipanje svetlobe pri več kotih (<i>Multi Angle Light Scattering</i>)
MCC	Mikrokristalna celuloza
MF	Mobilna faza
PCS	Fotonska korelacijska spektroskopija
PDI	Polidisperzni indeks
PP	Polipropilen
PVDF	Poliviniliden fluorid
PVP	Polivinilpirolidon
QELS	Kvazi elastično sipanje svetlobe (<i>Quasi Elastic Light Scattering</i>)
RI	Lomni količnik (refrakcijski indeks)
RMS	Efektivna vrednost (<i>Root Mean Square</i>)
RP-HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (reverzno-fazna kromatografija)
RSD	Relativni standardni odklon
S_{0A}	Slepi vzorec (prazna epruveta); ACN frakcija po uparevanju
S_{0B}	Slepi vzorec (prazna epruveta); netopna frakcija
S_{1A}	Slepi vzorec (HPMC K15M); ACN frakcija po uparevanju
S_{1B}	Slepi vzorec (HPMC K15M); netopna frakcija
S_{2A}	Slepi vzorec (PVP K30); ACN frakcija po uparevanju
S_{2B}	Slepi vzorec (PVP K30); netopna frakcija
SEC	Velikostno izključitvena kromatografija (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SF	Stacionarna faza
SLS	Statično sipanje svetlobe
SV₁	Sestavljeni vzorec 1 (zmes PVP K30 in HPMC K15M)
SV₂	Sestavljeni vzorec 2 (zmes učinkovine A in pomožnih snovi)
SV_A	Sestavljeni vzorec; ACN frakcija po uparevanju
SV_B	Sestavljeni vzorec; netopna frakcija
TBL_A	Tableta; ACN frakcija po uparevanju
TBL_B	Tableta; netopna frakcija

THF	Tetrahidrofurán
UHPLC	Tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti
UV	Ultravijolično
VIS	Vidno

1 UVOD

1.1 POLIMERI

Polimeri (grško *poli*: mnogo/veliko, *meros*: deli/enote) so makromolekule, ki jih sestavljajo manjše ponavljajoče se strukturne enote imenovane monomeri. Ti so med seboj povezani s kovalentnimi vezmi in tvorijo spojine z velikimi molskimi masami. Proces združevanja monomernih enot v daljše verige imenujemo polimerizacija. Glede na postopek pridobivanja ločimo kondenzacijske in adicijske polimere. Kadar so makromolekulske verige sestavljene iz ene vrste monomerov, govorimo o homopolimerih. Makromolekule, ki jih sestavljata dve ali več različnih osnovnih enot, uvrščamo med kopolimere (heteropolimere). Glede na način vezave dveh ali več različnih monomernih enot jih delimo na izmenične, statistične, naključne, blok in razvejane kopolimere. Polimerne verige so lahko linearne ali razvejane, kar vpliva na njihove fizikalne lastnosti. Glede na izvor polimere razdelimo na naravne, polysintetične in sintetične.

1.1.1 Polimeri kot pomožne snovi

Polimeri se v farmacevtski industriji uporabljajo kot učinkovine (npr. beljakovine) in kot pomožne snovi. Glede na njihove fizikalno-kemijske lastnosti jih v formulacije vključujemo z različnim namenom. Kot pomožne snovi imajo lahko vlogo polnil, veziv, razgrajeval, stabilizatorjev, uravnavajo in prirejajo sproščanje, izboljšajo topnost učinkovin, zagotavljajo gastrorezistenco, itn. (1). Veliko polimerov v eni farmacevtski obliki (FO) lahko opravlja več nalog hkrati.

Zelo pomembna naloga polimerov je uravnavanje sproščanja učinkovin. Pri prirejenem sproščanju se mesto, čas ali hitrost sproščanja prilagodi namenu/načinu delovanja. Dosežemo ga lahko s posebno sestavo, s posebno FO ali s posebnim postopkom izdelave. Pomembno je, da s FO s prirejenim sproščanjem dosežemo maksimalno koncentracijo učinkovine v krvi takrat, ko so simptomi bolezni najbolj izraziti. S takšnimi FO zmanjšamo pogostost odmerjanja in s tem povečamo zadovoljstvo in zaupanje bolnikov. Prirejene FO so lahko bolj učinkovite in tudi bolj varne, saj se zmanjša pojav neželenih učinkov.

Formulacije s prirejenim sproščanjem imajo tudi svoje slabosti, med katere spada npr. zahtevna izdelava, težko prilagodljiv odmerek, nevarnost metabolizma 1. prehoda in t.i. »dose dumpinga«, t.j. nenadna sprostitvev celotnega odmerka učinkovine. (2-6).

Med prirejene FO spadajo ogrodne tablete, obložene tablete, kapsule, pelete, mikrokapsule, gastrozistentni sistemi, transdermalni obliži, depo injekcije, osmotski sistemi, itn. Poznamo več vrst prirejenega sproščanja: zakasnelo (učinkovina se začne sproščati po določenem časovnem zamiku), pulzirajoče (sproščanje v časovnih presledkih) in podaljšano sproščanje (kontinuirano sproščanje skozi daljše časovno obdobje) (2, 7, 8).

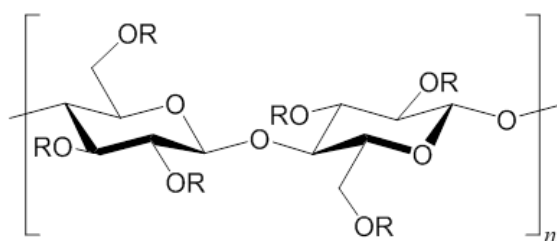
Ogrodne (hidrofilne) tablete so najpogostejša FO za podaljšano sproščanje. Pri tem imajo ključno vlogo polimeri, ki nabrekajo. Prisotnost vode ali bioloških tekočin spremeni strukturo polimera in omogoči učinkovini, da se sprosti/sprošča iz ogrodja. Zunanja plast tablete hidratira in nastane gelska plast. Njena hitra tvorba je kritična točka pri preprečevanju močenja notranjosti in razpada tabletnega jedra, saj nadzoruje prodiranje dodatne vode v tableto. Po popolni hidrataciji zunanje plasti gela se le ta raztopi. Nadomesti jo notranja plast, ki mora biti dovolj kohezivna in kontinuirana, da upočasni vdor vode in kontrolira difuzijo učinkovine (4, 6, 8-13).

Nabrekajoče hidrofilne ogrodne tablete pripravimo s stiskanjem zmesi hidrofilnih polimerov in učinkovin. Takšni polimeri so HPMC, karboksimetil celuloza, PVP, polietilen oksid, karbopol, itn. (12, 14-16).

1.1.2 Hidroksipropilmetil celuloza

Hidroksipropilmetil celuloza (Slika 1) je derivat mikrokristalinične celuloze in jo uvrščamo med pilsintetične polimere. Njeno kemijsko ime je celulozni 2-hidroksipropil metil eter. V uporabi je tudi veliko krajših komercialnih imen (npr., *Methocel*, *Pharmacoat*). Osnovni skelet sestavljajo glukozne enote, ki so med seboj povezane z β -1,4 glikozidnimi vezmi. Proste hidroksilne skupine na glukoznih enotah so zaetrene z metoksilnimi in hidroksipropilnimi skupinami. Množina metoksi in hidroksipropilnih skupin določa stopnjo substitucije, kar poleg velikosti makromolekul vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti HPMC (3, 11, 17, 18).

HPMC je kemijsko inertni, neionski, hidrofilni polimer. Hidrofoben značaj ji dajejo alkilne metoksi skupine, vendar hidrofilnost hidroksipropilnih skupin prevlada (19). Glede na viskoznost in obseg substitucije poznamo več tipov HPMC, ki so dostopni na trgu.



$R=H, CH_3, \text{ ali } CH_2CH(OH)CH_3$

Slika 1: Strukturna formula HPMC

HPMC je delno topna v hladni vodi in oblikuje viskozno koloidno raztopino, vendar je topnost močno odvisna od tipa HPMC. Praktično netopna je v topli vodi, kloroformu, etanolu (95 %) in etru, topna pa je v nekaterih mešanica vode in/ali organskih topil.

Tehnološko je HPMC multifunkcionalen polimer, ki se uporablja kot sredstvo za oblaganje, za tvorbo filma, uravnavanje sproščanja, kot vezivo v tabletah in kapsulah, kot sredstvo za zvišanje viskoznosti ali kot stabilizator (3, 16, 20-22). Zaradi kemijskih in fizikalnih lastnosti jo uporabljajo v uveljavljenih farmacevtskih postopkih, kot so direktno stiskanje ter suho in mokro granuliranje. Uporaba HPMC je zelo široka v peroralnih, oftalmičnih, nazalnih in topikalnih formulacijah (3, 15, 23). Rutinsko se uporablja za oblaganje tablet, saj se lahko uporablja kot vodna disperzija, kar prispeva k varovanju okolja (24).

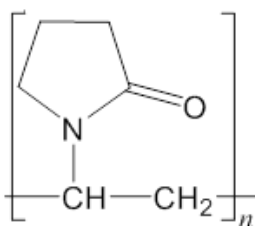
HPMC je eden od pomembnejših hidrofilnih nosilcev v (per)oralnih sistemih za kontrolirano dostavo učinkovin. Tako lahko poveča biološko uporabnost mnogih učinkovin. Pri tem ima ključno vlogo njena lastnost nabrekanja, kar ima pomemben učinek na kinetiko sproščanja učinkovine. Hidratacija polimera je odvisna od vsebnosti hidroksipropilnih skupin. Zaradi interakcij med molekulami vode oz. organskega topila (npr. MeOH) in funkcionalnimi skupinami polimera pride do nabrekanja. Verige HPMC se sprostijo in poveča se volumen FO. Učinkovina tako lahko difundira iz tablete (2, 4, 6, 8-13, 16, 25-28).

Prednosti HPMC so dobre kompresijske lastnosti, relativno nizka cena, netoksičnost, dostopna dokumentacija, sposobnost tvorjenja preprostih in robustnih FO, ki se jih da

enostavno izdelati, itn. Veliko se uporablja tudi zaradi biokompatibilnosti, biorazgradljivosti in bioadhezivnih lastnosti (4, 6, 9, 10, 18, 29).

1.1.3 Polivinilpirolidon

V začetku 20. stoletja je nemški kemik Walter Reppe raziskoval kemijske reakcije acetilena. Odkril je, da pri reakciji acetilena s pirolidonom nastane vinilpirolidon. (30, 31) Produkt neradikalne reakcije je vsestransko uporaben, fiziološko inerten PVP (Slika 2) (1, 2, 30, 32, 33).



Slika 2: Strukturna formula PVP

Kemijsko je PVP terciarni amid in Lewisova baza s površinsko aktivnostjo. Amfifilne lastnosti mu dajejo polarne amidne in nepolarne metilenske skupine. Topen je tako v hidrofilnih kot hidrofobnih topilih: npr. v vodi, metanolu, acetonitrilu, kloroformu in etanolu (95 %). Povprečno molsko maso PVP nam poda vrednost K . Izražena je kot relativna viskoznost v vodni raztopini in je del komercialnega imena. Njegovo kemijsko ime je poli[1-(2-okso-1-pirolidinil)etilen]. Na trgu lahko zasledimo več različnih komercialnih imen kot so *Povidone*, *Kollidon*, *Plasdone*, idr. (30-35).

V farmaciji se PVP veliko uporablja kot pomožna snov, še posebej v (per)oralnih tabletah in raztopinah. Je multifunkcionalen polimer in se uporablja kot sredstvo za oblaganje ali tvorjenje filma, kot polnilo, vezivo ali razgrajevalo v tabletah in kapsulah, kot snov za kontrolirano sproščanje, itn. Primarno se uporablja v trdih dostavnih sistemih (vezivo v procesu mokre granulacije). Zelo pomembna lastnost PVP je tvorba stabilnih vodotopnih kompleksov z netopnimi učinkovinami, ki jo izkoriščamo za izboljšanje sproščanja in topnosti učinkovin (1, 16, 30-32, 34, 36).

1.1.4 Povprečja molskih mas in porazdelitev molske mase

Stopnja polimerizacije podaja število monomernih enot v makromolekuli. Povezavo med molsko maso polimera in stopnjo polimerizacije opisuje enačba (1):

$$M = M_0 P \quad (1),$$

kjer je M_0 molska masa monomerne enote, P stopnja polimerizacije (število monomernih enot) in M molska masa makromolekule.

Pri polimerizaciji nastanejo polimerne molekule z različno dolgimi verigami oz. z različnimi molskimi masami. Zato pri polimerih ne govorimo o enotni molski masi, temveč o povprečni molski masi polimera. Bolj kot se posamezne molekule polimera med seboj razlikujejo, bolj se razlikujejo tudi povprečja molskih mas.

Znanih je več različnih definicij povprečnih molskih mas:

n-povprečje (številčno povprečje) je statistično povprečje molske mase in ga dobimo, če maso vzorca polimera delimo s celotnim številom vseh polimernih molekul v vzorcu. Na M_n vpliva predvsem število makromolekul. Izrazimo ga z enačbo (2):

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (2),$$

kjer je M_n številčno povprečje molske mase, N_i pa število vseh molekul v vzorcu, ki imajo molsko maso M_i .

Pomembno vlogo pri določanju **masnega (utežnega) povprečja molske mase** ima masa molekul in ne samo njihova številčnost. Čim večji je masni delež molekul z molsko maso M_i , tem večji je njegov prispevek k masnemu povprečju molske mase (enačba (3)):

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (3)$$

Viskozno povprečje definiramo z enačbo (4):

$$M_v = \left(\frac{\sum_i N_i M_i^{1+a}}{\sum_i N_i M_i} \right)^{\frac{1}{a}} \quad (4),$$

kjer je a empirična konstanta odvisna od hidrodinamičnega volumna (odvisna je od narave polimera kot tudi od topila, v katerem smo polimer raztopili). Če je njena vrednost 1, je viskozno povprečje enako masnemu povprečju molske mase.

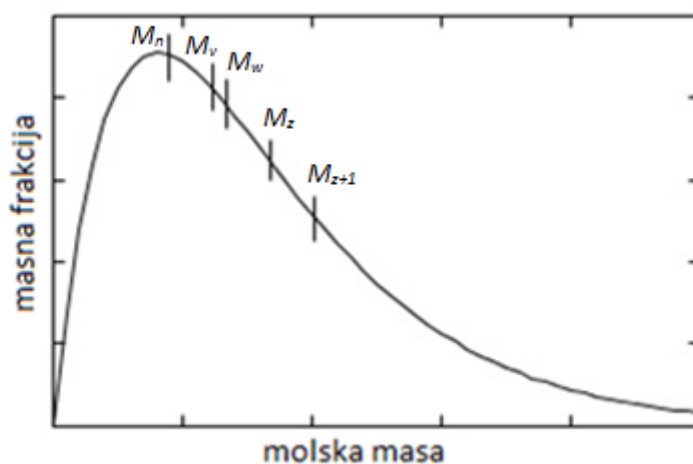
Na **z in z+1 povprečje molske mase** ima vpliv molekul z veliko molsko maso večji doprinos kot pri ostalih povprečjih molskih mas. Zato ju imenujemo tudi **višji povprečji molske mase**. Izrazimo ju lahko s skupno enačbo (5):

$$M = \frac{\sum_i N_i M_i^{n+1}}{\sum_i N_i M_i^n} \quad (5)$$

Kadar je $n = 2$, govorimo o **z-povprečju molske mase**, če pa je $n = 3$, pa o **z+1-povprečju molske mase**. (37-41)

Nekateri avtorji omenjajo tudi **p-povprečje molske mase** M_p , ki predstavlja molsko maso makromolekul na maksimumu kromatografskega vrha. Makromolekul s takšno molsko maso je največ (37, 38).

Zaradi različnih načinov določitve oz. različnih definicij povprečij molskih mas se njihove vrednosti med seboj razlikujejo. Razlika med njimi narašča z razpršenostjo velikosti molekul okrog določene povprečne vrednosti (Slika 3). Le v primeru monodisperznega vzorca so vsa povprečja molskih mas enaka.



Slika 3: Odvisnost molske mase od masne frakcije polimera

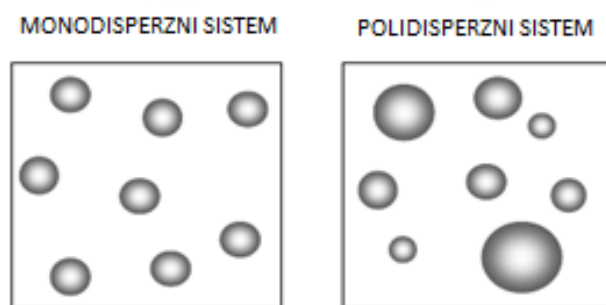
Različna povprečja molske mase polimera so posledica določanja molske mase z različnimi tehnikami. Z osmometrijo tako na primer določimo M_n , z merjenjem sipanja svetlobe M_w , M_v je povezano z merjenjem viskoznosti, M_z pa s sedimentacijo pri analitičnem ultracentrifugiranju. Skupna povezava povprečij molskih mas za polidisperzne polimere je naslednja:

$$M_n < M_v < M_w < M_z < M_{z+1} \quad (6)$$

Razpršenost oz. raznolikost molskih mas polimernih molekul v vzorcu opisuje polidisperznost. Definiramo jo kot mero heterogenosti velikosti molekul. Izražamo jo kot indeks polidisperznosti, ki je razmerje med masno in številčno molsko maso (enačba (7)):

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \quad (7),$$

kjer je PDI polidisperzni indeks, M_w masno povprečje molske mase in M_n številčno povprečje molske mase. Za idealne monodisperzne vzorce, kjer so vse verige enako dolge, je PDI enak 1. Razliko med monodisperznim in polidisperznim sistemom prikazuje Slika 4. Med takšne vzorce prištevamo npr. proteine. Sintetični polimeri, ki nastanejo med nadzorovano polimerizacijo, imajo PDI vrednosti med 1,02 – 1,10. Tudi te uvrščamo med monodisperzne polimere. Običajno je porazdelitev širša in so vrednost PDI med 2 in 20 (37, 40, 41).



Slika 4: Primera monodisperznega in polidisperznega sistema

Diferencialna, $f(M)$, in kumulativna (integralna), $I(M)$, funkcija porazdelitve molske mase se uporabljata za opis porazdelitve molske mase. S kumulativno porazdelitvijo lahko enostavno določimo masni delež polimera v specifičnem območju molske mase. Takšne informacije težko razberemo iz diferencialne porazdelitve. Ta pa je bolj priročna za oceno simetrije porazdelitve molske mase, saj razkriva multimodalno porazdelitev ali določitev minimuma in maksimuma molske mase in molsko maso najpogostejše frakcije.

Porazdelitev molske mase lahko opišemo grafično s porazdelitveno krivuljo ali matematično s porazdelitveno funkcijo. Porazdelitveno funkcijo, ki izraža količino snovi kot masni delež, imenujemo masna porazdelitev molske mase (označujemo z indeksom w). Ta se najpogosteje uporablja. Uporabljamo lahko tudi molski delež (številčni delež), kar imenujemo številčna porazdelitev molske mase (indeks n) (38, 40).

1.2 VELIKOSTNO IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA

Velikostno izključitvena kromatografija (SEC) je kromatografska metoda za kvantitativno in kvalitativno analizo makromolekul. Je relativna metoda za določevanje molske mase makromolekul. Ločba poteka na osnovi njihove velikosti oz. hidrodinamičnega volumna. Manjše molekule se ujamejo v pore stacionarne faze (SF), večje molekule pa potujejo mimo por in se zato prej eluirajo iz kolone. Je edina kromatografska tehnika, kjer med analitom in SF ne pride do nastanka interakcij, ampak temelji le na entropijskem ločevanju. Glavni mehanizmi ločevanja so zato sterična izključitev, omejena difuzija in ločevanje s pretokom. Zamaknjeni vrhovi ali druge nepravilnosti so posledica sekundarnih mehanizmov ločevanja (npr. adsorpcija ali hidrofobne interakcije). Te pojave moramo eliminirati z izbiro drugačnih pogojev analize, oz. moramo te interakcije upoštevati pri interpretaciji dobljenih rezultatov (40, 42-45).

S pospešenim razvojem je velikostna izključitvena kromatografija v veliki meri nadomestila uporabo tradicionalnih metod za določevanje molske mase, kot sta osmometrija ali ultracentrifugiranje.

Metoda je relativno enostavna, vsestransko uporabna in ima sposobnost določanja celotne porazdelitve molske mase. K prednostim metode v primerjavi s tradicionalnimi metodami za karakterizacijo polimerov prištevamo tudi hitrost merjenja, nizko porabo vzorca, intenziven razvoj instrumentacije in dostopnost instrumentov na trgu. Glavne pomanjkljivosti SEC metode so dolgotrajna priprava vzorcev za analizo (dolgotrajno raztapljanje vzorcev, spiranje sistema...) in priprava kromatografskega sistema (stabilizacija, stabilna bazna linija...) (40).

Pogoj za uspešno ločbo je predvsem izbira topila in SF. Pri izbiri topila oz. mobilne faze (MF) je najbolj pomembno, da je zagotovljena dobra topnost analita. Med organskimi topili se najpogosteje uporablja THF, saj je v njem topnih veliko sintetičnih polimerov. Uporabljajo se še toluen, voda z dodatki različnih soli, kloroform, itn. V primeru slabše topnosti analita, agregacije ali interakcij analita s SF lahko uporabimo tudi kombinacijo dveh (npr. vodna faza/MeOH) ali še več različnih topil in se tako omenjenim težavam lahko izognemo. Kadar kot MF uporabljamo organska topila, govorimo o gelski permeacijski kromatografiji. V primerih, ko makromolekule eluiramo z vodno MF, uporabljamo izraz gelska filtracijska kromatografija (39, 40, 43, 46).

V kombinaciji z organskimi topili se kot SF najpogosteje uporabljajo stiren-divinilbenzenski geli. Za vodne aplikacije se pogosto uporabljajo 2-hidroksietil metakrilatni geli. Ostala polnila na tržišču so še poliakrilamidni geli, sulfonirani polistiren, polivinil alkoholni geli, geli osnovani na dekstranu zamreženim z epiklorhidrinom, silika geli, ipd. (40, 43, 44).

Za ločevanje močno polidisperznih polimerov se uporabljajo SF, ki so mešanica materialov z različno velikimi porami (40, 43, 47).

Za detekcijo makromolekul v kombinaciji s SEC se uporabljajo koncentracijski (RI ali UV) detektorji ter detektor sipanja svetlobe (LS). Na občutljivost posameznega detektorja vplivajo različni parametri. RI detektor je občutljiv na sestavo mobilne faze in spremembe temperature. Pri UV detektorju spremembe temperature in sestava MF ne vplivajo na občutljivost. Se pa z UV detektorjem analizira veliko manj polimerov (ker je pogoj za analizo z UV detektorjem prisotnost kromoforjev v spojini). Detektor sipanja svetlobe je zaradi principa delovanja zelo občutljiv na prisotnost delcev v topilu. Izvor teh je lahko nečista MF, spiranje delcev s kolone (*bleeding*), ipd. Občutljivost LS detektorja na majhne spremembe temperature ali pretoka pa je zanemarljiva (40).

Poznamo dva načina določevanja molske mase z velikostno izključitveno kromatografijo: konvencionalno (relativno) in SEC-MALS (absolutno) metodo. Pri konvencionalni metodi za določitev uporabljamo koncentracijski detektor (RI ali UV detektor). Sama določitev molske mase polimera temelji na detekciji s koncentracijskim detektorjem in kalibracijo kolone s primernimi makromolekulskimi standardi. Analit mora za pravilno določitev povprečne molske mase imeti molsko maso v območju kalibracijskih standardov. Zaradi vpliva hidrodinamičnega volumna lahko kljub temu pride do napačne določitve povprečne molske mase.

Kombinacija SEC z detektorjem sipanja svetlobe in koncentracijskega RI/UV detektorja se uporablja za direktno (absolutno) določanje molske mase polimerov. Kalibracija kolone ni potrebna, molske mase polimerov lahko določamo v celotnem območju molskih mas. Poleg tega metoda omogoča tudi določitev porazdelitve molskih mas (40, 45, 46, 48-53).

1.3 SIPANJE SVETLOBE

Začetki razvoja metod za določevanje molske mase makromolekul, njihove velikosti in konformacije segajo v 19. stoletje, ko je J. C. Maxwell objavil teorijo o svetlobi kot ponavljajočem se sočasnem nihanju električnega in magnetnega polja in interakciji svetlobe s snovjo. Svetloba interagira z nevtralno molekulo, električno polje povzroči nastanek dipola v molekuli, svetloba se ukloni. Intenziteta sipane svetlobe je odvisna od magnitude dipola, ki se ustvari v molekuli. Bolj kot je molekula polarizabilna, večji je inducirani dipol in posledično je večja tudi intenziteta sipane svetlobe. Polarizabilnost je direktno sorazmerna z inkrementom lomnega količnika (dn/dc). Določimo ga z merjenjem spremembe lomnega količnika makromolekule v izbranem topilu v odvisnosti od koncentracije makromolekule.

Makromolekule, ki so veliko manjše od valovne dolžine vpadne svetlobe, lahko obravnavamo kot točke. Sipanje svetlobe večjih makromolekul je neodvisno od kota sipanja. Imenujemo jih izotropične molekule. Za velike molekule to ne velja. Sipana svetloba lahko z različnih koncev molekule detektor doseže v različni fazi, kar lahko pozitivno ali negativno vpliva na celotno sipanje svetlobe v detektorju. Rezultat tega je, da se intenziteta sipane svetlobe v nasprotni smeri širjenja laserskega žarka zmanjša relativno glede na svetlobo razpršeno v smeri naprej in je odvisna od kota. To je opisano z Rayleigh-Gans-Debye teorijo (40, 42).

Poznamo različne tipe sipanja svetlobe. **Statično ali Rayleigh-ovo sipanje svetlobe** (tudi SLS, klasično sipanje): pojavi se pri isti valovni dolžini kot je valovna dolžina vpadne svetlobe. Z njo merimo povprečno intenziteto sipane svetlobe pri več kotih sipanja. Določimo lahko molsko maso (M_w), radij giracije (r_g) in drugi virialni koeficient (A_2) makromolekul. Intenziteta sipane svetlobe je sorazmerna številu elektronov oziroma molski masi, koncentraciji in polarizabilnosti (dn/dc).

Dinamično sipanje svetlobe imenujemo tudi QELS ali PCS. Poda nam nihanje jakosti sipane svetlobe, oz. spreminjanje jakosti sipane svetlobe s časom. Direktno lahko določimo difuzijski koeficient, izračunamo pa hidrodinamični polmer. Sipana svetloba se pojavi pri isti valovni dolžini kot vpadna svetloba, preučuje se nihanje intenzitete sipane svetlobe v odvisnosti od časa (40, 42, 54).

Ramanovo sipanje je pojav, kjer je valovna dolžina sipane svetlobe drugačna od valovne dolžine vpadne svetlobe. Na ta način lahko dobimo informacije o strukturi spojin (40).

1.3.1 Statično sipanje svetlobe v teoriji

S sipanjem svetlobe delcev, ki so v primerjavi z valovno dolžino svetlobe veliko manjši, se je ukvajal Lord J. W. S. Rayleigh. Po njem se pojav imenuje Rayleighovo sipanje in pojasnjuje, da je gostota energijskega toka sipane svetlobe obratno sorazmerna s četrto potenco valovne dolžine. Tako je pojasnil, zakaj je nebo ob jasnem vremenu obarvano modro in zakaj se ob sončnem zahodu obarva rdeče. Raziskoval je tudi sipanje svetlobe delcev v topilu in ga opisal z enačbo (8):

$$R_{\theta} = \frac{(I_{\theta} - I_{\theta, \text{topilo}})r^2}{I_0 V} \quad (8),$$

kjer je R_{θ} Rayleighovo razmerje (cm^{-1}), I_{θ} intenziteta sipane svetlobe raztopine, $I_{\theta, \text{topilo}}$ intenziteta sipane svetlobe topila, I_0 intenziteta vpadne svetlobe, V volumen v katerem opazujemo sipanje svetlobe in r razdalja med volumnom v katerem opazujemo sipanje svetlobe in detektorjem.

Rayleighovo razmerje opisuje odvisnost intenzitete sipane svetlobe od kota pod katerim pride do uklona. Podaja razliko med Rayleighovimi razmerji raztopine in čistega topila. Je neodvisno od intenzitete vpadne svetlobe in geometrije LS celice. Za polidisperzne polimere je totalno Rayleighovo razmerje izraženo kot vsota razmerij, ki ustrezajo sipanju posamezne molekule. To pomeni, da je Rayleighovo razmerje razredčenih raztopin polidisperznih polimerov sorazmerno masnemu povprečju molske mase (M_w) in tako iz serije meritev sipanja svetlobe polidisperznih polimerov določimo M_w (40, 42, 54).

V praksi intenziteto sipane svetlobe s fotodiodami pretvorimo v napetost. Za pretvorbo intenzitete sipane svetlobe v napetost v Rayleighovem razmerju je potrebno določiti kalibracijsko konstanto f , ki vključuje tudi geometrijo LS celice (9):

$$R_{\theta} = f \frac{V_{\theta} - V_{\theta, \text{topilo}}}{V_{\text{laser}}} \quad (9),$$

kjer je V_{θ} napetost raztopine, $V_{\theta, \text{topilo}}$ napetost topila in V_{laser} napetost svetlobnega žarka na detektorju.

Intenziteto sipane svetlobe razredčene raztopine polimera opišemo z Rayleigh-Gans-Debye enačbo, ki jo je preoblikoval in poenostavil Zimm (10). V enačbi je združil intramolekularno (sipanje monomerov v makromolekuli) in intermolekularno (sipanje različnih makromolekul) sipanje svetlobe makromolekul.

$$\frac{K^*c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c \quad (10),$$

kjer je R_θ Rayleighovo razmerje, K^* optična konstanta, c koncentracija polimera, $P(\theta)$ funkcija sipanja delcev, M_w masno povprečje molske mase polimera in A_2 drugi virialni koeficient.

Optično konstanto K^* izrazimo z enačbo (11):

$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A \lambda_0^4} \quad (11),$$

kjer je n_0 lomni količnik topila, dn/dc inkrement specifičnega lomnega količnika, N_A Avogadrovo število in λ_0 valovna dolžina laserskega žarka v vakuumu.

Inkrement specifičnega lomnega količnika dn/dc je pomemben parameter za obdelavo podatkov sipanja svetlobe. Definiramo ga kot naklon odvisnosti lomnega količnika polimerne raztopine od njegove koncentracije. Odvisen je od kemijske strukture polimera, temperature in valovne dolžine. Zmanjšuje se z naraščajočo valovno dolžino, ta odvisnost pa postane manj izrazita proti višjim valovnim dolžinam. Narašča s padajočim lomnim količnikom topila. V območju nizkih molskih mas dn/dc narašča z naraščajočo maso. Pri molski masi nekaj tisoč pa dn/dc postane konstanten in lahko odvisnost molske mase od dn/dc zanemarimo. Določimo ga lahko eksperimentalno (*offline*, *online*) ali pa ga izračunamo (40, 42, 46, 49).

Drugi virialni koeficient A_2 je povezan s termodinamično kakovostjo topila. Opisuje jakost interakcij med topilom in raztopljenim polimerom. Odvisen je od temperature in molske mase polimera. V razredčeni raztopini so molekule polimera izolirane, tako intermolekularne interakcije polimer-topilo prevladajo nad intramolekularnimi interakcijami polimer-polimer. Fizikalne lastnosti polimera (predvsem topnost) v raztopini so zato odvisne od ravnovesja med temi interakcijami, te pa so močno odvisne od termodinamične kakovosti topila.

Glede na kakovost ločimo tako imenovana dobra in slaba topila. V dobrih topilih ($A_2 > 0$) so ugodnejše intermolekularne interakcije. V slabem topilu so ugodnejše intramolekularne

interakcije, polimer pa ima veliko manjšo molekulsko dimenzijo. Kadar se kakovost topila zniža čez določeno mejo, pride do fazne separacije in obarjanja polimera ($A_2 < 0$). Ko se intermolekularne interakcije izenačijo z intramolekularnimi interakcijami, je sistem v tako imenovanih mirnih ali theta pogojih ($A_2 = 0$). Kadar je koncentracija polimera dovolj nizka, lahko A_2 oziroma člen $2A_2c$ v enačbi (10) zanemarimo. To s pridom uporabimo pri SEC-MALS analizah (18, 40, 48, 53).

$P(\theta)$ opisuje kotno odvisnost sipane svetlobe. Intenziteta sipane svetlobe se zmanjšuje z naraščanjem kota sipanja. $P(\theta)$ je povezana z radijem giracije preko enačbe (12):

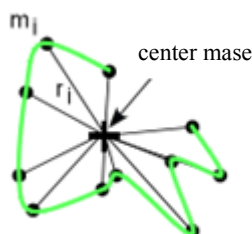
$$P(\theta) = 1 - \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \quad (12),$$

kjer je λ_0 valovna dolžina laserja v vakuumu, r_g radij giracije (RMS radij) in θ kot pod katerim se svetloba ukloni. Funkcija sipanja je neodvisna od koncentracije raztopine in dn/dc (18, 40, 42, 46, 49).

Če je molekula z maso M sestavljena iz delcev m_i , je radij giracije $\langle r_g^2 \rangle$:

$$\langle r_g^2 \rangle = \frac{\sum r_i^2 m_i}{M} \quad (13),$$

kjer je r_i razdalja monomera m_i od centra mase makromolekule z maso M (glej sliko 5).



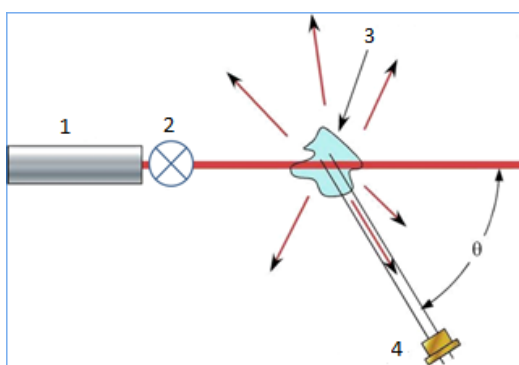
Slika 5: Prikaz oddaljenosti monomerne enote m_i od centra mase makromolekule

Radij giracije je merilo velikosti molekule merjene s porazdelitvijo mase okrog središča mase. Vrednost radija giracije za polimerno verigo je povezana z njegovo maso in je odvisna od oblike telesa (oblika naključnega navitja, krogle ali palice). Določimo lahko konformacijo vzorca, t.j. prostorska struktura makromolekule v razredčeni raztopini. (40, 42).

1.3.2 Statično sipanje svetlobe v praksi

Sipanje svetlobe je ena redkih absolutnih metod za določevanje molske mase polimerov v raztopini. Poleg tega lahko poda informacijo o velikosti in strukturi makromolekul ter o medsebojnih interakcijah oz. o interakcijah makromolekul s topilom (40, 42, 48). MALS (*Multi Angle Light Scattering*) je tehnika, ki omogoča sočasno merjenje intenzitete sipane svetlobe pri več kotih.

Detektor je sestavljen iz pretočne celice, ki je obdana s tremi ali več fotodiodami, nameščenimi pod različnimi koti (Slika 6). V stekleno pretočno celico v obliki cilindra je izvrtan kanal, ki omogoča kontinuiran pretok raztopine in vpadne svetlobe laserskega žarka (40).



Slika 6: Shema MALS detektorja: ¹laser, ²polarizator, ³volumen v katerem opazujemo sipanje in ⁴detektor (fotodioda) (42)

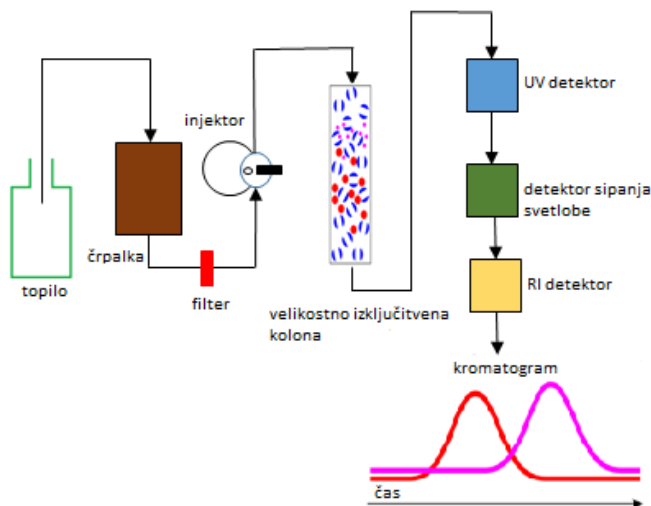
Sipanje svetlobe lahko merimo šaržno (*batch measurements*) ali kontinuirno, oz. kromatografsko (*online*). V šaržnem načinu se MALS detektor uporablja kot samostojni instrument za karakterizacijo polimernega vzorca. Pri tem celoten vzorec injiciramo v detektor naenkrat. Pogoji za določitev karakterističnih parametrov je poznavanje točne koncentracije vzorca. Rezultat takega načina merjenja je masno povprečje molske mase. Če izvedemo šaržne meritve pri več koncentracijah, lahko določimo A_2 . S šaržnimi meritvami se izognemo npr. interakcijam vzorca s SF ali strižni degradaciji makromolekul. Prav tako je možna uporaba agresivnejših topil kot so npr. DMSO ali koncentrirane kisline, v katerih moramo včasih raztopiti določene polimere. Šaržni način je primeren tudi za študije vpliva različnih topil na polimer. To je v kromatografskem eksperimentu težje, saj je potrebno sistem po zamenjavi topila ponovno stabilizirati, za kar navadno porabimo veliko časa.

S kombinacijo oz. uporabo SEC-MALS sistema pridobimo bistveno več informacij. Močno polidisperzen polimer ločimo na SEC koloni. Posamezni segmenti se s kolone eluirajo postopoma v obliki delnih monodisperznih segmentov. Pogoj za uspešno analizo je dobra učinkovitost kolone. Tako dobimo podatke o sipani svetlobi za vsak delni elucijski volumen in tako določeno M_w in r_g . Določimo lahko natančno porazdelitev molske mase in polidisperznost makromolekule. Z izmerjenim radijem giracije lahko v odvisnosti od ustrezno izmerjene molske mase določimo konformacijo vzorca (40, 42, 48, 51, 55, 56).

V kromatografskem eksperimentu točna koncentracija vzorca ni ključna, saj jo določimo s koncentracijskim RI (ali UV) detektorjem. Zaradi velikega števila polimerov, ki v UV območju ne absorbirajo, je RI detektor glavni koncentracijski detektor. Iz signala RI detektorja v voltih, kalibracijske konstante RI detektorja in inkrementa lomnega količnika dn/dc dobimo koncentracijo. RI konstanto določimo z raztopinami s točno poznano koncentracijo in natančno določenim dn/dc . Za kalibracijo se najpogosteje uporablja NaCl s točno določeno vrednostjo dn/dc za posamezno koncentracijo. Za natančne rezultate morata biti valovna dolžina RI in MALS detektorja enaki.

SEC-MALS lahko kombiniramo tudi z UV koncentracijskim detektorjem. Vendar večina sintetičnih in naravnih polimerov v UV območju ne absorbira. Izjema so stirenski polimeri in proteini (40, 48, 49, 57).

Slika 7 prikazuje sestavo SEC-MALS sistema. Raztopino polimera injiciramo v sistem. Ta z mobilno fazo potuje na kolono, kjer poteka ločba glede na velikost. Frakcionirani delež polimerov potuje skozi MALS fotometer, ki posname signale sipanja svetlobe makromolekule. Z RI detektorjem določimo koncentracijo polimera (40, 46, 54).



Slika 7: Shematski prikaz SEC-MALS sistema

Osnova vseh izračunov izvedenih v SEC-MALS je Zimmova izpeljava Rayleigh-Gans-Debye enačbe (enačba (10)). Molska masa in RMS radij polimera sta izračunana za vsak elucijski volumen izbranega kromatogramskega vrha s pomočjo tako imenovane Debyeve premice. Podatkovne točke na premici ustrezajo intenziteti sipane svetlobe pri različnih kotih pri določenem elucijskem volumnu. Debyeova premica, ki je po dogovoru $R_{\theta}/K*c$ v odvisnosti od $\sin^2(\theta/2)$, se uporablja za ekstrapolacijo intenzitete sipane svetlobe do kota sipanja nič. Odsek Debyeve premice pri kotu nič predstavlja molsko maso, naklon pa RMS radij. Premica je narejena z eno koncentracijo, zato s SEC-MALS ni mogoče določiti drugega virialnega koeficienta (40, 46, 48).

SEC-MALS je absolutna metoda. Na absolutno natančnost določitve povprečne molske mase vplivajo: kalibracijska konstanta f , inkrement specifičnega lomnega količnika dn/dc in koncentracija c polimernih molekul v raztopini.

Kalibracijsko konstanto pogosto določamo s toluenom. Kalibracijo izvedemo pri kotu 90° C in pri vklopljeni (*on*) in izklopljeni (*off*) fotodiodi. Za toluen absolutno določimo Rayleighovo razmerje in nato preko enačbe (9) izpeljemo konstanto f . Natančnost Rayleighovega razmerja toluena je v direktni povezavi z natančnostjo molske mase.

Kalibracijska konstanta je neodvisna od topila, rahlo odvisna pa je od temperature. Nanjo vpliva predvsem geometrija celice in lomni količnik. Določiti jo je potrebno po vsakem čiščenju oziroma odpiranju celice.

Čeprav je SEC-MALS absolutna metoda, pri kateri za meritve molske mase ne potrebujemo standarda in lahko vse parametre direktno izračunamo, je za uspešne meritve nujno določiti nekatere parametre. Z njimi lahko primerno obdelamo pridobljene podatke in izračunamo pravilne molske mase in radije giracije.

Vsak detektor ima drugačno občutljivost in operira z drugačnim volumnom sipanja (različni geometrijski efekt celice). Zato je potrebno izvesti normalizacijo. To je proces s katerim različne detektorske signale povežemo z 90° detektorskim signalom, ki je edini kalibriran, in MALS kalibracijsko konstanto. Po definiciji je vrednost normalizacijskega koeficienta detektorja pri 90° vedno 1. Normalizacijo izvedemo z majhnim (< 10 nm), monodisperznim vzorcem, oz. z vzorcem, ki ima nizko polidisperznost in je izotropičen. Takšni vzorci so npr. goveji serumski albumin (BSA), dekstran, pululan, polistiren. Normalizacijo je potrebno izvesti ob instalaciji sistema, nato pa ob vsaki zamenjavi topila oz. mobilne faze ali ob reinstalaciji celice.

Med elucijo polidisperznega vzorca pride do zamika volumna med MALS in drugimi detektorji. Sestavljen je iz volumna cevki znotraj detektorja, volumna celice in volumna interdetektorsko povezanih cevi in opreme. Zaradi volumna med detektorji, koncentracija, ki je izmerjena ob določenem času s koncentracijskim detektorjem, ne ustreza intenziteti svetlobe, ki je ob istem času izmerjena z LS detektorjem. Programska oprema uporabi zamik volumna, da popravi čas, ki je potreben za premik tekočine med instrumenti, tako da se intenziteta sipane svetlobe ujema z ustrezno koncentracijo. Zamik volumna (*alignment, interdetector delay*) je treba ponovno določiti samo ob zamenjavi cevk med detektorji. Zamik volumna določimo z meritvami monodisperznega polimera in poravnanimi vrhovi LS in RI signala. Samo v primeru monodisperznih polimerov so vrhovi kromatogramov elucijskih volumnov vseh detektorjev poravnani. Vzrok so različni odzivi različnih detektorjev na molsko maso in koncentracijo. Za določitev zamika volumna lahko uporabljamo BSA, polietilenoksid ali polistiren (40, 48).

Do razširitev vrha (*band broadening*) pride zaradi premika vrha med več detektorji, ki so povezani med seboj. Čeprav je vpliv na molsko maso majhen, je vseeno vir možnih napak in predstavlja »kozmetično« težavo. Pomerimo ga z monodisperznim polimerom (npr. BSA) (40, 50, 58).

2 NAMEN DELA

Poseben izziv pri analizi farmacevtskih izdelkov predstavljajo različni polimeri, ki so vključeni v formulacije. Velikokrat je v eni formulaciji hkrati več polimerov, ki opravljajo različne funkcije. Na tržišču je dostopnih veliko različnih tipov istega polimera, ki se med seboj razlikujejo v molski masi in posledično v fizikalno-kemijskih lastnostih. Z uporabo absolutne SEC-MALS metode za karakterizacijo polimerov lahko določimo parametre kot so povprečna molska masa, radij giracije in porazdelitev molske mase, ter tako določimo tip vključenega polimera.

Naša naloga je karakterizacija HPMC in PVP v ogrodni tableti. Sestava tablete nam je poznana. Pred analizo bomo polimera ločili. Poiskali bomo primerno topilo, v katerem bo topen samo en izmed polimerov in ju tako ločili s postopkom selektivnega raztapljanja. Razvili bomo RP-HPLC metodo, s katero bomo preverili uspešnost ločbe in določili izkoristek ekstrakcije posameznega polimera iz tablete.

Razvili bomo SEC-MALS metodo, s katero bomo določili povprečne molske mase, polidisperzni indeks in porazdelitev molske mase obeh polimerov v vzorcu. Metodo bomo validirali. Analizirali bomo različne tipe HPMC in PVP in dobljene rezultate primerjali z vzorcem. Določili bomo tip posameznega polimera v tableti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA SEC-MALS ANALIZO

Vzorci

- Tableta (TBL) (zmes učinkovine A in pomožnih snovi)
- Slep vzorec 0 (S_0) (prazna epruveta)
- Slep vzorec 1 (S_1) (Methocel K15M – HPMC K15M; Colorcon)
- Slep vzorec 2 (S_2) (Plasdone K30 – PVP K30; Ashland)
- Sestavljeni vzorec 1 (SV_1) (zmes PVP K30 in HPMC K15M)
- Sestavljeni vzorec 2 (SV_2) (zmes učinkovine A in pomožnih snovi)

Priprava vzorcev

Topilo: acetonitril (CH_3CN ; ACN), HPLC Gradient Grade; J.T.Baker (Netherlands)

Tableta (TBL_A in TBL_B):

Tableto (3 paralelke) smo stehtali, ji s skalpelom odstranili oblogo in tabletno jedro ponovno stehtali. Zdrobili smo ga v ahatni terilnici, prenesli v 15 mL polipropilensko (PP) konično epruveto in stehtali. Vzorcju smo dodali 2,5 mL ACN, ga premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Supernatant smo prenesli v prazno PP konično epruveto, ostanku pa smo ponovno dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Postopek smo še enkrat ponovili. Supernatant ni bil povsem bister, zato smo ga ponovno centrifugirali in bistro raztopino prenesli v 25 mL konično bučko. PP konično epruveto smo še enkrat sprali z ACN. Nato smo ACN iz konične bučke uparili pod znižanim tlakom. Netopnemu ostanku v bučki smo dali oznako TBL_A .

Neraztopljeni ostanek v PP konični epruveti smo pri 60 °C 20 ur sušili v sušilniku. Vzorec smo ohladili v eksikatorju in ga shranili za nadaljnje analize. Netopnemu ostanku smo dali oznako TBL_B .

Slepa vzorca S_{0A} in S_{0B}

V 15 mL PP konično epruveto (2 paralelki) smo dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Supernatant smo prenesli v prazno PP konično epruveto, v prvo PP konično epruveto pa smo ponovno dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Postopek smo še enkrat ponovili. ACN smo prenesli v 25 mL konično bučko. PP konično epruveto smo še enkrat sprali z ACN. Nato smo ACN uparili pod znižanim tlakom. Tako pripravljen vzorec smo poimenovali S_{0A} .

PP konično epruveto smo pri 60 °C 20 ur sušili v sušilniku. Tako pripravljen vzorec smo poimenovali S_{0B} .

Slepa vzorca S_{1A} in S_{1B}

V 15 mL PP konično epruveto (dve paralelki) smo natehtali točno okrog 50 mg HPMC K15M. Vzorcju smo dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Supernatant smo prenesli v prazno PP konično epruveto, ostanku pa smo ponovno dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Postopek smo še enkrat ponovili. Supernatant ni bil povsem bister, zato smo ga ponovno centrifugirali in bistro raztopino prenesli v 25 mL konično bučko. PP konično epruveto smo še enkrat sprali z ACN. Nato smo ACN uparili pod znižanim tlakom. Tako pripravljen vzorec smo poimenovali S_{1A} .

Neraztopljeni ostanek v PP konični epruveti smo pri 60 °C 20 ur sušili v sušilniku. Netopnemu ostanku v PP konični epruveti smo dali oznako S_{1B} .

Slepa vzorca S_{2A} in S_{2B}

V 15 mL PP konično epruveto (dve paralelki) smo natehtali točno okrog 8 mg PVP K30. Vzorcju smo dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Supernatant smo prenesli v prazno PP konično epruveto, v prvo PP konično epruveto pa smo ponovno dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Postopek smo še enkrat ponovili. ACN smo prenesli v 25 mL konično bučko. PP konično epruveto smo še enkrat sprali z ACN. Nato smo ACN uparili pod znižanim tlakom. Tako pripravljen vzorec smo poimenovali S_{2A} .

PP konično epruveto smo pri 60 °C 20 ur sušili v sušilniku. Tako pripravljen vzorec smo poimenovali S_{2B}.

Sestavljeni vzorec 1A in 1B (SV_{1A} in SV_{1B})

V 15 mL PP konično epruveto (6 paralelk) smo zatehtali točno okrog 8 mg PVP K30 in 50 mg HPMC K15M (PVP K30 : HPMC K15M = 1 : 6,25). Vzorcju smo dodali 2,5 mL ACN, ga premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Supernatant smo prenesli v prazno PP konično epruveto, ostanku pa smo ponovno dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Postopek smo še enkrat ponovili. Supernatant ni bil povsem bister, zato smo ga ponovno centrifugirali in bistro raztopino prenesli v 25 mL konično bučko. PP konično epruveto smo še enkrat sprali z ACN. Nato smo ACN iz konične bučke uparili pod znižanim tlakom. Netopnemu ostanku smo dali oznako SV_{1A}. Neraztopljeni ostanek v PP konični epruveti smo pri 60 °C 20 ur sušili v sušilniku. Netopnemu ostanku smo dali oznako SV_{1B}.

Sestavljeni vzorec 2A in 2B (SV_{2A} in SV_{2B})

V 15 mL PP konično epruveto (6 paralelk) smo natehtali točno okrog 1,50 mg učinkovine A, 98,60 mg laktoze monohidrata, 8,00 mg PVP K30, 50,00 mg HPMC K15M, 40,00 mg MCC, 0,40 mg koloidnega silicijevega dioksida in 1,50 mg magnezijevega stearata. Vzorcju smo dodali 2,5 mL ACN, ga premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Supernatant smo prenesli v prazno PP konično epruveto, ostanku pa smo ponovno dodali 2,5 mL ACN, premešali, pustili stati na sobni temperaturi 5 min in centrifugirali (10 min, 10000 obratov). Postopek smo še enkrat ponovili. Supernatant ni bil povsem bister, zato smo ga ponovno centrifugirali in bistro raztopino prenesli v 25 mL konično bučko. PP konično epruveto smo še enkrat sprali z ACN. Nato smo ACN iz konične bučke uparili pod znižanim tlakom. Netopnemu ostanku smo dali oznako SV_{2A}. Neraztopljeni ostanek v PP konični epruveti smo pri 60 °C 20 ur sušili v sušilniku. Netopnemu ostanku smo dali oznako SV_{2B}.

3.1.1 HPLC analiza vzorcev

Reagenti

- Amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$; AmOAc); for analysis; Merck Millipore (Germany)
- Metanol (MeOH); gradient grade for liquid chromatography; Merck Millipore (Germany)
- Dodatno prečiščena voda (Millipore, Advantage A10)

Standarda

- PVP K30
- HPMC K15M

Vzorci

- Tableta (TBL_A in TBL_B)
- Slepri vzorec 0 (prazna epruveta) (S_{0A} in S_{0B})
- Slepri vzorec 1 (HPMC K15M) (S_{1A} in S_{1B})
- Slepri vzorec 2 (PVP K30) (S_{2A} in S_{2B})
- Sestavljeni vzorec 1 (SV_{1A} in SV_{1B})
- Sestavljeni vzorec 2 (SV_{2A} in SV_{2B})

Topila

- Topilo 1: pufer / MeOH = 8 / 2 (V/V);
pufer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mM NaCl, 200 ppm NaN_3 , pH=6,8
- Topilo 2: H_2O / MeOH = 1 / 1 (V/V)
- Topilo 3: dodatno prečiščena voda (Ph. Eur.)

Pufer: 20 mM amonijev acetat

Mobilni fazi:

MF A: 20 mM AmOAc / MeOH = 95 / 5 (V/V)

MF B: 20 mM AmOAc / MeOH = 5 / 95 (V/V)

Kromatografski pogoji

Gradientna HPLC določitev z uporabo zunanega standarda

Kromatografski sistem: UHPLC System; Agilent Technologies, 1290 Infinity

Kolona: Jupiter C4 5 μm 300 \AA (150 \times 4,6) mm

MF A: 20 mM AmOAc / MeOH = 95 / 5 (V/V)

MF B: 20 mM AmOAc / MeOH = 5 / 95 (V/V)

Temperatura kolone: 40 $^{\circ}\text{C}$

Pretok: 1,50 mL/min

Gradient:	t (min)	% MF A	% MF B
	0,0	70	30
	2,0	70	30
	4,0	25	75
	4,50	0	100
	8,0	0	100
	8,10	70	30

Čas analize: 8,20 min

Čas stabilizacije: 3,0 min

Volumen injiciranja: 10 μL

Detektor: Corona Ultra RS CAD (Charged Aerosol Detector), Dionex

Priprava pufra:

v 1 L merilno bučko smo zatehtali 1,54 g AmOAc, z vodo dopolnili do oznake in dobro premešali.

Priprava MF A:

v 1 L merilno bučko smo z merilnim valjem nalili 950 mL pufra in z metanolom dopolnili do oznake. Raztopino smo dobro premešali in jo razplinili z ultrazvokom (5 min).

Priprava MF B:

v 1 L merilno bučko smo z merilnim valjem nalili 5 mL pufra in z metanolom dopolnili do oznake. MF smo dobro premešali in jo razplinili z ultrazvokom (5 min).

Priprava standardov

Priprava osnovne standardne raztopine PVP K30:

v 10 mL merilno bučko smo natehtali točno okrog 50 mg PVP K30 in dodali 2/3 volumna bučke vode. Raztopino standarda smo pustili na sobni temperaturi 5 ur. Nato smo raztopino standarda z vodo dopolnili do oznake in dobro premešali ($c_{\text{PVP}} \approx 5 \text{ mg/mL}$).

Iz osnovne standardne raztopine PVP smo pripravili razredčeno standardno raztopino PVP s koncentracijo 0,250 mg/mL. Za redčenje smo uporabili topilo 2.

Priprava osnovne standardne raztopine HPMC K15M:

v 25 mL merilno bučko smo natehtali točno okrog 25 mg HPMC K15M in dodali 2/3 volumna bučke vode. Raztopino standarda smo pustili v hladilniku 24 ur ($T = 2-8 \text{ }^\circ\text{C}$). Nato smo raztopino standarda z vodo dopolnili do oznake in dobro premešali

($c_{\text{HPMC}} \approx 1 \text{ mg/mL}$). Iz osnovne standardne raztopine HPMC smo pripravili razredčeno standardno raztopino HPMC s koncentracijo 0,125 mg/mL. Za redčenje smo uporabili topilo 2.

Priprava vzorcev

Vzorci z oznako A, ki smo jih pripravili s postopkom selektivnega odtapljanja, smo raztopili v topilu 1. Prefiltrirane vzorce skozi 0,45 μm PVDF membranske filtre (30 mm) smo s topilom 2 dvajsetkrat redčili v HPLC vialo.

Vzorci z oznako B, ki smo jih pripravili s postopkom selektivnega odtapljanja, smo kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko in dodali 2/3 volumna bučke topila 1. Vzorce smo 24 ur raztapljali v hladilniku. S topilom 1 smo dopolnili do oznake in jih filtrirali skozi 0,45 μm PVDF membranske filtre (30 mm). Nato smo filtrat s topilom 2 osemkrat redčili v HPLC vialo.

3.2 SEC-MALS ANALIZA

Reagenti

- Dodatno prečiščena voda (Millipore, Advantage A10)
- Metanol (MeOH); Gradient grade for liquid chromatography; Merck Millipore (Germany)
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); for analysis; Merck Millipore (Germany)
- Natrijev klorid (NaCl); for analysis (min 99,99 %); Merck Millipore (Germany)
- Natrijev azid (NaN_3); $\geq 99,5$ %; Sigma-Aldrich (Germany)
- Natrijev hidroksid (NaOH); pellets for analysis; Merck Millipore (Germany)

Pufer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mM NaCl, 200 ppm NaN_3 , pH = 6,8

Mobilna faza: pufer / MeOH = 8 / 2 (V/V)

Standardi

- Albumin iz govejega seruma (BSA); Bovine Serum Albumin heat shock fraction, pH 7, ≥ 98 %; Sigma-Aldrich (Germany)
- Dekstranski standardi, Molecular Weight Standards Kit, Kit Dextrane, Manufactured for Waters Corporation by: PSS Polymer Standards Service GmbH (Germany)

Preglednica I: Standardizirane vrednosti masnega in številčnega povprečja molskih mas in polidisperznih indeksov dekstranov

Dekstran	Številka serije	M_w (kDa)	M_n (kDa)	PDI
dxt12	dxt12wa	11,6	8,1	1,43
dxt50	dxt50wa	48,6	35,6	1,36
dxt150	dxt150wa	148,0	100,0	1,47
dxt270	dxt270wa	273,0	164,0	1,66
dxt670	dxt670wa	668,0	333,0	2,01

Vzorci

- Tableta (TBL_A in TBL_B)
- Slepí vzorec 0 (prazna epruveta) (S_{0A} in S_{0B})
- Slepí vzorec 1 (HPMC K15M) (S_{1A} in S_{1B})
- Slepí vzorec 2 (PVP K30) (S_{2A} in S_{2B})
- Sestavljeni vzorec 1 (SV_{1A} in SV_{1B})
- Sestavljeni vzorec 2 (SV_{2A} in SV_{2B})
- Hidroksipropilmetil celuloza (*Methocel*):
 - HPMC E15, HPMC K4M (Dow Chemical Company; Midland, Michigan, ZDA)
 - HPMC K100, HPMC K15M in HPMC K100M (Colorcon; Harleysville, ZDA)
- Polivinilpirolidon (*Plasdone*):
 - PVP K25, PVP K30 (Ashland; Covington, Kentucky, ZDA)
 - PVP K90 (BASF; Ljubljana, Slovenija)

Topilo: mobilna faza

Kromatografski pogoji

Kromatografski sistem:	HPLC; Agilent Technologies, 1200 series
Zaporedna vezava kolon:	HSPgel AQ 3,0 (150 × 6,0) mm (Waters) HSPgel AQ 4,0 (150 × 6,0) mm (Waters) HSPgel AQ 5,0 (150 × 6,0) mm (Waters)
Mobilna faza:	pufer / MeOH = 8 / 2 (V/V)
Temperatura kolone:	sobna temperatura
Pretok:	0,500 mL/min
Čas analize:	40 min
Volumen injiciranja:	40 µL
Detektor A:	miniDAWN Treos, Wyatt, Light Scattering Detektor (LS)
Detektor B:	Optilab T-reX, Wyatt, Refractive Index Detektor (RI)

Priprava pufra:

v 250 mL steklenico smo zatehtali 6,90 g natrijevega dihidrogen fosfata, 2,92 g natrijevega klorida in 200 mg natrijevega azida. Dodali smo 200 mL vode, dobro premešali in z 10 M NaOH umerili pH na 6,8. Raztopino smo filtrirali skozi dvojni membranski filter (30 mm filter Multigrade Glassfiber, PVDF 0,45 μm in 30 mm Syr filter PVDF 0,2 μm) v 1 L merilno bučko in z vodo dopolnili do oznake.

Priprava mobilne faze:

v 1 L merilno bučko smo nalili 800 mL pufra in z MeOH dopolnili do oznake. Mobilno fazo smo dobro premešali in jo razplinili z ultrazvokom (5 min).

3.2.1 Določanje konstante dn/dc

Priprava osnovne standardne raztopine PVP K30:

v 50 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 250 mg PVP K30 (3 paralelke) in dodali 2/3 volumna bučke topila. Raztopino standarda smo premešali in pustili na sobni temperaturi 20 ur. Nato smo raztopino standarda s topilom dopolnili do oznake ($c_{\text{PVP K30}} \approx 5,0 \text{ mg/mL}$).

Iz osnovne standardne raztopine smo pripravili razredčene raztopine PVP s koncentracijami 2,50 mg/mL, 1,00 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,50 mg/mL in 0,25 mg/mL.

Priprava osnovne standardne raztopine HPMC K100:

v 50 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 100 mg HPMC K100 (3 paralelke) in dodali 2/3 volumna bučke topila. Raztopino standarda smo premešali in pustili 20 ur v hladilniku ($T = 2-8 \text{ }^\circ\text{C}$), da se je standard popolnoma raztopil. Nato smo raztopino standarda s topilom dopolnili do oznake ($c_{\text{HPMC K100}} \approx 2,0 \text{ mg/mL}$).

Iz osnovne standardne raztopine smo pripravili razredčene raztopine HPMC K100 s koncentracijami 1,75 mg/mL, 1,50 mg/mL, 1,25 mg/mL, 1,00 mg/mL, 0,75 mg/mL in 0,50 mg/mL.

Priprava osnovne standardne raztopine HPMC K15M:

v 50 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 100 mg HPMC K15M (3 paralelke) in dodali 2/3 volumna bučke topila. Raztopino standarda smo premešali in pustili 10 dni v hladilniku ($T = 2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$), da se je standard popolnoma raztopil. Nato smo raztopino standarda s topilom dopolnili do oznake ($c_{\text{HPMC K15M}} \approx 2,0\text{ mg/mL}$).

Iz osnovne standardne raztopine smo pripravili razredčene raztopine HPMC s koncentracijami 1,50 mg/mL, 1,00 mg/mL, 0,75 mg/mL in 0,50 mg/mL.

3.2.2 Točnost in selektivnost SEC-MALS metode

V HPLC vialo smo pripravili raztopino BSA s koncentracijo 5,0 mg/mL.

V HPLC vialo smo pripravili raztopino dekstrana dxt12 (dxt50, dxt150, dxt270 in dxt670) s koncentracijo 5,0 mg/mL.

3.2.3 Ponovljivost SEC-MALS metode

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg PVP K25 (PVP K30, PVP K90). PVP K30 smo pripravili v 4 paralelkah. Dodali smo 2/3 volumna bučke topila, dobro premešali in pustili vzorec na sobni temperaturi 5 ur, da se je ves raztopil. Nato smo raztopino dopolnili s topilom do oznake ($c_{\text{PVP}} \approx 5,0\text{ mg/mL}$), dobro premešali in raztopino prenesli v HPLC vialo.

V 50 mL merilno bučko smo zatehtali točno okrog 50 mg HPMC K100 (HPMC K15M) (štiri paralelke). Dodali smo 2/3 volumna bučke topila, premešali in vzorec postavili v hladilnik za 4 dni ($T = 2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$), da se je vse raztopilo. Nato smo raztopine do oznake dopolnili s topilom ($c_{\text{HPMC}} \approx 1,0\text{ mg/mL}$), dobro premešali in raztopino prenesli v HPLC vialo.

Na enak način kot smo pripravili HPMC K100 in HPMC K15M, smo pripravili še HPMC E15, HPMC K4M in HPMC K100M (vsakega v eni paralelki).

3.2.4 Analiza standardov in vzorcev

Vzorci z oznako A, ki smo jih pripravili s postopkom selektivnega odtapljanja, smo raztopili v MF.

Vzorci z oznako B, ki smo jih pripravili s postopkom selektivnega odtapljanja, smo kvantitativno prenesli v 50 mL merilno bučko in dodali 2/3 volumna bučke MF. Za 24 ur smo vzorce postavili v hladilnik ($T = 2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$), da se je vse raztopilo. Z MF smo dopolnili do oznake.

Vse vzorce smo prefiltrirali v HPLC vialo skozi $0,45\text{ }\mu\text{m}$ PVDF membranske filtre (30 mm).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA SEC-MALS ANALIZO

V hidrofilnih ogrodnih tabletah se kot nabrekajoči polimer, ki uravnava (podaljša) sproščanje, najpogosteje uporablja HPMC. Lastnosti in debelina plasti gela so odvisne od koncentracije HPMC in njenih kemijskih in fizikalnih lastnosti (tipa HPMC) (2, 4, 8, 9, 11-13, 18).

Viskoznost HPMC močno vpliva na proces nabrekanja in s tem na hitrost sproščanja učinkovine. Zato je za izdelavo farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem pomembna določitev ustreznega tipa HPMC (4, 8, 10, 12). V formulacijah za prirejeno sproščanje se HPMC pogosto uporablja v kombinaciji s PVP. Čeprav ima PVP v tableti predvsem vlogo polnila in veziva, lahko s pravilnim razmerjem HPMC/PVP uravnavamo hitrost raztapljanja tablete oz. sproščanja učinkovine in dosežemo bolj predvidljivo sproščanje (2, 9, 59).

S SEC-MALS metodo smo analizirali PVP in HPMC v ogrodni tableti. Sestavljena je bila iz učinkovine A, HPMC, PVP, laktoze monohidrata, MCC, koloidnega silicijevega dioksida in magnezijevega stearata. Pogoji za karakterizacijo PVP in HPMC z omenjeno metodo je bila njuna ločba. Polimera smo ločili na podlagi različnih topnosti v izbranih topilih. Oba polimera sta bila v hladni vodi dobro topna. V organskih topilih se je HPMC slabo, oz. se ni raztapljal (v metanolu se je raztopilo pribl. 10 %, v ACN pa 4 % HPMC). PVP je bil v obeh topilih dobro topen. Iz tega razloga smo se odločili, da bomo PVP raztopili v ACN in ga tako ločili od HPMC. V ACN se je poleg PVP raztopila tudi učinkovina A. Zaradi nizke molske mase učinkovina A ni motila SEC-MALS analize PVP. Ostale komponente se v ACN niso raztopile. ACN smo kot topilo uporabili tudi zato, ker smo ga lahko potem odstranili z uparevanjem pod znižanim tlakom. Ostanek po uparevanju, ki je vseboval PVP, smo raztopili v SEC-MALS mobilni fazi.

Netopen ostanek, ki je vseboval tudi HPMC, smo sušili v sušilniku 20 ur pri 60 °C. Po sušenju smo ga raztopili v mobilni fazi, ki smo jo uporabili za SEC-MALS analizo. V MF sta se raztopili HPMC in laktoza. Laktoza SEC-MALS analize ni motila. MCC, magnezijev stearat in koloidni silicijev dioksid se v MF niso raztopili. Odstranili smo jih s filtracijo.

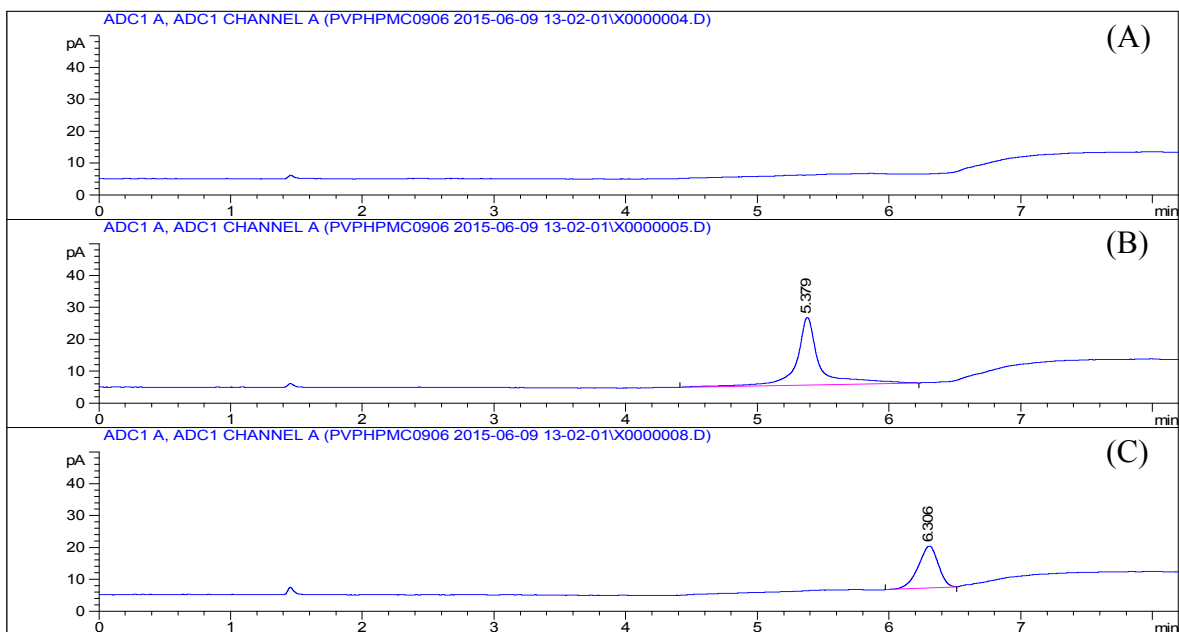
Poleg tablet smo pripravili tudi slepe vzorce (čisti HPMC (S_1), čisti PVP (S_2) in prazna epruveta (S_0)). S tem smo želeli preveriti, kaj se med raztapljanjem dogaja s posameznim polimerom in ali se iz sten PP konične epruvete ekstrahirajo komponente, ki bi lahko motile SEC-MALS analizo.

Ponovljivost priprave vzorcev za SEC-MALS analizo smo preverili s pripravo 6 paralelnih sestavljenih vzorcev tipa SV_1 (HPMC in PVP) in tipa SV_2 (enake spojine kot v tableti).

Čistost obeh izoliranih polimerov in izkoristek ekstrakcije smo preverili z RP-HPLC.

Čistost posameznega polimera lahko vpliva na kvaliteto rezultatov SEC-MALS analize.

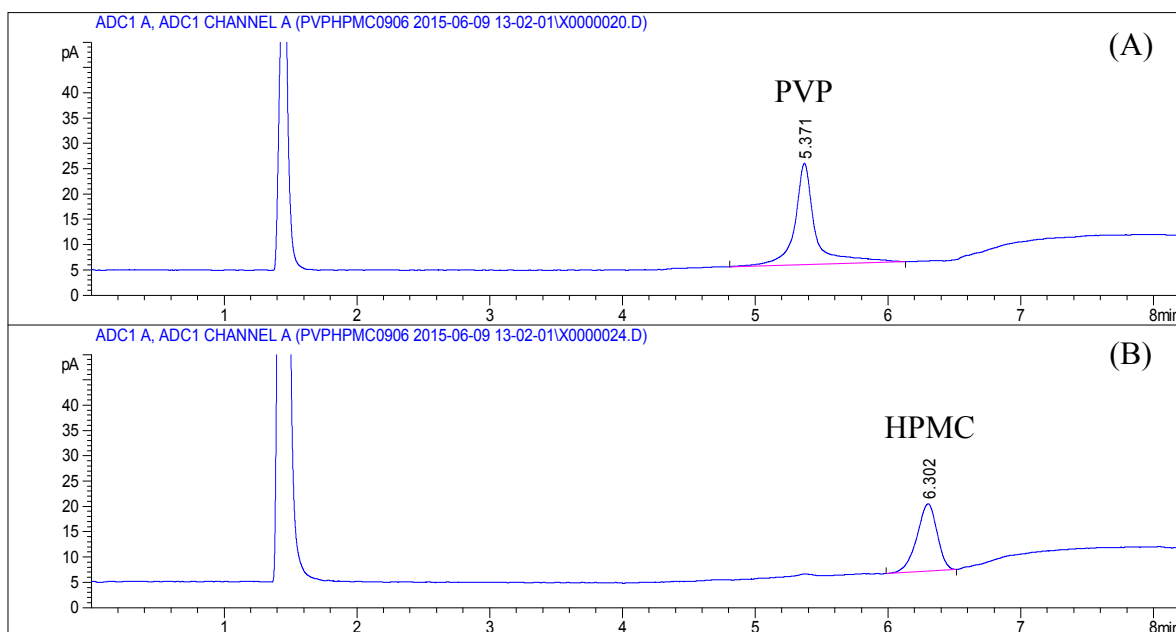
Razvili smo gradientno RP-HPLC metodo za določitev PVP in HPMC hkrati, kar je močno skrajšalo analizo. Uporabili smo kolono z nepolarno C4 stacionarno fazo z večjimi delci in porami (5 μm delci in 300 Å velike pore). PVP se je s kolone eluiral pri $t_R \approx 5,4$ min, HPMC pa pri $t_R \approx 6,3$ min (Slika 8). Kromatografska vrhova PVP in HPMC sta bila široka in rahlo nesimetrična. To je lahko posledica nastanka dodatnih steričnih interakcij velikih polimernih molekul s SF.



Slika 8: RP-HPLC kromatogram topila (A), PVP K30, $c \approx 0,25$ mg/mL (B) in HPMC K15M, $c \approx 0,125$ mg/mL (C).

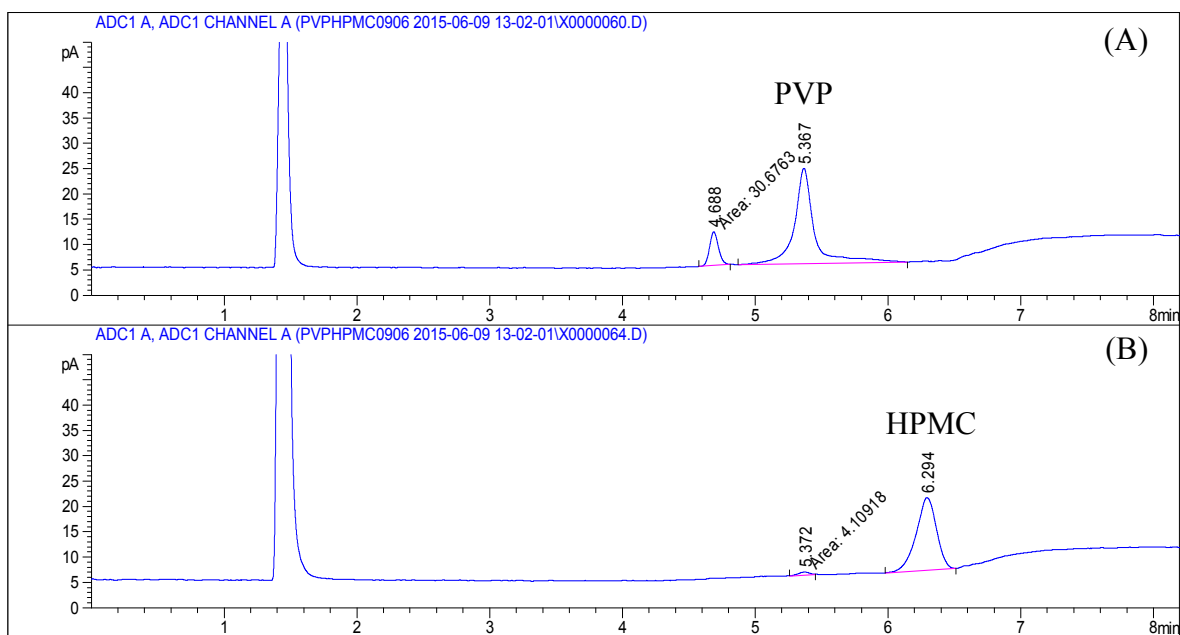
Analiza obeh frakcij vzorca S_0 je pokazala, da v nobeni od frakcij ni bilo prisotnih motečih komponent. Tudi pri analizi S_1 (HPMC) in S_2 (PVP) vzorcev se je izkazalo, da sta bila oba polimera čista. Druge spojine, ki bi motile analizo, se niso pojavile v nobenem od slepih vzorcev. Povprečen izkoristek ekstrakcije S_1 je bil 113 %, S_2 pa 97 %. Večji izkoristek HPMC bi lahko bil posledica nepopolne elucije HPMC s kolone. To smo opazili pri analizi topila, kjer se je eluiralo do največ 8 % HPMC.

SV_1 je vseboval zmes HPMC in PVP. Frakcija SV_{1A} je vsebovala le PVP. Prisotnosti HPMC s kromatografsko analizo nismo videli. Povprečni izkoristek ekstrakcije je znašal 84 % ($n = 6$). V frakciji SV_{1B} je bil prisoten le HPMC. PVP v tej frakciji nismo zaznali. Povprečni izkoristek ekstrakcije je znašal 97 % ($n = 6$). S tem smo dokazali, da smo z metodo selektivnega odtapljanja v SV_1 uspešno ločili PVP od HPMC (Slika 9).



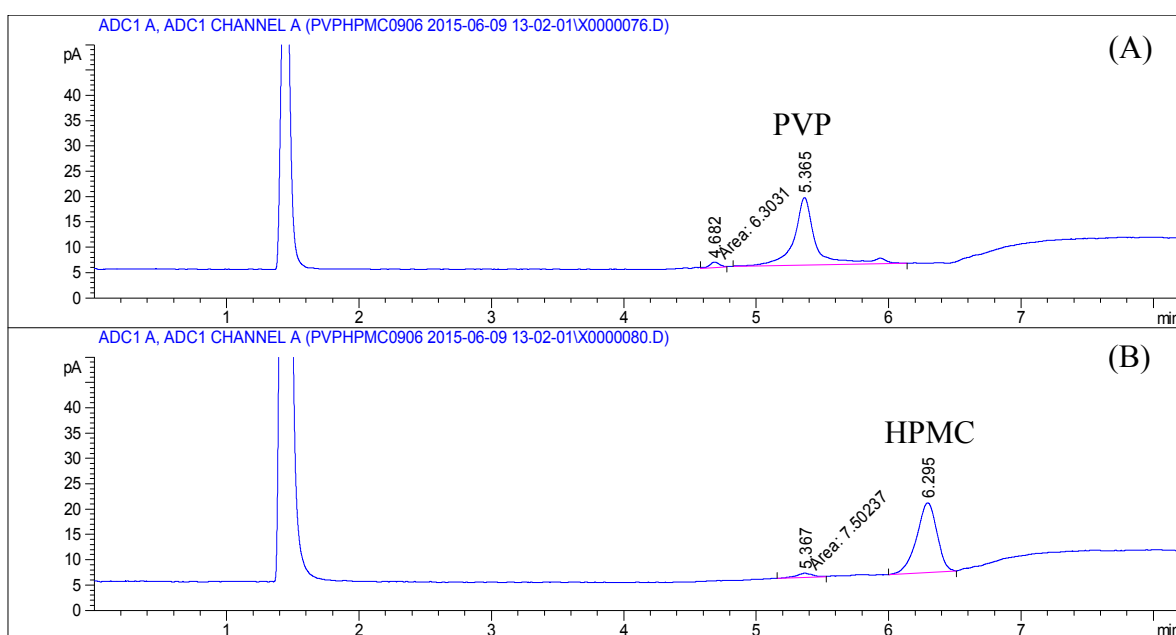
Slika 9: RP-HPLC kromatogram PVP (A) izoliran iz vzorca SV_1 (frakcija SV_{1A}) in kromatogram HPMC (B) v vzorcu SV_1 (frakcija SV_{1B}).

Iz vzorca SV_{2A} se je pri $t_R \approx 4,6$ min poleg PVP s kolone eluirala učinkovina A (Slika 10 (A)). Na kromatogramu SV_{2B} (Slika 10 (B)) poleg HPMC vidimo dodatni vrh, ki je ustrežal PVP. To pomeni, da je nekaj PVP ostalo v netopnem ostanku. Povprečni izkoristek ekstrakcije PVP iz SV₂ je znašal 82 %. Preostali del PVP se ni ekstrahirал. Z ekstrakcijo PVP iz vzorca SV₂ nismo vplivali na izgube HPMC. V netopnem ostanku smo določili 98 % HPMC.



Slika 10: RP-HPLC kromatogram PVP (A) izoliran iz vzorca SV₂ (frakcija SV_{2A}) in kromatogram HPMC (B) v vzorcu SV₂ (frakcija SV_{2B})

Izkoristek ekstrakcije PVP iz TBL je znašal 41 %. Iz kromatograma na sliki 11 (A) je razvidno, da se pri $t_R \approx 4,6$ min poleg PVP eluira še dodatna spojina. Vrh najverjetne ustreza aktivni učinkovini. V vzorcu TBL_B je bil poleg HPMC prisoten PVP (Slika 11 (B)). To pomeni, da se iz TBL ni ekstrahiralo ves PVP, ampak je ostal v netopnem ostanku. Vzrok za nepopolno ekstrakcijo, oz. slabši izkoristek je najverjetneje posledica prekratkega časa raztapljanja PVP v ACN. Izkoristek ekstrakcije je lahko slabši tudi zaradi majhne količine PVP v vzorcu. V frakciji TBL_B je ostalo 96 % HPMC. Med ekstrakcijo PVP iz TBL ni prišlo do večjih izgub HPMC.



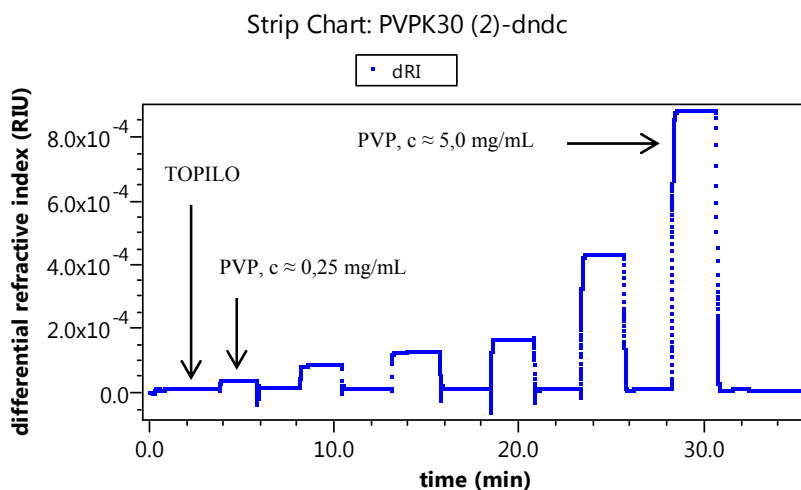
Slika 11: RP-HPLC kromatogram PVP (A) izoliran iz vzorca TBL (frakcija TBL_A) in kromatogram HPMC (B) v vzorcu TBL (frakcija TBL_B)

RSD vsebnosti PVP in HPMC v posameznih frakcijah sestavljenih vzorcev ($n = 6$) in tablet ($n = 3$) je bil manjši ali enak 10 %. Odločili smo se, da je takšna ponovljivost ločbe PVP in HPMC za nadaljno analizo zadovoljiva.

4.2 SEC-MALS ANALIZA

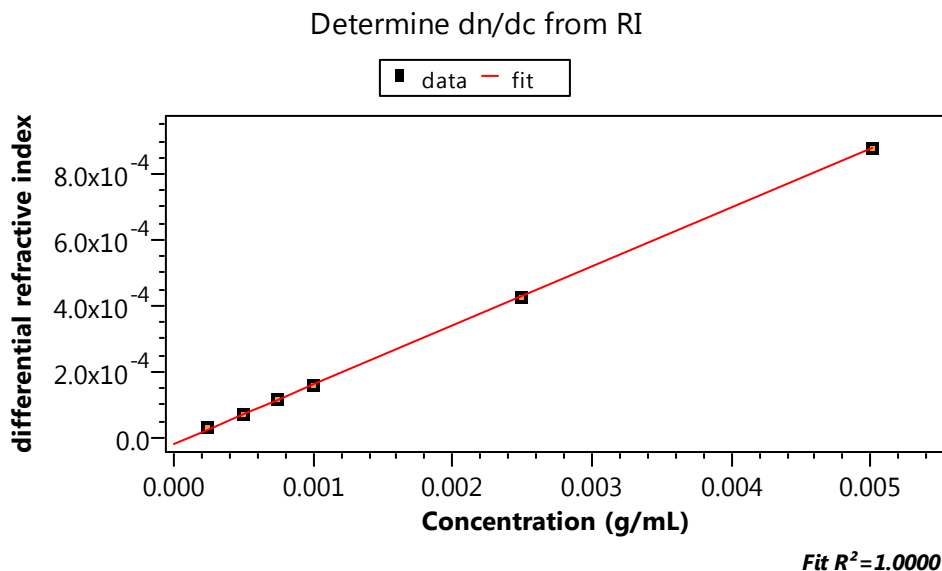
4.2.1 Določitev dn/dc

Inkrement lomnega količnika dn/dc je pomemben parameter, ki vpliva na rezultate dobljene z obdelavo podatkov o sipani svetlobi. Konstanten je za določen polimer v določenem topilu. Določili smo ga eksperimentalno. Pripravili smo tri sete raztopin PVP v koncentracijskem območju od 0,25 mg/mL do 5,0 mg/mL. Vsaki pripravljeni raztopini PVP smo izmerili lomni količnik. Meritve smo izvajali tako, da smo najprej izmerili lomni količnik topila. Sledilo je merjenje lomnega količnika PVP raztopin z naraščajočo koncentracijo. Posamezni raztopini smo lomni količnik merili toliko časa, da je vrednost lomnega količnika postala konstantna. Slika 12 prikazuje odvisnost lomnega količnika od časa.



Slika 12: Časovni prikaz meritve lomnega količnika

S pomočjo programske opreme (ASTRA[®]) smo iz meritev lomnega količnika posamezne koncentracije dobili umeritveno premico. Naklon te premice nam poda dn/dc vrednost PVP K30 v izbranem topilu. Odvisnost lomnega količnika od koncentracije prikazuje Slika 13.



Slika 13: Umeritvena krivulja dn/dc meritev PVP K30

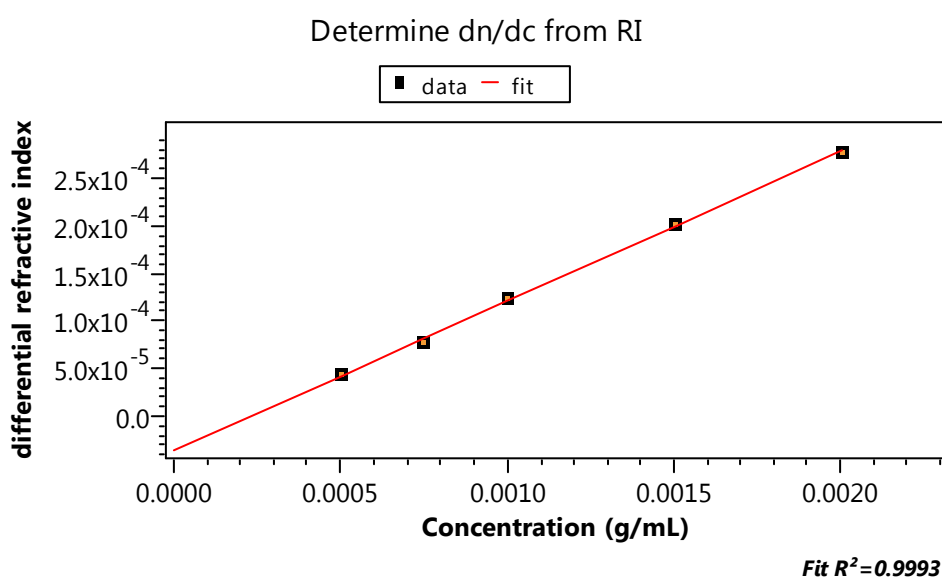
Določene vrednosti dn/dc iz naklona premice s pomočjo programske opreme so prikazane v Preglednici II.

Preglednica II: dn/dc konstanta za PVP K30

Paralelka	dn/dc (mL/g)	R^2
1	0,176	1,000
2	0,178	1,000
3	0,182	1,000
Povprečje	0,178	
RSD (%)	1,651	

Za verodostojno določitev dn/dc je dovolj, če uporabimo povprečje meritev dveh paralelk (40). Vrednost dn/dc tretje paralelke (0,182 mL/g) je odstopala od ostalih dveh vrednosti. Odločili smo se, da bomo za nadaljno analizo uporabili povprečje ostalih dveh meritev. Povprečna vrednost je znašala 0,177 mL/g.

Zaradi slabše topnosti smo morali pripraviti HPMC v nižjem koncentracijskem območju kot smo pripravili PVP. Pripravili smo raztopine s koncentracijo od 0,5 mg/mL do 2,0 mg/mL. Eksperimentalni postopek določitve dn/dc vrednosti je bil enak kot smo jo izvedli pri PVP. Slika 14 prikazuje primer določitve dn/dc vrednosti ene izmed paralelk HPMC K15M.



Slika 14: Umeritvena krivulja dn/dc meritev HPMC K15M

Z naklona premica smo dobili povprečne vrednosti dn/dc vseh treh paralelek HPMC K15M, ki so zbrane v preglednici III.

Preglednica III: dn/dc konstanta za HPMC K15M

Paralelka	dn/dc (mL/g)	R^2
1	0,157	0,999
2	0,168	0,997
3	0,173	0,997
Povprečje	0,166	
RSD (%)	5,012	

Vrednost dn/dc prve paralelke HPMC je odstopala od ostalih dveh vrednosti. Povprečno dn/dc dveh najbližjih si meritev (druga in tretja paralelka) smo uporabili za nadaljno obdelavo SEC-MALS podatkov in je znašala 0,171 mL/g.

V do sedaj objavljeni literaturi nismo našli veliko podatkov o dn/dc vrednostih za HPMC in PVP. Za PVP smo našli le eno vrednost dn/dc , in sicer 0,173 mL/g. (56, 60) Naša določitev dn/dc se je ujemala z literaturnimi podatki.

Za HPMC smo v literaturi našli naslednje vrednosti: 0,129 mL/g (18), 0,135 mL/g (12) in 0,136 mL/g (14). Keary (18) navaja, da so za SEC-MALS analizo različnih tipov HPMC uporabili dn/dc vrednost določeno za celulozne etre (0,129 mL/g). Vrednost dn/dc , ki smo jo eksperimentalno določili, se od literaturnih vrednosti razlikuje. Na različne vrednosti dn/dc lahko vpliva odvisnost dn/dc od topila, v katerem je polimer raztopljen. Poleg podatkov o dn/dc , ki smo jih zasledili v literaturi, ni navedeno kateremu tipu HPMC so določevali dn/dc in v katerem topilu so polimer pripravili. Navedeno je, da je Poche (53) pri določevanju vrednosti dn/dc celuloznim etrom kot topilo uporabil 0,01 M NaCl.

4.2.2 Točnost in selektivnost SEC-MALS metode

Z namenom razvoja metode za čim bolj učinkovito analizo HPMC in PVP smo preizkusili različne stacionarne in mobilne faze. Preizkusili smo stacionarne faze namenjene ločbi proteinov (SEC Protein Columns) in kolone za analizo vodotopnih polimerov različnih tipov (Ultrahydrogel kolone in HSP gel kolone). Kot najbolj učinkovita se je izkazala kombinacija treh HSPgel AQ kolon in vodna raztopina pufru z 20 % dodatkom MeOH. Izkazalo se je, da je za elucijo polimerov s HSP kolone potrebno raztopini pufru dodati določen delež MeOH. Prav tako dodatek MeOH preprečuje intreakcije aktivne učinkovine s SF.

Z BSA (5 mg/mL) smo izvedli normalizacijo SEC-MALS sistema in preverili točnost določitve molske mase. Standard je vseboval različne oligomerne oblike BSA. Certificirane vrednosti masnega povprečja molske mase za monomer so znašale 66,5 kDa, za dimer 135 kDa in za trimer 204 kDa. Monomer smo ločili od dimerne in trimerne oblike, ki pa se nista popolnoma ločili. Za normalizacijo sistema smo uporabili samo monomerno obliko. Dimerna in trimerna oblika za normalizacijo sistema nista bili relevantni. Monomerni frakciji smo določili masno povprečje molske mase 67,4 kDa, dimeru 141 kDa ter trimeru 209 kDa. Masno povprečje molske mase, ki smo ga določili za vse tri oligomerne oblike BSA, se je od certificiranih vrednosti razlikoval za največ 4 %. Izkoristek elucije BSA iz kolone je bil 75 %. Do slabšega izkoristka elucije je lahko prišlo zaradi interakcij med molekulami BSA in stacionarno fazo.

Za preverjanje točnosti in selektivnosti metode smo uporabili dekstranske standarde. Analizirali smo dekstrane v celotnem območju pričakovanih masnih povprečij molske mase HPMC in PVP (Preglednica IV). Standarde smo pripravili v mobilni fazi (5 mg/mL) v dveh paralelkah. Dobljene povprečne vrednosti smo primerjali s certificiranimi vrednostmi.

Preglednica IV: Certificirane in določene povprečne vrednosti molskih mas in polidisperzni indeks dekstranov

Dekstran	M_w (kDa)	<i>PDI</i>	M_w (kDa)	<i>PDI</i>
	Certificirane vrednosti		Določene vrednosti	
dxt12	11,6	1,43	11,3	1,24
dxt50	48,6	1,36	46,8	1,17
dxt150	148,0	1,47	146	1,21
dxt270	273,0	1,66	259	1,25
dxt670	668,0	2,01	656	1,43

Dokazali smo točnost metode. Z izbrano metodo smo določili masna povprečja molskih mas dekstranov, ki so bila primerljiva certificiranim vrednostim. Do najvišjega odstopanja masnega povprečja molske mase od certificiranih vrednosti je prišlo pri dxt270 (5 %). Najboljše ujemanje določene in certificirane vrednosti M_w je bilo pri dxt150 (99 %). Napaka določitve polidisperznega indeksa glede na certificirane vrednosti je bila najvišja pri dxt670 in je znašala 29 %. Večjo napako smo zaznali tudi pri dxt270 (25 %). Pri teh dveh dekstranih je bila najslabša tudi elucija s kolone (66 %, oz. 72 %).

Dokazali smo, da je analitska metoda selektivna, saj je sposobna ločiti dekstrane z različnimi molskimi masami.

4.2.3 Ponovljivost SEC-MALS metode in ponovljivost priprave vzorcev

Ponovljivost določitve masnega povprečja molske mase in polidisperznega indeksa smo preverili s pripravo štirih paralelk raztopin HPMC K100, HPMC K15M in PVP K30. Rezultati so zbrani v Preglednici V.

Preglednica V: Povprečne vrednosti ($n = 4$) masnega in številčnega povprečja molske mase in polidisperzni indeks za PVP K30, HPMC K100 in HPMC K15M

	M_w (kDa)	PDI
PVP K30	48,5	1,79
HPMC K100	103	1,77
HPMC K15M	402	1,38

Z analizo štirih paralelk istega vzorca smo preverili v kolikšni meri na določitev masnega povprečja molske mase in polidisperznega indeksa vpliva priprava raztopin vzorcev. Ponovljivost priprave vzorcev je dobra, saj so RSD analiz vseh vzorcev manjši od 5 %.

Pri določitvi masnega povprečja molske mase je največji RSD nastal pri analizi HPMC K100 (4,6 %). Najmanjši RSD pri analizi masnega povprečja molske mase je nastal pri PVP K30 in je znašal 1,9 %.

Pri določitvi polidisperznega indeksa je največji RSD znašal 4,9 % pri analizi PVP K30. Najmanjši RSD je nastal pri analizi HPMC K115M (3,2 %).

Povprečni izkoristki elucije iz kolone štirih paralelk PVP K30 so znašali 95 %, za HPMC K100 so bili 76 % in za HPMC K15M 74 %.

Preverili smo tudi ponovljivost določitve masnega povprečja molske mase in polidisperznega indeksa trikratne analize iste raztopine vsakega od omenjenih vzorcev. Ponovljivost trikratne analize istega vzorca je bila dobra, saj RSD pri določevanju masnega povprečja molske mase in polidisperznosti nobenega vzorca ni znašal več kot 10 %. Pri analizi masnega povprečja molske mase je RSD za PVP K30 znašal 4,0 %, za HPMC

K100 in HPMC K15M pa 2,4 % in 1,2 %, zaporedoma. Pri določitvi polidisperznega indeksa PVP K30 je RSD znašal 9,3 %, pri HPMC K100 2,3 % in pri HPMC K15M 2,7 %. Povprečen izkoristek elucije iz kolone trikratnega injiciranja iste paralelke PVP K30 je znašal 95 %. Pri analizi HPMC K100 in HPMC K15M je povprečen izkoristek elucije iz kolone trikratnega injiciranja iste paralelke znašal 80 % in 76 %, zaporedoma.

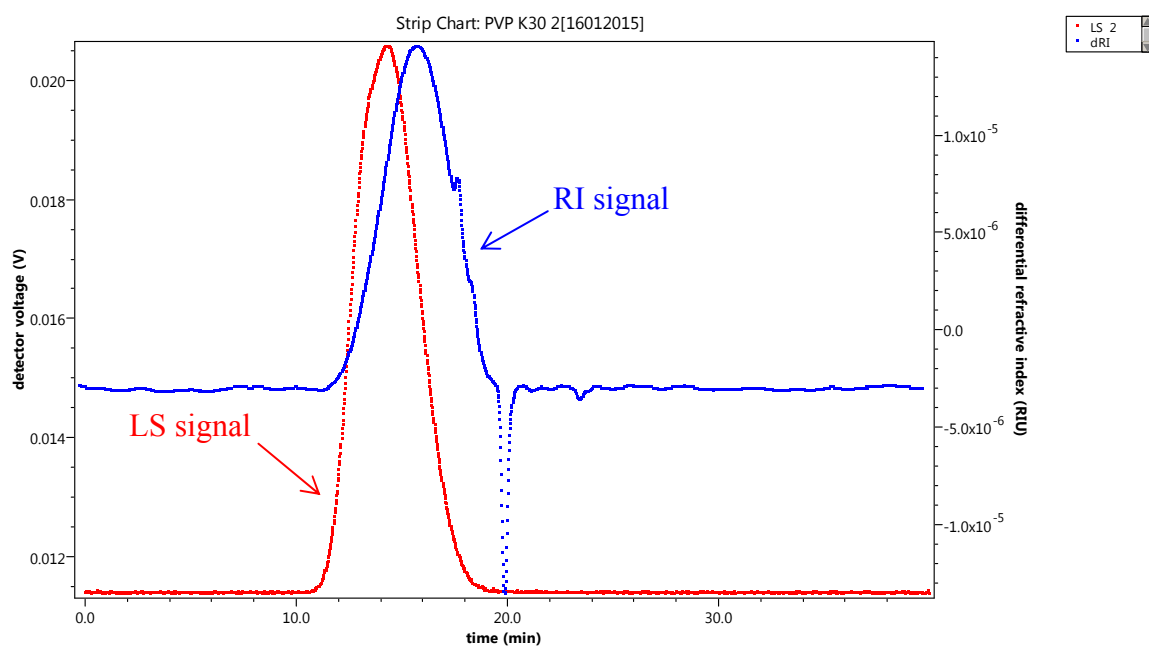
4.2.4 Analiza standardov in vzorcev

V literaturi smo našli različne podatke o masnem povprečju molskih mas in polidisperznem indeksu za PVP in HPMC. Prikazani so v Preglednici VI. Poleg podatkov o masnih povprečjih molskih mas in polidisperznem indeksu za PVP ni navedeno s kakšno metodo so jih določili. Za HPMC so masno povprečje molske mase in polidisperzni indeks določili s SEC-MALS metodo. Literaturne vrednosti smo v nadaljevanju primerjali z eksperimentalno določenimi vrednostmi, ki smo jih določili s SEC-MALS metodo.

Preglednica VI: Literaturne vrednosti masnih povprečij molskih mas za PVP in HPMC različnih tipov (18^a, 30, 31^b)

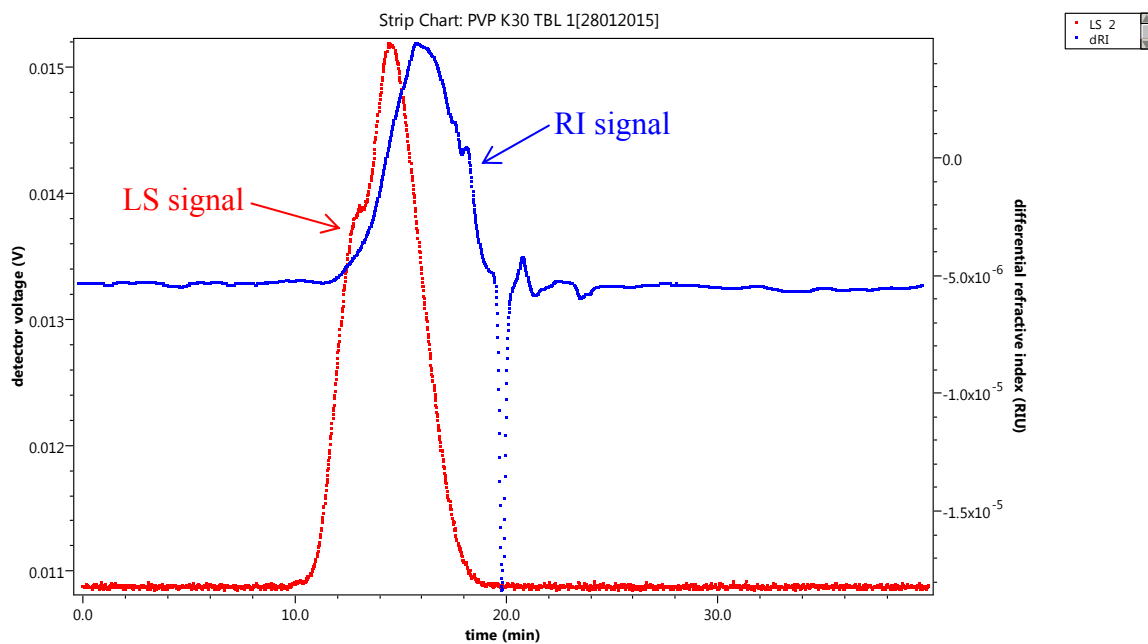
	<i>M_w</i> (kDa)	<i>PDI</i>
PVP K25	28-34 ^a (25 ^b)	
PVP K30	44-54 ^a (40 ^b)	
PVP K90	1000-1500 ^a (1100 ^b)	
HPMC E15	60,3	2,4
HPMC K100	117,5	4,1
HPMC K4M	390,7	5,8
HPMC K15M	485,0	6,4
HPMC K100M	720,2	4,8

Analizirali smo tri različne tipe PVP. Slika 15 prikazuje odziv LS in RI detektorjev pri analizi standarda PVP K30. Iz RI signala smo s pomočjo programske opreme dobili koncentracijo vzorca, LS signal pa je omogočal izračun masnega povprečja molske mase. Vrhova sta bila relativno simetrična in široka. Širši vrh je bil posledica večje polidisperznosti vzorca.



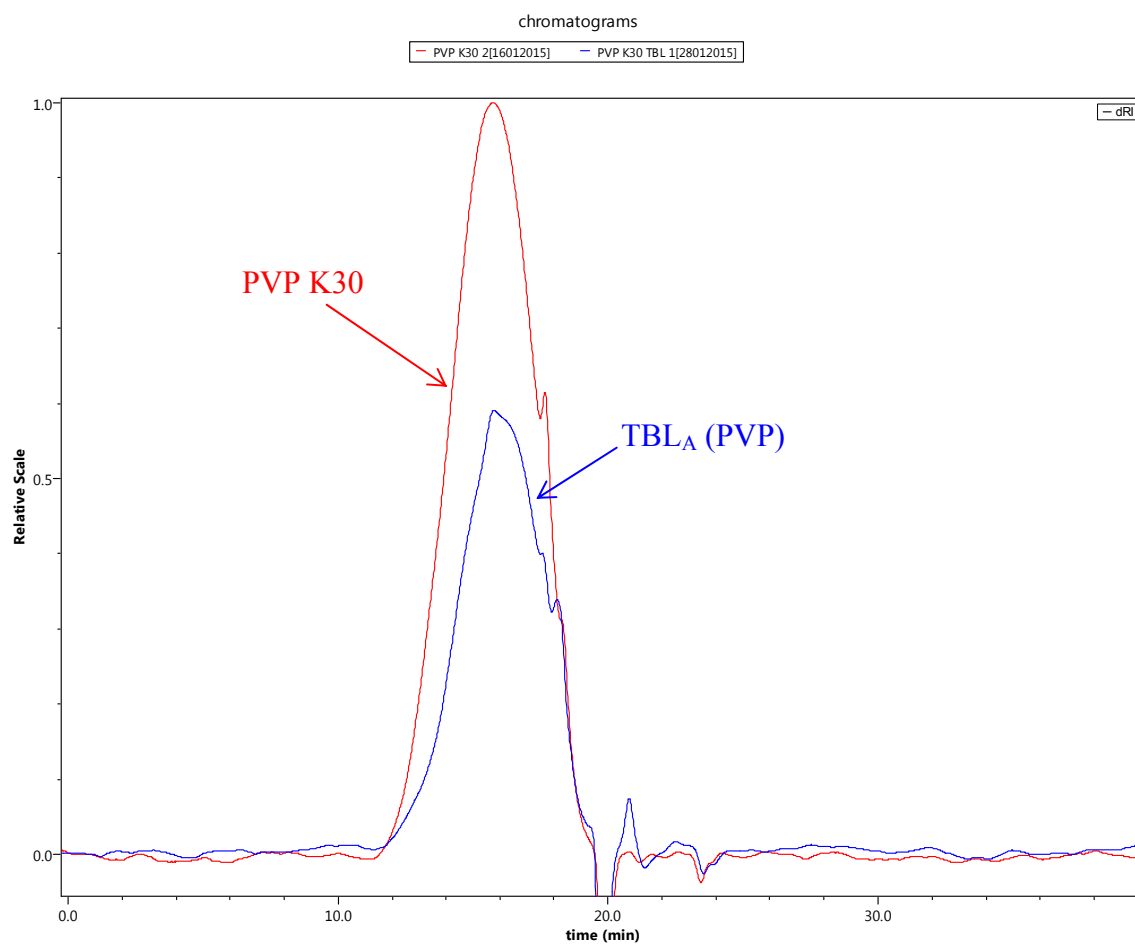
Slika 15: LS in RI kromatogram standarda PVP K30

Analizirali smo tudi sestavljene vzorce, slepe vzorce in ogrodno tableto. Slika 16 prikazuje odziv LS in RI detektorjev pri analizi PVP iz frakcije TBL_A. Primerjali smo LS in RI kromatograma standarda PVP K30 (glej Slika 15) z LS in RI kromatogramom PVP iz frakcije TBL_A (Slika 16). Vrhovi so bili podobno široki. Elucija obeh spojin se je začela okrog 10 min in končala okrog 20 min. Podobna elucija je bila posledica podobne polidisperznosti obeh vzorcev. Vrh vzorca PVP iz frakcije TBL_A je bil manj simetričen od vrha standarda PVP K30.



Slika 16: LS in RI kromatogram raztopine PVP v frakciji TBL_A

Na sliki 17 vidimo primerjavo RI signalov analize PVP K30 in PVP iz frakcije TBL_A. Koncentracija PVP v tableti je bila nižja v primerjavi s PVP K30, kar je povezano s slabšim izkoristkom ekstrakcije PVP iz tablete (izkoristek je znašal 41 %).



Slika 17: Primerjava RI kromatogramov standardne raztopine PVP K30 in raztopine PVP iz frakcije TBL_A

Masna povprečja molskih mas PVP, ki smo jih določili (Preglednica VII), so se ujemala ali minimalno odstopala iz določenega intervala masnih povprečij molskih mas v literaturi. Literaturni podatki o masnem povprečju molske mase za PVP K25 so nižji v primerjavi z našimi eksperimentalno določenimi podatki. PVP K30 smo določili masno povprečje molske mase, ki se nahaja znotraj območja masnega povprečja molske mase, ki smo jo zasledili v literaturi. Podatki o masnemu povprečju molske mase za PVP K90, ki jih navaja literatura, so nekoliko višji od naših eksperimentalno določenih M_w .

Masna povprečja molske mase in polidisperzne indekse PVP v vzorcih S_2 , SV_{1A} , SV_{2A} in TBL_A smo primerjali z masnimi povprečji molskih mas in polidisperznih indeksov standardov PVP.

Preglednica VII: Analiza standardov PVP in analiza vzorcev (PVP frakcija)

Vzorec	M_w (kDa)	RSD (%)	PDI	RSD (%)
PVP K25	34,8		1,73	
PVP K30	48,5	1,9	1,79	4,9
PVP K90	946		1,72	
S_{2A}	45,7		2,09	
SV_{1A}^*	46,2	5,1	1,63	6,8
SV_{2A}^*	37,7	4,6	1,65	5,0
TBL_A^{**}	41,5	1,4	2,20	11,9

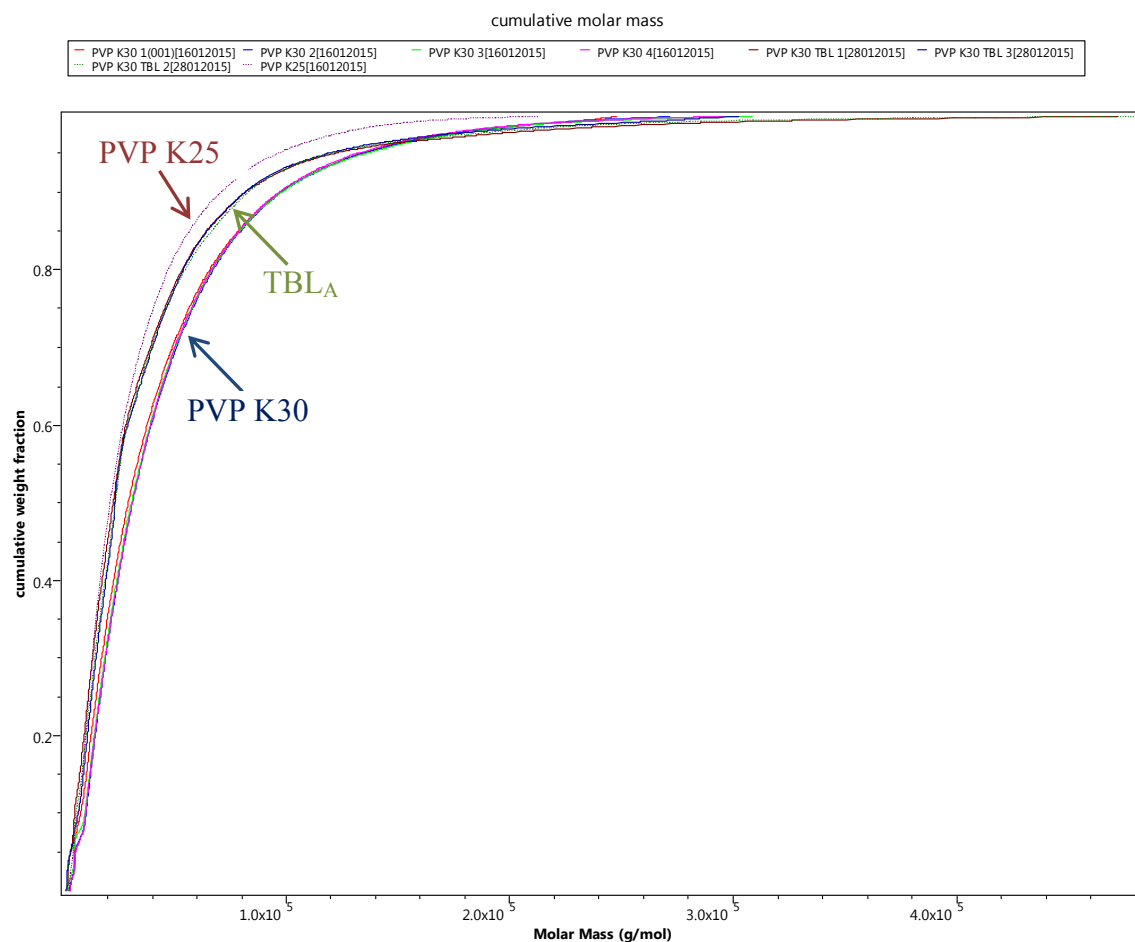
*RSD (n = 6) ** RSD (n = 3)

Povprečna M_w standarda PVP K30 je znašala 48,5 kDa. RSD pri analizi standarda PVP K30 je znašal 1,9 %. To pomeni, da se je masno povprečje molske mase nahajalo v območju od 47,6 do 49,4 kDa. V vzorcih S_{2A} , SV_{1A} in SV_{2A} je bil PVP K30. Rezultati analize masnega povprečja molske mase vzorcev so bili nižji od rezultatov standarda PVP K30. Predvsem v vzorcu SV_{2A} so bili rezultati precej nižji (22 %) in so se bolj ujemali z masnim povprečjem molske mase standarda PVP K25. Nižji rezultat bi lahko bili posledica slabše elucije iz kolone (povprečni izkoristek je znašal 81 %) ali izgube molekul z večjo molsko maso med pripravo vzorca.

PDI vrednosti so se med posameznimi vzorci precej razlikovali. Gibali so se od 1,63 do 2,20. Na podlagi njihovih vrednosti nismo mogli oceniti za kateri tip PVP gre.

Masno povprečje molske mase standarda PVP K90 je bilo sedemindvajsetkrat višje v primerjavi z M_w standarda PVP K25. Z gotovostjo smo lahko trdili, da se ta polimer v analiziranih tableti ni nahajal.

Med PVP K25 in PVP K30 je bila razlika v masnih povprečjih molskih mas manjša (razlikujeta se za približno 30 %). Glede na to nismo mogli biti prepričani kateri od obeh polimerov se je nahajal v tableti. Iz porazdelitvenih krivulj (Slika 18) smo videli, da je bila porazdelitev molskih mas v tableti med krivuljama, ki pripadata PVP K25 in PVP K30.



Slika 18: Kumulativna porazdelitev molske mase PVP K25, PVP K30 in TBL_A

Ponovljivost analize masnega povprečja molske mase je bila dobra. RSD ni presegal 5 %. Največji RSD je nastal pri analizi SV_{1A} in je znašal 5,1 %. Najmanjši RSD je nastal pri analizi tablet (1,4 %).

Ponovljivost določitve polidisperznega indeksa je bila slabša. Največji RSD je znašal 11,9 % in je nastal pri določitvi polidisperznega indeksa v TBL.

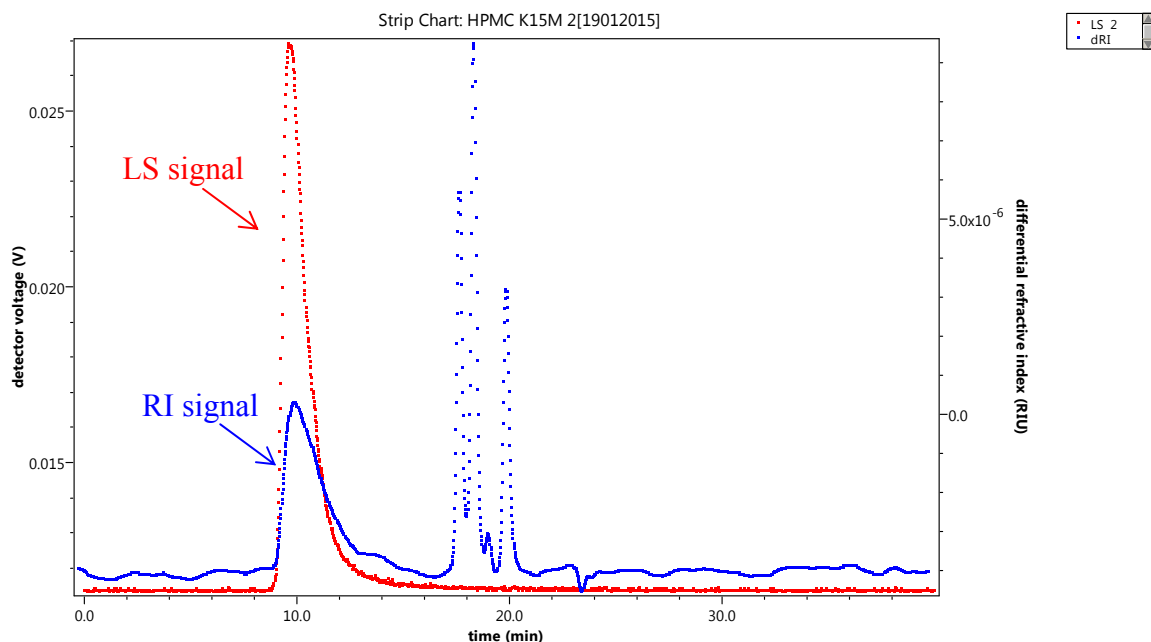
Izkoristki elucije PVP so bili med 81 % (SV_2) in 93 % (S_2). Izkoristek elucije pri SV_2 je bil manjši, kar pomeni, da se iz kolone ni eluirala vsa spojina. Sklepamo lahko, da je bila slabša elucija lahko vzrok nižjih rezultatov analize. Če izkoristek elucije iz SEC kolone ni 100 %, to namreč vpliva na izračun koncentracije polimera, ki ga določimo s pomočjo RI detektorja. To posledično vpliva na rezultate SEC-MALS analize oz. na določeno masno povprečje molske mase (18).

Pri primerjavi rezultatov analize standardov HPMC smo opazili, da so bila masna povprečja molskih mas za HPMC glede na podatke v literaturi nižja. Največjo razliko smo opazili pri HPMC K4M, pri kateri je bilo masno povprečje molske mase za 34 % nižje od M_w , ki smo ga zasledili v literaturi. Vir napake je lahko tudi dn/dc vredost (18, 51).

Eksperimentalno določene vrednosti masnega povprečja molske mase smo primerjali z objavljenimi M_w v literaturi (18). V tem viru so navedli, da so za določitev masnega povprečja molske mase vsem tipom HPMC uporabili eno vrednost dn/dc in da je zato prišlo do določene napake.

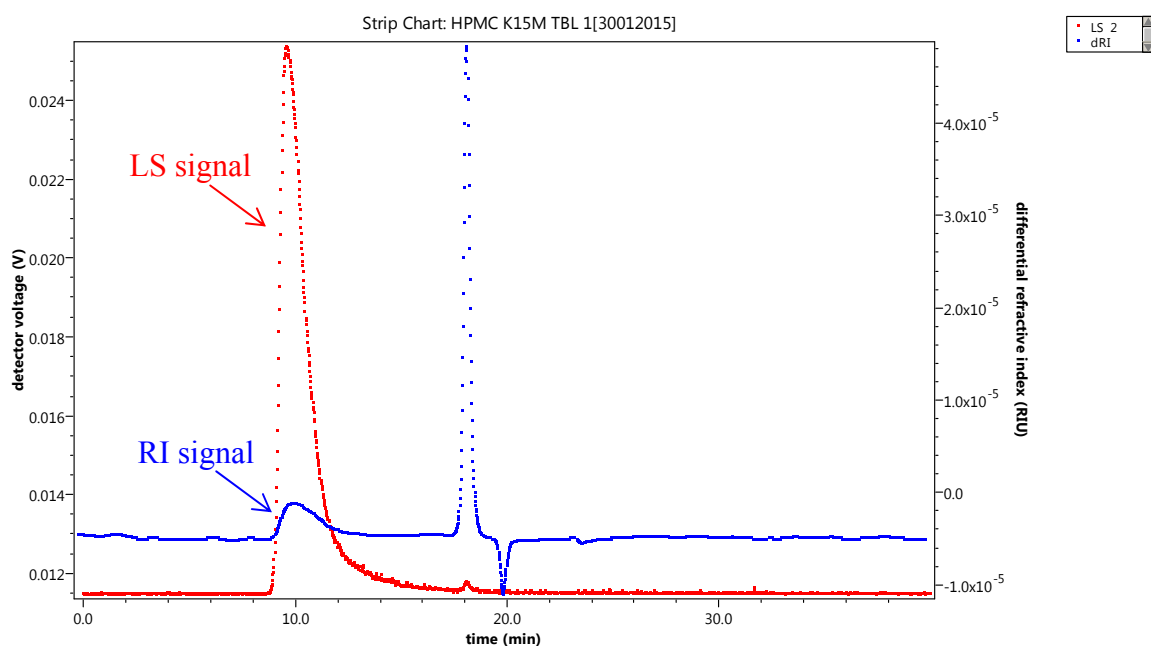
Povprečen izkoristek elucije iz kolone pri HPMC K100 je znašal 76 % in pri HPMC K15M 74 %.

Slika 19 prikazuje odziv LS in RI detektorja pri analizi standarda HPMC K15M. Videli smo, da je bil vrh HPMC K15M relativno simetričen in ožji od vrha PVP K30. To pomeni, da je bil HPMC manj polidisperzen kot PVP.



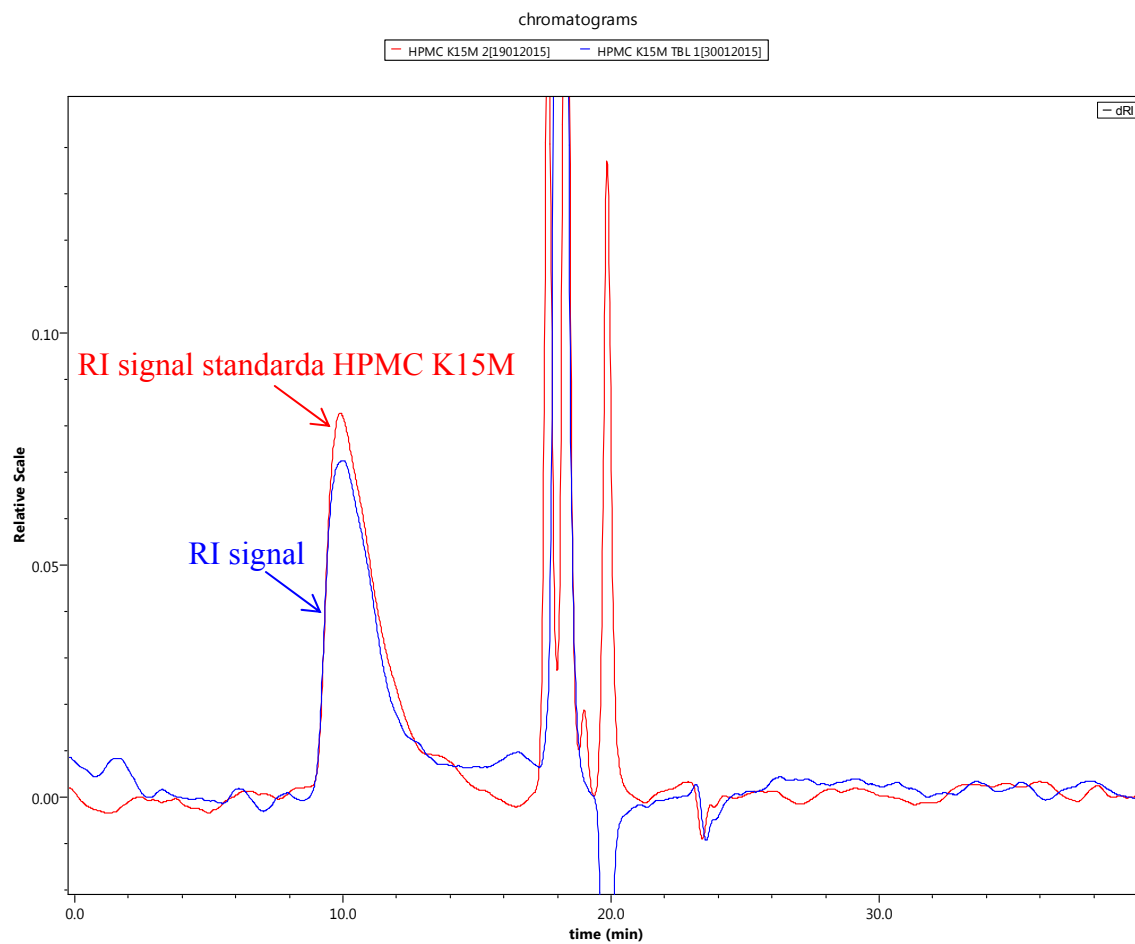
Slika 19: LS in RI kromatograma raztopine HPMC K15M

Na sliki 20 sta prikazana odziva LS in RI detektorja pri analizi HPMC iz frakcije TBL_B. Signala sta bila podobna signaloma, ki sta nastala pri analizi standarda HPMC K15M.



Slika 20: LS in RI kromatogram HPMC raztopine v frakciji TBL_B

Primerjava med odzivom RI detektorja pri analizi standarda HPMC K15M in HPMC iz frakcije TBL_B je prikazana na sliki 21. RI signala sta podobna. To potrjuje, da je bil izkoristek ekstrakcije HPMC iz tablete res okrog 100 %.



Slika 21: Primerjava RI kromatogramov standardne raztopine HPMC K15M in raztopine HPMC iz frakcije TBL_B

V Preglednici VIII so prikazani rezultati analize standardov HPMC in vzorcev s HPMC frakcijo.

Preglednica VIII: Analiza standardov HPMC in analiza vzorcev (HPMC frakcija)

Vzorec	M_w (kDa)	RSD (%)	<i>PDI</i>	RSD (%)
HPMC E15	43,4		1,48	
HPMC K100	103	4,6	1,77	3,5
HPMC K4M	260		1,50	
HPMC K15M	402	2,0	1,38	3,2
HPMC K100M	552		1,13	
S_{1B}	402		1,45	
SV_{1B}	400	1,8	1,43	1,9
SV_{2B}	404	3,2	1,46	1,1
TBL_B	431	1,4	1,40	5,2

*RSD (n = 6) ** RSD (n = 3)

Razlike med masnimi povprečji molske mase za posamezen tip HPMC so bile večje kot pri PVP K25 in PVP K30. Ponovljivost vzorcev je bila dobra, saj je bil RSD vseh določenih masnih povprečjih molske mase in polidisperznih indeksov manjši ali enak 5 %. Največji RSD pri določitvi masnega povprečja molske mase je nastal pri analizi SV_{2B} (3,2 %). Najmanjši RSD je nastal pri določitvi masnega povprečja molske mase HPMC v frakciji TBL_B. Znašal je 1,4 %.

Pri določitvi polidisperznega indeksa je največji RSD nastal pri analizi HPMC v frakciji TBL_B in je znašal 5,2 %. Najmanjši RSD je nastal pri določitvi polidisperznega indeksa HPMC v SV_{2B} (1,1 %).

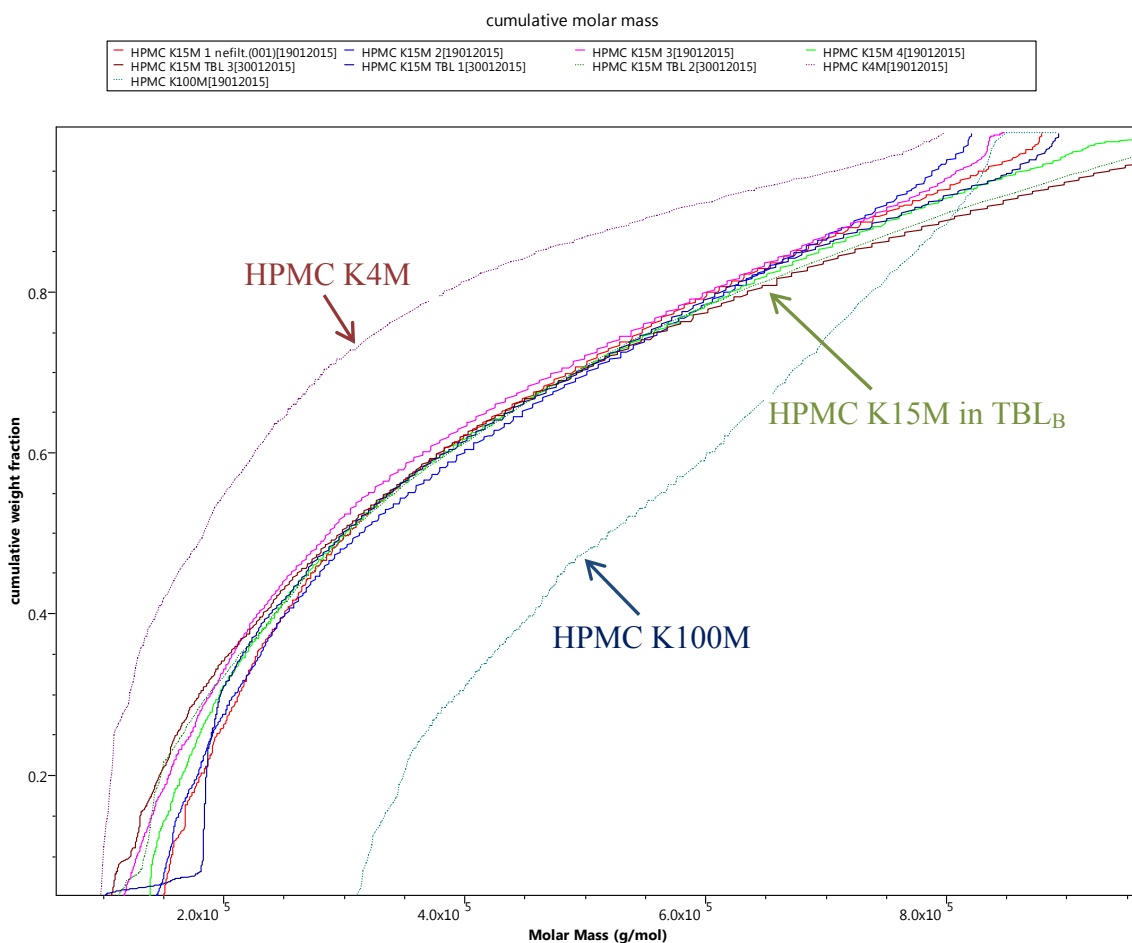
Povprečna M_w za standard HPMC K15M je znašala 402 kDa. Glede na 2,0 % RSD se je masno povprečje molske mase za HPMC K15M nahajalo v območju od 394 do 410 kDa. V vzorcih S_{1B}, SV_{1B} in SV_{2B} je bil HPMC K15M. Določili smo jim masno povprečje molske mase, ki se je nahajalo v intervalu določenega masnega povprečja molske mase standarda HPMC K15M. V tabletah smo določili višjo masno povprečje molske mase. Le to je bilo 7 % višje od povprečne M_w standarda HPMC K15M. Glede na te rezultate smo lahko predvidevali, da se je v tabletah nahajal HPMC K15M.

Povprečni polidisperzni indeks za standard HPMC K15M je znašal 1,38. Za vzorce S₁, SV_{1B} in SV_{2B} smo določili večji polidisperzni indeks (do 5 % večji od povprečnega *PDI* za standard HPMC K15M). PVP, ki se nahaja v tabletah, ima polidisperzni indeks vrednost 1,40, kar je v območju določenega *PDI* za HPMC K15M. To potrjuje, da se v tabletah najverjetneje nahaja HPMC K15M.

Izkoristki elucije so bili med 74 % (TBL) in 83 % (SV₁). Izkoristek elucije pri slepem HPMC vzorcu je bil 57 %.

Porazdelitvene krivulje treh tipov HPMC; ki so si glede na povprečne molske mase najbližji (HPMC K4M, HPMC K15M in HPMC K100M), prikazuje Slika 22.

Porazdelitvena krivulja HPMC, ki se je nahajal v frakciji TBL_B, se je pokrivala s porazdelitvenimi krivuljami standarda HPMC K15M. Nahajale so se med porazdelitvenimi krivuljami za HPMC K4M in HPMC K100M. Razdalja med njimi je bila precej velika, kar je nakazovalo na to, da so bile razlike v povprečnih molskih masa med temi tremi tipi HPMC večje. Z veliko gotovostjo smo lahko trdili, da se je v ogrodnih tabletah nahajal HPMC K15M.



Slika 22: Kumulativna porazdelitev molske mase HPMC K4M, HPMC K15M, HPMC K100M in TBL_B

5 SKLEP

V ogrodni tableti smo s SEC-MALS metodo analizirali polimera PVP in HPMC. Obema polimeroma smo določili masno povprečno molsko maso, polidisperzni indeks in porazdelitev molske mase.

Razvili smo metodo za ločbo PVP od HPMC. Metoda je temeljila na različni topnosti polimerov. S pripravo sestavljenih vzorcev smo preverili ponovljivost in točnost ločbe obeh polimerov.

Za ovrednotenje uspešnosti ločbe in izkoristka ekstrakcije smo razvili kromatografsko metodo (RP-HPLC). Metoda je omogočala hkratno določitev obeh polimerov, s čimer smo skrajšali čas analize. Izkazalo se je, da je v HPMC frakciji ostal del molekul PVP. PVP frakcija HPMC ni vsebovala. Nizek delež PVP v HPMC frakciji na SEC-MALS analizo HPMC ni imel bistvenega vpliva.

Razvili smo SEC-MALS metodo za karakterizacijo PVP in HPMC. Najbolj učinkovito sta se polimera ločila oz. eluirala na HSPgel AQ kolonah. Kot mobilno fazo smo uporabili fosfatni pufer z dodatkom metanola. Določili smo dn/dc vrednosti obema polimeroma.

Sistem smo normalizirali z BSA standardom. Metodo smo validirali. Z BSA in dekstranskimi standardi smo preverili točnost in selektivnost metode. Z analizo več paralelk standardov PVP in HPMC in večkratnim injiciranjem istega vzorca smo preverili ponovljivost metode.

Poleg analize različnih tipov PVP in HPMC smo analizirali obe frakciji tablet (frakcija A predstavlja izoliran PVP iz tablete, frakcija B pa ostanek HPMC v tableti) in sestavljenih vzorcev. Glede na določeno masno povprečje molske mase in porazdelitev molske mase PVP v tableti lahko potrdimo, da tablete vsebujejo PVP z nizko viskoznostjo (PVP tipa K25 oz. K30). Potrdili smo, da se v tableti nahaja HPMC, katerega M_w in porazdelitev molske mase se najbolj ujema s HPMC K15M.

Potrebno bi bilo izboljšati izkoristek ekstrakcije PVP iz tablete. Zaradi nizke koncentracije PVP v tableti je bil izkoristek ekstrakcije majhen. To bi lahko izboljšali s povečanjem količine vzorca (združili bi več tablet). Poleg tega bi bilo potrebno podaljšati čas raztapljanja PVP in izvesti večkratno ekstrakcijo. S tem bi zagotovili, da pri pripravi vzorca ne bi prišlo do izgub določenih frakcij makromolekul, kar vpliva na točnost določitve povprečne molske mase in porazdelitve molske mase.

Pri SEC-MALS analizah bi lahko z optimizacijo sestave mobilne faze (različni pufri, različna razmerja med pufrom in organskim topilom) izboljšali izkoristek elucije.

6 LITERATURA

1. Kumar V, Yang T, Yang Y: Interpolymer complexation. I. Preparation and characterization of a polyvinyl acetate phthalate-polyvinylpyrrolidone (PVAP-PVP) complex. *International Journal of Pharmaceutics* 199; 188: 221-232.
2. Karavas E, Georgarakis E, Bikiaris D: Application of PVP/HPMC miscible blends with enhanced mucoadhesive properties for adjusting drug release in predictable pulsatile chronotherapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006; 64: 115–126.
3. Kola R, Kumar B P: A Detailed Description of Synthetic and Natural Polymers which are used in the Formulation of Sustained Release Drug Delivery System: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* 2013; 6 (3): 0974-2115.
4. Salsa T, Veiga F, Pina M E: Oral Controlled-Release Dosage Forms. I. Cellulose Ether Polymers in Hydrophilic Matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1997; 23 (9): 929-938.
5. Gouthami T J, Jhansipriya M V, Naidu N: Effect of different polymers on release of the sustained release tablets of the glipizide. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2013; 5 (5): 111-118.
6. Ribeiro L, Ferreira D C, Veiga F J B: In vitro controlled release of vinpocetine-cyclodextrin-tartaric acid multicomponent complexes from HPMC swellable tablets. *Journal of Controlled Release* 2005; 103: 325-339.
7. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1) 2014.
8. Mason L M, Campiñez M D, Pygall S R, Burley J C, Gupta P, Storey D E, Caraballo I, Melia C D: The influence of polymer content on early gel-layer formation in HPMC matrices: The use of CLSM visualisation to identify the percolation threshold. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015; 94: 485-492.
9. Hardy I J, Windberg-Baarup A, Neri C, Byway P V, Booth S W, Fitzpatrick: Modulation of drug release kinetics from hydroxypropyl methyl cellulose matrix tablets using polyvinyl pyrrolidone. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 337: 246-253.
10. Tahara K, Yamamoto K, Nishihata T: Overall mechanism behind matrix sustained release (SR) tablets prepared with hydroxypropyl methylcellulose 2910. *Journal of Controlled Release* 1995; 35: 59-66.

11. Siepmann J, Peppas N A: Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64: 163-174.
12. Körner A, Piculell L, Iselau F, Wittgren B, Larsson A: Influence of Different Polymer Types on the Overall Release Mechanism in Hydrophilic Matrix Tablets. *Molecules* 2009; 14: 2699-2716.
13. Viriden A, Abrahmsen-Alami S, Wittgren B, Larsson A: Release of theophylline and carbamazepine from matrix tablets - Consequences of HPMC chemical heterogeneity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 78: 470-479.
14. Viridén A, Wittgren B, Larsson A: The consequence of the chemical composition of HPMC in matrix tablets on the release behaviour of model drug substances having different solubility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 77: 99–110.
15. P. Colombo, R. Bettini, P. Santi, N. A. Peppas: Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharmaceutical science & technology today* 2000; 3 (6): 198-204.
16. Roohullah, Iqbal Z, Nasir F, Akhlaq M, Sadozai S K, Zada A, Khan A: Sustained Release Carbamazepine Matrix Tablets Prepared by Solvent-Evaporation Technique Using Different Polymers. *Middle-East Journal of Scientific Research* 2013; 15 (10): 1368-1374.
17. Sheskey P J, Cook W, Cable C G: Handbook of Pharmaceutical Excipients: https://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/1001939693.htm?q=hpmc&t=search&ss=text&p=1#_hit (dostopano: 17.03.2015)
18. Keary C M: Characterization of METHOCEL cellulose ethers by aqueous SEC with multiple detectors. *Carbohydrate Polymers* 2001; 45: 293-303.
19. Zhang Y, Hu X, Liu X, Dandan Y, Di D, Yin T, Zhang S, Tang X : Dry state microcrystals stabilized by an HPMC film to improve the bioavailability of andrographolide. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 493: 214-223.
20. Jaipal A, Pandey M M, Charde S Y, Raut P P, Prasanth K V, Prasad R G: Effect of HPMC and mannitol on drug release and bioadhesion behavior of buccal discs of buspirone hydrochloride: In-vitro and in-vivo pharmacokinetic studies. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2015; 23: 315–326.

21. Riekens M K, Kuminek G, Rauber G S, Maduro de Campos C E, Bortoluzzi A J, Stulzer H K : HPMC as a potential enhancer of nimodipine biopharmaceutical properties via ball-milled solid dispersions. *Carbohydrate Polymers* 2014; 99: 474– 482.
22. Akbari J, Enayatifard R, Saeedi M, Saghafi M: Influence of Hydroxypropyl Methylcellulose Molecular Weight Grade on Water Uptake, Erosion and Drug Release Properties of Diclofenac Sodium Matrix Tablets. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2011; 10 (5): 535-541.
23. Whelan M R, Ford J L, Powell M W: Simultaneous determination of ibuprofen and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) using HPLC and evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 30: 1355-1359.
24. Sharma P, Modi S R, Bansal A K: Co-processing of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) for improved aqueous dispersibility. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 485: 348-356.
25. Ebube N K, Hikal A H, Wyandt C M, Beer D C, Miller L G, Jones A B: Sustained Release of Acetaminophen from Heterogeneous Matrix Tablets: Influence of Polymer Ratio, Polymer Loading, and Co-active on Drug Release. *Pharmaceutical Development and Technology* 1997; 2 (2): 161-170.
26. Tiwari S B, Krishna Murthy T, Raveendra Pai M, Mehta P R, Chowdary P B: Controlled Release Formulation of Tramadol Hydrochloride Using Hydrophilic and Hydrophobic Matrix System. *AAPS PharmSciTech* 2003; 4 (3) Article 31 (<http://www.pharmscitech.org>).
27. Siepmann J, Podual K, Sriwongjanya M, Bodmeier R.: A New Model Describing the Swelling and Drug Release Kinetics from Hydroxypropyl Methylcellulose Tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999; 88 (1): 65-72.
28. Raghuram Reddy K, Mutalik S, Reddy S: Once-Daily Sustained-Release Matrix Tablets of Nicorandil: Formulation and In Vitro Evaluation. *AAPS PharmaSciTech* 2003; 4 (4) Article 61 (<http://www.aapspharmscitech.org>).
29. The Dow Chemical Company: Using METHOCEL Cellulose Ethers for Controlled Release of Drugs in Hydrophilic Matrix Systems. July 2000.
30. Bühler V: Kollidon®. Polyvinylpyrrolidone excipients for the pharmaceutical industry. BASF The Chemical Company 2008; 11-139.
31. Haaf F, Sanner A, Straub F: Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and Uses. *Polymer Journal* 1985; 17 (1): 143-152.

32. Sheskey P J, Cook W, Cable C G: Handbook of Pharmaceutical Excipients: https://www.medicinescomplete.com/mc/excipients/current/1001944386.htm?q=pvp&t=search&ss=text&p=1#_hit (dostopano: 17.03.2015)
33. Levy G B, Caldas I JR, Fergus D: Evaluation of Polyvinylpyrrolidone Preparations. *Analytical Chemistry* 1952; 24 (11): 1799–1803.
34. Jones S A, Martin G P, Brown M B: Determination of polyvinylpyrrolidone using high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; 35: 621–624.
35. Kreft K, Kozamernik B, Urleb U: Qualitative determination of polyvinylpyrrolidone type by near-infrared spectrometry. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 177: 1-6.
36. Micromedex[®], Cerner Multum[™], Wolters Kluwer[™]: Povidon K90; Excipient (pharmacologically inactive substance): <http://www.drugs.com/inactive/povidone-k90-376.html> (dostopano: 18.11.2015)
37. Agilent Technologies: Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages. Technical Overview. 2015
38. Putus Macromolecular Sci.&Tech.Ltd.: <http://www.putus.org/news/2009/0121/13.shtml> (dostopano: 03.05.2016)
39. Shimadzu Corporation: Size Exclusion Chromatography: <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/letalk/55/55intro.html> (dostopano: 17.04.2016)
40. Podzimek S: Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation; Powerful Tools for the Characterization of Polymers, Proteins and Nanoparticles. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2011: 1-258.
41. Jordi Labs: Mw Averages Explanations: <https://jordilabs.com/knowledge-base/gpc-sec-white-papers/> (dostopano: 19.03.2016)
42. Wyatt Technology Corporation: <http://www.wyatt.com> (dostopano: 11.04.2016)
43. Pitkänen L, Striegel M A: Size-exclusion chromatography of metal nanoparticles and quantum dots. *Trends in Analytical Chemistry* 2016; 80: 311-320.
44. Caltabiano M A, Foley P J, Barth G H: Size exclusion chromatography of synthetic polymers and biopolymers on common reversed phase and hydrophilic interaction chromatography columns. *Journal of Chromatography A* 2016; 1437: 74-87.

45. M. Gričar, E. Žagar, A. Kržan, M. Žigon: Karakterizacija kopolimerov SEC in SEC-MALS asparaginske kisline in laktida. *Materiali in tehnologije* 40 (2006): 161-165.
46. Yu Y, DesLauriers J P, Rohlfing C D: SEC-MALS method for the determination of long-chain branching and long-chain branching distribution in polyethylene. *Polymer* 2005; 46: 5165-5182.
47. Zhang M, Zhang L, Cheung C K P, Dong J: Fractionation and characterization of a Polysaccharide from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* by preparative size-exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2003; 56: 281-289.
48. Tarazona M P, Saiz E: Combination of SEC/MALS experimental procedures and theoretical analysis for studying the solution properties of macromolecules. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2003; 56: 95–116.
49. Pollock F J, Ashton S R, Rode A N, Schaffer V D, Healy E K.: Molecular Characterization of Multivalent Bioconjugates by Size-Exclusion Chromatography with Multiangle Laser Light Scattering. *Bioconjugate Chemistry* 2012; 23: 1794-1801.
50. Fu H: *Methods in Molecular Biology, Vol. 261: Protein-Protein Interactions: Methods and Protocols*. Human Press Inc., Totowa, New Jersey, 2004: 113-118.
51. Sondermann H, Zhao C, Bar-Sagi D: Analysis of Ras:RasGEF interactions by phage display and static multi-angle light scattering. *Methods* 2005; 37: 197-202.
52. Nedelkov D, Nelson R W: *Methods in Molecular Biology, Vol. 328: New and Emerging Proteomic Techniques*. Human Press Inc., Totowa, New Jersey, 2006: 97-112.
53. Poche S D, Ribes J A, Tipton L D: Characterization of Methocel™: Correlation of Static Light-Scattering Data to GPC Molar Mass Data Based on Pullulan Standards. *Journal of Applied Polymer Science* 1998; 70: 2197-2210.
54. Alliance Protein Laboratories Inc.: *Laser Light Scattering*: http://www.ap-lab.com/light_scattering.htm (dostopano: 29.04.2016)
55. Brewer A K, Striegel A M: Characterizing String-of-Pearls Colloidal Silica by Multidetector Hydrodynamic Chromatography and Comparison to Multidetector Size-Exclusion Chromatography, Off-Line Multiangle Static Light Scattering, and Transmission Electron Microscopy. *Analytical Chemistry* 2011; 83: 3068–3075.
56. Strelitzki R, Reed W F: Automated Batch Characterization of Polymer Solutions by Static Light Scattering and Viscometry. *Journal of Applied Polymer Science* 1999; 73: 2359–2368.

57. Marcelo G, Mendicuti F, Saiz E, Tarazona M P: Combination of SEC-MALS and Fluorescence with Molecular Dynamics Simulations for the Analysis of Ionomer Dimensions in Solution. Application to Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid-co-styrene). *Macromolecules* 2007; 40: 1311-1320.
58. Zhang P, Mazoyer P, Gilbert G R: A broad-standard technique for correcting for band broadening in size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* 2016; 1443: 267-271.
59. Dow Chemical Company: Using METHOCEL Cellulose Ethers for Controlled Release of Drugs in Hydrophilic Matrix Systems. DOW (2002).
60. Norwood D P, Minatti E, Reed W F: Surfactant/Polymer Assemblies. 1. Surfactant Binding Properties. *Macromolecules* 1998; 31: 2957-2965.