

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



PETRA KOS

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

**ŠTUDIJ KOMPLEKSOV MED KATIONSKO UČINKOVINO IN  
POLIANIJSKIMI KARAGENANI ZA DOSEGANJE PRIREJENEGA  
SPROŠČANJA**

**STUDY OF COMPLEXES BETWEEN CATIONIC DRUG AND POLY-  
ANIONIC CARRAGEENANS FOR MODIFIED DRUG RELEASE**

Ljubljana, september 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo in Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner in izr. prof. dr. Ksenije Kogej.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner in somentorici izr. prof. dr. Kseniji Kogej za vse nasvete in strokovno pomoč ter ves njun trud in podporo.

Hkrati se zahvaljujem vsem sodelavcem na Fakulteti za farmacijo in Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali in bili prijetna družba pri opravljanju diplomskega dela; še posebna hvala delovnemu mentorju dr. Mateju Pavliju.

Na koncu pa bi se rada najlepše zahvalila svojim staršem in sestri Nini, ki so mi ves čas študija stali ob strani ter prijateljem za vse lepe trenutke, ki smo jih v tem času preživel skupaj.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Saše Baumgartner in somentorice izr. prof. dr. Ksenije Kogej.

**VSEBINA**

<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>5</b>
<b>POVZETEK .....</b>	<b>6</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>8</b>
1.1. PRIREJENO SPROŠČANJE .....	8
1.2. KARAGENANI .....	12
1.3. HIDROKSIPROPILMETILCELULOZA (HPMC) .....	15
1.4. DOKSAZOSINIJEV MESILAT (DM) .....	16
1.5. IZOTERME VEZANJA ZA SISTEME POLIELEKTROLIT-POVRŠINSKO AKTIVNA SNOV (PAS) .....	17
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>20</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>22</b>
3.1 MATERIALI .....	22
3.1.1 UČINKOVINA IN POMOŽNE SNOVI .....	22
3.1.2. OSTALE UPORABLJENE SNOVI .....	23
3.2. NAPRAVE .....	24
3.3. POTENCIOMETRIČNE MERITVE .....	25
3.3.1. DOLOČITEV STOPNJE VEZANJA $\beta$ .....	27
3.3.2. GALVANSKI ČLEN .....	28
3.3.3. PRIPRAVA IONOSELEKTIVNE MEMBRANSKE ELEKTRODE .....	30
3.3.3.1. Priprava nosilnega kompleksa .....	30
3.3.3.2. Priprava membrane .....	31
3.3.3.3. Izdelava elektrode .....	31
3.4. DIALIZNA METODA .....	32
3.4.1. PRIPRAVA FOSFATNIH PUFROV .....	32
3.4.2. IZDELAVA UMERITVENIH PREMICE Z METODO UV-VIS .....	33
3.4.3. DOLOČANJE NASIČENE TOPNOSTI UČINKOVINE .....	34
3.5. MERITVE DINAMIČNEGA SIPANJA SVETLOBE .....	35
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>38</b>
4.1. POTENCIOMETRIČNE MERITVE .....	38

---

4.1.1. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V VODI .....	38
4.1.1.1. Jakost in obseg vezave DM na karagenane pri 25 °C.....	38
4.1.1.2. Jakost in obseg vezave DM na karagenane pri 37 °C.....	41
4.1.2. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V FOSFATNEM PUFRU.....	45
4.1.3. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V VODNI RAZTOPINI NATRIJEVEGA KLORIDA.....	46
4.1.4. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V VODI OB PRISOTNOSTI HIDROKSIPROPILMETILCELULOZE (HPMC) .....	48
4.2. PRIMERJAVA REZULTATOV POTENCIOMETRIČNIH MERITEV Z DIALIZNO METODO .....	50
4.3. MERITVE POTENCIALA ZETA .....	52
4.4. VPLIV DODATKA SDS NA TVORBO KOMPLEKSA MED DM IN λ- KARAGENANOM .....	54
4.4.1. ODZIV ELEKTRODE NA DODATEK SDS H KOMPLEKSU.....	55
4.4.2. VPLIV DODATKA SDS NA VELIKOST DELCEV.....	57
<b>5. SKLEP .....</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>64</b>

**SEZNAM OKRAJŠAV**

CAC	kritična koncentracija agregacije (ang. <i>critical aggregation concentration</i> )
CMC	kritična micelarna koncentracija (ang. <i>critical micelle concentration</i> )
DLS	dinamično sipanje svetlobe (ang. <i>dynamic light scattering</i> )
DM	doksazosinijev mesilat
HPMC	hidroksipropilmetilceluloza
MIE	membranska ionoselektivna elektroda
PAS	površinsko aktivna snov
PE	polielektrolit
SAXS	ozkokotno rentgensko sipanje X-žarkov (ang. <i>small-angle X-ray scattering</i> )
SDS	natrijev lavrilsulfat ali natrijev dodecilsulfat (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
UV-VIS	absorpcijska spektrofotometrija (ang. <i>ultraviolet-visible spectrophotometry</i> )
ZU	zdravilna učinkovina

## POVZETEK

Z uporabo različnih hidrofilnih polimerov kot tvorilcev ogrodja tablet lahko dosežemo podaljšano sproščanje zdravilne učinkovine, kar nam omogoča bolj varno, učinkovito in bolniku prijaznejšo terapijo. Med takšne hidrofilne polimere sodijo tudi polisaharidi karagenani, ki imajo v svoji strukturi sulfatne skupine in se v vodnih raztopinah obnašajo kot polielektroliti. Med modelno kationsko učinkovino doksazosinijevim mesilatom (DM) in  $\lambda$ -,  $\iota$ - in  $\kappa$ -karagenani pride do močnih elektrostatskih interakcij, ki jih lahko dodatno izkoriščamo za prirejeno sproščanje. V diplomskem delu smo omenjene interakcije oziroma nastanek kompleksov med DM in karagenani proučili pri različnih eksperimentalnih pogojih. S pomočjo potenciometričnih meritev smo določili stopnjo vezanja DM na karagenane in narisali izoterme vezanja. V ta namen smo prvič pripravili posebno membransko ionoselektivno elektrodo, ki je bila selektivna na doksazosin.

Primerjava izoterm vezanja DM na  $\lambda$ -,  $\iota$ - in  $\kappa$ -karagenane je pokazala, da so interakcije med DM in karagenani močno odvisne od števila in razporeditve sulfatnih skupin na disaharidni monomerni enoti na karagenanu. Vezava DM je najmočnejša na  $\lambda$ -karagenan, sledi  $\iota$ -karagenan, najšibkejša pa je vezava na  $\kappa$ -karagenan. Z meritvami pri temperaturi 37 °C, v fosfatnem pufrom ter v raztopini elektrolita s povišano ionsko močjo smo se približali pogojem *in vivo*. Rezultati so pokazali, da je kompleksacija doksazosina in karagenanov pri višji temperaturi v primerjavi s sobno temperaturo slabša. Tudi prisotnost elektrolitov v mediju zmanjša obseg vezave doksazosina na karagenane.

Da bi preverili vpliv različnih soli in drugih nečistot v komercialno dostopnih vzorcih karagenana, smo potenciometrične meritve v vodi izvedli tudi s karagenani, prečiščenimi po točno določenih postopkih. Rezultati so pokazali, da je pri slednjih interakcija sicer nekoliko močnejša, vendar do pomembnejših odstopanj ni prišlo. Zaradi obetavnosti kombinacije različnih hidrofilnih polimerov v ogrodnih tabletah smo preverili tudi vezavo DM na karagenane ob dodatku hidroksipropilmetilceluloze k raztopini karagenana. Ugotovili smo, da hidroksipropilmetilceluloza ovira interakcije med DM in karagenani in močno zmanjša obseg kompleksacije.

Stopnjo vezanja DM na karagenane smo določili tudi z dializno metodo in rezultate primerjali z rezultati potenciometrične metode. Dokazali smo, da je slednja za proučevanje interakcij med DM in karagenani hitrejša, bolj točna in natančna. V nadaljevanju smo z meritvami potenciala zeta potrdili težnjo po nastanku kompleksov med DM in karagenani. Ker se v prebavnem traktu izločajo številne površinsko aktivne snovi, ki lahko pomembno vplivajo na dostavo učinkovine iz farmacevtske oblike, smo s pomočjo potenciometričnih meritev in meritev dinamičnega sipanja svetlobe ugotavljali vpliv natrijevega lavrilsulfata na nastanek kompleksa in ugotovili, da natrijev lavrilsulfat pri koncentraciji večji od  $2 \times 10^{-4}$  mol/L začne razgrajevati komplekse.

Nov pristop k proučevanju interakcij med učinkovino in karagenani z membransko ionoselektivno elektrodo bistveno pripomore k boljšemu razumevanju mehanizmov vezave učinkovine na karagenane in omogoča razlago procesov sproščanja ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet.

Ključne besede: prirejeno sproščanje, karagenani, interakcije med amfifilnimi snovmi in polielektroliti, ionoselektivna elektroda, dinamično sipanje svetlobe

## 1. UVOD

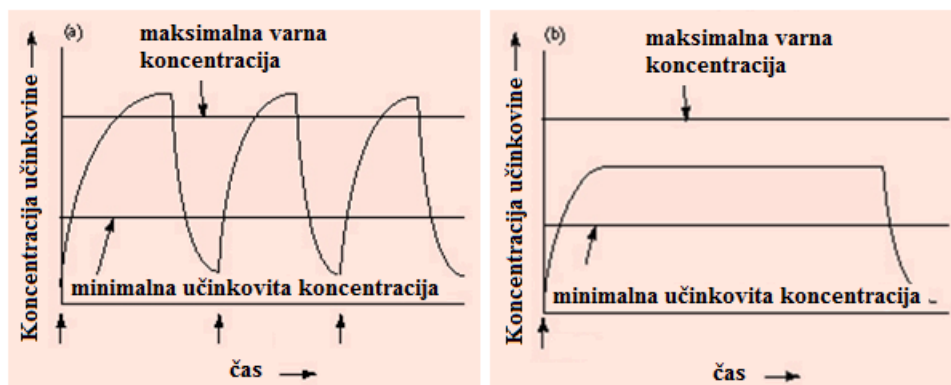
V preteklosti so v farmaciji prevladovala zdravila, ki so bila večinoma sestavljena iz preprostih, hitro delujočih učinkovin. Namenjena so bili predvsem za peroralno uporabo v obliki tablet ali tekočih farmacevtskih oblik ali za parenteralno aplikacijo v obliki injekcij. V zadnjih treh desetletjih pa je uporaba polimerov v farmacevtski tehnologiji pripeljala do intenzivnega razvoja na področju novih dostavnih sistemov. S kompleksnimi formulacijami lahko nadziramo hitrost in čas dostave učinkovin in zdravilno učinkovino dostavimo na specifično tarčno mesto v našem organizmu. Zaradi široke izbire polimerov, njihove nizke reaktivnosti in možnosti enostavnega spreminjanja njihovih kemijskih in fizikalnih lastnosti s pomočjo molekulske sinteze polimeri danes predstavljajo enega najpomembnejših področij raziskovanja (1). K razvoju znanosti na področju polimerov so največ prispevali biopolimeri. V farmaciji so zlasti uporabni zaradi njihove biokompatibilnosti in/ali biorazgradljivosti, saj so večinoma netoksični in se v telesu po sprostitvi učinkovine razgradijo na telesu neškodljive manjše molekule oziroma se izločijo.

### 1.1. PRIREJENO SPROŠČANJE

O prirejenem sproščanju govorimo, ko se ZU iz FO sprošča na predviden način v določenih časovnih obdobjih in intervalih in/ali na določenem mestu za doseganje terapevtskih ali drugih koristi, ki jih ni mogoče doseči s pomočjo klasičnih FO (2).

Cilj večine prvotnih FO s prirejenim sproščanjem je bil doseči profil sproščanja, ki bi omogočal dovolj visoko koncentracijo učinkovine skozi daljši čas. Krivulja a na sliki 1 prikazuje profil sproščanja pri klasičnih dostavnih sistemih, kjer koncentracija učinkovine v plazmi po vsakem odmerku zdravila naraste in nato do naslednjega odmerka hitro pada zaradi različnih metabolnih procesov izločanja. Pri takšnih dostavnih sistemih je pomembno, da koncentracija učinkovine niha znotraj terapevtskega območja in ostane pod mejo toksičnosti ter nad mejo minimalne učinkovite koncentracije. Pri dostavnih sistemih s podaljšanim sproščanjem koncentracija učinkovine sledi krivulji b (slika 1) in ostaja konstantna skozi daljši čas.





Slika 1: Koncentracije učinkovine v krvi pri (a) klasičnih FO in (b) FO s podaljšanim sproščanjem (3).

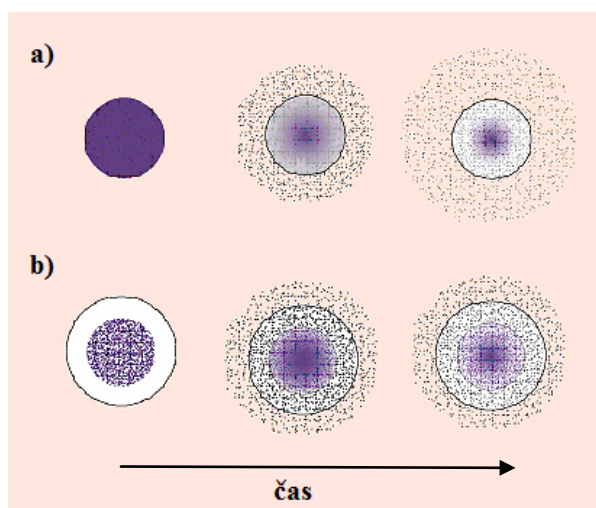
V zadnjih letih so postali dostavni sistemi s prirejenim sproščanjem veliko bolj napredni in so sposobni več kot zgolj podaljševati čas sproščanja učinkovine. Lahko se odzivajo na spremembe v okolju in omogočajo dostavo na točno določeno tarčno mesto v organizmu (3). S FO s prirejenim sproščanjem tako zmanjšamo pogostost odmerjanja, povečamo učinkovitost ZU z zadrževanjem FO na mestu delovanja, zmanjšamo porabo ZU, vzdržujemo optimalno koncentracijo ZU v plazmi in s tem zmanjšamo neželene učinke. Zmanjša se tudi zadrževanje ZU v telesu in verjetnost izgube učinkovitosti (pri kronični uporabi). Bistvo FO s prirejenim sproščanjem je izboljšanje pacientove compliance in učinkovitosti zdravljenja (3,4).

Izrazoslovje FO s prirejenim sproščanjem je zaradi razvoja številnih novih FO zelo kompleksno. V različnih literarnih virih v angleškem jeziku se za FO s prirejenim sproščanjem uporabljajo različni izrazi, zlasti ko govorimo o podaljšanem sproščanju, ki so pogosto zavajajoči ali sinonimni (4). Formularium Slovenicum navaja tri vrste FO s prirejenim sproščanjem:

- FO s podaljšanim sproščanjem (*extended-release dosage forms*), ki sproščajo zdravilno učinkovino skozi daljše časovno obdobje.
- FO z zakasnelim sproščanjem (*delayed-release dosage forms*), ki imajo časovno zamaknjeno nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine.
- FO s pulzirajočim sproščanjem (*pulsatile-release dosage forms*), ki sproščajo zdravilno učinkovino v določenih časovnih intervalih (5).

Od vseh FO s prirejenim sproščanjem predstavljajo največji delež peroralne FO. Z naraščajočim številom biotehnoških zdravil znanstvenikom na področju farmacije predstavlja velik izziv te biotehnoško pridobljene učinkovine učinkovito in varno dostaviti na neinvaziven in človeku prijazen način (6). Cilj je tako pripraviti dostavne sisteme, ki bi omogočali dostavo proteinov, peptidov in drugih makromolekularnih učinkovin kot tudi majhnih molekul z neustreznimi biofarmaceutskimi lastnostmi po peroralni poti.

Peroralni enoodmerni dostavni sistemi so večinoma ogrodni ali rezervoarni sistemi v obliki tablet. V rezervoarnih sistemih je rezervoar z zdravilno učinkovino obdan s filmom oziroma membrano, ki nadzoruje hitrost sproščanja in omogoča ves čas konstantno sproščanje učinkovine (slika 2). Med dostavnimi sistemi, proizvedenimi z že uveljavljenimi postopki, so najpogostejši ogrodni sistemi, predvsem zaradi enostavnosti njihove proizvodnje, stabilnosti in zanesljivosti. Še vedno pa tudi ti sistemi niso povsem raziskani, saj zaradi številnih kombinacij in novih materialov na tržišču stalno prihaja do napredka na tem področju.



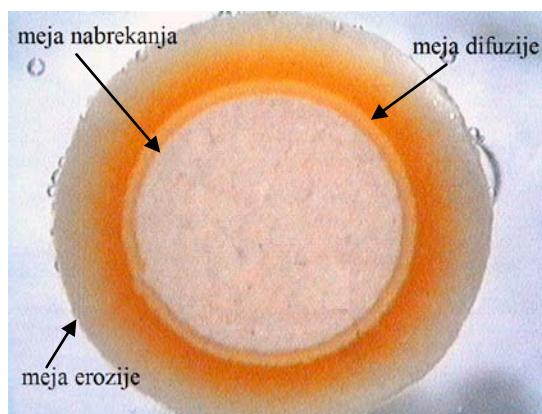
Slika 2: Sproščanje učinkovine iz (a) ogrodnega in (b) rezervoarnega sistema.

V ogrodnih sistemih je ZU dispergirana v pomožni snovi (večinoma polimeru), ki tvori ogrodje. Tako polimer in ZU tvorita homogen sistem. Bistvenega pomena je, da v vodi ne pride do takojšnjega razpada ogrodja, saj je ohranitev monolitne strukture sistema osnovnega pomena za nadzorovanje sproščanja ZU. Učinkovina difundira skozi polimerno ogrodje v

zunanje okolje (slika 2). Pri tem se s časom hitrost sproščanja zmanjšuje, saj se povečuje difuzijska razdalja, ki jo mora prepotovati učinkovina (3). Tovrstni ogrodni sistemi se ponavadi proizvajajo s stiskanjem (tabletiranje) ali iztiskanjem (ekstruzija) praškastih mešanic (7).

Ločimo tri vrste ogrodij: inertno, erozijsko in nabrekajoče. Najbolj so priljubljena nabrekajoča hidrofилna ogrodja zaradi dostopnosti nabrekajočih polimerov, ki so dovoljeni za uporabo v farmaciji, in sposobnosti interagirati z medijem, v katerem se ZU sprošča (7). Nabrekanje ogrodja vpliva na kinetiko sproščanja ZU glede na lastnosti komponent in geometrijo ogrodja (8). Gelska plast, ki se tvori na površini trdnega jedra ogrodja, nadzira transport tako učinkovine kot vode. Pri nabrekanju hidrofилnih ogrodnih tablet ločimo tri meje (slika 3):

- meja nabrekanja (meja med polimerom v steklastem in elastičnem stanju)
- meja difuzije (meja med neraztopljeno in raztopljeno učinkovino v gelu)
- meja erozije (meja med ogrodjem in medijem za raztapljanje)



Slika 3: Ogrodna tableta iz hidrofилnega polimera (9).

Med hidrofилnimi nabrekajočimi polimeri, ki se uporabljajo v hidrofилnih ogrodnih tabletah, so pogosti zlasti celulozni etri kot so metilceluloza (MC), hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), hidroksipropilceluloza (HPC) in natrijeva karboksimetilceluloza (NaCMC). Poleg sintetičnih celuloznih etrov se za učinkovito doseganje prirejenega sproščanja iz nabrekajočih ogrodnih tablet uporabljajo tudi naravni polimeri kot so ksantan, guar gumi in karagenani (10-12).

## 1.2. KARAGENANI

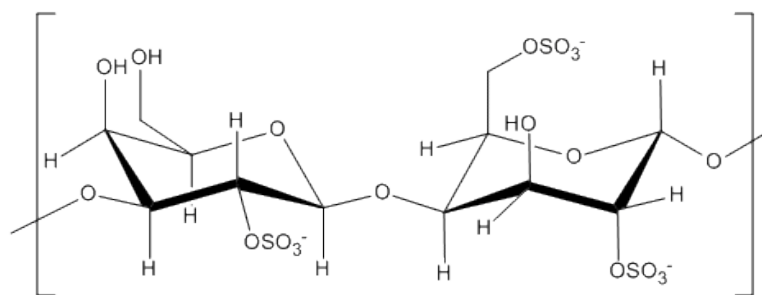
Karagenan je skupno ime za vsaj tri vrste ionskih polisaharidnih biopolimerov: lambda ( $\lambda$ ), iota ( $\iota$ ) in kappa ( $\kappa$ ) karagenan. Spadajo v skupino naravnih polisaharidov, ki jih večinoma najdemo v celičnih stenah rdečih alg (Rhodophyceae) (13).

Začetki uporabe karagenanov segajo že v čas antike, ko so ekstrakte rdečih alg uporabljali za geliranje mleka. Danes imajo karagenani kot stabilizatorji, zgoščevala in sredstva za geliranje pomembno vlogo predvsem v prehrambeni industriji,  $\kappa$ -karagenan je na primer zelo pogost v mlečnih izdelkih, uporablja pa se tudi kot konzervans v mesnih izdelkih. Prav tako so karagenani pogosti v kozmetični industriji, zlasti  $\iota$ -karagenan (14).

V farmaciji se uporabljajo kot pomožna snov pri izdelavi različnih FO. Najdemo jih v različnih neparenteralnih FO, vključujoč suspenzije, emulzije, gele, kreme, losjone, kapljice za oči, svečke, tablete in kapsule (15). V zadnjem času pa zlasti zaradi njihove sposobnosti povečanja viskoznosti in tvorjenja gelov ter zaradi dokazane varnosti močno narašča zanimanje za njihovo uporabo v farmaciji z namenom doseganja prirejenega sproščanja. Narejenih je bilo že nekaj študij, ki so proučevale vključevanje karagenana v ogrodne tablete z različnimi zdravilnimi učinkovinami (ZU) in pomožnimi snovmi (12,16,17).

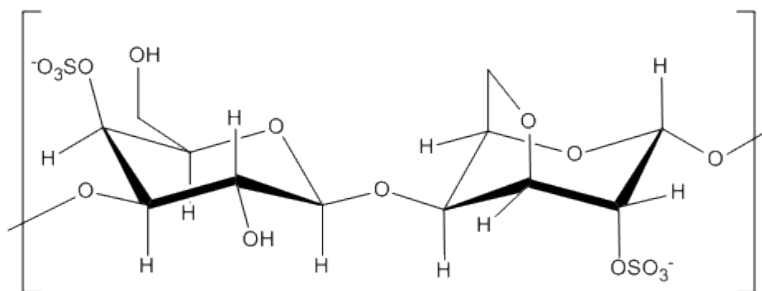
Široka uporaba in številne študije karagenanov so posledica njihove raznolikosti, saj lahko odvisno od njihovega izvora in načina pridobivanja pridobimo karagenane z najrazličnejšimi lastnostmi. Karagenani so večinoma dostopni v obliki natrijevih, kalijevih, kalcijevih ali magnezijevih soli. Njihova osnovna veriga je sestavljena iz ponavljajočih se galaktoznih enot. Naštete tri vrste karagenanov se med seboj razlikujejo predvsem po položaju in številu sulfatnih skupin na disaharidno enoto ter po vsebnosti 3,6-anhidrogalaktoze. Galaktozne enote so med sabo povezane z alfa 1-3 in beta 1-4 glikozidnimi vezmi:

a)  $\lambda$ -Karagenan (slika 4) sestavljajo ponavljajoče se disaharidne enote D-galaktoza-2-sulfata in D-galaktoza-2,6-disulfata. V strukturi ima tri sulfatne skupine na monomerno disaharidno enoto.



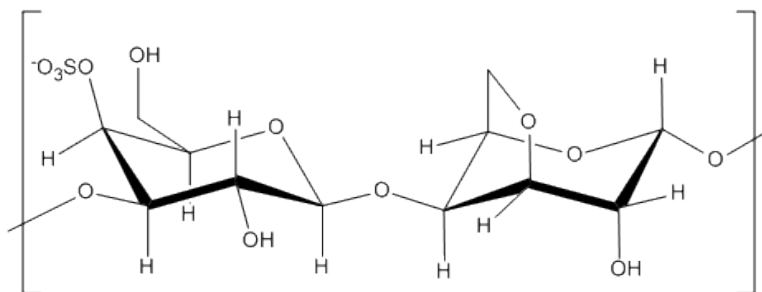
Slika 4: Struktura monomerne enote karagenana lambda.

b) ι-Karagenan (slika 5) je kopolimer D-galaktoza-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoza-2-sulfata. V strukturi ima dve sulfatni skupini na eno disaharidno enoto.



Slika 5: Struktura monomerne enote karagenana iota.

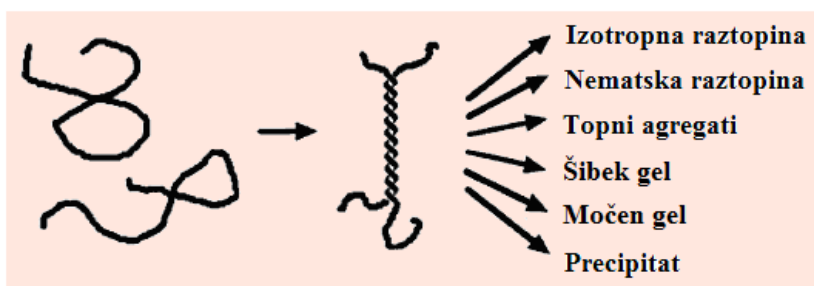
c) κ-Karagenan (slika 6) sestoji iz D-galaktoza-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze in ima eno samo sulfatno skupino na disaharidno enoto (18).



Slika 6: Struktura monomerne enote karagenana kappa.

Slike 4, 5 in 6 prikazujejo idealizirane strukture karagenanov. Dejanske strukture se od idealiziranih lahko razlikujejo, kar je predvsem posledica naravnega izvora karagenanov. Študije so pokazale, da v realnih raztopinah  $\lambda$ -karagenan ne vsebuje treh elementarnih nabojev na ponavljajočo se disaharidno enoto, ampak le nekje med dva in tri naboje (v povprečju okrog 2.8 na disaharidno enoto) (19).

V ustreznih pogojih  $\kappa$ -karagenan in  $\iota$ -karagenan v vodni raztopini prehajata iz sol-stanja v gel-stanje, medtem ko zaradi večjega števila sulfatnih skupin  $\lambda$ -karagenan tvori le viskozne raztopine in ne gelira (18). Znano je, da karagenani, ki vsebujejo odseke, ki lahko tvorijo urejene vijačne strukture, tvorijo gele. Večji delež sulfatnih skupin zniža temperaturo, pri kateri postane karagenan topen in povzroči nastanek šibkejših gelov (lambda karagenan) ali prepreči njihov nastanek (20). Hkrati pa je geliranje le ena izmed možnih posledic tvorjenja vijačnice (slika 7).



Slika 7: Možne posledice tvorjenja vijačnice pri karagenanih (14).

Do te raznolikosti pride, ker so lastnosti karagenanov, poleg raznovrstnosti v kemijski strukturi, močno odvisne od sestave vodnega medija, predvsem od prisotnih ionov. Na njihove lastnosti (kot so na primer termična stabilnost, elastičnost, optična bistrost gela) lahko močno vplivamo zgolj s spreminjanjem vsebnosti in narave dodane soli (14).

Do danes je bilo zbranih že veliko informacij o makroskopskih lastnostih najrazličnejših sistemov s karagenani. Razumevanje njihovih lastnosti na molekularnem nivoju pa je še vedno precej slabo (14), čeprav pridobiva na pomenu, saj nam nudi razlago in omogoča napoved

učinkov, ki jih dosežemo s spreminjanjem fizikalno-kemijskih pogojev v danem realnem sistemu.

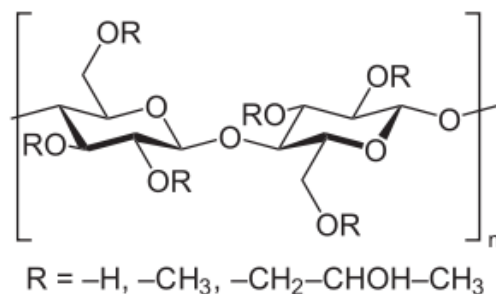
Karagenani se v vodnih raztopinah obnašajo kot polielektroliti (PE). Monomerne enote PE lahko v polarnem mediju popolnoma ali deloma ionizirajo, odvisno od narave njihovih funkcionalnih skupin (21). Kadar so v različnih farmacevtskih formulacijah prisotne ZU ali druge substance s pozitivnim nabojem in negativno nabiti karagenani, lahko med njimi pride do različnih interakcij, ki jih je potrebno proučiti. V primeru, ko sta karagenan in ZU nasprotno nabita, prevladujejo močno privlačne interakcije, ki navadno vodijo do nastanka kompleksa med PE in ZU. Različne študije so pokazale, da pri tvorbi kompleksa med PE in ZU poleg ionskih interakcij igrajo pomembno vlogo tudi hidrofobne interakcije. Poleg tega je adsorpcija pozitivno nabite ZU na nasprotno nabit polisaharid odvisna še od številnih drugih faktorjev, med katerimi so najpomembnejši tridimenzionalna ureditev polarnih in hidrofobnih segmentov, razdalja med naboji in gostota naboja ter ionska moč raztopine, torej koncentracija enostavnih soli v topilu (22).

V nekaterih primerih se interakcijam med ZU in polimerom želimo izogniti, predvsem če želimo ohraniti homogen sistem. Lahko pa te interakcije dodatno izkoriščamo za prirejeno sproščanje ZU. Študij takšnih realnih raztopin je zaradi kompleksne strukture polimerov ter velikega števila ostalih prisotnih komponent iz fizikalno kemijskega stališča zelo zapleten.

### 1.3. HIDROKSIPROPILMETILCELULOZA (HPMC)

HMPC je polsintetičen, inerten in viskoelastičen polimer, ki se pogosto uporablja kot pomožna snov v tabletah s prirejenim sproščanjem. Najdemo ga tudi v najrazličnejših izdelkih na trgu, saj je pogost dodatek v prehrabeni industriji, zgoščevalo, emulgator in hkrati alternativa živalski želatini (23). Kemijsko je HPMC delno O-metilirana in O-(2-hidroksipropilirana) celuloza (slika 8). Na tržišču je prisotnih več vrst HPMC, ki se med sabo razlikujejo po viskoznosti in stopnji substitucije. V farmaciji se HPMC pogosto uporablja v peroralnih FO in tudi v FO za okularno in dermalno uporabo (15). V vodi ne ionizira in je običajno

kompatibilna z večino ZU. Ker je polsinteznega izvora, lahko njeno kakovost relativno dobro nadzirajo. Tako kot karagenani je tudi HPMC predmet številnih raziskav.

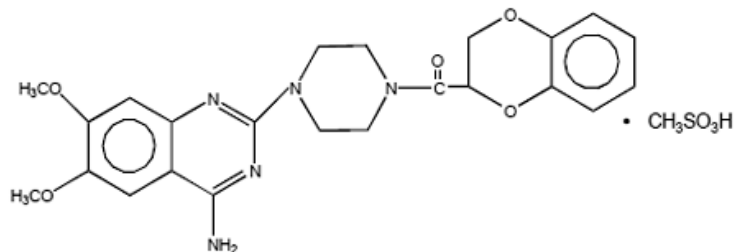


Slika 8: Struktura HPMC.

#### 1.4. DOKSAZOSINIJEV MESILAT (DM)

Modelna učinkovina doksazosinjev mesilat je dolgo delujoči kinazolinski antagonist postsinaptičnih  $\alpha_1$ -adrenergičnih receptorjev. Kemijsko in farmakološko je podoben prazosinu in terazosinu. Uporablja se sam ali v kombinaciji z drugimi antihipertenzivi. Deluje tako, da zmanjša mišični tonus krvnih žil, zaradi česar pride do padca perifernega upora v žilah in krvnega tlaka brez signifikantnega vpliva na minutni volumen srca in srčni utrip. Doksazosin se uporablja tudi za zdravljenje benigne hiperplazije prostate. Z blokado  $\alpha_1$ -adrenoreceptorjev se namreč zmanjša mišični tonus v prostati in s tem lajšajo simptomi bolezni. Novejše študije kažejo tudi na učinkovitost doksazosina pri zniževanju povišanega holesterola in ostalih dejavnikov tveganja za srčne bolezni (24,25). V zdravilih na tržišču ga najdemo v obliki doksazosinjevega mesilata (slika 9). V strukturi doksazosinjevega mesilata (slika 9) je pet dušikovih atomov s protonskimi afinitetami med 880 kJ/mol in 1080 kJ/mol (26). V vodnih raztopinah ima tako DM pozitiven naboj.

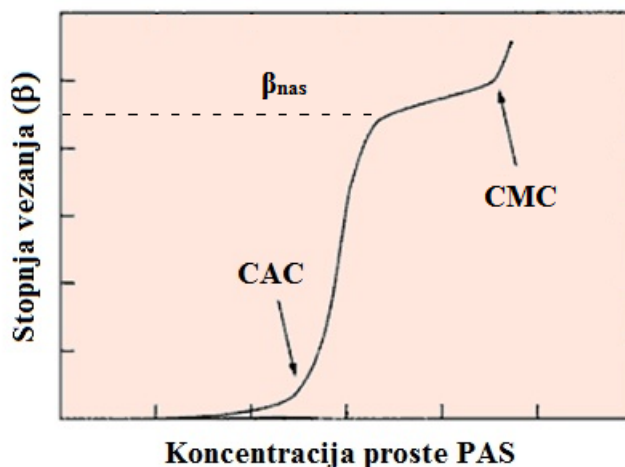




Slika 9: Struktura doksazosinijevega mesilata (DM).

### 1.5. IZOTERME VEZANJA ZA SISTEME POLIELEKTROLIT-POVRŠINSKO AKTIVNA SNOV (PAS)

Izoterme vezanja se uporabljajo za proučevanje interakcij med polimeri in PAS. Prikazujejo odvisnost stopnje vezanja,  $\beta$  (množina PAS vezane na en mol monomernih enot polimera), od logaritma koncentracije proste PAS v raztopini (slika 10), v našem primeru odvisnosti od logaritma koncentracije prostega DM v raztopini.



Slika 10: Shema izoterme vezanja, kjer CAC predstavlja kritično koncentracijo agregacije, CMC kritično micelarno koncentracijo in  $\beta_{nas}$  stopnjo vezanja ob nasičenju vezavnih mest na poliionu.

Izoterme imajo tipično sigmoidno obliko, ki odraža kooperativnost v procesu vezave liganda na poliion. Kooperativnost je posledica hidrofobnih interakcij med vezanimi ioni PAS, zaradi česar se ioni PAS na poliion vežejo v obliki agregatov, ki so podobni micelom.

Kot je razvidno s slike 10, je stopnja vezanja pod določeno koncentracijo proste PAS zanemarljivo majhna ( $\beta$  je blizu 0), nato pa pri tako imenovani kritični koncentraciji agregacije, CAC (ang. *critical aggregation concentration*), strmo naraste. Tak skokovit porast  $\beta$  je značilen za vezanje z močno kooperativnim značajem. Nad CAC je koncentracija PAS bolj ali manj konstantna. Ob nasičenju vezavnih mest na polimeru s PAS pa prične koncentracija PAS ponovno naraščati. Izoterma v tem območju doseže nekakšen »plato«. V tem območju  $\beta$  počasneje narašča z naraščajočo koncentracijo PAS ali pa je celo konstantna. Določimo lahko stopnjo vezanja ob nasičenju, ki jo označimo z  $\beta_{\text{nas}}$ . Območju nasičenja v sistemih polimer-PAS sledi ponovno zvišanje  $\beta$  nad kritično micelarno koncentracijo, okrajšano CMC (iz ang. *critical micelle concentration*).

Pomemben parameter, ki odraža moč interakcij med učinkovino in polimerom, je CAC. Definirana je kot koncentracija proste učinkovine, pri kateri se začne kooperativno vezanje na polimer. Močnejše kot so interakcije med polimerom in učinkovino, nižja je CAC. Določimo jo z ekstrapolacijo strmega dela izoterme (slika 10) na abscisno os (27).

Standardna metoda za določitev izoterm vezanja je ravnotežna dializa, pri kateri se po vzpostavitvi ravnotežja določi koncentracija PAS v raztopinah z in brez polimera. Raztopini sta ločeni z membrano, ki je ponavadi iz celuloze oziroma celuloznega derivata ali sintetičnega polimerne materiala. Glavni dejavnik uspešnosti poskusov je poroznost membrane, saj se lahko ioni PAS ujamejo v membrano in motijo nadaljnje prehajanje ionov, kar med drugim podaljša čas do vzpostavitve ravnotežja (28). Na osnovi dializne metode so v nekaj študijah že preučevali tudi vezavo ligandov na karagenane, v nekaterih tudi vezavo različnih ZU, kot so na primer amfilni triciklični antidepresivi (amitriptilin) in benzodiazepini (diltiazem) (22,29-31). Caram-Lelham in Sundelöf (29,30) sta z dializno metodo na primer proučevala vpliv gostote naboja, razdalje med naboji, tridimenzionalne strukture in hidrofobnih lastnosti karagenanov na adsorpcijo amitriptilina.

Druga pomembna metoda, ki se v fizikalni kemiji uporablja za proučevanje interakcij med PE in PAS, je potenciometrična metoda, ki temelji na uporabi membranske ionoselektivne

elektrode (MIE). Bistveni del te elektrode je membrana, katere potencial je odvisen od aktivnosti (koncentracije) posameznega iona v preiskovani raztopini. V primeru, da v raztopino dodamo nasprotno nabite ione ali snovi, s katerimi preiskovani ion tvori komplekse, se potencial membrane spremeni. V našem primeru gre za polivinilkloridno membrano z vgrajenim kompleksom med dodecilsulfatom in doksazosinom. S pomočjo MIE smo določali vezavo ZU na PE. Prednosti te metode so hitrost, dobra občutljivost, točnost in ponovljivost (ponavadi veliko večja kot pri dializni metodi, odvisni od spektrofotometričnih ali volumetričnih meritev) in manjši volumen vzorca (32,33).

## 2. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo proučevali interakcije med karagenani, ki se lahko uporabljajo kot ogrodni polimeri v tabletah s prirejenim sproščanjem, in modelno kationsko učinkovino doksazosinijevim mesilatom (DM). Doksazosin ima v vodnih raztopinah pozitiven naboj in lahko z negativno nabitimi karagenani tvori komplekse. S pomočjo potenciometrične metode bomo določili stopnjo vezanja DM na  $\lambda$ -,  $\iota$ -,  $\kappa$ -karagenane in narisali izoterme vezanja pod različnimi eksperimentalnimi pogoji. V ta namen bomo poskusili izdelati membransko ionoselektivno elektrodo (MIE), ki se bo odzivala na doksazosin, kar bo po nam znanih podatkih prvi tovrsten poskus za določanje izoterm vezanja ZU na polielektrolite.

Poskuse bomo najprej izvedli v vodi pri sobni temperaturi in nato pri 37 °C. Z namenom, da bi se približali pogojem v prebavnem traktu, bomo poskuse izvedli tudi v fosfatnem pufru s pH 7,0 in v vodni raztopini natrijevega klorida. Karagenani, ki so dostopni na tržišču, se lahko razlikujejo v vsebnosti soli in drugih nečistot. Pri raziskovalnem delu bomo tako ugotavljali, kakšna je razlika v vezavi DM v vodi na komercialno dostopne karagenane in karagenane, ki so bili predhodno prečiščeni po točno določenih postopkih. Kombinacija karagenanov z drugimi hidrofилnimi polimeri, kot je na primer hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), predstavlja dodatne možnosti za doseganje prirejenega sproščanja. Zato nas bo zanimalo, kakšen vpliv na vezavo DM na karagenane ima dodatek HPMC k raztopini karagenana pri potenciometričnih meritvah.

Stopnjo vezanja DM na karagenane v vodi bomo določili tudi z dializno metodo, ki pa je za razliko od potenciometrične metode že uveljavljena metoda za določevanje vezave ZU na polimere. Rezultate dializne metode bomo primerjali z rezultati potenciometrične metode in poskušali dokazati prednosti uporabe slednje. V nadaljevanju bomo dodatne informacije o težnji po nastanku kompleksov pridobili z meritvami potenciala zeta raztopin DM in  $\lambda$ -karagenana v vodi in fosfatnih pufrih s pH 7,0 in pH 4,5.

Ker se v prebavnem traktu sproščajo različne površinsko aktivne snovi, ki lahko pomembno vplivajo na dostavo učinkovine iz FO, bomo na koncu s pomočjo MIE ter metode

dinamičnega sipanja svetlobe proučili še, kako dodatek površinsko aktivnih snovi vpliva na tvorbo kompleksov med DM in karagenani. Poskušali bomo potrditi, da površinsko aktivna snov natrijev lavril sulfat preprečuje nastanek kompleksov oziroma jih razgradi.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 UČINKOVINA IN POMOŽNE SNOVI

###### DOKSAZOSINIJEV MESILAT

Okrajšava: DM

Kemijsko: 1-(4-amino-6,7-dimetoksikinazolin-2-il)-4-[(2,3-dihidro-1,4-benzodioksin-2-il)karbonil]-piperazinijev metilsulfonid

Molska masa: 547,6 g/mol

Izgled: bel prašek brez vonja

Dobavitelj: Krka d.d.

###### KARAGENANI:

- Lambda ( $\lambda$ ) karagenan (VISCARIN GP 209NF; št:40620160)

Kemijsko: kopolimer D-galaktoza-2-sulfata in D-galaktoza-2,6-disulfata

Molska masa: 400.000-600.000 g/mol (34)

Izgled: rjavkast prašek brez vonja in okusa

Proizvajalec: FMC Biopolymer (ZDA)

- Iota ( $\iota$ ) karagenan (GELCARIN GP-379NF; št: 50443050)

Kemijsko: kopolimer D-galaktoza-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoza-2-sulfata

Molska masa: 400.000-600.000 g/mol

Izgled: rjavkast prašek brez vonja in okusa

Proizvajalec: FMC Biopolymer (ZDA)

- Kappa ( $\kappa$ ) karagenan (GELCARIN GP-911 NF; št: 90305060)

Kemijsko: kopolimer D-galaktoza-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze

Molska masa: 400.000-600.000 g/mol

Izgled: rjavkast prašek brez vonja in okusa

Proizvajalec: FMC Biopolymer (ZDA)

- Iota/lambda/kappa prečiščeni karagenani

Tipi III (št. 127H-1222), V (št. 27F-0373) in IV (št. 58-0604)

Očiščeni so bili po postopkih, ki so navedeni v literaturi (35).

Izgled: beli kosmiči

Proizvajalec: Sigma Chemicals (Belgija)

HPMC (HPMC K100 PREMIUM LV; št: UA8687)

Kemijsko: 2-hidroksipropilmetilcelulozni eter

Izgled: bel ali kremno bel prašek brez vonja in okusa

Molska masa: 10.000-1.500.000 g/mol (15)

Proizvajalec: Colorcon (ZDA)

### NATRIJEV LAVRILSULFAT

Kemijsko: natrijev dodecilsulfat (SDS)

Formula:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$

Molska masa: 288,4 g/mol

Izgled: bel fin prašek (močno draži sluznice)

Dobavitelj: Merck (Nemčija)

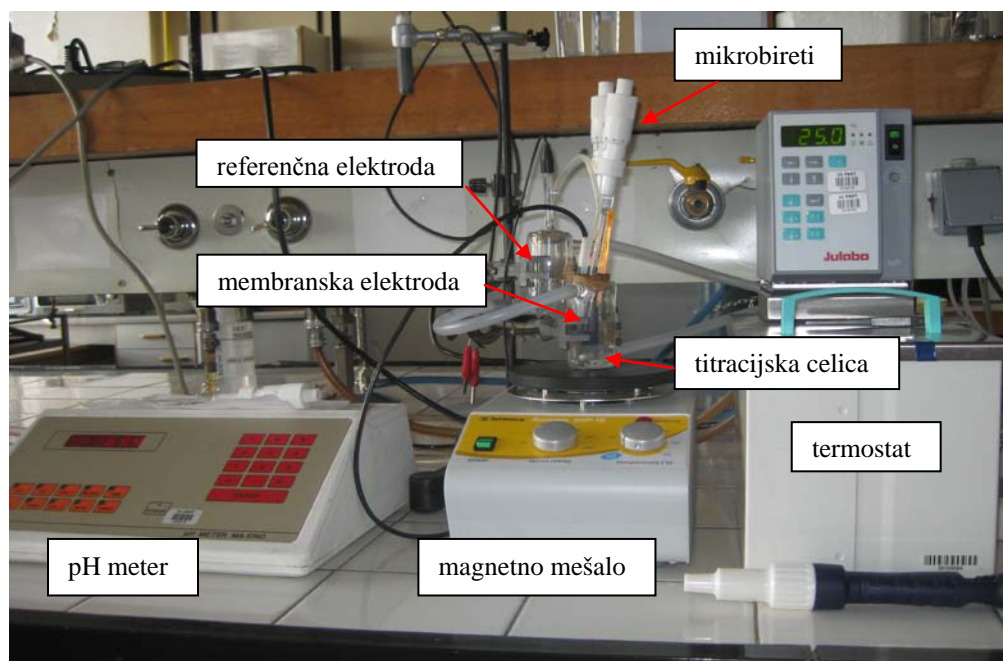
### *3.1.2. OSTALE UPORABLJENE SNOVI*

- Prečiščena voda
- 3-krat destilirana voda
- Natrijev klorid; NaCl (Lex, Slovenija)

- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid;  $\text{NaOH}$  (Merck, Nemčija)

### 3.2. NAPRAVE

- precizna tehtnica: AG 245, Mettler Toledo (Švica)
- napravi za merjenje pH raztopin in električne napetosti:
  - pH METER, Mettler Toledo MA235 (Švica)
  - pH meter ISKRA (slika 11) tipa MA 5740 (Slovenija)
- spektrofotometer: HP 8453, UV-Visible spectroscopy system, Hewlett Packard (Nemčija)
- naprava za določanje potenciala zeta: Zetasizer nano-ZS; Malvern Instrument (Velika Britanija)
- naprava za merjenje dinamičnega sipanja svetlobe: 3D-DLS-SLS spektrometer, LS Instruments (Švica)



Slika 11: Naprave za izvedbo potenciometričnih meritev: pH meter ISKRA tipa MA 5740, magnetno mešalo, titracijska celica z mikrobiretama, membranska in referenčna elektroda, termostat.



### 3.3. POTENCIOMETRIČNE MERITVE

Potenciometrične metode temeljijo na merjenju razlike med potencialom indikatorske elektrode in referenčne elektrode (36). Sestavimo galvanski člen iz dveh elektrod: indikatorske, katere potencial se spreminja z množino (koncentracijo) dodanega iona, na katerega je elektroda reverzibilna, in referenčne, katere potencial je stalen. Vsaka od elektrod je potopljena v ustrezno raztopino, raztopini pa povezuje elektrolitski ključ, ki omogoča električni stik med raztopinama. Pri našem delu smo merili aktivnost doksazosinijevega kationa ( $D^+$ ) v raztopinah z različnimi koncentracijami učinkovine. Potential membranske ionoselektivne elektrode (indikatorska) je sorazmeren logaritmu aktivnosti doksazosinijevega kationa ( $D^+$ ).

Velja Nernstova enačba:

$$E_{\text{ind}} = E^{\circ}_{\text{ind}} + \left( \frac{RT}{zF} \right) \ln(a_{D^+}) \quad \text{/enačba 1/}$$

V enačbi 1 je  $E^{\circ}_{\text{ind}}$  standardni elektrodni potencial indikatorske elektrode,  $R$  splošna plinska konstanta ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  temperatura v K,  $F$  Faradayeva konstanta ( $96485 \text{ As mol}^{-1}$ ),  $z$  število izmenjanih elektronov in  $a_{D^+}$  aktivnost kationov  $D^+$ , ki je sorazmerna njihovi koncentraciji  $c_{D^+}$ :  $a_{D^+} = \gamma_{D^+} c_{D^+}$ , kjer je  $\gamma_{D^+}$  aktivnostni koeficient kationov  $D^+$ . Za razredčene raztopine učinkovine lahko predpostavimo, da je  $\gamma_{D^+} \approx 1$ . Tako je aktivnost približno enaka koncentraciji:  $a_{D^+} \approx c_{D^+}$ .

Če obravnavamo doksazosinijeve katione kot enovalentne ( $z = 1$ ), lahko Nernstovo enačbo zapišemo kot:

$$E_{\text{ind}} = E^{\circ}_{\text{ind}} + \left( \frac{2,303RT}{F} \right) \log(c_{D^+}) \quad \text{/enačba 2/}$$

Napetost galvanskega člena,  $E$ , je definirana kot razlika med potencialoma katode in anode. Če je katoda indikatorska in anoda referenčna elektroda, lahko zapišemo:

$$E = E_{\text{ind}} - E_{\text{ref}} = E_{\text{ind}}^{\circ} + \left( \frac{RT}{F} \right) \ln(c_{\text{D}^+}) - E_{\text{ref}} \quad \text{/enačba 3/}$$

kjer sta  $E_{\text{ind}}$  in  $E_{\text{ref}}$  potenciala indikatorske in referenčne elektrode. Če za konstantne prispevke  $E_{\text{ind}}^{\circ} - E_{\text{ref}}$  pišemo  $E'$ , dobimo za napetost galvanskega člena:

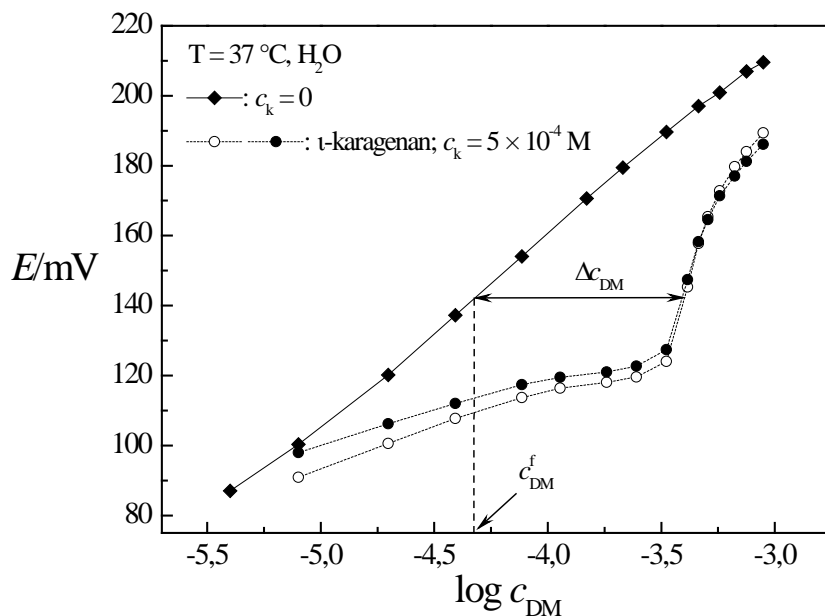
$$E = E' + \left( \frac{2.303RT}{F} \right) \log(c_{\text{D}^+}) \quad \text{/enačba 4/}$$

Enačba 4 napove, da je  $E$  linearna funkcija  $\log(c_{\text{D}^+})$ . Pri 25 °C je številčna vrednost konstant  $2,303RT/F$ , ki določa teoretično strmino odvisnosti  $E$  od  $\log(c_{\text{D}^+})$ , enaka 0,0592 V, pri 37 °C pa 0,0615 V. Linearna odvisnost  $E$  od  $\log(c_{\text{D}^+})$  je potrjena tudi eksperimentalno za dovolj nizke koncentracije  $\text{D}^+$  v raztopini, ko je  $\text{D}^+$  raztopljen v obliki posameznih molekul. Ko se koncentracija  $\text{D}^+$  bliža meji topnosti v danem mediju, pa pride do odstopanj od linearne zveze, ker se v raztopini verjetno pričnejo tvoriti agregati večih molekul DM. Elektroda se namreč odziva le na proste, to je monomerne, ione  $\text{D}^+$  in ne na ione v agregatih.

Na podlagi potenciometričnih meritev lahko narišemo diagram, ki podaja napetost galvanskega člena z membransko in referenčno elektrodo v odvisnosti od logaritma celotne koncentracije DM v titracijski celici. Primer takšnega diagrama je prikazan na sliki 12. Potek napetosti v odvisnosti od  $\log c_{\text{DM}}$  v raztopini same učinkovine, torej brez dodanega karagenana ( $c_{\text{k}} = 0$ ), predstavlja umeritveno krivuljo, ki je linearna funkcija logaritma koncentracije v širokem koncentracijskem območju (enačba 4).

V raztopinah, kjer je prisoten tudi karagenan, pa pride do vezave učinkovine na polisaharid, pri čemer je koncentracija prostega doksazosina ( $c_{\text{DM}}^{\text{f}}$ ) v raztopini majhna. Membranska ionoselektivna elektroda zaznava le proste ione učinkovine, zato izmerjena potenciometrična krivulja v prisotnosti polisaharida odstopa od umeritvene. Merilo za koncentracijo prostih  $\text{D}^+$

je izmerjena napetost  $E$ :  $c_{DM}^f$  odčitamo iz umeritvene krivulje pri enaki vrednosti  $E$ , kot smo jo izmerili v raztopini (slika 12). Razlika med krivuljo ob prisotnosti karagenana in umeritveno krivuljo nam torej da informacijo o množini vezanega DM. Na sliki 12 je množina vezanega DM označena kot  $\Delta c_{DM}$ .



Slika 12: Primer odvisnosti napetosti,  $E$ , galvanskega člena od logaritma koncentracije DM; umeritvena krivulja ( $\blacklozen$ ), kjer karagenan ni prisoten ( $c_k = 0$ ), in meritev za prečiščen ( $\circ$ ) ter neprečiščen ( $\bullet$ )  $\iota$ -karagenan s koncentracijo  $5 \times 10^{-4}$  M v vodi pri  $T = 37$  °C. Oznaka  $c_k$  označuje koncentracijo karagenana,  $c_{DM}^f$  koncentracijo prostega DM in  $\Delta c_{DM}$  koncentracijo vezanega DM.

### 3.3.1. DOLOČITEV STOPNJE VEZANJA $\beta$

Stopnja vezanja,  $\beta$ , doksazosina na polimer je definirana kot množina učinkovine (v molih), ki se veže na en mol monomernih enot karagenana (37). Če upoštevamo, da je membrana občutljiva le na prost doksazosin in vezanega ne zazna, ter da je aktivnostni koeficient prostega DM v območju meritev stalen, lahko stopnjo vezanja  $\beta$  izračunamo iz zveze:

$$\beta = \Delta c_{DM} / c_k = (c_{DM}^{\text{tot}} - c_{DM}^f) / c_k \quad \text{/enačba 5/}$$

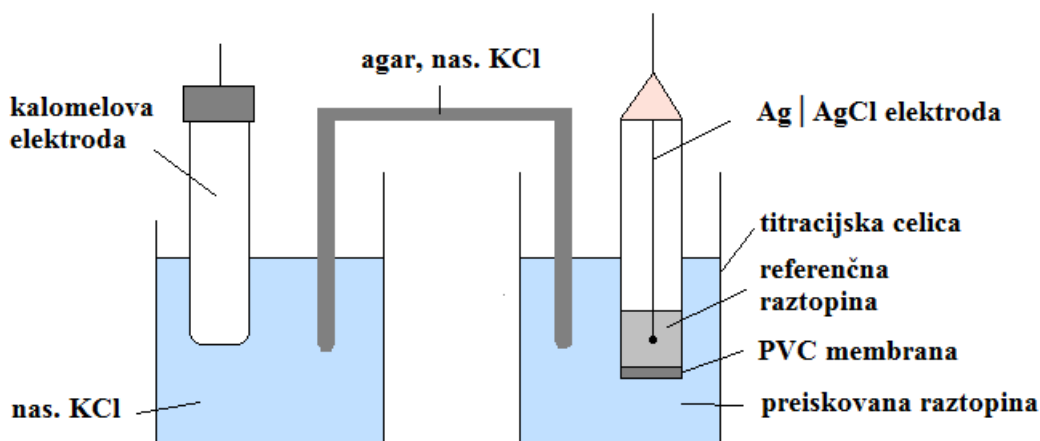
kjer je  $c_{DM}^{tot}$  celotna koncentracija učinkovine v raztopini in  $c_{DM}^f$  koncentracija proste učinkovine, ki jo določimo z merjenjem napetosti galvanskega člena, kot smo opisali prej. V enačbi 5 je  $c_k$  koncentracija karagenana, izražena v nabojih na monomernih enotah na volumen raztopine. V skladu s to definicijo predstavlja  $\beta$  delež vseh negativnih nabojev na karagenanu, ki so zasedeni z učinkovino. Na podlagi dobljenih eksperimentalnih podatkov lahko narišemo izoterme vezanja, ki so opisane v poglavju 1.5.

### 3.3.2. GALVANSKI ČLEN

Galvanski člen, ki smo ga uporabljali pri našem delu, lahko shematsko zapišemo na sledeč način:

kalomelova elektroda | agar, nasičena raztopina KCl | preiskovana raztopina | PVC membrana | referenčna raztopina | AgCl | Ag

Napetost smo merili s pH metrom ISKRA tipa MA 5740. Meritve smo izvedli pri temperaturah 25 °C in 37 °C. Postavitev aparature (pH metra in termostata) ter galvanskega člena kaže slika 11, shematsko pa je galvanski člen prikazan na sliki 13.

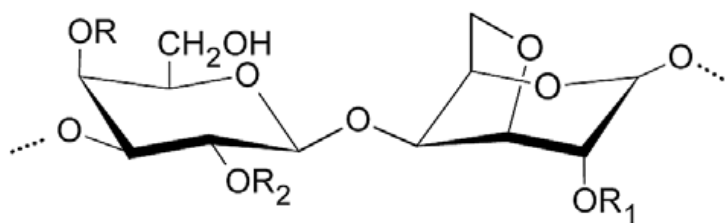


Slika 13: Shema galvanskega člena.

Za določanje odvisnosti napetosti od koncentracije DM smo uporabili titracijsko tehniko. Z njo smo najprej izmerili napetost,  $E$ , v odvisnosti od koncentracije učinkovine ( $c_{DM}^{tot}$ ) v raztopinah brez dodatka karagenana. Ta meritev je predstavljala umeritveno premico. Nato smo določili še ustrezno krivuljo v raztopinah z dodatkom karagenana.

V celico smo odmerili 10 ml 3-krat destilirane vode in ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu s pomočjo mikrobirete dodajali majhne volumne vodne raztopine DM s koncentracijo 0,004 mol/L. Ob vsakokratnem dodatku smo izmerili napetost med elektrodama, ki je po nekaj minutah dosegla konstantno vrednost. Poskuse smo izvajali pri temperaturah 25 °C in 37 °C. Tako smo dobili umeritveni premici  $E$  v odvisnosti od  $\log c_{DM}$  v vodi pri obeh temperaturah. Postopek določanja umeritvene premice v fosfatnem pufri in v raztopini NaCl je bil podoben, le da smo na začetku v titracijsko celico namesto destilirane vode dali 10 ml pufra oziroma raztopine NaCl.

Za določanje vezanja DM na karagenan smo v titracijsko celico odpipetirali 10 ml vodne raztopine karagenana koncentracije  $5 \times 10^{-4}$  molov nabojev na ponavljajočo se disaharidno enoto na liter. Tako izraženo koncentracijo smo označili kot monomol/L. Monomolarne koncentracije smo izračunali na osnovi idealiziranih struktur karagenanov (slika 14) in upoštevali, da ima, kot smo že navedli, v idealnem primeru v raztopini  $\kappa$ -karagenan en elementarni naboj na ponavljajočo se disaharidno enoto,  $\iota$ -karagenan dva in  $\lambda$ -karagenan tri elementarne naboje.



Slika 14: Idealizirana struktura disaharidne enote karagenanov:  $\kappa$ -karagenan:  $R = SO_3^-$ ;  $R_1, R_2 = H$ ;  $\iota$ -karagenan:  $R, R_1 = SO_3^-$ ;  $R_2 = H$ ;  $\lambda$ -karagenan:  $R, R_1, R_2 = SO_3^-$ .

Z mikrobireto smo nato raztopini karagenana tako kot v prejšnjem primeru v titracijsko celico dodajali majhne volumne 0,004 M raztopine DM. Ob vsakokratnem dodatku DM smo dodali še enak volumen raztopine karagenana z dvakrat višjo koncentracijo kot je bila koncentracija karagenana v titracijski celici. Tako je ostala koncentracija raztopine karagenana v celici med merjenjem ves čas konstantna, dodatki DM niso povzročili njene razredčitve. Po vsakem takem dodatku smo izmerili napetost med kalomelsko in membransko elektrodo.

Pri meritvah vezanja DM na karagenane ob prisotnosti HPMC smo v titracijsko celico namesto 10 ml raztopine karagenana dali 10 ml raztopine karagenana in HPMC v masnem razmerju 1:1. Koncentracijo karagenana v titracijski celici smo ohranili nespremenjeno, torej  $5 \times 10^{-4}$  monomol/L. Pri pripravi raztopine karagenana in HPMC smo natehtani količini karagenana dodali enako količino HPMC in nato dodali 3-krat destilirano vodo do ustrezne koncentracije polimera. Ob vsakokratnem dodatku DM v titracijsko celico smo hkrati dodali raztopino karagenana in HPMC v masnem razmerju 1:1, vendar je ta imela dvakrat večjo koncentracijo kot raztopina v titracijski celici. S tem smo tako kot pri prejšnjih meritvah preprečili razredčenje raztopine polimera v titracijski celici ob dodatku DM.

### 3.3.3. PRIPRAVA IONOSELEKTIVNE MEMBRANSKE ELEKTRODE

#### 3.3.3.1. Priprava nosilnega kompleksa

Nosilni kompleks za membrano smo pripravili iz kationske učinkovine (DM) in anionske PAS natrijevega dodecilsulfata, SDS (ang. *sodium dodecyl sulfat*). Ločeno smo pripravili 0,004 M vodno raztopino DM in 0,4 M vodno raztopino SDS. Po 30 min mešanja obeh raztopin na magnetnem mešalu smo 0,5 mL raztopine SDS počasi po kapljicah dodali v 50 ml raztopine DM, s čimer je bilo množinsko razmerje SDS in DM enako ena. Pri tem se je oboril bel netopen kompleks  $D^+ \cdot DS^-$  med kationom učinkovine ( $D^+$ ) in anionom natrijevega dodecilsulfata ( $SD^-$ ). Kompleks smo na nuči sprali z vodo, ki smo jo odstranjevali s pomočjo vakuumske črpalke, in ga posušili v vakuumskem sušilniku pri 50-60 °C.

### 3.3.3.2. Priprava membrane

Membrano, reverzibilno na DM, smo pripravili iz 23 ut. % polivinil klorida (PVC), 76 ut.% dioktil ftalata (DOP) in 1,3 ut.% nosilnega kompleksa  $D^+-DS^-$  (38). Najprej smo nosilni kompleks raztopili v 5mL tetrahidrofurana (THF), nekoliko pogreli in mešali, dokler ni nastala bistra raztopina. Nato smo dodali PVC in raztopino ponovno pogreli. Na koncu smo dodali še DOP, ki ima vlogo plastifikatorja. Nastalo viskozno raztopino smo vlili v petrijevko premera 5 cm in pustili stati v digestoriju, dokler tetrahidrofuran ni odparel in je na dnu petrijevke ostala tanka, trdna plast membrane, debela približno 1 mm (slika 15).

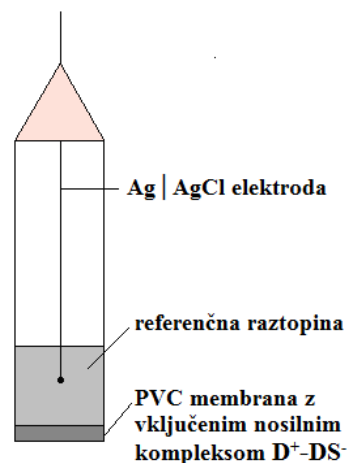


Slika 15: Petrijevka z membrano s kompleksom  $D^+-DS^-$  po odparevanju THF.

### 3.3.3.3. Izdelava elektrode

S pomočjo goste raztopine PVC v THF, s katero smo prevlekli spodnji rob predhodno očiščene plastične cevke z notranjim premerom 1 cm, smo cevko prilepili na membrano v petrijevki (sliki 15 in 16). Pripravili smo referenčno raztopino (to je bila  $1 \times 10^{-4}$  M raztopina DM v 0,01 M NaCl) in jo napolnili v cevko. Drugi konec cevke, ki je opremljen z navojem, smo zaprli s plastičnim pokrovčkom, skozi katerega je v referenčno raztopino segala  $Ag | AgCl$  elektroda. Elektrodo z referenčno raztopino smo pred prvo uporabo pustili nekaj

časa stati, da se je membrana z notranje strani dobro omočila. Kot referenčno elektrodo smo uporabili nasičeno kalomelovo elektrodo.



Slika 16: Membranska ionoselektivna elektroda.

### 3.4. DIALIZNA METODA

#### 3.4.1. PRIPRAVA FOSFATNIH PUFROV

- Priprava fosfatnega pufru s pH 7,0

Fosfatni pufer s pH 7,0, ki smo ga uporabljali pri meritvah, smo pripravili tako, da smo 1,17 g  $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$  natehtali v 1000 ml bučko, dodali 980 ml prečiščene vode in z 1M NaOH uravnali pH na  $7,0 \pm 0,05$ . Nato smo bučko dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.

- Priprava fosfatnega pufru s pH 4,5

Fosfatnega pufru s pH 4,5 pri dializni metodi sicer nismo uporabljali, smo ga pa pripravili za poskuse merjenja zeta-potenciala (poglavje 4.3.). 15,60 g  $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$  smo natehtali v 1000 ml bučko in dodali 980 ml prečiščene vode. Z 1M NaOH ali 1M HCl smo pH uravnali na  $4,5 \pm 0,05$ . Nato smo dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in ponovno preverili pH.



### 3.4.2. IZDELAVA UMERITVENIH PREMICE Z METODO UV-VIS

Koncentracijo raztopljenega doksazosina pri določanju nasičene topnosti in pri dializnih poskusih smo določili z UV-VIS spektrofotometrijo. Naredili smo umeritvene premice za doksazosin v sledečih medijih:

- v prečiščeni vodi
- v fosfatnem pufru s pH 7,0
- v raztopini NaCl (2 g/L)

Pripravili smo osnovno raztopino, pri čemer smo zatehtali  $24,18 \pm 0,5$  mg DM v 100 ml bučko in dopolnili do oznake z metanolom, ki smo ga uporabili kot topilo za osnovno raztopino. Z redčenjem osnovne raztopine smo pripravili standarde znanih koncentracij. Pri tem smo koncentracije standardov enakomerno porazdelili po območju, kjer spektrofotometer daje najbolj zanesljive rezultate (absorbanca je bila med 0,1 in 1,2). Kot topilo za redčenje smo uporabili prečiščeno vodo, pufer oziroma raztopino NaCl.

Redčitve so bile (ml/ml):

- 6,0/100 ( $c_{DM} = 0,012$  mg/ml)
- 5,0/100 ( $c_{DM} = 0,01$  mg/ml)
- 3,0/100 ( $c_{DM} = 0,006$  mg/ml)
- 1,0/100 ( $c_{DM} = 0,002$  mg/ml)
- 1,0/200 ( $c_{DM} = 0,001$  mg/ml)
- 1,0/500 ( $c_{DM} = 0,0004$  mg/ml)

Absorbance pripravljenih raztopin smo merili pri valovni dolžini 247 nm, saj ima pri tej valovni dolžini DM absorpcijski maksimum. V programu UV Visible ChemStation Software 8453 HP smo izračunali umeritveno premico, ki smo jo potrebovali za določanje količine učinkovine v različnih medijih. Koncentracijo učinkovine smo izračunali iz enačbe 6, kjer je  $c$  koncentracija v mg/ml,  $A$  absorbanca in  $k_{up}$  naklon umeritvene premice v mg/ml.

$$c = k_{up} \times A$$

/enačba 6/

### 3.4.3. DOLOČANJE NASIČENE TOPNOSTI UČINKOVINE

Določali smo nasičeno topnost DM v različnih medijih, za katere nismo našli podatka o topnosti v literaturnih virih. V čašo smo zatehtali po 100 mg DM in dodali 20 ml ustreznega topila, čašo pokrili s parafilmom in mešali 20 ur na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi. Suspenzijo smo nato filtrirali skozi filtre RC 0,45  $\mu\text{m}$ , filtrat ustrezno redčili in izmerili absorbance. Po enačbi umeritvenih premic smo nato izračunali koncentracije doksazosina v redčeni raztopini. Te smo pomnožili še s faktorjem redčenja, da smo dobili vrednosti nasičene topnosti.

Nasičeno topnost smo izmerili v naslednjih medijih:

- prečiščena voda
- fosfatni pufer pH 7,0
- raztopina NaCl (2 g/L)

### 3.4.4. IZVEDBA DIALIZNE METODE

Dializo smo izvedli v čašah, ki smo jih napolnili z 1 L raztopine DM različnih koncentracij. Dializne vrečke celuloznega tipa proizvajalca Spectrum z velikostjo por 12.000-14.000 Da smo napolnili z raztopino  $\lambda$ -karagenana koncentracije 0,3 g/L ( $1,5 \times 10^{-3}$  monomol/L) in jih na obeh straneh zaprli s plastičnimi objemkami. Koncentracijo raztopine karagenana smo izbrali glede na poskuse sproščanja DM iz ogrodnih tablet s karagenanom, ki so jih izvedli na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Izdelali so namreč tablete z maso 300 mg, ki so vsebovale 8 mg DM, ostalo pa je predstavljal karagenan. Po razpadu tablet med preskusom sproščanja je bila koncentracija karagenana v mediju za sproščanje približno 0,3 g/L (39). Dializne vrečke smo nato dali v čaše z raztopinami DM in vse skupaj pustili mešati na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi (25 °C). Ioni doksazosina so pri tem prehajali skozi membrano v raztopino karagenana. Ob različnih časovnih intervalih smo merili koncentracije doksazosina v čašah, to je na zunanji strani celulozne membrane.



Slika 17: Dializna metoda: slika prikazuje čaše z raztopinami DM različnih koncentracij. Dializne vrečke v čašah so napolnjene z raztopino  $\lambda$ -karagenana s koncentracijo 0,33 g/L.

Na osnovi enačbe 7 smo izračunali stopnjo vezanja in narisali graf odvisnosti stopnje vezanja od koncentracije prostih ionov doksazosina. V enačbi predstavlja  $n_{\text{DM}}^{\text{tot}}$  množino DM v čaši na začetku,  $n_{\text{DM}}^{\text{f}}$  množino DM v čaši po vzpostavitvi ravnotežja in  $n_{\text{k}}$  množino karagenana v dializni vrečki, izraženo v nabojih na monomerno enoto.

$$\beta = \Delta n_{\text{DM}} / n_{\text{k}} = (n_{\text{DM}}^{\text{tot}} - n_{\text{DM}}^{\text{f}}) / n_{\text{k}} \quad \text{/enačba 7/}$$

### 3.5. MERITVE DINAMIČNEGA SIPANJA SVETLOBE

Pri dinamičnem sipanju svetlobe (ang. *dynamic light scattering*, DLS) merimo nihanja v intenziteti sipane svetlobe, ki nastanejo zaradi naključnega Brownovega gibanja delcev v raztopini. Iz teh meritev lahko določimo difuzijski koeficient delca,  $D$ . Pri meritvah DLS uporabljamo lasersko svetlobo z zelo natančno definirano valovno dolžino. Ko laserska svetloba pade na premikajoče se delce, pride do spremembe valovne dolžine vpadne svetlobe, kar poznamo kot Dopplerjev efekt: frekvenca sipane svetlobe se pomakne k nekoliko večjim ali pa k nekoliko manjšim vrednostim glede na valovno dolžino vpadne svetlobe, odvisno od tega, ali se delec približuje detektorju ali se od njega oddaljuje. To privede do t.i. Dopplerjeve frekvenčne razširitve, iz katere lahko izračunamo difuzijski koeficient delcev. Difuzijski

koeficient pa je za delce kroglaste oblike povezan z njihovo velikostjo preko Stokes-Einsteinove zveze (enačba 8):

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{/enačba 8/}$$

kjer je  $\eta$  viskoznost medija,  $k_B$  Boltzmannova konstanta in  $T$  temperatura. Velikost delca je izražena s hidrodinamskim radijem,  $R_h$ . Ta zveza omogoča izračun hidrodinamskega radija sipalnih struktur iz izmerjenega difuzijskega koeficienta ob predpostavki, da imajo delci okroglo obliko (40).

Za meritve sipanja svetlobe smo uporabljali 3D-DLS-SLS spektrometer firme LS Instruments (41,42). Vir svetlobe je bil helij-neon (HeNe) laser z valovno dolžino  $\lambda = 632,8$  nm (rdča svetloba). Namesto klasičnega načina merjenja sipanja z enim žarkom pri tej napravi vpadni žarek najprej razcepimo na dva žarka, ki ju vhodna planarno konveksna leča fokusira v isto točko v raztopini. Kiveta z raztopino je vstavljena v kopel, ki jo termostatiramo na 25 °C in je napolnjena z dekalinom, ki ima podoben lomni količnik kot steklo. Svetloba se na delcih v raztopini sipa, sipana svetloba (2 žarka) pa nato potuje skozi izhodno konkavno planarno lečo na dva detektorja (foto diodi), kjer se signala ojačata. Ojačana signala potujeta po optičnih vlaknih v korelator, povezan z računalnikom, kjer se izvede križna korelacija med njima. S križno korelacijo žarkov, ki sta se sipala na istem volumskem elementu v vzorcu, iz sipane svetlobe izločimo tako imenovano multiplo ali večkratno sipanje, ki otežuje interpretacijo rezultatov predvsem v primeru motnih vzorcev (40).

Pri DLS eksperimentu običajno izvajamo meritve sipanja pri kotu 90°, rezultat meritev pa je korelacijska funkcija. Osnovna parametra, ki ju želimo določiti, sta korelacijski čas,  $\tau$ , oziroma odgovarjajoči difuzijski koeficient,  $D$ , iz katerega določimo  $R_h$ .

V diplomski nalogi nas je zanimala določitev difuzijskega koeficienta in odgovarjajočega hidrodinamskega radija delcev spodaj navedenih raztopin. Določili smo ju iz izmerjenih korelacijskih funkcij z metodo CONTIN.

Pripravili in analizirali smo sledeče raztopine:

- a) raztopino DM s koncentracijo 0,02 mmol/L in raztopino SDS s koncentracijo 2 mmol/L
- b) raztopino  $\lambda$ -karagenana s koncentracijo  $4,5 \times 10^{-4}$  monomol/L
- c) mešano raztopino  $\lambda$ -karagenana in DM: koncentracija  $\lambda$ -karagenana je bila  $4,5 \times 10^{-4}$  monomol/L in koncentracija DM je bila 0,02 mmol/L. Molsko razmerje med naboji na  $\lambda$ -karagenanu in DM je bilo torej 22,5.
- d) raztopino SDS s koncentracijo 5g/L ali 0,0173 mol/L
- e) raztopine kompleksa med  $\lambda$ -karagenanom in DM (glej c) in dodanega SDS v naslednjih količinah:
  - [SDS] = 5 × [DM]
  - [SDS] = 25 × [DM]
  - [SDS] = 950 × [DM]

Pred merjenjem smo te raztopine filtrirali skozi filtre z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$ . 1,8 ml vodnih raztopin smo dodali 200  $\mu\text{L}$  prefiltrirane 2M vodne raztopine NaCl. Koncentracija NaCl v končnih raztopinah je bila 0,2 mol/L.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. POTENCIOMETRIČNE MERITVE

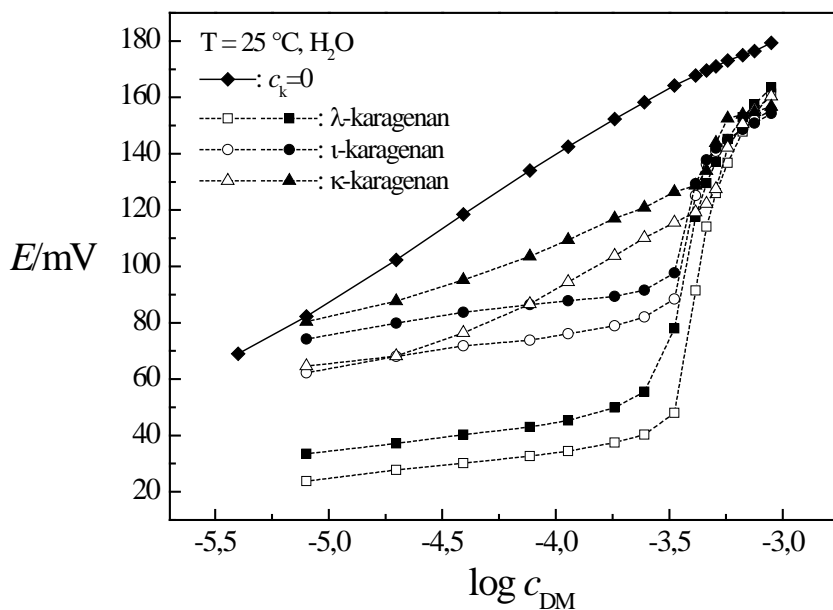
Komplekse med DM in karagenanom so na Katedri za farmacevtsko tehnologijo že proučevali z dinamično diferenčno kalorimetrijo, elektronskim mikroskopom in infrardečo spektroskopijo. Poleg tega so vpliv tvorbe kompleksov na sproščanje DM iz ogrodnih tablet preverjali s poskusi sproščanja učinkovine. Ugotovili so, da se v mediju za sproščanje tvori kompleks med DM in  $\lambda$ -karagenanom, zaradi česar se sprostijo približno 30 % učinkovine. Pri  $\kappa$ -karagenanu je ta delež višji, saj ima izmed vseh karagenanov najmanj sulfatnih skupin, torej najmanjši naboj, kar pomeni, da je možnost kompleksacije z DM manjša (39). Nastanek teh kompleksov smo se odločili podrobneje proučiti s pomočjo potenciometričnih meritev. Potenciometrična metoda je sicer že uveljavljena metoda za proučevanje vezave PAS na različne polimere. Ker pa ima večina ZU podobno kot kationske in anionske PAS v molekuli tako hidrofoben kot polarni del, ki v vodi ionizira, smo prišli do ideje, da bi metodo lahko uporabili tudi za določanje vezave kationa  $D^+$  na karagenane.

#### 4.1.1. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V VODI

##### 4.1.1.1. Jakost in obseg vezave DM na karagenane pri 25 °C

Rezultati potenciometričnih meritev z membransko ionoselektivno elektrodo za  $\lambda$ -,  $\iota$ - in  $\kappa$ -karagenane v vodi pri 25 °C so prikazani na sliki 17. Eksperimentalno določen naklon umeritvene premice pri 25 °C znaša 51,2 mV/dekado, kar je dokaj blizu teoretičnemu naklonu (59,2 mV), ki ga izračunamo iz Nernstove enačbe (enačba 4). Odziv elektrode je linearen v širokem območju od  $c_{DM} \approx 7 \times 10^{-6}$  M do  $c_{DM} \approx 3 \times 10^{-4}$  M. Pri višjih koncentracijah DM se premica prične nekoliko ukrivljati, kar je, kot smo že omenili, lahko posledica asociacije molekul DM in obarjanja učinkovine iz raztopine. Eksperimentalno določena topnost DM v vodi pri 25 °C je  $7 \times 10^{-3}$  M.

Potenciometrične meritve smo izvedli tako s prečiščenimi kot z neprečiščenimi karagenani. Komercialno dostopne karagenane smo uporabili brez predhodnega čiščenja, zato lahko vsebujejo razne nečistote, na primer enostavne soli in tudi druge nizkomolekularne substance, ki pa jih pri postopku čiščenja odstranimo (30). Številne študije so namreč pokazale, da imajo različni kationi velik vpliv na lastnosti karagenanov in na vezanje učinkovine nanje, še posebej pri višjih koncentracijah, zato smo poskuse z namenom primerjave izvedli tudi s prečiščenimi karagenani, ki so vsebovali le eno vrsto protiiona in so bile iz njih odstranjene vse nizkomolekularne v vodi topne snovi. Prečiščeni karagenani, uporabljeni v tem delu, so bili v obliki natrijevih soli. Karagenani so bili očiščeni z dializo. Postopki čiščenja so natančno opisani v literaturi (35).

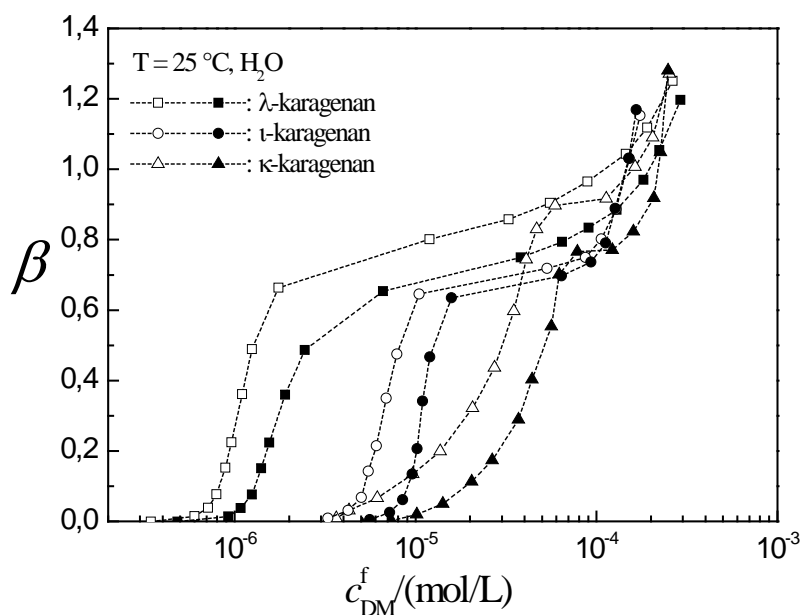


Slika 17: Odvisnost napetosti,  $E$ , galvanskega člena od koncentracije DM v vodi pri  $T = 25\text{ °C}$ : umeritvena krivulja ( $\blacklozen$ ) in meritve za prečiščene (prazni znaki) in neprečiščene (polni znaki)  $\lambda$ - ( $\square/\blacksquare$ ),  $\iota$ - ( $\circ/\bullet$ ) in  $\kappa$ -karagenane ( $\Delta/\blacktriangle$ ).

Iz grafov odvisnosti napetosti od logaritma koncentracije DM (slika 17) vidimo, da se krivulje za prečiščene (prazni znaki) in neprečiščene (polni znaki) karagenane ne ujemajo. V prisotnosti neprečiščenih karagenanov so izoterme pomaknjene k višjim koncentracijam prostega DM v primerjavi z izotermami za prečiščene karagenane, kar nakazuje na manjšo

vezavo, torej višje vrednosti CAC. Prisotnost različnih elektrolitov namreč senči elektrostatski privlak med polielektrolitom in kationi DM in tako vodi do slabšega vezanja DM.

Na sliki 18 so prikazane izoterme vezanja DM na karagenane v vodi pri 25 °C. Izoterme imajo tipično obliko, ki je značilna za kooperativno vezanje ligandov na polielektrolite. Krivulje na sliki 18 kot tudi na sliki 17 kažejo, da je moč interakcije sorazmerna številu nabojev na disaharidno enoto. Pri  $\lambda$ -karagenanu je CAC najnižja (tabela 1, str. 50) in torej vezava najmočnejša. Sledi vezava na  $\iota$ -karagenan, najšibkejša pa je vezava učinkovine na  $\kappa$ -karagenan, ki ima le en negativni naboj na disaharidno enoto.



Slika 18: Izoterme vezanja DM na prečiščene (prazni znaki) in neprečiščene (polni znaki)  $\lambda$ - ( $\square/\blacksquare$ ),  $\iota$ - ( $\circ/\bullet$ ) in  $\kappa$ -karagenane ( $\Delta/\blacktriangle$ ) v vodi pri 25 °C.

S slike 18 je tako tudi razvidno, da se širina platoja zmanjšuje z zmanjševanjem števila sulfatnih skupin in je najširša pri  $\lambda$ -karagenanu ter najožja pri  $\kappa$ -karagenanu. Do ponovnega strmega dviga izoterm na koncu platoja pride pri vseh karagenanih pri podobnih koncentracijah prostih ionov doksazosina ( $c_{DM}^f$ ), to je pri približno  $c_{DM} \approx 1-2 \times 10^{-4}$  M. Strm porast krivulje in rast  $\beta$  do vrednosti 1,4 in več je lahko posledica združevanja oziroma urejevanja DM v različne asociirane strukture brez ali z karagenani. Potrebne bi bile dodatne



metode in poskusi, da bi te strukture lahko določili, na primer s pomočjo ozkokotnega rentgenska sipanja X-žarkov, SAXS (ang. *small-angle X-ray scattering*).

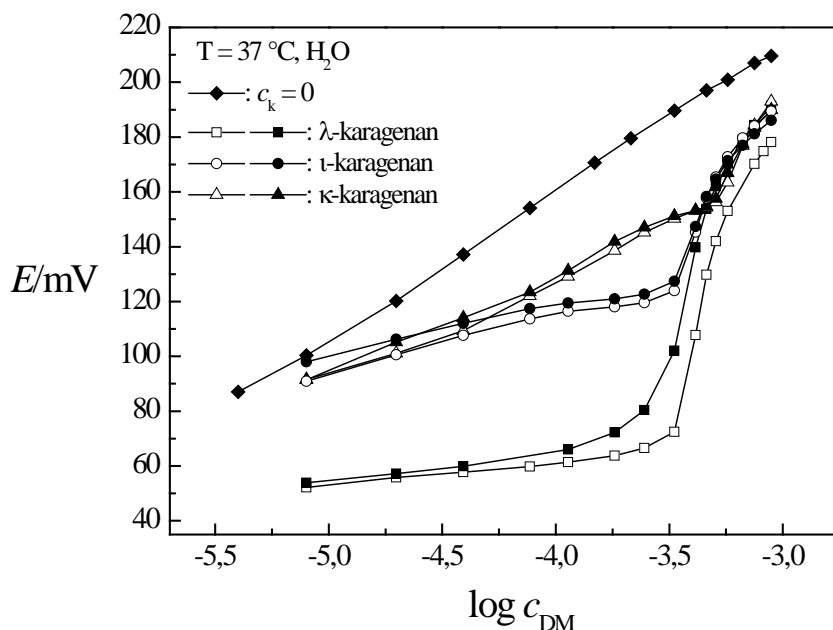
Stopnja vezanja ob nasičenju,  $\beta_{\text{nas}}$ , je pri  $\lambda$ - in  $\iota$ -karagenanu podobna in ima vrednost med 0,6 in 0,8, kar pomeni, da je na vsakih deset negativnih nabojev na karagenanu vezanih 6 do 8 molekul DM. Pri  $\kappa$ -karagenanu je  $\beta_{\text{nas}}$  večji in znaša približno 0,8 za neprečiščen in 0,9 za prečiščen karagenan. Zanimivo je, da  $\beta_{\text{nas}}$  doseže največjo vrednost pri  $\kappa$ -karagenanu, ki ima najmanjšo gostoto naboja. Na podlagi tega lahko sklepamo, da sterična porazdelitev sulfatnih skupin na karagenanih vpliva na vezavo DM oziroma jo lahko ovira. Sterično oviranje je najmanjše pri  $\kappa$ -karagenanu, ki ima le eno sulfatno skupino na disaharidno enoto, zato je v tem primeru pri nasičenju vezane največ učinkovine na negativno nabito skupino.

Opazimo tudi, da sta v primeru  $\kappa$ -karagenana izoterma na začetku nekoliko bolj položni v primerjavi s preostalima karagenanoma. Strmina izoterme je merilo za kooperativnost vezanja. Manj strma izoterma pomeni, da je kooperativnost manjša, kar lahko pripišemo razliki v razdalji med naboji na verigi. Razdalja med naboji je največja pri  $\iota$ -karagenanu, kar pomeni, da je gostota naboja tega polianiona najmanjša. To vodi do šibkejšega privlaka med  $D^+$  in polianionom, do višjih vrednosti za CAC in tudi do manjše strmine izoterme. Krivulji postaneta strmi šele tik pred nasičenjem, kooperativnost vezanja DM na  $\kappa$ -karagenan torej narašča. Predvidevamo, da v tem primeru DM »pomaga« pri medmolekulski asociaciji verig. Ko je DM dovolj, se verige  $\kappa$ -karagenana urejajo druga ob drugi s pomočjo učinkovine (gre za neke vrste geliranje).

#### 4.1.1.2. Jakost in obseg vezave DM na karagenane pri 37 °C

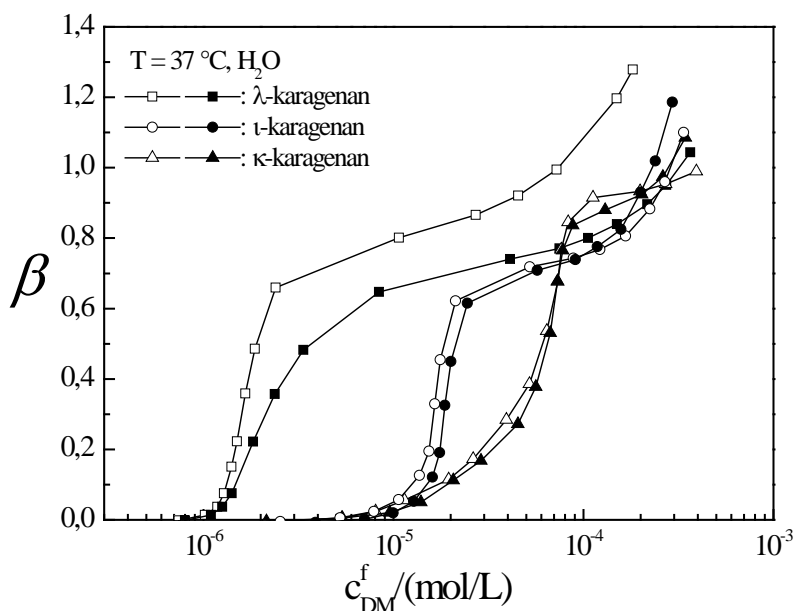
Potenciometrične meritve smo izvedli tudi v vodi pri 37 °C, saj je to temperatura, ki jo vzdržuje človeško telo za pravilno delovanje telesnih funkcij. S tem smo preverili vpliv višje temperature na tvorbo kompleksov med DM in karagenani oziroma na vezanje učinkovine na karagenane. Na sliki 19, ki podaja odvisnost napetosti od logaritma koncentracije DM, vidimo, da je odziv elektrode linearen v širokem območju tudi pri 37 °C in sicer od  $c_{\text{DM}} \approx 4,0 \times 10^{-6}$  M do  $9,2 \times 10^{-4}$  M. Eksperimentalno določen naklon premice pri 37 °C je 54,4 mV/dekado,

teoretični naklon (enačba 4) pri tej temperaturi pa je 61,5 mV. Ujemanje je torej tudi v tem primeru dobro.



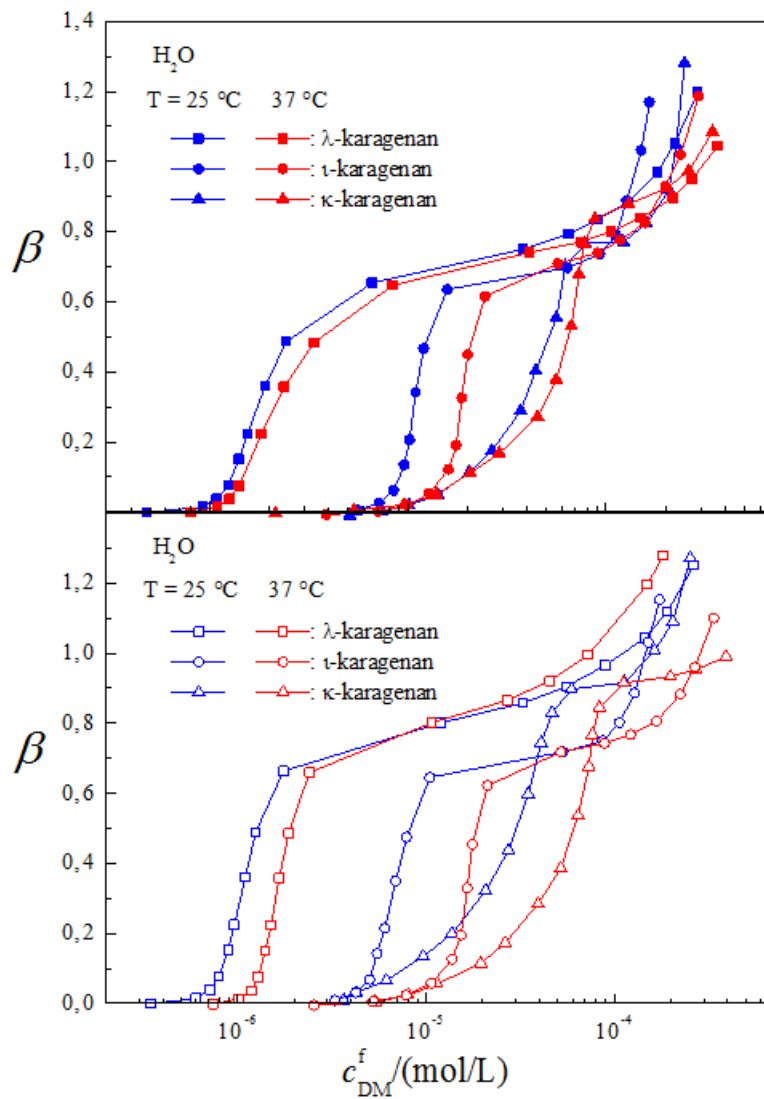
Slika 19: Odvisnost napetosti,  $E$ , galvanskega člena od koncentracije DM v vodi pri  $T = 37\text{ °C}$ : umeritvena krivulja ( $\blacklozen$ ) in meritve za prečiščene (prazni znaki) in neprečiščene (polni znaki)  $\lambda$ - ( $\square/\blacksquare$ ),  $\iota$ - ( $\circ/\bullet$ ) in  $\kappa$ -karagenane ( $\Delta/\blacktriangle$ ).

Rezultati za izračunano stopnjo vezanja so podobni tistim pri  $25\text{ °C}$ . Slika 20 prikazuje izoterme vezanja pri  $37\text{ °C}$  za neprečiščene in prečiščene karagenane. Tudi pri tej temperaturi je vezava DM najmočnejša na  $\lambda$ -karagenanu najmanjša pa na  $\kappa$ -karagenanu, ki ima tako najvišjo CAC (tabela 1, str. 50). Vezava na prečiščene karagenane je znova nekoliko močnejša od vezave na neprečiščene karagenane, vendar pa je v primerjavi z meritvami pri  $25\text{ °C}$  ta razlika manjša in je zlasti pri  $\iota$ - in  $\kappa$ -karagenanu skoraj zanemarljiva.



Slika 20: Izoterme vezanja DM na prečiščene (prazni znaki) in neprečiščene (polni znaki)  $\lambda$ - ( $\square/\blacksquare$ ),  $\iota$ - ( $\circ/\bullet$ ) in  $\kappa$ -karagenane ( $\Delta/\blacktriangle$ ) v vodi pri  $T = 37\text{ °C}$ .

Primerjavo med meritvami pri  $25\text{ °C}$  in  $37\text{ °C}$  prikazuje slika 21, pri čemer so na zgornjem grafu predstavljeni rezultati meritev za neprečiščene, na spodnjem grafu pa za prečiščene karagenane. Pri vseh karagenanih so vrednosti CAC pri  $37\text{ °C}$  višje (tabela 1, str. 50), vezanje je torej šibkejše. Slabše vezanje DM na karagenane pri višji temperaturi lahko razložimo preprosto kot posledico višje termične energije in hitrejšega gibanja ionov.

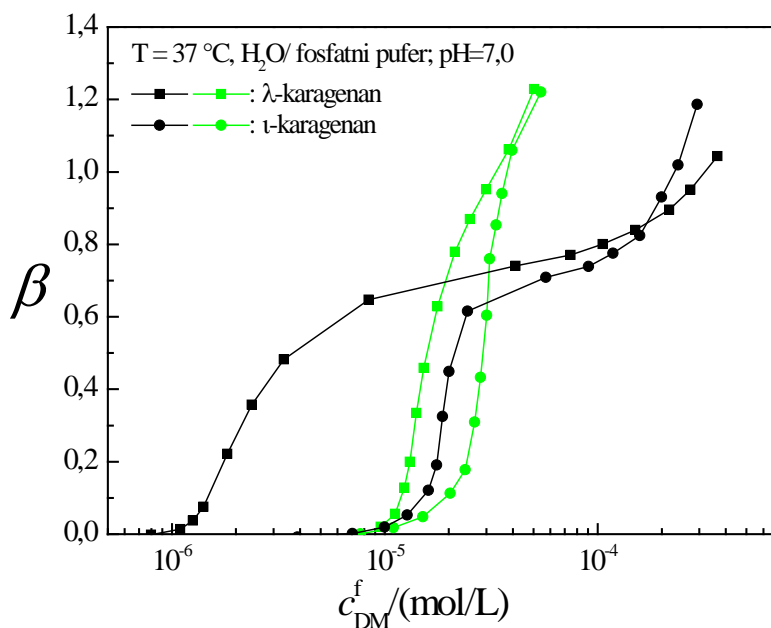


Slika 21: Primerjava izoterm vezanja DM na neprečiščene (zgornja slika) in prečiščene (spodnja slika) karagenane:  $\lambda$ - (■/□),  $\iota$ - (●/○) in  $\kappa$ - (▲/△) vodi pri 25 °C in  $\lambda$ - (■/□),  $\iota$ - (●/○) in  $\kappa$ - (▲/△) v vodi pri 37 °C.

#### 4.1.2. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V FOSFATNEM PUFRU

Določali smo še vezavo DM na neprečiščena  $\lambda$ - in  $\iota$ -karagenana v fosfatnem pufru s pH 7,0 (poglavje 3.4.1.) pri temperaturi 37 °C. Na ta način smo se poskušali čim bolj približati pogojem pri poskusih raztapljanja in tvorbi kompleksov v različnih medijih za sproščanje (39). Meritev s  $\kappa$ -karagenanom zaradi slabše vezave DM nanj nismo izvedli.

Eksperimentalno določena topnost DM v fosfatnem pufru je zelo majhna. Koncentracijo nasičene raztopine DM v pufru smo določili pri temperaturi 25 °C in znaša 0,004 M. Pri potenciometričnih meritvah v vodi smo titracije vedno izvajali z 0,004 M vodno raztopino DM. Pri poskusu titracije z 0,004 M raztopino DM v fosfatnem pufru s pH 7,0 se je titracijska raztopina v bireti kmalu pričela obarjati, zato smo kot titracijsko raztopino za meritve uporabljali kar raztopino DM v vodi. V prečiščeni vodi je bila izmerjena nasičena topnost namreč nekoliko višja in je znašala 0,007 M. Zaradi titracije raztopine karagenana v pufru z vodno raztopino DM je pH raztopine v titracijski celici po koncu meritev padel iz začetne vrednosti 7,0 na vrednost 6,5.



Slika 22: Izoterme vezanja DM na neprečiščena  $\lambda$ - (■) in  $\iota$ -karagenana (●) v vodi in  $\lambda$ - (■) in  $\iota$ -karagenana (●) v fosfatnem pufru pri 37 °C.

Na sliki 22 so prikazane izoterme vezanja pri 37 °C v vodi in v fosfatnem pufru za  $\lambda$ - in  $\iota$ -karagenan. Takoj je razvidno, da vezava DM v prisotnosti ionov iz fosfatnega pufru poteka precej drugače. V pufru se vezava pri obeh karagenanih prične pri višjih koncentracijah prostih ionov doksazosina (višje CAC), kar je posledica že omenjenega vpliva ionov v pufru na senčenje elektrostatskega privlaka. Pri meritvah v pufru se poleg tega spremeni oblika izoterme. Le-ta nima več izrazitega platoja, vezanje (asociacija) pa se nadaljuje preko točke nevtralizacije naboja ( $\beta \geq 1$ ), kar je lahko znak nastanka večjih medmolekulskih asociacij. Hkrati večja ionska jakost raztopine vodi do samoasociacije ionov  $D^+$  pri nižjih koncentracijah in zato se lahko plato in porast  $\beta$  nad njim zblížata in zato krivulja nima več izrazitega platoja.

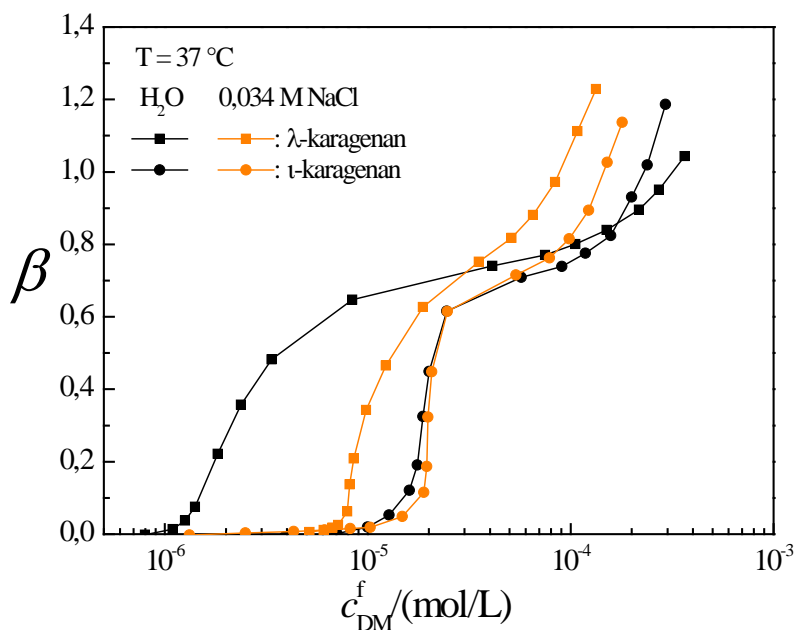
Čeprav je CAC za vezanje DM na karagenane v pufru večja kot v vodi (kooperativno vezanje se torej pomakne k višjim koncentracijam), pa do kompleksacije vseeno pride in bi jo bilo nujno potrebno nadalje ovrednotiti, to je proučiti stabilnost kompleksov v primeru posnemanja fizioloških pogojev. Hkrati je iz krivulj opazno, da se razlika med vezavo DM na  $\lambda$ - in  $\iota$ -karagenan v fosfatnem pufru opazno zmanjša, kar pomeni, da bo tudi razlika v dostavi učinkovine iz ogrodnih tablet z  $\lambda$ - in  $\iota$ -karagenanom najverjetneje v fizioloških pogojih manjša.

#### 4.1.3. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V VODNI RAZTOPINI NATRIJEVEGA KLORIDA

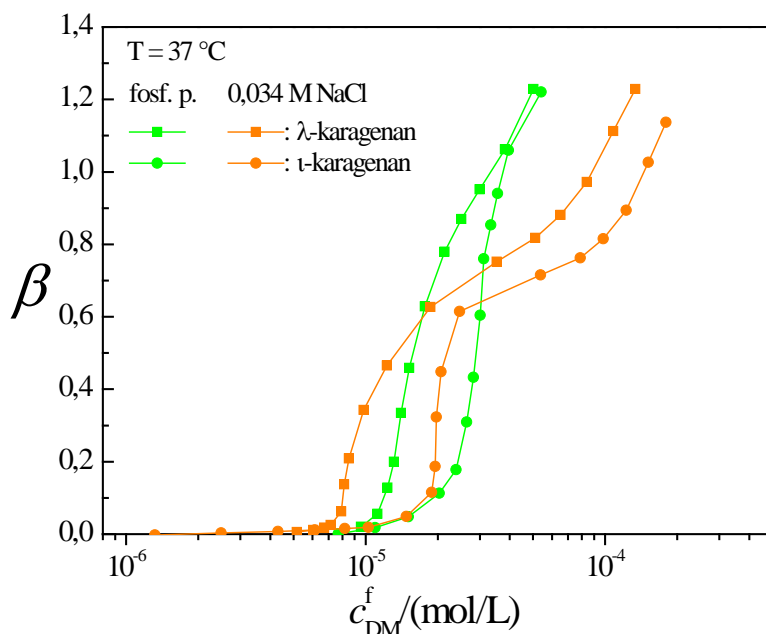
V prebavnem traktu se ionska moč spreminja nekje v območju od 0,01 M do 0,2 M in lahko povzroči spremembe v biološki razpoložljivosti dostavnih sistemov s hidrofilnim ogrođjem (43). Vpliv ionske moči na sproščanje v *in vitro* pogojih se pri preskusih sproščanja iz tablet ponavadi simulira tako, da se mediju za sproščanje doda NaCl v določeni koncentraciji (npr. 2g/L ali 0,034 M). Pri različnih osebah se ionska moč v prebavnem traktu razlikuje, zato je cilj proizvajalcev peroralnih FO, da bi razlike v ionski moči čim manj vplivale na hitrost in obseg sproščanja. Zaradi navedenega smo želeli preveriti tudi, kako prisotnost NaCl vpliva na tvorbo kompleksov med DM in karagenani. Vsi trije karagenani naj bi imeli v raztopini NaCl konformacijo naključnega klopčiča (44,45).

V 0,034 M NaCl je topnost DM zelo slaba. Določili smo, da je koncentracija nasičene raztopine pri 25 °C enaka 0,0009 mol/L. Zato smo tudi v tem primeru pri titraciji uporabili vodno raztopino DM brez dodatka elektrolita. Koncentracija NaCl se je tako do konca titracije zmanjšala iz 0,034 mol/L na 0,024 mol/L.

Izvedli smo potenciometrične meritve z neprečiščenima  $\lambda$ - in  $\iota$ -karagenanoma pri 37 °C. Na slikah 23 in 24 vidimo, da je vpliv NaCl na vezavo DM podoben vplivu fosfatnega pufru s pH 7,0, saj povzroči premik krivulj v desno ali višje CAC. Premik izoterme v primerjavi z izotermo v vodi lahko znova razložimo kot posledico večje ionske moči vodne raztopine NaCl (0,034 mol/L). Fosfatni pufer ima v primerjavi z raztopino NaCl sicer manjšo ionsko moč (0,018 mol/L), vendar povzroči večji premik CAC v primerjavi z meritvami v vodi kot jih povzroči prisotnost NaCl (tabela 1, str. 50). Poleg tega pride pri meritvah v pufru do večje spremembe v obliki izoterme glede na vodo in je zato v primerjavi z meritvami v 0,034 M NaCl tudi  $\beta_{\text{nas}}$  težje določljiva. Obnašanje karagenanov v raztopinah in s tem tudi vezava DM na karagenane je močno odvisna ne le od ionske moči medija, ampak tudi od valence ter celo vrste prisotnih ionov, ki so v primeru fosfatnega pufru drugačni.



Slika 23: Izoterme vezanja DM na neprečiščena  $\lambda$ - (■) in  $\iota$ -karagenana (●) v vodi in  $\lambda$ - (▣) in  $\iota$ -karagenana (◐) v 0,034 M vodni raztopini NaCl pri 37 °C.



Slika 24: Izoterme vezanja DM na neprečiščena karagenana:  $\lambda$ - (■) in  $t$ -karagenana (●) v pufru in  $\lambda$ - (■) in  $t$ -karagenana (●) v 0,034 M vodni raztopini NaCl pri 37 °C.

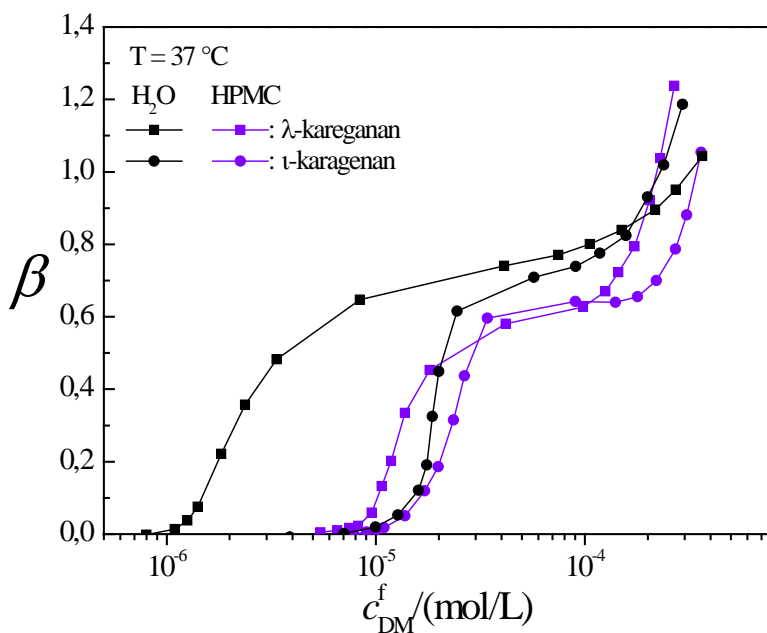
#### 4.1.4. INTERAKCIJE MED KARAGENANI IN DM V VODI OB PRISOTNOSTI HIDROKSIPROPILMETILCELULOZE (HPMC)

Zaradi obetavnosti kombinacij HPMC in karagenanov v hidrofilnih ogrodnih tabletah, kjer lahko z ustreznim razmerjem med obema polimeroma dosežemo linearen profil sproščanja učinkovine in neodvisnost od pH okoljskega medija (47), smo želeli preveriti, kakšen vpliv bi imela prisotnost HPMC na tvorbo kompleksov med DM in karagenani. Meritve smo izvedli v vodi brez dodanega elektrolita pri 37 °C (poglavje 3.4.3.). Izoterme vezanja za ta primer so podane na sliki 25.

HPMC kot nenabit derivat celuloze povzroči premik izoterm vezanja k višjim vrednostim proste koncentracije DM enako kot NaCl in elektroliti v fosfatnem pufru, kar je nekoliko presenetljivo (slika 25). Sklepamo lahko, da HPMC ovira dostopnost vezavnih mest na karagenanu in tako zmanjša obseg vezanja in tvorbe kompleksov med DM in karagenani.



Predvsem je razlika med vezavo brez in ob prisotnosti HPMC velika pri  $\lambda$ -karagenanu. Iz slike 25 vidimo, da se močno (za skoraj en velikostni razred) zviša CAC, če je v raztopini prisotna HPMC. Tudi vrednost  $\beta_{\text{nas}}$  se pri  $\lambda$ -karagenanu ob prisotnosti HPMC precej zniža (iz približno 0,8 na 0,6), kar potrjuje, da HPMC najbrž sterično ovira približevanje nasprotno nabitih ionov DM k verigam karagenanov in je končno zasedenje mest na polisaharidu manjše.



Slika 25: Izoterme vezanja DM na neprečiščena  $\lambda$ - (■) in  $\iota$ -karagenana (●) v vodi in  $\lambda$ - (■) in  $\iota$ -karagenana (●) ob dodatku HPMC raztopini karagenana v vodi pri 37 °C.

Tabela 1: Kritične koncentracije agregacije, CAC, v raznih raztopinah  $\lambda$ -,  $\iota$ - in  $\kappa$ -karagenanov in DM pri temperaturah 25 °C in 37 °C.

	medij	T/°C	$10^6 \times \text{CAC}/(\text{mol/L})$	
			neprečiščen karagenan	prečiščen karagenan
$\lambda$ -karagenan	voda	25	1,1	0,8
	voda	37	1,2	1,0
	pufer <sup>a</sup>	37	12	/
	NaCl <sup>b</sup>	37	6,5	/
	HPMC <sup>c</sup>	37	7,9	/
$\iota$ -karagenan	voda	25	9,1	4,8
	voda	37	16	14
	pufer	37	26	/
	NaCl	37	15	/
	HPMC <sup>c</sup>	37	17	/
$\kappa$ -karagenan	voda	25	39	17
	voda	37	39	34

<sup>a</sup>fosfatni pufer: pH 7,0

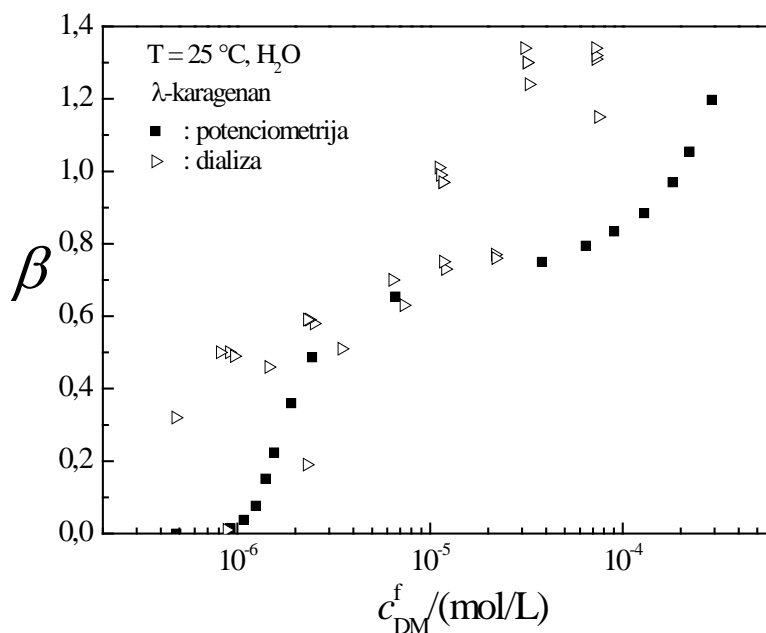
<sup>b</sup>NaCl: c = 0,034 M

<sup>c</sup>dodatek HPMC (topilo je voda)

#### 4.2. PRIMERJAVA REZULTATOV POTENCIOMETRIČNIH MERITEV Z DIALIZNO METODO

Nekatere stopnje vezanja smo določili tudi z dializno metodo. Slika 26 prikazuje primerjavo med rezultati, ki smo jih dobili z dializno metodo in rezultati potenciometričnih meritev. Dializna metoda se je po pričakovanjih izkazala za manj primerno za določevanje vezave DM na karagenane, saj je manj občutljiva in ima slabšo ponovljivost. Slabost dializne metode je tudi v tem, da je dolgotrajna, saj se mora vzpostaviti ravnotežje med raztopinama na obeh straneh membrane. Rezultati dializne metode so pokazali, da se med DM in  $\lambda$ -karagenanom ravnotežje vzpostavi po približno 24 urah, kar je enako kot v študijah Caram-Lelhama in Sundelöfa, ki sta proučevala vezavo amitripitilina na  $\lambda$ -karagenan (29). Podobno rezultati dializne metode (slika 26) precej sipajo in bi skozi izmerjene točke težko narisali izotermo vezanja. Sipanje rezultatov opazimo tudi pri omenjeni študiji Caram-Lelhama in Sundelöfa. Potrebni bi tako bilo veliko število meritev in veliko časa, da bi s to metodo prišli do bolj zanesljivih rezultatov. Omeniti velja, da vsaka točka na sliki 26, ki predstavlja rezultate

potenciometrične metode, predstavlja zgolj en dodatek DM raztopini karagenana v titracijski celici; čas vzpostavljanja ravnotežja (torej konstantne vrednosti izmerjene napetosti; glej eksperimentalni del) je le nekaj minut. Vsaka točka, dobljena z dializno metodo, pa predstavlja en poskus, to je čašo z dializno vrečko, v kateri se ravnotežje vzpostavlja 24 ur. Razlog za slabše rezultate pri dializni metodi je najbrž tudi v tem, da smo spektrofotometrično merili zelo majhne razlike v koncentraciji DM, pri čemer lahko hitro pride do večjih napak pri določitvah stopnje vezanja. Poleg tega je pri dializni metodi pomemben vpliv same membrane, ki nadzoruje prehod ionov, saj verjetno lahko pride do vezave/adsorpcije doksazosinijevih kot tudi drugih ionov na membrano, kar vpliva na končni rezultat. V povprečju so vse vrednosti za  $\beta$ , dobljene z dializno metodo, večje od tistih, ki so dobljene s potenciometrično metodo. Vzrok za to bi lahko bilo vezanje DM na dializno membrano. Kljub temu pa rezultati dializne metode kažejo podobno tendenco kot rezultati potenciometričnih meritev, tudi  $\beta_{\text{nas}}$  približno sovpadata.

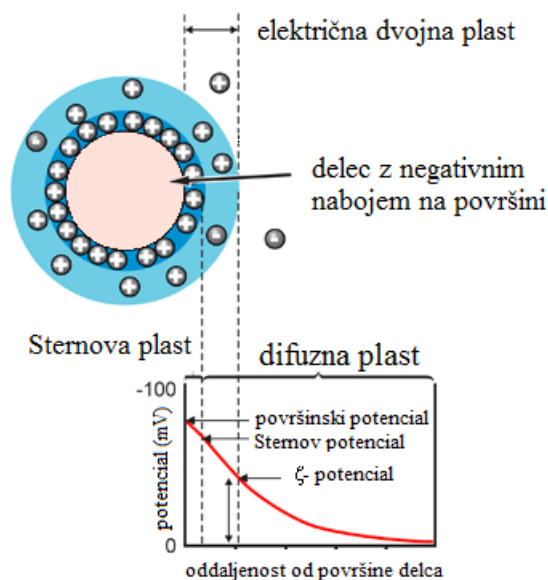


Slika 26: Stopnja vezanja,  $\beta$ , kot funkcija koncentracije prostega DM v ravnotežju za neprečiščen  $\lambda$ -karagenan v vodi pri 25 °C. Primerjava rezultatov, pridobljenih z dializno metodo (trikotni prazni znaki) in potenciometričnimi meritvami (kvadratni polni znaki).

### 4.3. MERITVE POTENCIALA ZETA

Komplekse med DM in karagenani smo želeli dodatno proučiti z meritvami potenciala zeta ( $\zeta$ ). Elektrokinetične meritve  $\zeta$ -potenciala so namreč uporabna metoda za določevanje lastnosti površine delcev kot so na primer naboj, kislost, bazičnost, polarnost, nepolarnost (hidrofobnost) (48). Potencial zeta je merilo za naboj koloidnih delcev in s tem za elektrostatske interakcije med delci in tako igra pomembno vlogo pri določanju lastnosti disperzijskih sistemov (49). Na podlagi  $\zeta$ -potenciala lahko predvidimo, ali bodo sile med nabitimi delci privlačne ali odbojne. Razlika  $\zeta$ -potencialov med nasprotno nabitimi delci je merilo za verjetnost nastanka kompleksa med delci. Potencial zeta nabitih delcev v raztopinah DM in  $\lambda$ -karagenana smo določili z napravo Zetasizer nano-ZS na podlagi merjenja elektroforetske mobilnosti delcev v električnem polju (50).

Na površini delcev v koloidnih disperzijah nastane naboj bodisi z adsorpcijo ionov bodisi z ionizacijo funkcionalnih skupin na površini in je odvisen tako od kemijskih lastnosti delca kot od okolja. Naboj na površini koloidnega delca vpliva na porazdelitev ionov v okolici, kar se kaže kot povečana koncentracija nasprotno nabitih ionov v bližini površine delca. Ustvari se tako imenovana električna dvojna plast (slika 27), ki je sestavljena iz dveh plasti: naboja na površini delca, ki je fiksni, in difuzno porazdeljenega naboja ionov v raztopini okoli delca. Porazdelitev ionov v raztopini je odvisna od razdalje od delca. V raztopini ločimo dve področji: notranje področje, imenovano Sternova plast s trdno vezanimi ioni ter zunanje področje, difuzna plast, kjer ravnotežje med elektrostatičnimi silami in naključnim termičnim gibanjem določa razporeditev ionov. Električni potencial z naraščanjem oddaljenosti od površine delca eksponentno pada, dokler ne doseže konstantne vrednosti. Ko se koloidni delec v raztopini giblje, se skupaj z njim giblje del nasprotno nabitih ionov in topilo. Koloidni delec in ti ioni predstavljajo elektrokinetično enoto. Naboj na strizni ploskvi med to enoto in raztopino imenujemo  $\zeta$ -potencial (51). Potencial zeta je tako merilo za naboj na površini delcev v disperzijah.



Slika 27: Shematični prikaz električne dvojne plasti potenciala zeta (50).

Rezultate meritev  $\zeta$ -potenciala v prikazuje tabela 2.  $\lambda$ -karagenan ima najbolj negativen naboj v vodi (-105,0 mV), sledi naboj v fosfatnem pufru s pH 7,0 (-57,9 mV), najmanj negativen pa je naboj v fosfatnem pufru s pH 4,5 (-39,9 mV). Pri meritvah naboja nasprotno nabitih delcev DM  $\zeta$ -potencial pada v enakem vrstnem redu in je tako pri pH 4,5 nižji (5,49 mV) kot pri pH 7,0 (19,6 mV), najvišji pa je v vodi (70,2 mV). Razlog za take rezultate je, da prisotni elektroliti v mediju znižajo  $\zeta$ -potencial delcev.  $\zeta$ -potencial je močno odvisen od ionske moči preiskovanega medija. Ionska moč fosfatnega pufru s pH 4,5 je 0,135 M in je večja od ionske moči fosfatnega pufru s pH 7,0, ki je 0,018 M, zato so  $\zeta$ -potenciali delcev DM in tudi delcev  $\lambda$ -karagenana v fosfatnem pufru s pH 4,5 manjši kot v fosfatnem pufru s pH 7,0.

Pri potenciometričnih meritvah smo že opazili, da na tvorbo kompleksa vpliva tako NaCl kot fosfatni pufer, kar smo potrdili tudi z meritvami  $\zeta$ -potenciala. V primeru, ko pride tableta s karagenanom v neko okolje, bo torej stopnja vezanja DM na karagenane (*in situ* kompleksacija) močno odvisna od okoljnega medija. Meritve  $\zeta$ -potenciala kažejo, da lahko med DM in  $\lambda$ -karagenanom pričakujemo močne privlačne sile in da to vpliva na *in situ* kompleksacijo med učinkovino in karagenani. Če izračunamo razlike med  $\zeta$ -potencialoma  $\lambda$ -karagenana in DM, je ta v vodi večja (175,2 mV) kot v fosfatnem pufru s pH 7,0 (77,5 mV).

Slednje razloži močnejše privlačne sile med DM in  $\lambda$ -karagenanom v vodi, kar je razvidno tudi iz potenciometričnih meritev.

Tabela 2:  $\zeta$ -potenciali raztopin DM in  $\lambda$ -karagenana v prečiščeni vodi in fosfatnih pufrih s pH 7,0 in pH 4,5.

	$\zeta$ -potencial/mV		
	Prečiščena voda	Fosfatni pufer pH 7,0	Fosfatni pufer pH 4,5
DM	70,2	19,6	5,49
$\lambda$ -karagenan	-105,0	-57,9	-39,9

#### 4.4. VPLIV DODATKA SDS NA TVORBO KOMPLEKSA MED DM IN $\lambda$ -KARAGENANOM

V prebavnem traktu se izloča več različnih površinsko aktivnih snovi, ki bi lahko imele vpliv na tvorbo in stabilnost kompleksov, zato smo želeli s potenciometričnimi titracijami in meritvami dinamičnega sipanja svetlobe preveriti tudi vpliv SDS na tvorbo kompleksov.

Dosedanje študije na Katedri za farmacevtsko tehnologijo so pokazale, da dodajanje SDS v medije pri preskusih sproščanja preprečuje interakcije med DM in karagenani (39). Ugotovljeno je bilo, da lahko le v prisotnosti SDS UV-spektrofotometrično določimo celoten odmerek DM v prisotnosti karagenanov. V nasprotnem primeru je bil DM vezan na karagenan in ga spektrofotometrično ni bilo mogoče določiti. Običajno so lahko določili le približno 30% vgrajenega odmerka. Na osnovi naših meritev vezanja lahko rečemo, da je to le prosta učinkovina.

#### 4.4.1. ODZIV ELEKTRODE NA DODATEK SDS H KOMPLEKSU

Najprej smo s pomočjo potenciometričnih meritev želeli ugotoviti, kaj se v raztopini zgodi, ko SDS dodamo h kompleksu med DM in  $\lambda$ -karagenanom. MIE je v membrani vsebovala kompleks  $D^+DS^-$  in bi se morala odzivati tako na DM kot tudi na SDS. Tako smo najprej preverili sam odziv elektrode na SDS. V titracijsko celico smo dali 10 ml 3-krat destilirane vode, nato pa dodajali 0,01 M raztopino SDS in merili napetost. Pri tem smo določili umeritveno krivuljo za SDS v vodi, ki pa v preučevanem koncentracijskem območju ni bila linearna (slika 28). Nato smo v titracijsko celico dali 10 ml raztopine  $\lambda$ -karagenana s koncentracijo  $5 \times 10^{-4}$  monomol/L in ponovno dodajali 0,01 M SDS, pri čemer smo kot rezultat dobili umeritveno krivuljo v vodi ob prisotnosti karagenana. Želeli smo namreč preveriti, ali prisotnost karagenana v raztopini vpliva na odzivnost elektrode na SDS. Tretji poskus smo zasnovali tako, da smo v titracijsko celico ponovno dali 10 ml raztopine karagenana, nato pa najprej trikrat dodali DM. Glede na prejšnje rezultate je bila koncentracija DM na ta način v območju, kjer je praktično ves DM vezan (glej plato krivulje odvisnosti napetosti od logaritma koncentracije DM na sliki 17 pod koncentracijo  $1 \times 10^{-4}$  M). V raztopini je tako zagotovo že nastal kompleks med  $\lambda$ -karagenanom in DM.

Zatem smo raztopino v titracijski celici titrirali z raztopino 0,01 M SDS tako kot poprej in merili napetost. Narisali smo graf napetosti v odvisnosti od koncentracije SDS na logaritemski skali (slika 28). Sredinska krivulja prikazuje odziv elektrode pri dodajanju SDS v vodo, krivulja levo od nje pa pri dodajanju SDS raztopini karagenana. Vidimo lahko, da sta si krivulji po obliki podobni. Z naraščanjem koncentracije SDS napetost pri obeh na približno enak način pada. Prisotnost karagenana povzroči le premik krivulje v levo. Če bi se SDS vezal na  $\lambda$ -karagenan, bi pričakovali premik krivulje v desno. Dobljeni rezultat kaže, da se SDS ne veže na karagenan. Nasprotno, zaradi odbojnih interakcij med anionom  $\lambda$ -karagenana  $DS^-$  ioni elektroda pokaže navidezno preveliko koncentracijo SDS.

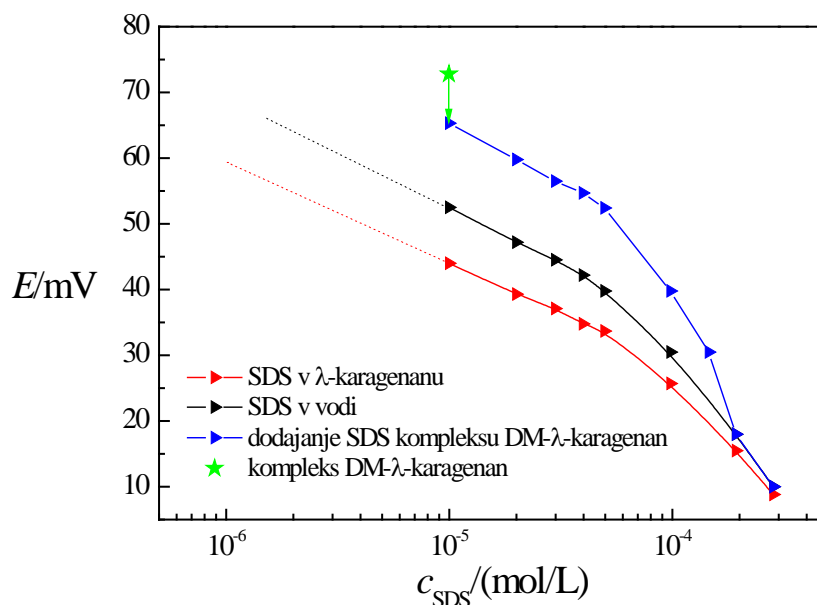
Desna krivulja na sliki 28 pa prikazuje potek napetosti v odvisnosti od  $\log c_{SDS}$ , ko raztopini, ki že vsebuje komplekse med DM in karagenanom, dodajamo SDS. Premik v desno od prejšnjih dveh krivulj pove, da je koncentracija prostega SDS manjša. Ker vemo, da se SDS na

$\lambda$ -karagenan ne veže, lahko sklepamo, da tvori komplekse z DM, pri čemer potegne DM s kompleksa s karagenanom. Med SDS in DM verjetno nastajajo mešani miceli ali njim podobni agregati.

Ravnokar opisano primerjamo s krivuljo, dobljeno v raztopini SDS in  $\lambda$ -karagenana (skrajno leva krivulja). Če predpostavimo linearen odziv elektrode na koncentracijo SDS tudi pri koncentracijah pod  $1 \times 10^{-5}$  M (glej črtkane dele krivulj), lahko sklepamo, da je ob prvem dodatku SDS ( $c_{\text{DS}} = 9,98 \times 10^{-6}$  mol/L) v raztopino kompleksa med DM in  $\lambda$ -karagenanom glede na umeritveno krivuljo v vodi (srednja krivulja) vezanih 83 % dodanega SDS, glede na umeritveno krivuljo v raztopini s karagenanom (skrajno leva krivulja) pa kar 96 % dodanega SDS. Z vezanim SDS mislimo na SDS, ki tvori agregate z DM, saj vemo, da se SDS na karagenan ne veže. Ob večanju koncentracije SDS se razlika med desno krivuljo in umeritvenima krivuljama zmanjšuje, na koncu se celo izenači z umeritveno krivuljo v vodi. To pomeni, da je z naraščajočo koncentracijo SDS delež celotnega SDS, ki tvori kompleks z DM vedno manjši, koncentracija prostega SDS raste, na koncu je skoraj ves SDS prost.

Na podlagi teh rezultatov je mogoče sklepati, da SDS le postopoma razgrajuje kompleks med DM in karagenanom. Šele pri koncentracijah SDS, ki so nad približno  $2 \times 10^{-4}$  mol/L (to je pri približno  $[\text{SDS}] = 5 \times [\text{DM}]$ ) SDS razgradi kompleks med DM in karagenanom. SDS bi se lahko pri nižjih koncentracijah najprej vezal na kompleks, nato pa odtegnil DM karagenanu. Pri tem se lahko z negativnim delom približa k pozitivnemu naboju na DM ali pa s hidrofobnim repom k bolj nepolarnim delom DM, najbrž lahko pri tem pride tudi do asociacije samih molekul SDS med seboj. Tega iz naših rezultatov ne moremo razbrati. Za osvetlitev stanja v taki kompleksni mešani raztopini smo uporabili še metodo dinamičnega sipanja svetlobe, s katero smo določili velikosti delcev v raztopinah.





Slika 28: Odvisnost napetosti,  $E$ , od koncentracije SDS v vodi ( $\blacktriangleright$ ), v raztopini  $\lambda$ -karagenana ( $\blacktriangleright$ ) in ob dodajanju SDS h kompleksu med  $\lambda$ -karagenanom in DM ( $\blacktriangleright$ ). Skala na abscisni osi je logaritemska. Zvezdasta točka označuje koncentracijo DM po njegovem zadnjem dodatku ( $c_{\text{DM}} = 3,92 \times 10^{-5} \text{ M}$ ).

#### 4.4.2. VPLIV DODATKA SDS NA VELIKOST DELCEV

Dodatek SDS h kompleksu med doksazosinom in karagenanom torej predvidoma razgradi kompleks in omogoči, da z UV spektrofotometrom kljub prisotnosti karagenana v raztopini zaznamo celoten DM. Razgradnjo kompleksa smo proučili tudi s pomočjo DLS meritev. Postavili smo več hipotez. SDS bi se lahko z negativnim delom približal pozitivnim naboju doksazosina ali s hidrofobnim delom tvoril šibke vezi s hidrofobnim delom doksazosina. V drugem primeru bi vezava SDS na kompleks vodila do zvečanja velikosti delcev v raztopini. Druga možna razlaga je, da SDS odtegne DM s karagenana, pri čemer pride do razgradnje kompleksov in do zmanjšanja velikosti delcev v raztopini.

Korelacijske krivulje, ki so rezultat DLS meritev, so za proučevane raztopine (poglavje 3.5.) prikazane na sliki 29 zgoraj. Vse krivulje smo obravnavali s programom CONTIN. Rezultat obravnave so porazdelitve velikosti delcev v sistemu. Dobljene velikosti so podane v tabeli 3.

Krivulja skrajno levo prikazuje meritev v raztopini SDS. Ta krivulja je pomaknjena k najmanjšim časom,  $t$ , kar pomeni, da so delci v raztopini SDS najmanjši. Krivulja skrajno desno je korelacijska funkcija za raztopino kompleksa med DM in  $\lambda$ -karagenanom ob prvem dodatku SDS ( $[SDS] = 5 \times [DM]$ ). Tu so delci največji. Velikost večjih delcev v raztopini DM- $\lambda$ -karagenan s prvim dodatkom SDS ( $[SDS] = 5 \times [DM]$ ) je  $R_{h,2} = 247$  nm in je večja od velikosti delcev v raztopini kompleksa brez SDS ( $R_{h,2} = 216$  nm). To pomeni, da se ob dodatku SDS h kompleksu med DM in  $\lambda$ -karagenanom velikost delcev v raztopini v začetku poveča, kar pripisujemo vezavi SDS na kompleks. Molekule SDS se na obstoječi kompleks vežejo s hidrofobnim repom, kot smo predvideli na začetku.

Z nadaljnjim večanjem koncentracije SDS pa se velikost delcev v raztopini zmanjša. Že po drugem dodatku SDS ( $[SDS] = 25 \times [DM]$ ) pa postanejo delci v raztopini celo nekoliko manjši od delcev v raztopini kompleksa brez SDS ( $R_{h,2} = 200$  nm). Enako velja za delce, ki nastanejo po največjem dodatku SDS ( $[SDS] = 950 \times [DM]$ ):  $R_{h,2} = 209$  nm). Te razlike v velikostih pa niso velike in so v okviru eksperimentalne napake.

V raztopini kompleksa kot tudi v vseh raztopinah kompleksa z dodatkom SDS so prisotni tudi manjši delci s hidrodinamskim radijem od 10 do 30 nm, ki so najverjetneje posledica asociacije DM in SDS. Na podlagi teh rezultatov lahko torej sklepamo, da SDS v veliki meri odtegne DM s karagenana. Tudi na sliki 29 spodaj, ki prikazuje porazdelitev hidrodinamskih radijev po intenziteti, se lepo vidi, da velikost kompleksa med DM in  $\lambda$ -karagenanom pada, ko dodajamo SDS. Hkrati lahko vidimo, da velikost prisotnih majhnih agregatov, ki so kot že omenjeno verjetno mešani miceli SDS in DM, s padanjem velikosti kompleksa med DM in  $\lambda$ -karagenanom narašča. To bi lahko razložili tako, da SDS vedno več DM vgrajuje v svoje agregate in zato ti rastejo. Poleg tega lahko opazimo, da so porazdelitve velikosti kompleksov med DM in  $\lambda$ -karagenanom in tudi tiste za komplekse z dodanim SDS ožje kot pri samem  $\lambda$ -

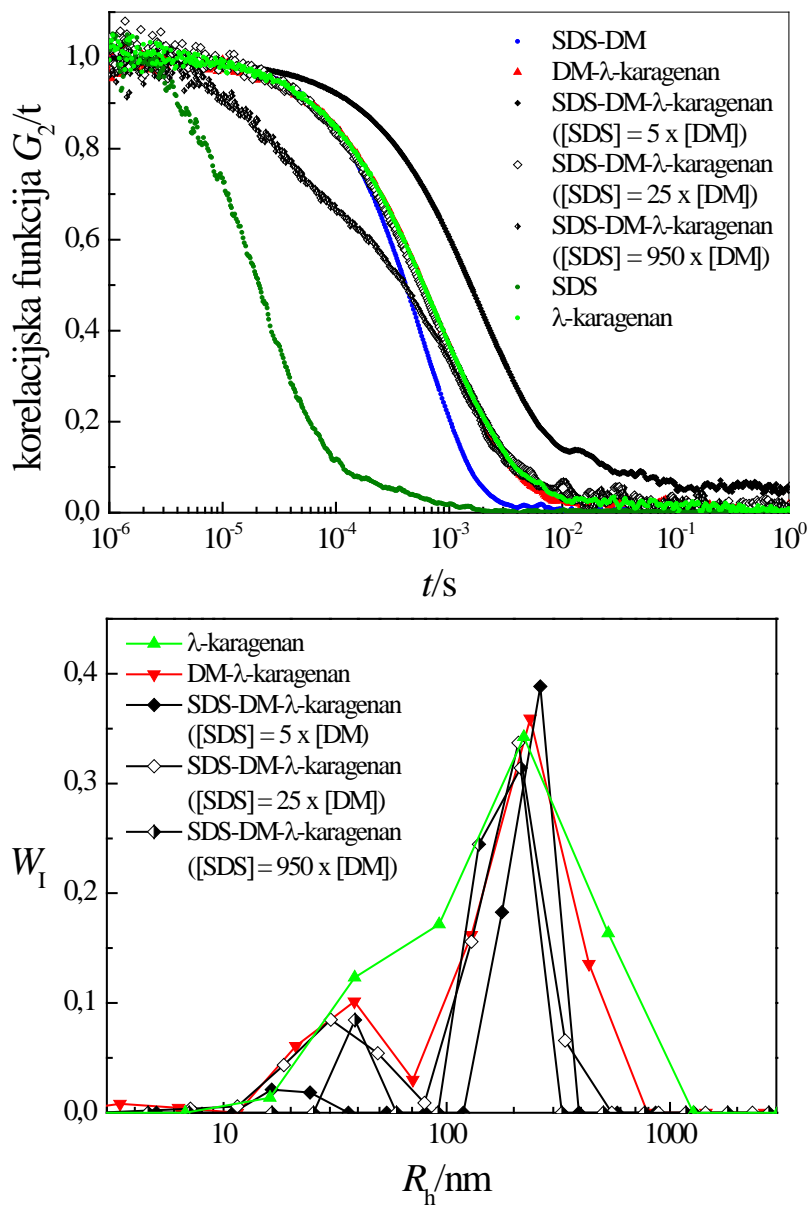
karagenanu. Takšen pojav je pri tvorbi kompleksov precej pogost, saj iz dokaj polidisperznih vzorcev nastajajo bolj monodisperzni kompleksi.

Na ta način dobljeni rezultati DLS potrjujejo to, kar smo predvidevali že na osnovi meritev z membransko elektrodo. SDS se v začetni fazi veže na kompleks, ob dovolj visoki koncentraciji pa odtegne DM iz kompleksa in tvori micle z DM. Na podlagi vseh teh rezultatov je mogoče razložiti, zakaj smo v raztopinah s kompleksom med DM in karagenanom, ki smo jim dodali 5 g/L SDS (to je 950-kraten prebitek glede na DM) z UV-spektrofotometrom zaznali celotno količino prisotnega DM.

Dobljeni rezultati kažejo, da SDS razgradi komplekse med DM in karagenani, kar je izredno zanimivo s stališča stabilnosti kompleksa *in vivo*. V *in vivo* pogojih v prebavnem traktu se sproščajo PAS, ki imajo lahko vpliv na stabilnost kompleksov in s tem na sproščanje učinkovine. Njihov vpliv na komplekse med ZU in karagenani je zato potrebno skrbno proučiti.

Tabela 3: Hidrodinamski radii,  $R_h$ , analiziranih raztopin (poglavje 3.5.).

Raztopina	$R_{h,1}/\text{nm}$	$R_{h,2}/\text{nm}$
DM in SDS	13	97
$\lambda$ - karagenan	/	218
$\lambda$ - karagenan in DM	31	216
$\lambda$ - karagenan in DM in SDS ( $[\text{SDS}] = 5 \times [\text{DM}]$ )	23	247
$\lambda$ - karagenan in DM in SDS ( $[\text{SDS}] = 25 \times [\text{DM}]$ )	34	200
$\lambda$ - karagenan in DM in SDS ( $[\text{SDS}] = 950 \times [\text{DM}]$ )	4	209



Slika 29: Korelacijske funkcije proučevanih raztopin (zgoraj) in porazdelitve velikosti delcev (spodaj).

## 5. SKLEP

V diplomski nalogi smo proučevali vezavo doksazosinijevega mesilata na karagenane oziroma komplekse med DM in karagenani v vodi in v medijih z dodanimi elektroliti. Dokazali smo, da je v membransko ionoselektivno elektrodo mogoče vgraditi tudi ZU kot je doksazosin in elektrodo uporabiti za proučevanje vezave doksazosina na polimere, kar je po literaturnih podatkih prvi tovrstni primer. Izdelana elektroda se je odlično odzivala na ZU v dovolj širokem območju, eksperimentalno določen naklon umeritvene premice pa je bil blizu teoretičnemu. Potenciometrična metoda se je v primerjavi z dializno metodo za proučevanje vezave DM na karagenane izkazala za izrazito boljše, saj je hitrejša, občutljivejša in daje bolj ponovljive rezultate.

Rezultati potenciometričnih meritev so pokazali, da se DM na karagenane veže na podoben način kot se sicer vežejo različne PAS na polielektrolite. Izoterme vezanja DM na karagenane imajo tipično sigmoidno obliko, ki je značilna za kooperativno vezanje ligandov na polielektrolite. Iz izoterm je razvidno, da je moč interakcije med DM in karagenani sorazmerna številu nabojev na disaharidno enoto. Tako so vrednosti kritične koncentracije agregacije najmanjše pri  $\lambda$ -karagenanu, ki ima od dva do tri naboje na monomerno disaharidno enoto. Sledi vezava na  $\iota$ -karagenan z dvema nabojema na disaharidno enoto, najšibkejša pa je vezava na  $\kappa$ -karagenan, ki ima le en negativni naboj na disaharidno enoto.

S potenciometričnimi meritvami smo pokazali, da sterična porazdelitev sulfatnih skupin na karagenanih vpliva na vezavo DM na karagenane. Sterično oviranje je najmanjše pri  $\kappa$ -karagenanu, ki ima samo eno sulfatno skupino na monomerno enoto, zato je v tem primeru končna množina vezanega DM, izražena kot  $\beta_{\text{nas}}$ , največja. Kooperativnost v vezavi je pri  $\kappa$ -karagenanu v primerjavi s preostalima karagenanoma manjša, kar lahko pripišemo večji razdalji med naboji na verigi. Pri 37 °C je v primerjavi s 25 °C vezava na vse karagenane slabša, kar smo pripisali višji termični energiji in hitrejšemu gibanju ionov.

Primerjava med karagenani, ki so komercialno dostopni in vsebujejo različne nečistote, ter karagenani, ki so bili prečiščeni po točno določenih postopkih, je pokazala, da prisotne

nečistote v komercialno dostopnih karagenanih vplivajo na njihove vezavne lastnosti. Izoterme vezanja so v prisotnosti neprečiščenih karagenanov v primerjavi s prečiščenimi karagenani pomaknjene k višjim koncentracijam prostega doksazosina, torej k višjim vrednostim CAC, kar kaže na slabšo vezavo DM na karagenane.

Poskusi pri 37 °C v vodni raztopini NaCl in v fosfatnem pufru s pH 7,0 so pokazali, da tudi prisotnost elektrolitov v mediju vodi do slabšega vezanja, ki je posledica senčenja elektrostatskega privlaka. To povzroči premik izoterm vezanja k višjim vrednostim CAC. Pri potenciometričnim meritvah v pufru se vezanje predvidoma zaradi nastanka večjih medmolekulskih asociacij nadaljuje celo preko točke nevtralizacije naboja (nad  $\beta = 1$ ). Tudi ob dodatku HPMC vodni raztopini karagenanov v titracijski celici so vrednosti CAC višje, poleg tega pa je  $\beta_{\text{nas}}$  nižji. Sklepamo, da HPMC sterično ovira tvorbo kompleksov med DM in  $\lambda$ -karagenanom.

Nekatere rezultate potenciometričnih meritev smo potrdili tudi z meritvami potenciala zeta. Pri meritvah  $\zeta$ -potenciala smo ugotovili, da le-ta v raztopinah  $\lambda$ -karagenana in DM pada v naslednjem vrstnem redu: voda > fosfatni pufer s pH 7,0 > fosfatni pufer s pH 4,5. Rezultati nakazujejo, da očitno bolj kot protonacija dušikov na doksazosinu, na potencial zeta ionov doksazosina vpliva ionska moč, ki je v fosfatnem pufru s pH 4,5 v primerjavi s pufrom pri pH 7,0 veliko večja. Razlika med  $\zeta$ -potencialoma DM in  $\lambda$ -karagenana v vodi je veliko večja od razlike v fosfatnem pufru s pH 7,0. Interakcije so zato v vodi močnejše kot v fosfatnem pufru s pH 7,0, kar je v skladu s potenciometričnimi meritvami.

Na podlagi potenciometričnih poskusov dodajanja SDS raztopini, kjer je že bil prisoten kompleks med DM in  $\lambda$ -karagenanom, smo ugotovili, da SDS približno nad koncentracijo SDS, ki je 5-krat večja od koncentracije DM, začne razgrajevati kompleks oziroma odtegovati DM s karagenana. To smo potrdili tudi z meritvami dinamičnega sipanja svetlobe. Velikost delcev v raztopinah kompleksa med DM in  $\lambda$ -karagenani ob večanju koncentracije SDS pada. Z metodo sipanja svetlobe smo tudi ugotovili, da so porazdelitve velikosti delcev pri kompleksih med DM in  $\lambda$ -karagenanom ožje kot v raztopinah čistega  $\lambda$ -karagenana. Manjša polidisperznost vzorca je pogost pojav pri nastajanju takih kompleksov.

Dobljeni rezultati omogočajo boljše razumevanje interakcij med modelno kationsko učinkovino in karagenani. Membranska ionoselektivna elektroda predstavlja nov pristop k proučevanju mehanizmov vezave učinkovin na karagenane in druge polielektrolite. Obnašanje karagenanov je zelo kompleksno in močno odvisno od zunanlega medija, kar se odraža tudi na vezavi učinkovin na karagenane. S proučevanjem interakcij v pogojih, ki bodo čim bolj posnemali fiziološke, bodo dobljeni rezultati omogočali dobro napoved dogajanja v *in vivo* pogojih, kar bo ključnega pomena pri uporabi karagenanov kot hidrofilnih polimerov v ogrodnih tabletah. Membranska ionoselektivna elektroda nam poleg pomembnih informacij za načrtovanje ogrodnih tablet lahko daje pomembne informacije tudi za načrtovanje drugih farmacevtskih oblik, kot so na primer polielektrolitski nanodelci in nanodelci s polielektrolitsko oblogo. Na podlagi poskusov z doksazosinijevim mesilatom pa je mogoče sklepati tudi na interakcije med karagenani in drugimi podobnimi amfifilnimi učinkovinami.

## 6. LITERATURA

1. Vogelson CT: Advances in Drug Delivery Systems. *Modern Drug Discovery* 2001; 4(4): 49–52.
2. Marroum PJ: Bioavailability/Bioequivalence for Oral Controlled Release Products, Controlled Release Drug Delivery systems: Scientific and Regulatory Issues, Fifth International symposium on Drug Development, East Brunswick, NJ, 1997; 15-17.
3. Brannon-Peppas L: Polymers in controlled drug delivery, *Medical Plastics and Biomaterials*, 1997.
4. Kim C: Controlled release dosage form design, Technomic Publishing Co, Lancaster, PA, 2000: 1-11.
5. Formularium Slovenicum, Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 2.0. Ministrstvo za zdravje, Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke 2005: 77, 430.
6. Morishita M, Peppas NA: Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery?. *Drug Discov Today* 2006; 11: 905-910.
7. Colombo P, Siepmann SJ, Colombo G, Sonvico F, Rossi A, Strusi OL: Swellable and Rigid Matrices: Controlled Release Matrices with Cellulose Ethers, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 2*, Informa Healthcare USA, Inc., New York 2008: 433-468.
8. Reynolds TD, Mitchell SA, Balwinski KM: Investigation of the effect of tablet surface area/volume on drug release from hydroxypropylmethylcellulose controlled-release matrix tablets. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28: 457-466.
9. Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA: Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharm Sci Technol Today* 2000; 3: 198-204.
10. Doelker E: Water-swollen cellulose derivatives in pharmacy. In *Hydrogels in Medicine and Pharmacy Polymers (II)*, CRC Press, Florida 1987: 115-160.
11. Durig T, Fassihi R: Guar-based monolithic matrix systems: effect of ionizable and non-ionizable substances and excipients on gel dynamics and release kinetics, *J. Controlled Release* 2002; 80: 45-56.



12. Hariharan M, Wheatley TA, Price JC: Controlled –release tablet matrices from carrageenans: compression and dissolution studies. *Pharm. Dev. Technol.* 1997; 2(4): 383-393.
13. Rees DA: *Polysaccharide Shapes*. Chapman & Hall, Florida, 1977.
14. Alistair MS, Glyn OP, Williams PA: *Food Polysaccharides and Their Applications*, CRC Press, Florida, 2006: 240-273.
15. Kibbe AH: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 3<sup>rd</sup> Ed, Pharmaceutical Press, 2000: 124-127, 346-349.
16. Picker KM: Carrageenans used for tableting and controlled release. *Proc. 2nd World Meeting on Pharm., Biopharm. Pharm. Technol* 1998; 2: 270.
17. Picker KM: Matrix tablets of carrageenans II. Release behaviour and effect of added cations. *Drug Dev. Ind. Pharm* 1999; 25 (3): 339-346.
18. Yuguchi Y, Thuy TTT, Urakawa H, Kajiwara K: Structural characteristic of carrageenans gels: temperature and concentration dependence. *Food hydrocolloids* 2002; 16: 515-522.
19. Kogej K: Binding of Cationic Surfactants by Carrageenans. A Study of the Influence of Polyelectrolyte Charge Density. *Acta Chim. Slov.* 2007; 54: 469-475.
20. Carrageenan/Chemistry  
<http://www.fmcbiopolymer.com/Food/Ingredients/Carrageenan/Chemistry.aspx>  
(dostop december 2009)
21. Kogej K, Škerjanc J: Surfactant Binding to Polyelectrolytes. In *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Radeva T; Surfactant Science Series 99, Marcell Decker, New York, 2001; 21: 793.
22. Caram-Lelham N, Sundelöf L: The Effect of Hydrofobic Character of Drugs and Helix-coil Transition of  $\kappa$ -Carrageenan on the Polyelectrolyte-drug Interaction. *Pharmaceutical Research* 1996; 13: 920-925.
23. Kavanagh N, Corrigan OI: Swelling and erosion properties of hydroxypropyl methylcellulose (Hypermellose) matrices-influence of agitation rate and dissolution medium composition. *Int. J. Pharm.* 2004; 297: 141-152.
24. Snow EK: *AHFS Drug information 2009*, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD, 2009: 1868-1972.

25. Fulton B, Wagstaff AJ, Sorkin EM: Doxazosin. An update of its clinical pharmacology and therapeutic applications in hypertension and benign prostatic hyperplasia. *Drugs* 1995; 49 (2): 295-320.
26. Kinsella GK, Watson GW, Rozas I: Theoretical proton affinities of  $\alpha 1$  adrenoceptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; 14: 1580-1587.
27. Jönsson B, Lindman B, Holmberg K, Kronberg B: *Surfactants and Polymers in aqueous solutions*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2003: 19.
28. Kwak JCT: *Polymer-Surfactant Systems*, Surfactant Science Series 77, Marcel Dekker, New York, 1998.
29. Caram-Lelham N, Sundelöf L: Changes in the Polyelectrolyte-Amphiphile Interaction Due to Helix-Coil Transition Induced by Specific Counterions or Variations in Temperature. *Biopolymers* 1996; 39: 387-393.
30. Caram-Lelham N, Sundelöf L: Some aspects on characterization and properties of charged polysaccharides. An investigation of the system carrageenan/amitriptylin/water with relation to amphiphile adsorption and charge density. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 115: 103-111.
31. Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Bettinetti GP, Caramella C: Characterization of diltiazem-lambda carrageenan complex. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 200: 207-216.
32. Hayakawa K, Kwak JCT: Surfactant-Polyelectrolyte Interactions. 1. Binding of Dodecyltrimethylammonium Ions by Sodium Dextran Sulfate and Sodium Poly(styrenesulfonate) in Aqueous Solution in the Presence of Sodium Chloride. *J. Phys. Chem.* 1982; 86: 3866-3870.
33. Hayakawa K, Santere JP, Kwak JCT: Study of Surfactant-Polyelectrolyte Interactions. Binding of Dodecyl- and Tetradecyltrimethylammonium Bromide by Some Carboxylic Polyelectrolytes. *Macromolecules* 1983; 16: 1642-1645.
34. Van de Velde F, De Ruiter GA. In: *Polysaccharides II*, 6, Steinbüchel A, Debates S, Banadme EJ, (ed). *Biopolymers*, Wiley-VCH, Weinheim 2002: Carrageenans: 247-271.
35. Deneff B, Gamini A, Delben F, et al.: Thermodynamics of conformational transition and chain association of iota-carrageenan in aqueous solution: Calorimetric and chiroptical data. *Biopolymers* 1998. 45(2):105-117.

36. Bratko D in ostali: Laboratorijski vaje iz fizikalne kemije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2000.
37. Malovikova A, Hayakawa K, Kwak JCT: Surfactant poly-electrolyte interactions. 4. Surfactant chain-length dependence of the binding of alkylpyridinium cations to dextran sulphate. *J. Phys. Chem* 1984; 88: 1930.
38. Kogej K: Študij interakcije med polielektrolitom in površinsko aktivnimi snovmi. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 1988.
39. Božič V: Vpliv karagenanov na sproščanje kationske učinkovine iz ogrodnih tablet. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008.
40. Berne BJ, Pecora R: *Dynamic light scattering*, Mineola, Dover, 2000.
41. Urban C, Schurtenberger P: Characterization of Turbid Colloidal Suspensions Using Light Scattering Techniques Combined with Cross-Correlation Methods. *J. Colloid. Interf. Sci.* 1998; 207:150-158
42. Urban C, Schurtenberger P: Application of a new light scattering technique to avoid the influence of dilution in light scattering experiments with milk. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1999; 1: 3911-3915.
43. Johnson JL, Holinej J, Williams MD: Influence of ionic strength on matrix integrity and drug release from hydroxypropylcellulose compacts. *Int. J. Pharm* 1993; 90: 151-159.
44. Deneff B, Gamini A, Delben F, et al.: Thermodynamics of conformational transition and chain association of iota-carrageenan in aqueous solution: Calorimetric and chiroptical data. *Biopolymers* 1998. 45(2):105-117.
45. Snoeren THM, Payens TAJ: On the sol-gel transition in solutions of Kappa-carrageenan. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976; 437: 264-272.
46. Pass G., Phillips G.O., Wedlock DJ: Interaction of Univalent and Divalent Cations with Carrageenans in Aqueous Solution. *Macromolecules*, 1977; 10 (1): 197-201.
47. Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, et.al.: On the employment of lambda carrageenan in a matrix system. III. Optimization of a lambda carrageenan-HPMC hydrophilic matrix. *Journal of Controlled Release* 1998; 51 (2-3): 231-239.

48. Bismarck A, Springer J, Mohanty AK, et al.: Characterization of several modified jute fibers using zeta-potential measurements. *Colloid and polymer science* 2000; 278 (3): 229-235.
49. Li LC, Tian Y: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, 1997; 16: 429-458.
50. <http://www.malvern.co.uk> (dostop december 2009)
51. Washington C: *Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries*, Ellis Horwood Limited, West Sussex, 1992: 105-165.