

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA PLANINC

**KORELACIJA MED REOLOŠKIMI LASTNOSTMI IN HITROSTJO
SPROŠČANJA IZ OGRODNIH TABLET IZ KSANTANA**

**CORRELATION BETWEEN REOLOGICAL PROPERTIES AND RELEASE
RATE FROM XANTHAN MATRIX TABLETS**

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner, mag. farm. za strokovno in moralno podporo, Tatjani Hrovatič za praktične nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju, Biljani Govedarica mag. farm. za pomoč pri merjenju kontaktnega kota ter doc. dr. Tomažu Vovku, mag. farm. za nasvete pri izračunu sestave pufrov.

Hvala tudi staršem in prijateljem za vso podporo pri študiju in izdelavi diplomskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner.

Nina Planinc

Ljubljana, september 2011



Predsednica diplomske komisije: *prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.*

Član diplomske komisije: *doc. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.*

Mentorica: *izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.*

KAZALO

POVZETEK	5
SEZNAM OKRAJŠAV	6
1. UVOD	7
1.1. KSANTAN	7
1.2. HIDROGELI	12
1.3. FARMACEVTSKE OBLIKE S PRIREJENIM SPROŠČANJEM	14
1.3.1. PODALJŠANO SPROŠČANJE IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	14
1.3.2. NABREKANJE HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	15
1.4. REOLOGIJA	17
1.4.1. IDEALNO VISKOZNE TEKOCINE	18
1.4.2. IDEALNO ELASTICNE SNOVI (IDEALNO TRDNO TELO)	20
1.4.3. VISKOELASTICNE SNOVI	22
1.4.4. MERJENJE VISKOELASTICNIH LASTNOSTI SISTEMOV	23
2. NAMEN DELA	28
3. EKSPERIMENTALNO DELO	29
3.1. MATERIALI	29
3.2. APARATURE	29
3.3. POSTOPKI IN METODE	30
3.3.1. IZDELAVA TABLET ZA VREDNOTENJE HITROSTI SPROŠČANJA	30
3.3.2. PRIPRAVA MEDIJEV ZA PRESKUS RAZTAPLJANJA IN IZDELAVO HIDROGELOV IZ KSANTANA	30
3.3.3. PRIPRAVA RAZTOPINE PULVIS KONZERVANS	32
3.3.4. PRIPRAVA HIDROGELOV IZ KSANTANA	32
- počasno dodajanje ksantana mediju med mešanjem na magnetnem mešalu	33
- postopek dodatka netopila	33
- postopek priprave v pateni	34
3.3.5. IZDELAVA TABLET IN PREUCEVANJE HITROSTI OMOČENJA	34

3.3.6. PRESKUS RAZTAPLJANJA ZA TRDNE FARMACEVTSKE OBLIKE	35
3.3.7. REOMETRIJA	38
- Amplitudni test	38
- Frekvenčni test	39
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1. VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET	40
4.1.1. PRESKUS ENAKOMERNOSTI MASE ENOODMERNIH FARMACEVTSKIH OBLIK	40
4.1.2. PRESKUS TRDNOSTI	40
4.1.3. PRESKUS ENAKOMERNOSTI VSEBNOSTI	41
4.2. SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ OGRODNIH TABLET IZ KSANTANA	41
4.2.1. SPROŠČANJE PRI PUFRIH S STANDARDNIM DODATKOM NaCl	41
4.2.2. SPROŠČANJE V MREŽICI	42
4.2.3. SPROŠČANJE PRI IONSKI MOČI $I = 0,2 \text{ M}$	43
4.3. REOMETRIJA	47
4.3.1. AMPLITUDNI TEST	47
4.3.2. FREKVENČNI TEST	48
4.4. HITROST OMOČENJA TABLET	65
5. SKLEPI	66
6. LITERATURA	68

POVZETEK

Raztopine ksantana so ene izmed najbolj intenzivno preučevanih polisaharidnih sistemov – reološko in fizikalno-kemijsko. Ksantan je najpomembnejši bakterijski polisaharid, ki se ga uporablja na mnogih področjih. Eden od možnih načinov uporabe ksantana je tudi kot pomožna snov pri ogrodnih tabletah, saj v vodnih medijih nabreka in tvori čvrst gel okoli tablete, ki zagotavlja enakomerno in upočasnjeno sproščanje učinkovine iz tablete.

V diplomskem delu smo primerjali rezultate hitrosti sproščanja modelne učinkovine iz ogrodnih tablet iz ksantana z reološkimi lastnostmi hidrogelov iz ksantana, pripravljenih v medijih z različno ionsko jakostjo in različnim pHjem. Test raztapljanja ogrodnih tablet smo najprej izvedli v prečiščeni vodi, v prečiščeni vodi z dodatkom NaCl, v HCl mediju s pH 1.2 in 1.2 z dodatkom NaCl, v HCl mediju s pH 3.0 in 3.0 z dodatkom NaCl ter v fosfatnem pufru s pH 4.5 in 7.0. Dodatek NaCl je bil 11,69 g/l. Ker je ksantan anionski polisaharid, nas je zanimalo, ali lahko preko hitrosti sproščanja učinkovine vidimo vpliv pHja na hitrost nabrekanja ksantana. Zato smo preskus raztapljanja izvedli še v pufrih z enako ionsko jakostjo (0,2 M), kjer smo opazovali le vpliv pHja na hitrost sproščanja učinkovine. Opazili smo rahel trend vpliva pHja v obeh sklopih medijev, vendar razlike glede na standardno deviacijo rezultatov niso dovolj velike, da bi ta vpliv z gotovostjo potrdili. V istih medijih smo naredili tudi hidrogele iz ksantana in jih ovrednotili z oscilacijsko reometrijo. Direktne korelacije med reološkimi lastnostmi in hitrostjo sproščanja nismo dokazali, saj je gel v prečiščeni vodi po konsistenci šibek, pa vendar sprošča učinkovino najpočasneje, gel v pH 1.2, ki ima najšibkejšo konsistenco pa sprošča učinkovino najhitreje. Iz tega lahko sklepamo, da na sproščanje učinkovine poleg konsistence gela vpliva tudi hitrost nastajanja gela ter njegova debelina. Pomembna pa je ugotovitev, da serije ksantana med sabo reološko niso ekvivalentne, zato naših rezultatov oscilacijskih testov ne gre posploševati za vsako serijo ksantana.

Ker direktne korelacije med reološkimi lastnostmi nismo našli, smo poskusili ugotoviti, ali obstaja razlika v hitrosti omočenja ogrodne tablete s posameznim medijem. Uporabljena metoda se je izkazala za neustrezno, saj so bile znotraj enega medija razlike prevelike, da bi lahko med seboj primerjali posamezne medije in njihov vpliv.

Zaključimo lahko, da na hitrost sproščanja učinkovine iz ogrodnih tablet ne vpliva primarno konsistenca gelskega plaščka, temveč hitrost nastajanja gela in njegova debelina.

SEZNAM OKRAJŠAV

AFM – Atomic force microscopy, mikroskopija na atomsko silo

FDA – Food and Drug Administration, ameriška agencija za hrano in zdravila

FO – farmacevtska oblika

G' – elastični modul

G'' – plastični modul

I – ionska moč

LVO – linearni viskoelastični odziv

p.c. – pulvis conservans, prašek za konzerviranje

PF – pentoksifilin

Xan – ksantan

1. UVOD

1.1. Ksantan

Ksantan je visokomolekularni anionski eksopolisaharid. Izloča ga po gramu negativna bakterija *Xanthomonas campestris*, ki je rastlinski parazit, z namenom, da jo ščiti pred visoko temperaturo in vplivom svetlobe. Odkrit je bil v petdesetih letih 20. stoletja. Od takrat ga intenzivno proučujejo zaradi njegovih pozitivnih lastnosti, zaradi katerih je primerna zamenjava za druge naravne in sintezne vodotopne gumije (1, 2). Pridobivajo ga s fermentacijo iz izbranega seva bakterije. Na leto ga proizvedejo 30.000 ton.

Uporablja se v:

- prehrabeni industriji kot zgoščevalo, stabilizator emulzij, nadomestek kalorični hrani,
- kozmetologiji pri proizvodnji zobnih past, krem,
- farmacevtski industriji kot stabilizator emulzij in suspenzij, npr. raztopine z barijevim sulfatom za rentgensko slikanje.

FDA je ksantan leta 1969 odobrila kot dodatek hrani pod oznako E415, leta 1988 pa je bil potrjen kot varen in sprejemljiv aditiv, katerih dnevne količine ni potrebno omejevati. Ne povzroča preobčutljivosti, ne draži kože ali oči (1, 2, 3).

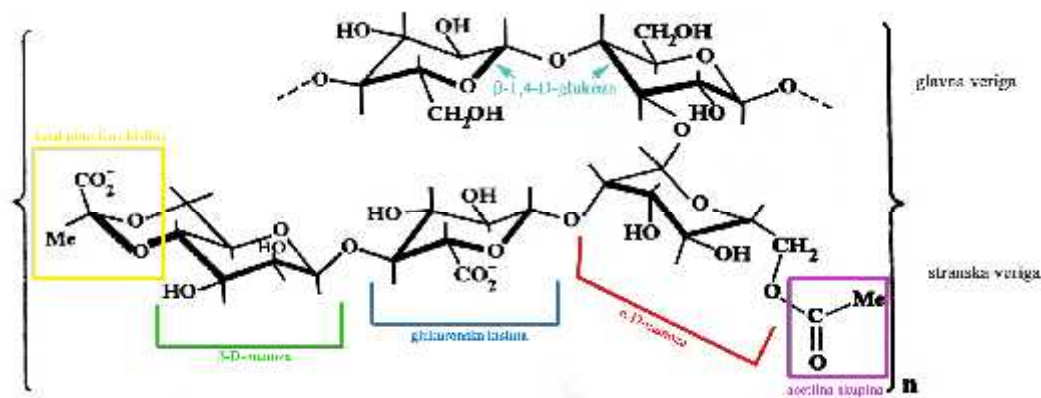
Ksantan obstaja v obliki natrijeve, kalijeve ali kalcijeve soli. Je bel ali rumenkasto bel sipek prašek (slika 1), dobro topen v vroči in hladni vodi ter praktično netopen v organskih topilih (4). Praškast ksantan je higroskopen. Na vlagi pride čez čas do hidrolize acetata in ketala piruvične kisline (1). Raztopine so zelo viskozne že pri nizkih koncentracijah in so psevdoplastični sistemi, saj viskoznost pada z naraščajočo strižno hitrostjo.



Slika 1: Praškast ksantan

Viskoznost je odvisna tudi od temperature priprave vzorca in temperature merjenja, koncentracije polimera, koncentracije soli in pHja. Raztopine so stabilne v širokem pH območju med 3 in 9. Pri pH nižjem kot 3 pride do hidrolize ketala piruvične kisline ter acetilne skupine, pri pH višjem od 9 pa pride do deacetilacije (1). pKa ksantana je 3.1 (5).

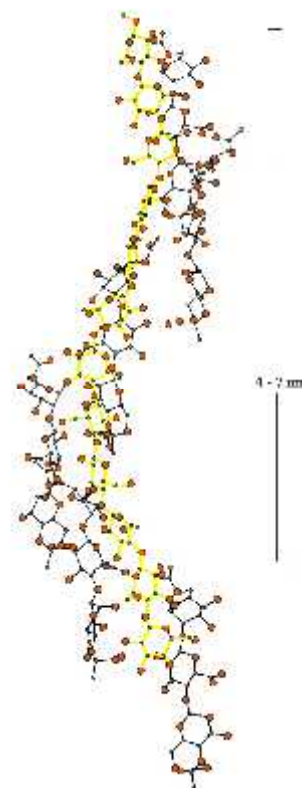
Ksantan je heteropolisaharid s **primarno strukturo** iz pentasaharidnega fragmetna in molsko maso v območju med 10^6 in 10^7 g/mol. Glavno verigo tvorijo z 1,4 vezjo povezane β -D-glukozne enote, kot pri celulozi. Na vsako 2. glukozo je pripet trisaharid, sestavljen iz 2 manoz, med kateri je vrinjena glukuronska kislina (slika 2).



Slika 2: Primarna struktura ksantana (6)

Približno polovica terminalnih β -D-manoz tvori preko hidroksilnih skupin na mestu 4 in 6 ketal s piruvično kislino. Neterminalna D-manoza ima lahko na hidroksilni skupini na mestu 6 acetilno skupino. Vsebnost acetilnih skupin in piruvatov pri ksantanu variira glede na pogoje fermentacije in glede na sev bakterije (1, 2, 6, 7). Glukuronska kislina in piruvatna skupina dajeta ksantanu anionski značaj (5). Evropska farmakopeja zahteva ne manj kot 1,5% piruvatnih skupin, računano na suho snov (4).

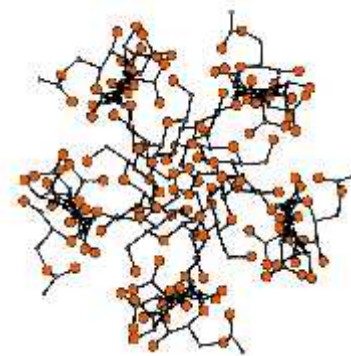
Za **sekundarno strukturo** ksantana (konformacijo ogrodja) je znano, da prehaja iz urejene v neurejeno obliko glede na ionsko moč in temperaturo. V destilirani vodi je ksantan pri 25°C v neurejeni obliki. To je popolnoma iztegnjena molekula zaradi elektrostatskih odbojev med stranskimi verigami. Molekule se lahko približajo in združujejo preko vodikovih vezi ter tvorijo šibko strukturiran material. Če ksantan v taki obliki segrejemo nad t.i. temperaturo »tališča« T_m (50-60°C), se molekule oddaljijo in zvijejo v naključno



Slika 3: 5x zavrt desnosučni heliks (6)

zvito vijačnico, kar je vidno na upadu viskoznosti (7).

Ob dodatku katerekoli soli pri 25°C pride do prehoda iz neurejene v urejeno obliko, kjer zavzame glavna veriga obliko vijačnice. Rentgenska praškovna analiza leta 1977 je pokazala, da je molekula ksantana desnosučna 5x zavita enojna vijačnica (sliki 3 in 4). Zaradi dodatka ionov pride do senčenja nabojev na nabitih stranskih verigah. Te se zato lažje prilegajo glavni verigi in jo preko vodikovih vezi



Slika 4: 5x zaviti heliks - pogled od zgoraj (6)

stabilizirajo v obliko rigidne palice (2, 6, 7). V takšni urejeni obliki je prehod v neurejeno stanje pri mnogo višjih temperaturah (80-100°C). Stabilizacija glavne verige s stranskimi je razlog visoke odpornosti ksantana na kemijsko in encimsko razgradnjo (1).

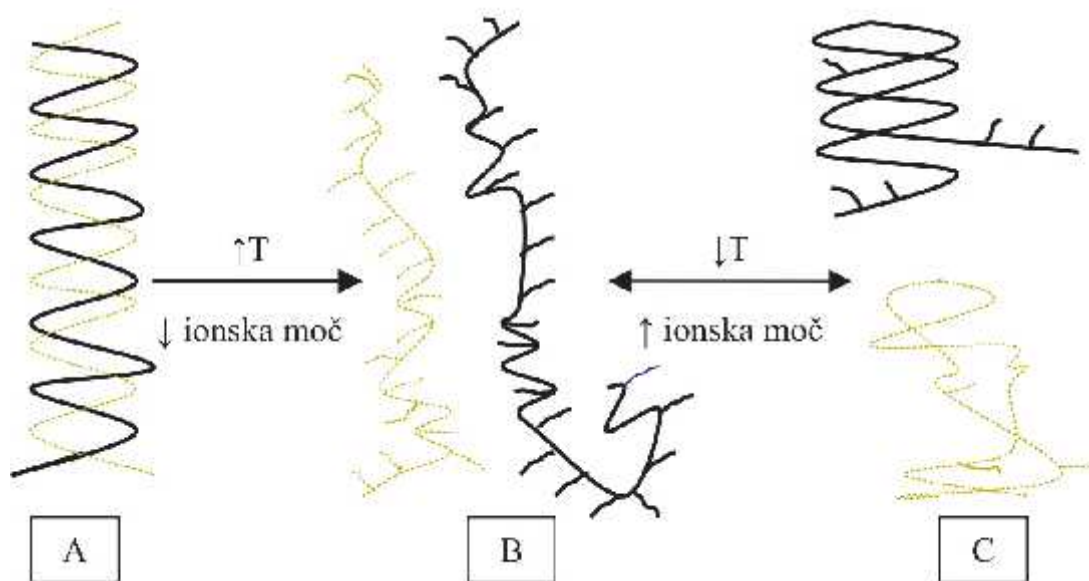
Temperatura prehoda (T_m) ksantana iz urejene v neurejeno (denaturirano) obliko je odvisna od koncentracije polimera, razmerja acetilnih in piruvatnih skupin in ionske moči raztopine (7). Acetilne skupine stabilizirajo urejeno obliko preko povezovanja stranskih verig z glavno z vodikovimi vezmi, med tem ko piruvatne skupine favorizirajo neurejeno obliko ksantana, saj je elektrostatski odboj med stranskimi verigami najmanjši, če so le-te iztegnjene stran od glavne verige (8).

Ali ima ksantan **terciarno strukturo** (v literaturi imenovano tudi sekundarna struktura) ali ne, je še vedno predmet raziskav. Ponovna rentgenska praškovna analiza leta 1980 je podala rezultate, da je ksantan dvojna vijačnica, sestavljena iz 2 molekul ksantana. Obstajajo dokazi različnih analiznih metod, ki podpirajo teorijo enojne ali dvojne vijačnice (7).

Po pregledu literature o ksantanu lahko ugotovimo, da obstaja več modelov terciarne konformacije. Najbolje sprejeta je teorija o obstoju ksantana v obliki dvojne vijačnice.

Mnogi avtorji navajajo to obliko kot nativni ksantan, ki pri segrevanju in/ali nizki ionski jakosti prehaja v neurejeno oz. denaturirano obliko in potem pri ohlajanju spet v urejeno, renaturirano obliko (slika 5).

Prehode iz dvojne v enojno verigo razlagajo sledeče: zaradi povišanja temperature in/ali znižanja ionske moči pride do prevlade odbojnih elektrostatskih sil med negativno nabitimi stranskimi verigami in posledično do denaturacije molekule. Stranske verige se ne prilegajo več osnovni verigi, ampak segajo od nje. Dvojna vijačnica se začne razpirati in pri določeni temperaturi povsem razpade (slika 5B).



Slika 5: Terciarna oblika ksantana: A-urejena (nativna), B-neurejena (denaturirana), C-urejena (renaturirana) (9)

To teorijo potrjujejo slike z AFM (10, 11) in rezultati masne spektroskopije. Slednji so potrdili, da je molekulska masa denaturiranega ksantana za polovico manjša od molekulske mase ksantana v nativni konformaciji zaradi razpada vijačnice, sestavljene iz dveh verig (12).

Prehod iz nativnega v denaturirano stanje je ireverzibilen (7). Ob ohlajanju oz. višanju ionske moči poteče ponovna tvorba dvojne vijačnice, vendar jo tokrat tvori ena sama molekula. Ta struktura je v primerjavi z nativno konformacijo bistveno manj popolna, saj ostane veliko zavojev ali delov verig, ki prosto segajo z osnovne strukture (11). Taki obliki pravimo renaturirana konformacija (slika 5C). Struktura je bila potrjena z rentgensko difrakcijo. Druge študije, ravno tako podprte z rezultati rentgenske difrakcije pa navajajo, da je renaturiran ksantan v obliki enojne, desnosične vijačnice. Prehod iz denaturirane v renaturirano obliko je reverzibilen. V renaturiranem stanju prevladujejo intramolekularne interakcije (9).

Poimenovanje »nativni« ksantan za suh, praškast ksantan ni popolnoma primerno, glede na to, da se povečini fermentacijsko brozgo ob izolaciji ksantana termično obdela, da se uniči bakterije (80-130°C, 10-20 min) (1). Torej pride že pri izolaciji do (vsaj delnega) prehoda v denaturirano obliko in nazaj. Študija na ksantanu, izoliranem iz fermentacijske brozge le z izobarjanjem in brez segrevanja je pokazala, da je nativni ksantan enojna vijačnica, ki po

segrevanju preide v enojno neurejeno obliko, ta pa v renaturirano obliko, ki je intramolekularna dvojna vijačnica (13).

Glede na to, da nativnega ksantana iz fermentacijske brozge ni mogoče analizirati brez predhodnih postopkov čiščenja, verjetno terciarna struktura ne bo nikoli dokončno dorečena. Kot kaže je lahko ksantan v obliki enojne ali dvojne vijačnice, ki lahko v vzorcu obstajata istočasno (12, 14), kar seveda oteži njegovo proučevanje. Delež ene ali druge oblike je odvisen predvsem od postopkov čiščenja nativnega ksantana po fermentaciji (12), pa tudi od vrste proučevanega vzorca, pogojev med fermentacijo in pogojev priprave raztopine za raziskavo (topilo, ionska moč, temperatura, sonifikacija) (7). Možno je, da je nativni ksantan, kot ga sintetizira bakterija, v obliki enojne 5x zavite vijačnice (13), vendar molekule tekom izolacije in sušenja med sabo interagirajo in tvorijo dvojne in celo trojne vijačnice, ki dalje tvorijo agregate (1, 2, 10).

Prav tako je terciarna struktura verjetno odvisna tudi od koncentracije ksantana v raztopini. Pri višjih koncentracijah ob segrevanju ne pride do popolnega razprtja dvojne vijačnice, zato je manj verjetno, da se pri renaturaciji tvorijo dvojne vijačnice znotraj ene same molekule in bolj verjetno, da se med sabo poveže več molekul ksantana, ki s svojimi prepleti tvorijo strukturo gela (8). To potrjujejo rezultati raziskave, kjer so preučevali integriteto 2% gela iz ksantana v odvisnosti od časa segrevanja gela in v odvisnosti od temperature, na katero so gel segreli. Ugotovili so, da je gel bolj čvrst, če je bil dlje časa segret na višji temperaturi (92°C, v primerjavi s 77 in 67°C). Razlog za to je verjetno razplet večjega deleža dvojnih vijačnic, ki so se po ohlajanju ponovno vzpostavile med sosednjimi molekulami in tvorile bolj čvrsto gelsko rešetko (15). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Fujiwara in sodelavci, ki so 2% gel dlje časa segrevali na 40°C in ga potem 1 dan pustili na 5°C v hladilniku. Čvrstost je naraščala s časom segrevanja (16).

Prehod denaturirane oblike v intramolekularno dvojno vijačnico je bolj verjeten pri nižjih koncentracijah, ko molekule niso dovolj blizu, da bi interagirale med sabo in tvorile dvojni heliks (11).

Po podrobnem pregledu literature lahko ugotovimo, da je struktura ksantana zelo kompleksna in še zdaleč ni povsem raziskana.

1.2. Hidrogeli

Hidrogeli so tridimenzionalne hidrofilne mreže polimerov, sposobne nabrekanja v vodi in bioloških tekočinah. V nabreklem stanju vsebujejo veliko tekočine. Prednosti hidrogelov kot biomaterialov so v njihovi podobnosti z živim tkivom: visoka vsebnost vode, elastičnost in mehka konsistenca ter nizka medpovršinska napetost z vodo in biološkimi tekočinami.

Na strukturo gela vpliva več dejavnikov. Najpomembnejši sta narava monomerov ter posledično kemizem polimera, struktura in morfologija nastale mreže (gostota premreženosti ...), lahko pa nanjo vplivajo tudi dejavniki okolja kot so pH, ionska moč in temperatura (17). Zaradi prisotne kemijske ali fizikalne premreženosti polimernih molekul jih opisujemo kot netopne. Fizikalna premreženja so lahko prepleti, kristalna področja ali šibke asociacijske povezave preko Van der Waalsovih sil ali vodikovih vezi. Premreženost je ključna za strukturo in fizikalno integriteto hidrogela.

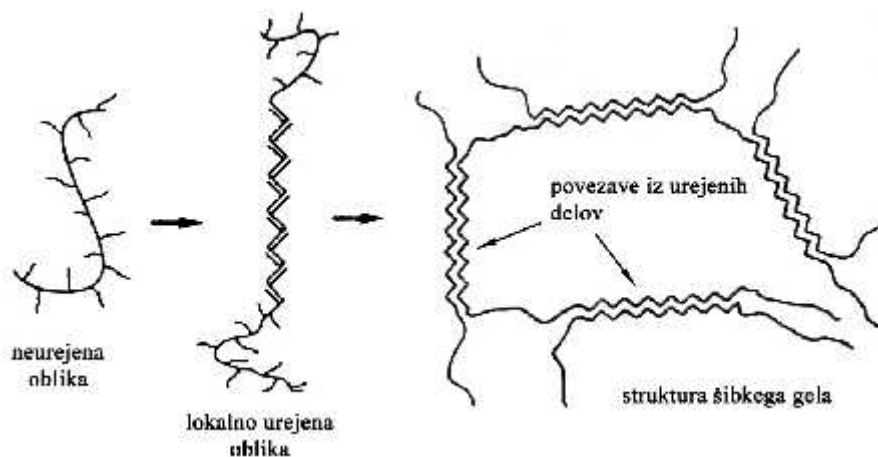
Voda, ki je ujeta v hidrogelski rešetki, je lahko vezana (na hidrofilne skupine polimera) ali prosta (vsrkana v hidrogel zaradi osmotske sile). Za raztapljanje zdravilne učinkovine in njeno difuzijo skozi gel je bistva prosta voda (18).

Prazne prostore v hidrogelih je možno napolniti z učinkovino in jih aplicirati npr. bukalno, nazalno, vaginalno pa tudi subkutano ali v bližino tarče preko kirurške vstavitve (17). Prav tako pa lahko dosežemo podaljšano sproščanje iz ogrodnih tablet, če uporabimo kot pomožno snov tako snov, ki tvori hidrogel. V primeru naših ogrodnih tablet pride zaradi nabrekanja ksantana do tvorbe hidrogelske plasti, ki predstavlja bariero za difuzijo učinkovine in s tem nadzira sproščanje le-te iz tablete (5).

Raztopine ksantana so hidrogeli v širšem pomenu besede, saj niso kemijsko premreženi. Literatura jih poimenuje tudi »weak-gel« oz. šibek gel (6). Ob stiku z vodnim medijem pronica tekočina v praškaste delce ksantana. Molekule ksantana se začnejo razpletati iz urejene dvojnovijske oblike in tvoriti vodikove vezi z vodnimi molekulami. Prav tako pride do prepletov med verigami ksantana in tvorbe intermolekularnih povezav s sosednjimi verigami (5).

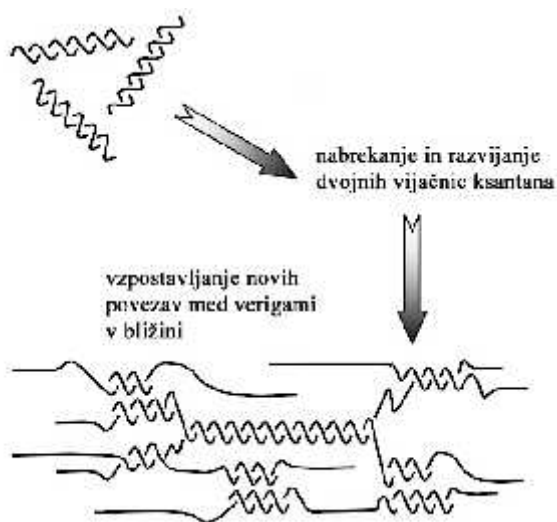
V literaturi obstajata dva modela strukture hidrogela iz ksantana. Slika 6 ponazarja strukturo šibkega gela iz molekul ksantana, ki nastane zaradi vodikovih in Van der

Waalsovih vezi med urejenimi regijami posameznih molekul (6). Pod vplivom striga se posamezne molekule ksantana orientirajo v smeri delovanja strižne sile, kar ima za rezultat upad viskoznosti (pseudoplastični sistem).



Slika 6: Asociacije lokalno urejenih delov molekul ksantana v strukturo šibkega gela (6)

Druga razlaga za strukturo hidrogela iz ksantana pa je narejena na podlagi AFM raziskav, ki so pokazale, da so raztopine ksantana zgrajene iz takoimenovanih mikrogelov. To so agregati večih molekul ksantana, ki med sabo tvorijo premreženja v obliki dvojnih vijačnic (10, 19).



Slika 7: Nabrekanje, razvijanje dvojnih vijačnic in zvijanje novih med drugimi verigami (povzeto po 19)

Prepoenostavljeno je obravnavati raztopine komercialno dostopnega ksantana kot molekulske disperzije dvojnih vijačnic ali neurejenih vijačnic. Prava struktura hidrogela je

verjetno nekje vmes med sliko 6 in 7. Delež dvojnih vijačnic je odvisen od postopka priprave gela (segrevanje nad T_m povzroči razpiranje dvojne vijačnice, ohlajanje vzpostavitve novih) in ionske moči raztopine (več soli favorizira dvojno vijačnico). Da tvorijo gelsko rešetko tudi premreženja iz dvojnih vijačnic, potrjujejo raziskave, kjer je bil gel iz ksantana, ki je bil segret in nato ohlajen, bolj čvrst kot gel, ki ni bil termično obdelan (15, 20).

1.3. Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem

Farmacevtska oblika (FO) s prirejenim sproščanjem je tista, pri kateri se hitrost ali mesto sproščanja zdravilne učinkovine (ali zdravilnih učinkovin) razlikujeta od hitrosti ali mesta sproščanja pri farmacevtski obliki z neprirejenim sproščanjem, ki jo apliciramo po isti poti. Prirejeno sproščanje omogoča posebna sestava ali posebna farmacevtska oblika ali poseben postopek izdelave.

Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem vključujejo farmacevtske oblike s podaljšanim, z zakasnelim in s pulzirajočim sproščanjem (21).

Razloga za razvoj FO s prirejenim sproščanjem sta povečati terapevtsko učinkovitost in sprejemljivost za bolnika.

1.3.1. Podaljšano sproščanje iz hidrofilnih ogrodnih tablet

Farmacevtska oblika s podaljšanim sproščanjem je tista, ki počasneje sprošča zdravilno učinkovino (zdravilne učinkovine) kot farmacevtska oblika z neprirejenim sproščanjem, ki jo apliciramo po isti poti. Podaljšano sproščanje omogoča posebna sestava ali posebna farmacevtska oblika ali poseben postopek izdelave (21).

Tekom zadnjih let je bilo veliko pozornosti namenjene formulacijam, ki bi sproščale učinkovino z nadzorovano hitrostjo, skozi daljši čas. Cilji oblikovanja takih FO so:

- zmanjšati pogostost odmerjanja in tako poveča sprejemljivost s strani bolnikov,
- povečati učinkovitost zdravilne učinkovine z zadrževanjem farmacevtske oblike na mestu delovanja,

- znižati odmerke in hkrati vzdrževati optimalno koncentracijo učinkovine v plazmi, ter na tak način zmanjšati neželene učinke, ki so povezani z nihanjem plazemskih koncentracij »klasičnih« FO (22, 23).

1.3.2. Nabrekanje hidrofilnih ogrodnih tablet

Velika večina FO s podaljšanim sproščanjem je ogrodnih tablet, sestavljenih iz hidrofilnega polimera, ki v stiku z vodnim medijem tvori gel, in praškaste učinkovine. Gel, ki nastane ob nabrekanju polimera, je difuzijska bariera za sproščanje učinkovine. Prednost hidrofilnih ogrodnih tablet je enostavnost njihove izdelave (direktno tabletiranje praškaste zmesi) in njihova varnost, saj obstaja zelo majhna verjetnost, da bi taka tableta sprostila ves odmerek naenkrat (ti. dose dumping) (22, 23).

Voda ali telesne tekočine hidratirajo hidrofilno ogrodno tableto, ki vsebuje učinkovino. Okoli suhega tabletnega jedra se tvori hidrogelski ovoj. Sproščanje učinkovine je kompleksen proces, na katerega vpliva pretežno gelski ovoj. Njegova struktura je odvisna od medija sproščanja, tipa polimera, površine FO in termodinamskih parametrov (24).

Na začetku predstavlja osrednji del ogrodne tablete rezervoar učinkovine. Polimer je v steklasti obliki, saj je pod temperaturo steklastega prehoda T_g . Ko voda prodira v tableto, se polimerne verige hidratirajo in z večanjem deleža vode se temperatura steklastega prehoda zniža, tako da polimer preide v elastično stanje. Nastaja elastični hidrogel.

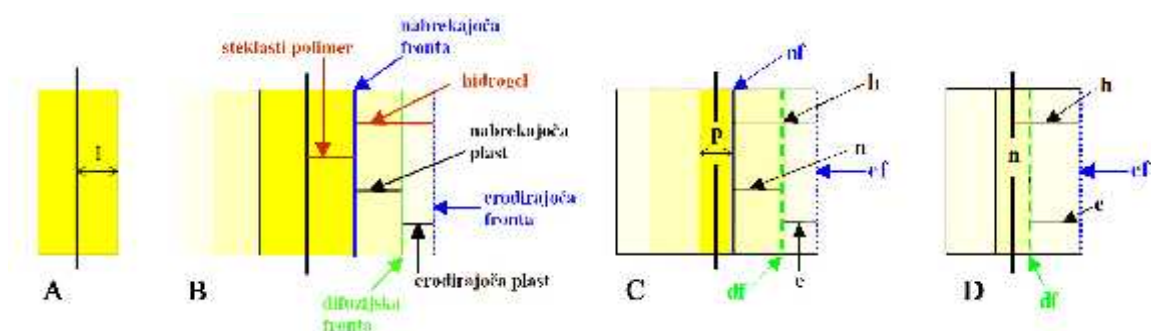
Plasti, ki nastanejo znotraj ogrodne tablete tekom hidratacije, so pomembne za nadzorovano sproščanje učinkovine (slika 8). Plasti ločijo med sabo:

- meja nabrekanja, ki se nahaja med suhim polimerom in gelom,
- meja difuzije med neraztopljeno in raztopljeno učinkovino v gelu in
- meja erozije, ki se nahaja med ogrođjem in medijem za raztapljanje (slika 8).

Na začetku hidratacije ogrodne tablete se meja nabrekanja pomika proti sredini tablete, meja erozije in difuzije pa stran od sredine. Po določenem času se vzpostavi ravnotežje med nabrekanjem in erozijo. Erozijski proces odplavljanja polimernih verig s površine tablete. Ko je tableta v celoti omočena, steklasto jedro izgine in z njim tudi meja nabrekanja. Meja erozije in difuzije se pomikata proti sredini tablete, dokler tableta ne izgine.

Debelina gelskega sloja, ki predstavlja bariero za sproščanje učinkovine, je odvisna od penetracije vode, relaksacije verig polimera in erozije. Na začetku prevladuje penetracija vode, ki povzroči nabrekanje polimera, nato se nabrekanje s časom upočasni, saj postane vodna penetracija zaradi povečane difuzijske razdalje manjša. Pridemo v fazo ravnotežja, kjer sta hitrost vodne penetracije in relaksacija polimernih verig podobni. V tej fazi je debelina gelske plasti konstantna. V nadaljevanju prevladuje erozija, zato se debelina gelske plasti manjša.

Sproščanje učinkovine (slika 8 in 9) iz ogrodnih tablet je odvisno od lastnosti nastalega gelskega sloja – debelina, struktura in morfologija gela, od lastnosti učinkovine – velikost, hidrofilnost, lipofilnost, topnost..., interakcij med raztapljanjem in difuzijo učinkovine ter od erozije. Hidrofilne zdravilne učinkovine, ki so vgrajene v ogrodne tablete, se v glavnem sproščajo z difuzijo, lipofilne pa z erozijo.



Slika 8: Shematski enodimenzionalni prikaz procesa difuzije vode v tableto in raztapljanja polimernega ogrodja tablete.

A – začetna debelina tablete l ;

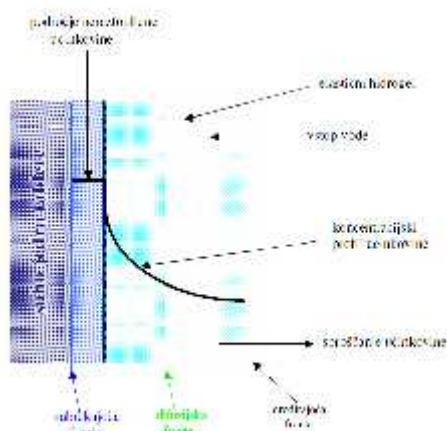
B – začetni proces nabrekanja, kjer na meji med polimerom in topilom nastaja elastični hidrogel (h), znotraj katerega ločimo nabrekajočo (n) in erodirajočo (e) plast, v jedru tablete pa je še prisoten steklasti polimer (p). Med plastmi ločimo tri fronte: nabrekajoča fronta (nf), difuzijska fronta (df) in erodirajoča fronta (ef). Nabrekajoča plast se pomika proti notranjosti tablete, steklasti polimer pa izgineva.

C – Začetek procesa raztapljanja ogrodja, kjer se steklasta plast polimera in nabrekajoča plast manjšata. Zaradi erozije se tabletno ogrodje manjša.

D – po določenem času je vidna še samo tanka nabrekajoča plast in debelejša erodirajoča. Postopoma polimerno ogrodje v celoti erodira (22).

Ker je na začetku za tvorbo gelske plasti potreben določen čas, je na začetku sproščanje učinkovine hitrejše kot kasneje, ko je že prisoten gelski plašč, ki ovira nadaljnje sproščanje. Nato se polimerne molekule na površini hidratirajo, zato se začnejo relaksirati in s tem je olajšano sproščanje učinkovine. Topilo prehaja proti jedru tablete in tudi v notranjosti se tvori gelski sloj. V tej fazi je debelina gelske plasti konstantna, saj je nastajanje v ravnotežju z odplavljanjem in tudi sproščanje učinkovine je konstantno. Ko je

celotna tableta hidratirana, prevladuje erozija, zato je sproščanje učinkovine pospešeno (22, 23, 24).



Slika 9: Fronte pri nabrekanju in koncentracijski gradient učinkovine (22)

Glede na njegove lastnosti bi lahko bil ksantan ustrezna pomožna snov za farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem. Je biokompatibilen, relativno hitro nabreka in tvori dokaj čvrst gel. Že majhne količine ksantana samega ali v kombinaciji z galaktomananom signifikantno upočasnijo sproščanje učinkovine iz tablete, kar bi omogočilo formulacijo farmacevtske oblike z velikim odmerkom učinkovine brez prevelikega vpliva na maso FO zaradi dodatka ksantana.

Ksantan se je pokazal kot ustrezna pomožna snov tudi pri študijah *in vivo*, saj zagotavlja konstantne plazemske koncentracije učinkovine, zato je zanimiv s stališča ekonomske in terapevtske prednosti. Tekom raztapljanja pride ob stiku z medijem praktično takoj do tvorbe gelskega sloja, ki je dovolj močan, da prepreči prehiter razpad tablete in takoimenovan "burst efekt" in signifikantno upočasnijo sproščanje učinkovine iz tablete za daljši čas (5).

1.4. Reologija

Reologija je veda, ki proučuje deformacije in tok snovi. Omogoča ovrednotenje mehanskih lastnosti predvsem tekočin in poltrdnih snovi, pa tudi trdnih snovi. Pomaga razjasniti notranjo strukturo snovi, kar je pomembno tudi v farmaciji. S poznavanjem reoloških lastnosti snovi lahko npr. sledimo različnim kemijskim reakcijam, razlagamo lahko različne pojave koloidnih sistemov, vrednotimo kvaliteto vstopnih surovin in produktov pri

industrijskih procesih, interpretiramo in kontroliramo laboratorijske poskuse, kontroliramo delovanje proizvodnih naprav in drugo.

Ime je grškega izvora: beseda *rheos* pomeni tok, *logos* pa vedo (25, 26, 27).

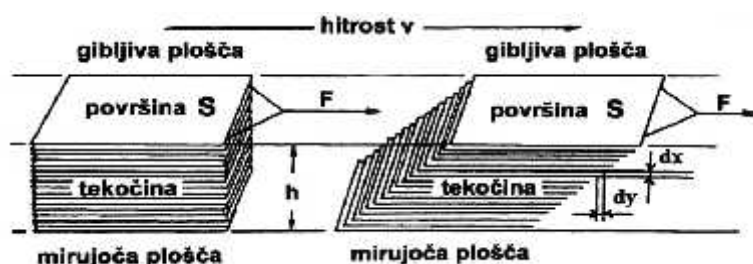
Vse vrste strižnega obnašanja snovi, ki jih lahko opisujemo z reologijo, lahko gledamo kot da so med dvema ekstremoma: tok idealno viskoznih tekočin na eni in deformacija idealno elastičnih trdnih snovi na drugi strani. Obnašanje vseh realnih snovi temelji na kombinaciji obojega – viskoznega in elastičnega dela, zato se imenujejo viskoelastične snovi (25).

Reometrija je merilna tehnika, s katero pridobivamo reološke podatke. Lastnosti trdnih snovi in tekočin lahko proučujemo z rotacijskimi testi, viskoelastične lastnosti snovi pa se vrednoti s testi lezenja in obnove in oscilatornimi testi (25).

1.4.1. Idealno viskozne tekočine

Osnovne reološke parametre idealno viskoznih tekočin lahko predstavimo s pomočjo enostavnega modela. Med dvema vzporednima ploščama s površino S [m²] in medsebojno razdaljo h [m] je preiskovana tekočina. Spodnja plošča miruje, zgornjo pa premikamo z določeno silo F [N] in hitrostjo v [m/s] (27). Predpostavimo, da se vzorec adherira na obe plošči in ne zdrsava in da je tok laminaren (25).

Pri laminarnem toku, ki nastane zaradi delovanja sile F , se posamezne tekočinske plasti gibljejo z različnimi hitrostmi. To pomeni, da se plast, ki je od zgornje odmaknjena za dx , giblje s hitrostjo, ki je za dv manjša od zgornje (26, 27).



Slika 10: Model za razlago osnovnih reoloških parametrov (27).

Definiramo:

- strižna deformacija γ (strig, shear strain)

Sila, ki deluje v smeri ploskve, je *strižna sila*. Odgovorna je za spremembo oblike telesa. Delovanje strižne sile povzroči določen premik plasti, kar opišemo s *strižno deformacijo* (γ , brez enote):

$$\gamma = \frac{dy}{dx} \quad y - \text{premik}, \quad x - \text{višina oz. debelina} \quad /1/$$

Po prenehanju delovanja mehanske sile se lahko atomi oz. molekule vrnejo v prvotni položaj. V tem primeru govorimo o *prožni* ali elastični deformaciji, ki pomeni razteg kemijskih vezi med atomi. Če pa se atomi med obremenjevanjem preveč odmaknejo in se niso sposobni vrniti na prvotno mesto, ali če pride do njihovega preurejanja, in se zaradi tega prekinajo kemijske vezi, gre za *plastično* oz. *trajno* deformacijo. Vrsta deformacije je tako odvisna od zgradbe sistema ter od velikosti in trajanja deformacije (27).

- strižna napetost τ (shear stress)

Je kvocient strižne sile F in površine S .

$$\tau = \frac{F}{S} \quad [\text{Pa} = \text{N} \cdot \text{m}^2] \quad /2/$$

- strižna hitrost $\dot{\gamma}$ (D) (shear rate)

Je mera tekočinske deformacije oz. kvocient med diferencialom hitrosti in razmikom med sosednjima tekočinskima plastema.

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dx} = \frac{v}{h} \quad [\text{s}^{-1}] \quad /3/$$

Če imamo idealno viskozno tekočino, laminaren tok in je vzorec adheriran na obe plošči, je dv konstanta, saj se $v(h)$ zmanjšuje linearno. Ob predpostavki, da imajo vse plasti tekočine enako debelino dx , je $\dot{\gamma}$ konstanta čez celo debelino vzorca h (25).

- viskoznost η (viscosity)

Različni deli tekočine se v splošnem gibljejo z različnimi hitrostmi, kar pomeni, da se sosednje tekočinske plasti gibljejo relativno druga glede na drugo. Zaradi tega se med njimi izrazi t.i. *notranje trenje* ali *viskoznost*, ki je tem večje, čim večja je razlika hitrosti sosednjih plasti, to je čim bolj se hitrost tekočine spreminja s krajem. Notranjega trenja ni,

če je hitrostno polje homogeno – če se vsak tekočinski delec giblje enako hitro in v enaki smeri.

Viskoznost je posledica medmolekularnih sil, s katerimi molekule iz ene plasti učinkujejo na molekule iz sosednje plasti, ter posledica preskakovanja molekul iz hitrejše plasti v počasnejšo in obratno. Oboje skupaj povzroča, da hitrejša plast vleče počasnejšo s seboj z viskozno silo F , obenem pa počasnejša plast zadržuje hitrejšo z enako veliko silo (28).

Ločimo (27):

- *dinamično viskoznost*, ki je sorazmernostni faktor med strižno napetostjo in strižno hitrostjo in predstavlja notranjo upornost tekočin pri pretakanju. Opisuje jo Newtonov zakon:

$$\frac{F}{S} = \eta \cdot \frac{dy}{dx} \Rightarrow \tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad [\text{Pa} \cdot \text{s}] \quad /4/$$

- *kinematično viskoznost*, ki je kvocient med dinamično viskoznostjo in gostoto sistema pri točno določeni temperaturi:

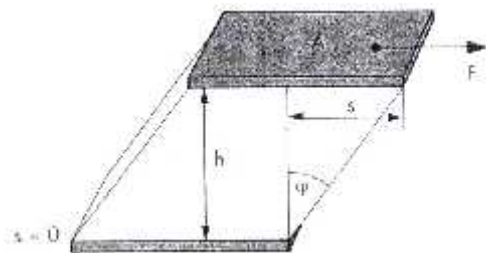
$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad [\text{m}^2/\text{s}] \quad /5/$$

1.4.2. Idealno elastične snovi (idealno trdno telo)

Idealno elastične snovi se pod vplivom strižnih sil deformirajo elastično. Njihov odziv na deformacijo lahko ponazorimo z odzivom vzmeti: ob deformaciji se v snovi shrani z deformacijo vnesena energija, ki omogoča popolno obnovo telesa po prenehanju delovanja strižnih sil (26).

Tudi tukaj za definicijo osnovnih pojmov uporabimo model dveh vzporednih plošč, enako kot pri idealno viskoznih tekočinah.

- **strižna deformacija γ (strig, shear strain)**



Slika 11: Strižna deformacija snovi na modelu dveh vzporednih plošč (25).

Strižna sila deformira snov iz prvotne lege za kot φ (slika 11). Strižna deformacija je tako definirana z:

$$\gamma = \frac{s}{h} = \tan \varphi \cong \varphi \quad /6/$$

- **strižna hitrost $\dot{\gamma}$ (D) (shear rate)**

Strižna hitrost v primeru poltrdnih in trdnih sistemov $\dot{\gamma}$ je obravnavana kot odvod deformacije $d\gamma$ po času dt (25, 27).

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} \quad [s^{-1}] \quad /7/$$

- **strižni modul G (shear modulus)**

Pri elastičnem obnašanju je strižna mehanska napetost v linearni zvezi z deformacijo. To pomeni, da ob razbremenitvi napetost v snovi popusti in deformacija se sorazmerno zmanjša. To zvezo opisuje *Hookov zakon*:

$$\tau = \frac{F}{S} = G \cdot \varphi \Rightarrow G \cdot \gamma \quad /8/$$

φ - kot zasuka (za majhne kote je $\varphi \cong \tan \varphi = \gamma$)

G - strižni modul (merilo odpornosti oz. rigidnosti telesa proti spremembi oblike).



Slika 12: Odvisnost strižne napetosti od velikosti deformacije – Hookov zakon (28).

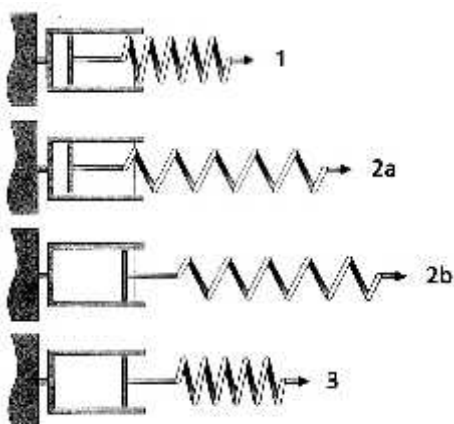
Hookov zakon velja le v tistem območju, ko je mehanska napetost premo sorazmerna z deformacijo (slika 12). Ko pa majhno povečanje zunanje sile povzroči relativno veliko deformacijo, ne pa tudi napetosti, smo že v območju plastične deformacije (27).

1.4.3. Viskoelastične snovi

To so snovi, ki se obnašajo viskozno in elastično hkrati. Viskozna komponenta sledi Newtonovemu zakonu (/4/), elastična pa Hookovemu (/8/). Viskoelastične tekočine se obnašajo drugače kot viskoelastične trdne snovi, oboje pa imajo zakasnjjen odziv na deformacijo in zakasnjjen odziv na prenehanje deformacije (25).

Viskoelastične tekočine

Zanje velja *Maxwellov mehanski model*, ki je sestavljen iz zaporedno vezane dušilke

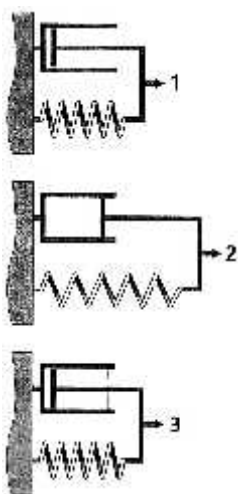


Slika 13: Obnašanje viskoelastičnih tekočin ob deformaciji (25).

(predstavlja viskozno komponentno) in vzmeti (elastična komponenta) (slika 13). V začetku sta obe komponenti nedeformirani (slika 13, 1). Nato se na začetku delovanja sile deformira le vzmet (slika 13, 2a), ob nadaljnjem delovanju sile se prične premikati tudi bat v dušilki – vzorec se deformira do določene stopnje glede na velikost sile (slika 13, 2b). Ko sila preneha delovati, se vzmet vrne v prvotno lego, dušilka pa ne, vzorec ostane delno deformiran (slika 13, 3) (25). Strižna napetost v obeh elementih je

enaka celotni na sistem delujoči strižni napetosti, deformacija celotnega sistema pa je enaka vsoti deformacij obeh komponent (26).

Viskoelastične trdne snovi



Slika 14: Obnašanje viskoelastičnih trdnih snovi ob deformaciji (25).

Predstaviti se jih da s *Kelvin-Voigtovim mehanskim modelom*, kjer sta dušilka in vzmet vezani vzporedno (slika 14). Deformacija dušilke je v tem primeru enaka deformaciji vzmeti, med tem ko je napetost, ki deluje na sistem, porazdeljena enakomerno po obeh (26). Na začetku sta obe komponenti nedeformirani (slika 14, 1). Ob delovanju sile dušilka upočasnjuje raztezanje vzmeti (slika 14, 2). Ko sila preneha delovati, se sistem po določenem času vrne v začetni položaj (dušilka upočasnjuje krčenje vzmeti) (slika 14, 3) (25).

1.4.4. Merjenje viskoelastičnih lastnosti sistemov

Z reometrijo merimo in kasneje vrednotimo reološke parametre. Poznamo več različnih metod in naprav, s katerimi lahko merjene sisteme ocenimo. Za določanje viskoznosti tekočin lahko uporabljamo enostavne viskozimetre npr. pretočne, kroglične, pri bolj konsistentnih sistemih pa za opredelitev viskoznosti oziroma viskoelastičnih lastnosti uporabljamo rotacijske in oscilacijske viskozimetre (25, 26).

Dinamični – oscilatorni testi

Oscilatorno testiranje z dovolj majhno amplitudo deformacije omogoča določanje viskozne in elastične komponente viskoelastične snovi pri nedestruktivnih strižnih pogojih. Pri meritvi se strižna deformacija s časom spreminja sinusno z določeno frekvenco in amplitudo. Kot posledica časovno odvisne deformacije se bo v snovi vzpostavila časovno odvisna napetost, ki se prav tako sinusno spreminja, vendar je glede na deformacijo zamaknjena za določen fazni zamik.

Glede na način izvajanja meritev poznamo dve osnovni merilni tehniki, ki se razlikujeta glede na nastavljene in merjene parametre pri oscilaciji. Pri reometrih z nastavljivo strižno hitrostjo (in deformacijo) je nastavljena količina deformacija, merimo pa odgovarjajočo strižno napetost. Pri reometrih z nastavljivo strižno napetostjo pa merimo odgovarjajočo deformacijo (26).

Tudi oscilatorne teste razlagamo z modelom dveh vzporednih plošč, kjer spodnja miruje, zgornja pa je pripeta na obod vrtečega se kolesa in niha levo-desno.

Za *idealno elastično* snov velja *Hookov zakon*:

$$\tau(t) = G^* \cdot \gamma(t) \quad /9/$$

G^* je kompleksni strižni modul [Pa], ki je merilo odpornosti proti spremembi oblike, $\tau(t)$ je časovno odvisna strižna napetost, $\gamma(t)$ pa časovno odvisna deformacija (26).

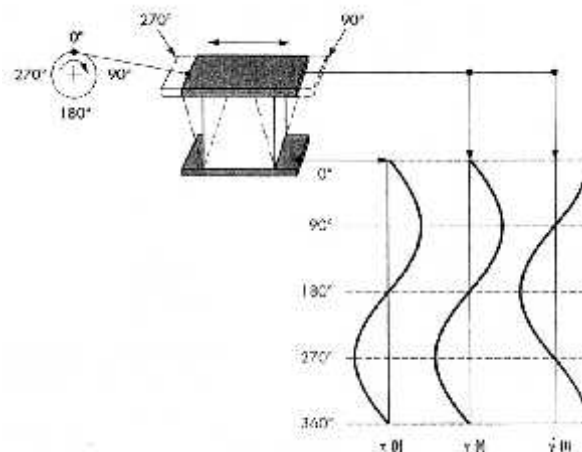
Ker je $G^* = \tau(t) / \gamma(t) = \text{konst.}$, sta obe sinusni krivulji v fazi, med njima ni faznega zamika (slika 15). Strižna deformacija se s časom spreminja po enačbi:

$$\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t \quad /10/$$

in ker je $\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$, se strižna hitrost spreminja po enačbi:

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma_A \cdot \omega \cdot \cos \omega t$$

/11/



Slika 15: Sinusni in kosinusna krivulja časovno odvisnih funkcij strižne napetosti $\tau(t)$, strižne deformacije $\gamma(t)$ in strižne hitrosti $\dot{\gamma}(t)$ za idealno elastično snov (25).

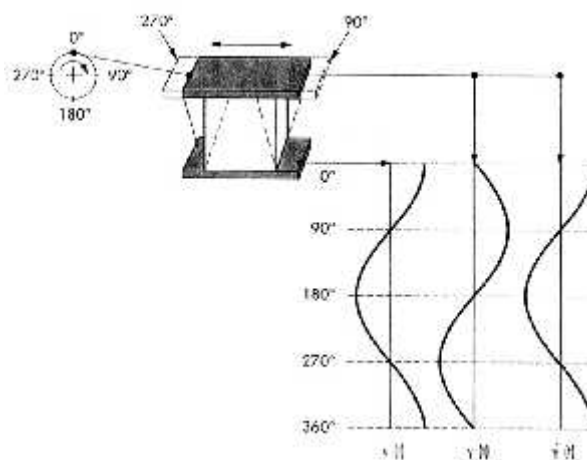
Za *idealno viskozno* snov velja *Newtonov zakon*:

$$\tau(t) = \eta^* \cdot \dot{\gamma}(t)$$

/12/

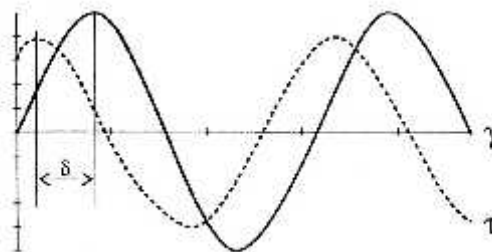
η^* predstavlja kompleksno viskoznost [Pa·s]. Ker je $\eta^* = \tau(t) / \dot{\gamma}(t) = konst.$, je strižna napetost vedno v fazi s strižno hitrostjo (slika 16).

Če vsilimo vzorcu sinusno spreminjajočo deformacijo $\gamma(t)$, sta $\tau(t)$ in $\dot{\gamma}(t)$ kosinusni krivulji, fazni zamik je torej $\delta = 90^\circ$ (oz. $\pi/2$ v radianih) (25).



Slika 16: Sinusna in kosinusni krivulji časovno odvisnih funkcij strižne napetosti $\tau(t)$, strižne deformacije $\gamma(t)$ in strižne hitrosti $\dot{\gamma}(t)$ za idealno viskozno snov (25).

V primeru realnega **viskoelastičnega** sistema je kot faznega zamika $0^\circ \leq \delta \leq 90^\circ$. Odziv realne viskoelastične snovi pri oscilacijskem testu na vsiljeno sinusno nihanje strižne deformacije, je nihanje strižne napetosti z enako frekvenco, drugačno amplitudo in zamaknjeno za fazni zamik δ (slika 17) (26).



Slika 17: Funkcija nastavljene strižne deformacije $\gamma(t)$ in rezultirajoča funkcija strižne napetosti $\tau(t)$, ki ima enako frekvenco in fazni zamik δ (25).

Pri testih z nastavljivo strižno deformacijo se ta spreminja po enačbi: $\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t$, rezultat meritve pa je funkcija strižne napetosti $\tau(t) = \tau_A \cdot \sin(\omega t + \delta)$. /13/

Pri testih z nastavljivo strižno napetostjo se ta spreminja po enačbi: $\tau(t) = \tau_A \cdot \sin \omega t$, rezultat meritve pa je strižna deformacija $\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin(\omega t + \delta)$ (25).

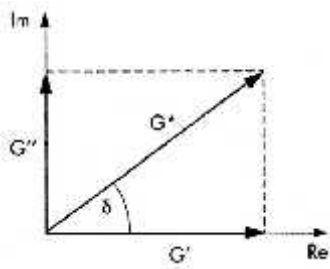
Definicije pojmov pri oscilacijskih meritvah

Kompleksni strižni modul G^* je vektorska vsota 2 komponent: *elastičnega* in *plastičnega modula* (slika 18, enačba /13/).

- **Elastični modul ali modul shranjene energije** (G' , storage modulus, [Pa]) je merilo elastičnega obnašanja sistema in karakterizira njegovo upiranje preoblikovanju. Podaja informacijo o shranjeni energiji med obremenitvijo vzorca, ki je po obremenitvi v celoti na razpolago za vzpostavitev prvotne oblike vzorca.

- **Viskozni modul ali modul energijskih izgub ali plastični modul** (G'' , loss modulus, [Pa]) opisuje viskozno obnašanje sistema. Predstavlja tisto energijo, ki se med procesom deformacije ne ohrani. Del energije se porabi za preoblikovanje notranje strukture vzorca, del pa se izgubi v obliki toplote, nastale zaradi trenja med molekulami oz. delci v snovi.

- **Faktor izgube** ($\tan \delta$, loss factor, damping factor, [brez enote]) je kvocient med viskoznim in elastičnim modulom (enačba /14/). Predstavlja razmerje med oddano in shranjeno energijo oz. razmerje med viskoznim in elastičnim delom vzorca (25, 26).



$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad /14/$$

$$\operatorname{tg} \delta = G'' / G' \quad /15/$$

Slika 18: Vektorski diagram G' , G'' in njune vsote G^* (25).

G' in G'' lahko izpeljemo iz enačb (26):

$$\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t \quad /10/$$

$$\tau(t) = \tau_A \cdot \sin(\omega t + \delta) \quad /13/$$

$$\tau(t) = G^* \cdot \gamma(t) \Rightarrow G^* = \tau_A / \gamma_A \quad /9/$$

Z upoštevanjem trigonometričnih funkcij dobimo iz enačb /10/ in /13/:

$$\tau(t) = \tau_A \cdot [\cos \delta \cdot \sin(\omega t) + \sin \delta \cdot \cos(\omega t)] \quad /16/$$

Sinusni del funkcije predstavlja elastično komponento, kosinusni del pa viskozno komponento viskoelastičnega odziva. Če vpeljemo še enačbo /9/, dobimo:

$$\tau(t) = G^* \cdot \gamma_A \cdot \cos \delta \cdot \sin(\omega t) + G^* \cdot \gamma_A \cdot \sin \delta \cdot \cos(\omega t) = \gamma_A \cdot [G' \cdot \sin(\omega t) + G'' \cdot \cos(\omega t)] \quad /17/$$

Pri tem smo definirali frekvenčno odvisni funkciji:

- **elastični modul**, ki je v fazi z vsiljeno deformacijo

$$G' = (\tau_A / \gamma_A) \cdot \cos \delta \quad /18/$$

- **viskozni modul**, ki je iz faze z vsiljeno deformacijo

$$G'' = (\tau_A / \gamma_A) \cdot \sin \delta \quad /19/$$

V primeru, ko sta deformacija in hitrost deformacije dovolj majhni, lahko zveze med strižno napetostjo in deformacijo zapišemo s pomočjo linearnih diferencialnih enačb s konstantnimi koeficienti, ki predstavljajo zapis linearnega viskoelastičnega območja. V nasprotnem primeru, ko so deformacije dovolj velike tj. v območju nelinearne viskoelastičnosti, so konstitutivne enačbe precej bolj kompleksne, zato meritve vedno poskušamo izvajati v linearnem viskoelastičnem območju.

Ko določimo meje linearnega viskoelastičnega odziva, lahko na osnovi enačb izračunamo vrednosti dinamičnih količin. Elastični in viskozni modul sta sinusna (*enačba /19/*) in kosinusna (*enačba /18/*) funkcija faznega zamika δ .

Meritve izvajamo v območju deformacij ali amplitud strižne napetosti, ki zagotavljajo linearen viskoelastičen odziv pri različnih frekvencah oscilacije. Na ta način določimo frekvenčno odvisnost dinamičnih količin v pogojih, ko se struktura testirane snovi ne podira (nedestruktivni pogoji). Iz tako dobljenih mehanskih spektrov je možno sklepati na tip mikrostrukture, jakost vezi med strukturnimi elementi, stopnjo geliranosti, premreženost polimerov ipd. (29).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo ugotoviti, ali obstaja korelacija med hitrostjo sproščanja učinkovine iz ogrodnih tablet iz ksantana pri različnih pH-jih, različnih ionskih močeh in strukturo gelske plasti v teh pufrih. Vemo namreč, da je za hitrost sproščanja iz ogrodnih tablet odgovorna struktura hidrogela, ki nastane ob stiku ksantana z vodnim medijem.

Najprej bomo stisnili 500 mg ogrodne tablete iz ksantana, v katere bomo vgradili 100 mg pentoksifilina kot modelno učinkovino. Na teh tabletah bomo izvedli preskus raztapljanja in določili hitrost sproščanja modelne učinkovine v prečiščeni vodi in pri pH-jih 1.2, 3.0, 4.5 in 7.0. Ker je ksantan anionski polimer, na strukturo hidrogela vplivata pH in ionska moč. Poskušali bomo ugotoviti, v kolikšni meri na hitrost sproščanja vpliva pH in v kolikšni meri ionska moč.

Nato bomo izdelali 1%, 2% in 4% hidrogele iz ksantana v istih medijih kot smo določali hitrost sproščanja in jim z metodo oscilacijske reometrije izmerili viskoelastične lastnosti. Zanimalo nas bo, ali obstajajo razlike v čvrstosti gela v odvisnosti od koncentracije, saj ima ogrodna tableta v svojem gelskem plaščku glede na oddaljenost od jedra različno koncentracijo polimera. Tako je koncentracija ksantana v erozijski coni najnižja, višja je v difuzijski coni in najvišja v območju nabrekanja suhega polimera.

S pomočjo merjenja kontaktnega kota bomo poskusili ovrednotiti hitrost omočenja tablet iz ksantana z različnimi mediji.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1. Materiali

- Ksantan – Sigma-Aldrich, USA; CAS 11138-66-2, seriji #108K0038 in #056K0007
- Pentoksifilin – Krka, Batch no. 91H1070, 22.10.91
- NaCl: Merck KGaA, Nemčija; 1.06404.1000
- KH_2PO_4 : Merck KGaA, Nemčija; A917973 824
- NaOH (1 M): Merck KGaA, Nemčija; B0475998 020
- HCl (1 M): Merck KGaA, Nemčija;
- Ortofosforna kislina: Merck KGaA, Nemčija;
- KOH: Merck KGaA, Nemčija;
- Pulvis conservans: Galenski laboratorij Lekarna Ljubljana, (metilparahidroksibenzoat 66,66 g, propilparahidroksibenzoat 33,33 g)
- Prečiščena voda – pripravljena na Fakulteti za farmacijo

3.2. Aparature

- Elektronska tehtnica Mettler Toledo AG245, Švica, 2000
- UV-VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453, USA
- Sistem za preskušanje sproščanja z vesli (USP 2), VK 7000, VanKel New Jersey, ZDA in avtomatski vzorčevalnik VK 8000, VanKel New Jersey, ZDA
- Hidravlična tabletirka na udarec IMA Killian SP300
- Ročna hidravlična stiskalnica za stiskanje praškov v ploščice Graseby Specac, Velika Britanija
- Naprava za merjenje stičnega kota Drop Shape Analysis System DSA 100 Contact Angle Meter KRUSS, Nemčija
- Magnetno mešalo KIKA – WERKE RO 15 Power
- Hladilnik Gorenje, 4°C, tip HZ0S3566, model RK6357E
- Ultrazvočna kadička PIO SONIS 4, Iskra
- Naprava za določanje trdnosti tablet Tablet hardness tester VK 200, Vanderkamp ZDA
- Naprava za merjenje pH raztopin pH METER Mettler Toledo MA235, Švica
- Reometer z nastavljivo strižno napetostjo Anton Paar Physica MCR 301, senzorski sistem stožec-plošča CP50-2

3.3. Postopki in metode

3.3.1. Izdelava tablet za vrednotenje hitrosti sproščanja

Izdelali smo 3 serije (april 2010, februar 2011 in april 2011) 500 mg tablet s vsebnostjo 100 mg pentoksifilina kot modelne učinkovine.

Najprej smo s ksantanom zapolnili pore v pateni. Tabletirno maso smo pripravili tako, da smo posebej zatehtali ustrezno maso ksantana in pentoksifilina in ju po pravilu rastočih mas zmešali v homogeno zmes.

Tabletirno zmes smo v celoti raztehtali na $m = 500$ mg ter vsako maso posebej stresli v odprtino tabletirke. Tablete smo stisnili polavtomatsko (slika 19). Velikost pečatov je bila 12 mm in legi pečatov

- zgornji pečat: 156 mm
- spodnji pečat: 170 mm.



Slika 19: Zgornji pečat tabletirke in izvržena tableta

3.3.2. Priprava medijev za preskus raztapljanja in izdelavo hidrogelov iz ksantana

Medije smo pripravili tako, da smo odpipetirali ustrezen volumen HCl ali zatehtali ustrezno maso soli in dodali prečiščeno vodo do oznake v bučki (tabela I). pH smo uravnali na $\pm 0,05$ predpisane enote s pomočjo pH metra.

Tabela I: Sestava pufrov s standardnim dodatkom NaCl

Ime pufra	Sestava (za 1 liter pufra)	Ionska moč (M)
H ₂ O	prečiščena voda	0
H ₂ O + NaCl	NaCl: 11,69 g	0,2
pH 1.2	1 M HCl: 80 ml	0,08
pH 1.2 + NaCl	1 M HCl: 80 ml NaCl: 11,69 g	0,28
pH 3.0	1 M HCl: 1 ml	0,001
pH 3.0 + NaCl	1 M HCl: 1 ml NaCl: 11,69 g	0,201
pH 4.5	KH ₂ PO ₄ : 13,61 g	0,1
pH 7.0	KH ₂ PO ₄ : 6,804 g NaOH: 1,164 g	0,108

Pufre z različnimi ionskimi močmi smo pripravili tako, da smo po *Hendersen-Hasselbachovi* enačbi in enačbi za ionsko moč preračunali sestavo (tabela II).

Enačba za ionsko moč raztopine:

$$\mu = 1/2 \sum c_i \cdot i^2 \quad /20/$$

μ .. ionska moč (oznaka tudi I)

c .. koncentracija iona v mol/l

i .. naboj iona

Hendersen-Hasselbachova enačba:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} - 0,509 \cdot (2n-1) \cdot \frac{\sqrt{\mu}}{1 + \sqrt{\mu}} \quad /21/$$

μ .. ionska moč

n .. naboj soli

Tabela II: Sestava pufrov s točno določeno ionsko močjo

Ime pufra	Sestava (za 1 liter pufra)	Ionska moč (M)
H ₂ O + NaCl	NaCl: 11,69 g	0,2
pH 1.2 + NaCl	1 M HCl: 80 ml NaCl: 7,0140 g	0,2
pH 3.0 + NaCl	1 M HCl: 1 ml NaCl: 11,6316 g	0,2
pH 4.5	KH ₂ PO ₄ : 27,1968 g	0,2
pH 7.0	KH ₂ PO ₄ : 13,5786 g NaOH: 2,0046 g	0,2
pH 4.5	KH ₂ PO ₄ : 6,805 g	0,05
pH 4.5	KH ₂ PO ₄ : 20,415 g	0,15
pH 7.0	KH ₂ PO ₄ : 10,1839 g NaOH: 1,5036 g	0,15

pH 7.0	KH ₂ PO ₄ : 16,9732 g NaOH: 2,5058 g	0,25
pH 7.0	KH ₂ PO ₄ : 20,3679 g NaOH: 3,00693 g	0,3
pH 7.0	KH ₂ PO ₄ : 27,1572 g NaOH: 4,0092 g	0,4

3.3.3. Priprava raztopine pulvis konzervans

0,2% raztopino pulvis konzervans, ki smo jo uporabili za konzerviranje gelov (slika 20), smo pripravili tako, da smo 0,2 g pulvis konzervansa s pomočjo segrevanja in mešanja na magnetnem mešalu raztopili v 99,8 g prečiščene vode.



Slika 20: Nekonzerviran 2% Xan po 3 dneh na sobni temperaturi

3.3.4. Priprava hidrogelov iz ksantana

Največji problem pri uporabi ksantana v industrijske namene je priprava homogene disperzije. To smo spoznali tudi mi pri našem delu, saj se ksantan zelo počasi raztaplja in tvori viskozne raztopine že pri nizkih koncentracijah. Ista težava je prisotna pri mnogih hidrofilnih polimerih. Je posledica delne hidratacije in razpletanja verig ter nastanek gelske plasti na površini delcev, ki preprečuje ločevanje praškastih delcev in njihovo nadaljnjo hidratacijo. Potrebne so velike strižne sile pri mešanju. Priprava homogenih disperzij je tema mnogih patentov (19). Nehomogena disperzija ne daje ponovljivih rezultatov pri reometriji, zato je bil ta del ključen pri našem delu. Homogeno disperzijo smo poskusili pripraviti na naslednje 3 načine: s počasnim dodajanjem ksantana mediju med mešanjem na magnetnem mešalu, z dodatkom netopila in v pateni.

Posebej smo zatehtali ustrezno maso ksantana in ustrezno maso medija (tabela III), v katerega smo dodali toliko raztopine pulvis konzervans, da je bila končna koncentracija v gelu 0,001%. Tako konzerviran hidrogel je bil obstojen v hladilniku vsaj 3 tedne, kar je bilo dovolj, da so iz 1% in 2% vzorcev oddifundirali mehurčki.

Tabela III: Sestava gelov iz ksantana

Koncentracija ksantana	Masa ksantana (g)	Masa medija (g)	Masa raztopine p.c. 0,2% (g)
1%	1	98,5	0,5
2%	2	97,5	0,5
4%	4	95,5	0,5

- počasno dodajanje ksantana mediju med mešanjem na magnetnem mešalu

Mediju smo med mešanjem na magnetnem mešalu počasi dosipavali praškast ksantan. Težava pri tem postopku je bila, da se je med mešanjem vmešalo preveč mehurčkov (mehurčki v vzorcu dajejo neponovljive in netočne rezultate pri reometriji), ki tudi po večjih dneh v hladilniku niso oddifundirali iz hidrogela. Prav tako je bilo raztapljanje ksantana pri pH 1.2 (z in brez NaCl) zelo počasno. Pri 1% raztopini so bili vidni kosmički (slika 21). Ksantan se pri pripravi 2% gelov po tej metodi ni povsem omočil (slika 22).



Slika 22: Kosmički v 1% Xan pri pH 1.2



Slika 21: Kepa nehidratiranega Xan v hidrogelu

- postopek dodatka netopila

Natehtan ksantan smo v čaši omočili z n-heksanom (netopilo), ki je onemogočil nastanek večjih skupkov praškastega ksantana. Dodali smo medij in na hitro premešali. Vzorce smo postavili v hladilnik, tako kot je to izvedla H. Flajšman pri svojem diplomskem delu (30). Težava pri tej metodi je bila, da so se (sicer manjši) skupki ksantana posedli na dno in

vzorec ni bil homogen, saj je bila koncentracija ksantana na dnu večja. Vsakršno mešanje je vmešalo mehurčke. Prav tako smo z reometrijo ugotovili, da v vzorcu prisoten heksan vpliva na strukturo gela.

- postopek priprave v pateni

Najprej smo na dno patene nalili približno 10 g medija, da smo preprečili zlepljenje ksantana na pateno. Nanj smo v čimtanjši plasti posuli natehtan ksantan in vse skupaj razribali s pestilom, tako da je bil omočen skoraj ves ksantan. Nato smo postopoma dodajali medij in mešali s pestilom, da je ksantan enakomerno hidratiral. Mešali smo počasi in poskušali vmešati čimmanj mehurčkov. Pri mešanju smo si pomagali s plastičnimi karticami, s katerimi smo strgali ksantan s pestila in patene. Medij smo dodajali do približno 2/3, nato smo ksantan s pomočjo kartice iz patene prenesli v erlenmajerico in s preostalim medijem sprali pateno, pestilo ter kartice, tako da je bil gel kvantitativno prenesen. V erlenmajerico smo dali magnetno mešalo (vsaj 5 cm - čim večje tem boljše) in vse skupaj na hitro premešali, da se je kepa ksantana razdelila na manjše. Erlenmajerico smo pokrili s parafilmom in postavili na magnetno mešalo (Kika Werke, hitrost 3) za približno 15 ur. Nato smo gel postavili za vsaj 4 dni v hladilnik, da so iz njega oddifundirali mehurčki. Ta metoda se je pokazala za najbolj primerno, saj smo na ta način vmešali najmanj mehurčkov. Geli so bili homogeni, zato so bili rezultati meritev ponovljivi. Vse gele smo nato pripravljali po tem postopku. Rezultati reometrije so imeli majhno standardno deviacijo znotraj vzorca pa tudi med različnimi vzorci v istem mediju.

3.3.5. Izdelava tablet in preučevanje hitrosti omočenja

Izdelali smo tabletirno zmes iste sestave kot za tablete za preskus raztapljanja FO in jo raztehtali po 400 mg. Na ročni hidravlični stiskalnici smo s silo 100 kN stisnili ploščice premera 12 mm.

Z injekcijsko brizgo z iglo smo kanili na tableto kapljico medija in ob izostreni sliki s pomočjo programske opreme na računalniku posneli filmček spreminjanja oblike kapljice s časom. S pomočjo programske opreme smo nato obdelali posnet film tako, da smo za vsako sliko posnetka izračunali kot močenja, izračunali hitrost spreminjanja kota močenja za posamezne medije ter iz tega sklepali na hitrost omočenja.

Za metodo z injekcijsko brizgo smo se odločili zato, ker bi bilo avtomatsko apliciranje kapljice s pomočjo črpalke na napravi prezamudno, saj je med posameznimi mediji potrebno spirati kapilare črpalke. Delali smo z istimi mediji, v katerih smo izvedli preskus raztapljanja FO (8 medijev s standardnim dodatkom NaCl in 4 mediji z $I = 0,2 \text{ M}$).

3.3.6. Preskus raztapljanja za trdne farmacevtske oblike

Preskus raztapljanja izvajamo za potrditev ustreznosti raztapljanja učinkovine iz FO v skladu z monografijo FO (32, 33). Prav tako se ga lahko uporablja za ugotavljanje določenih razlik med različnimi FO, ugotavljanje razlik med oblikami, ki niso bioekvivalentne, za simulacijo pogojev v gastrointestinalnem traktu in za napovedovanje dokaj zanesljivih podatkov za regulativo, kontrolo kakovosti in za napovedovanje *in vitro* - *in vivo* korelacije (31). Formularium Slovenicum navaja, da moramo pri tabletah s prirejenim sproščanjem opraviti ustrezen preskus za dokaz ustreznosti sproščanja zdravilne učinkovine (21). Mi smo preskus izvedli na ogrodnih tabletah iz ksantana, saj nas je zanimalo, ali obstaja korelacija med hitrostjo sproščanja učinkovine in gelskim plaščem, ki nastane okoli tablete tekom raztapljanja.

Preskus smo izvajali na napravi za raztapljanje z vesli VK 7000 (po USP2, slika 23) z avtomatskim vzorčevalnikom VK 8000 (slika 24).



Slika 23: Raztapljanje ogrodnih tablet iz xan na napravi VK 7000.



Slika 24: Avtomatski vzorčevalnik VK 8000.

V steklene posode predpisanega volumna smo nalili 900 ml medija in počakali, da se je segrel na $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ preden smo vanje dali tableto. Hitrost mešanja je bila 50 obratov/minuto. Temperatura se je tekom raztapljanja vzdrževala na $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Na igle za vzorčenje smo namestili 10 μm filtre. Vzorčili smo po 10 ml brez vračanja medija po vzorčenju, v časovnih točkah: 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24h.

Ker ima Naprava 2 na dnu posode mrtvo cono (tj. predel kjer ni gibanja medija) (31), so se naše hidrofilne tablete prilepile na dno, kar je imelo za posledico manjšo površino za sproščanje. Rezultati zato niso pokazali dejanske hitrosti sproščanja, zato smo uvedli modifikacijo metode in tablete v posodo spuščali v mrežici (sliki 25 in 26), ki je preprečila prelepljenje tablete na dno.



Slika 26: Suha tableta v mrežici



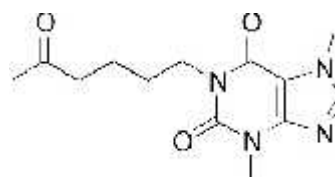
Slika 25: Nabrekla tableta v mrežici na dnu čaše

Vzorci smo analizirali na HP Diode Array UV-VIS spektrofotometru.

Kot modelno učinkovino pri sproščanju iz ogrodnih tablet smo uporabili pentoksifilin (PF) (slika 27).

Pentoksifilin spada v farmakoterapijsko skupino derivatov purina (ATC: C04AD03). Je kompetitivni neselektivni inhibitor encima fosfodiesteraze v membranah trombocitov in eritrocitov. Ima ugodno hemoreološko delovanje, saj zmanjša viskoznost krvi in poveča prožnost eritrocitov.

Prednost pentoksifilina kot modelne učinkovine je možnost analize sproščenih koncentracij z UV-VIS spektrofotometrijo, ki je hitra in natančna metoda. Spojina ima enega absorpcijskih maksimumov pri 274 nm. Pri tej valovni dolžini se tudi izvaja metoda kvantifikacije.



Slika 27: Pentoksifilin

Za vsak medij smo pripravili umeritveno premico. Približno 20 mg pentoksifilina smo raztopili v 200 ml medija. Delali smo 2 paraleli za vsak medij. Da se je PF popolnoma raztopil, smo postavili bučke še za vsaj 5 minut v ultrazvočno kadičko.

Iz osnovne raztopine smo potem z redčenjem (v ml):

1/20, 2/25, 2/20, 3/20, 5/25 in 5/20 pripravili 6 raztopin standardov, jim izmerili absorbanco in preko Beer-Lambertovega (*enačba /22/*) zakona izračunali naklon umeritvene premice.

Beer-Lambertov zakon:

$$c = k \cdot A \Rightarrow k = c/A \quad /22/$$

c .. koncentracija (mg/ml)

k .. naklon umeritvene premice (ml/mg)

A .. absorbanca

S pomočjo umeritvenih premic smo iz absorbanc za vzorce izračunali koncentracijo c_n učinkovine v vzorcu. Pri izračunu deleža sproščene učinkovine (*enačba /25/*) smo upoštevali zmanjšanje volumna medija zaradi odvzetih vzorcev (*enačba /23/*) ter maso učinkovine v 10 ml vzorcih.

$$V_n = V_0 - (n \cdot V_{vz}) \quad /23/$$

V_n .. volumen medija po n-kratnem vzorčenju (ml)

V_0 .. začetni volumen, 900 ml

V_{vz} ..volumen vzorca, 10 ml

n .. število vzorcev

$$m_n = c_n \cdot V_n + \sum_{n=1}^n c_n \cdot V_{vz} \quad /24/$$

m_n .. masa sproščene učinkovine ob n-tem vzorcu (mg)

c_n ..koncentracija sproščene učinkovine ob n-tem vzorcu (mg/ml)

$$X_n = m_n \cdot 100/m_0 \quad /25/$$

X_n .. delež sproščene učinkovine (%)

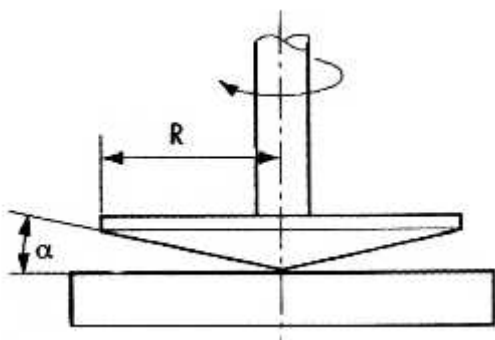
m_0 .. začetna masa učinkovine v tableti, 100 mg

Rezultate hitrosti sproščanja učinkovine smo predstavili grafično, z odstotkom sproščene učinkovine (os y) kot funkcijo časa (os x).

3.3.7. Reometrija

Oscilacijske teste smo izvajali s pomočjo rotacijskega reometra z nastavlljivo strižno napetostjo Anton Paar Physica MCR 301 (slika 29) s senzorskim sistemom stožec - plošča (slika 28) (CP50-2, premer $R = 49,961$ mm in kot $\alpha = 2,001^\circ$).

Vse teste smo izvajali pri 37°C , ker smo pri tej temperaturi izvajali tudi preskus raztapljanja ogrodnih tablet.



Slika 29: Senzorski sistem stožec - plošča



Slika 28: Reometer Anton Paar Physica MCR 301

- Amplitudni test

Prvi korak k opredelitvi viskoelastičnih lastnosti snovi so amplitudni testi. Z njimi določimo območje linearnega viskoelastičnega odziva (LVO) snovi glede na vneseno amplitudo strižne deformacije γ_A .

Pri amplitudnem testu s konstantno frekvenco spreminjamo velikost strižne deformacije γ in spremljamo spreminjanje dinamičnih modulov G' in G'' . V območju linearnega viskoelastičnega odziva sta G' in G'' neodvisna od τ_A oz. γ_A , potem pa se začneta z naraščanjem γ_A padati (25).

Amplitudni test smo izvajali pri kotni hitrosti $\omega = 10$ rad/s ($\nu = 1,95$ Hz; $\omega = 2\pi\nu$) in s sinusno spreminjajočo se deformacijo v območju $\gamma = 0,01 - 100$ % in temperaturi $T = 37^\circ\text{C}$.

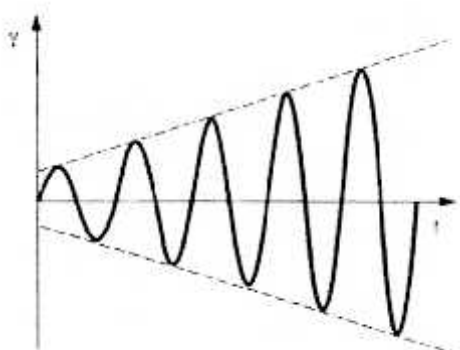
V splošnem sta kritični amplitudi strižne deformacije in/ali strižne napetosti, ki opredeljujeta prehod iz linearnega v nelinearen viskoelastični odziv, odvisni od frekvence oscilacije. Zato nadaljne teste, pri katerih spreminjamo frekvenco oscilacije, izvajamo v območju nižjih amplitud kot je zgornja meja LVO pri določeni frekvenci oscilacije. Kritični amplitudi sta predvsem odvisni od mehanskih lastnosti preskušane snovi (26).

- Frekvenčni test

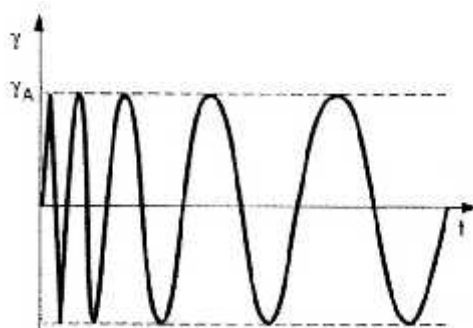
Vrednosti G' in G'' lahko izračunamo iz enačb /17-19/ le v območju linearnega viskoelastičnega odziva. Meritve izvajamo pri različnih frekvencah oscilacije, vendar v območju amplitud strižnih deformacij (ali amplitud strižne napetosti), ki zagotavljajo linearen viskoelastičen odziv. Navadno zvezno ali stopenjsko povečujemo frekvenco oscilacije (slika 30). Na ta način določimo frekvenčno odvisnost dinamičnih količin v pogojih, ko se notranja struktura testirane snovi ne podira.

Frekvenčna odvisnost dinamičnih količin je lastnost snovi. Pogosto se to odvisnost v literaturi imenuje tudi mehanski spekter in omogoča sklepanje na tip mikrostrukture proučevane snovi (26).

Frekvenčne teste smo izvajali pri strižni deformaciji $\gamma_A = 0,1 \%$ v frekvenčnem območju $\nu = 0,628 - 628 \text{ Hz}$ ($\omega = 0,1 - 100 \text{ rad/s}$) in pri temperaturi 37°C . Nedestruktivni oscilacijski testi pri majhnih strižnih deformacijah (kot v našem primeru) omogočajo materialu, da ohrani svojo notranjo strukturo. Odziv materiala je zato odraz neporušene strukture (25). Ker so meritve pod $0,5 \text{ rad/s}$ zelo dolgotrajne in se trend G' in G'' nižje ni spreminjal, smo meritve izvajali v območju $0,5-100 \text{ rad/s}$.



Slika 30: Amplitudni test: spreminjanje velikosti strižne deformacije (25)



Slika 31: Frekvenčni test: spreminjanje frekvence pri konstantni amplitudi deformacije (25)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Vrednotenje ogrodnih tablet

Izdelali smo tri serije ogrodnih tablet iz ksantana. Ovrednotili smo jih z nekaterimi testi po 7. Evropski farmakopeji.

4.1.1. Preskus enakomernosti mase enoodmernih farmacevtskih oblik

Glede na to, da smo maso za vsako tableto raztehtali ročno (500 mg tabletirne zmesi za preskus raztapljanja in 400 mg za preskus hitrosti omočenja), so naše tablete ustrezale predpisu v poglavju 2.9.5., da lahko največ 2 tableti iz serije 20 tablet presegata standardno deviacijo 5%, nobena pa ne sme odstopati za več kot 10%.

4.1.2. Preskus trdnosti

Preskus trdnosti opisuje poglavje 2.9.8. Njegov namen je pod specifičnimi pogoji določiti odpornost tablet na lomljenje. Tableto položimo med mirujoči in gibljivi del (slika 28, levo mirujoči, desno gibljivi del) naprave za preskus trdnosti. Gibljivi del stisne tableto ob mirujoči del in naprava izmeri silo, ki je bila potrebna za lomljenje tablete.



Slika 32: Tableta po preskusu trdnosti

Ciljana trdnost tablet je bila ~ 100 N. Trdnost smo preskušali med procesom tabletiranja na vsaj 10 tabletah. Ugotovili smo, da je pozimi v neklimatiziranih pogojih praktično nemogoče stisniti tako trde tablete zaradi nizke vsebnosti vlage v ozračju. Povprečne trdnosti serij so predstavljene v tabeli IV.

Tabela IV: Povprečne trdnosti ogrodnih tablet po serijah

Serija	Serija 1 (apr. 2010)	Serija 2 (feb. 2011)	Serija 3 (apr. 2011)
Povprečna trdnost (N)	$94,2 \pm 3,3$	$51,2 \pm 2,1$	$87,6 \pm 2,9$

Vse tri serije tablet so bile dovolj trdne, da se niso krušile. Po tabletiranju smo jih shranili v plastični vrečki, da niso bile izpostavljene vlagi, saj je ksantan higroskopen.

4.1.3. Preskus enakomernosti vsebnosti

Čeprav predpis po Ph. Eur. v poglavju 2.9.6. določa preskušanje 10 tablet, smo v našem primeru preskus zaradi majhnosti serij izvedli le na 3 tabletah ene serije. Vzeli smo 3 tablete in vsako posamezno dali v 500 ml bučko, ki smo jo napolnili do oznake s prečiščeno vodo. Vse skupaj smo zamašili s steklenim zamaškom in mešali 24 ur na magnetnem mešalu.

Pred analizo koncentracije na UV-VIS spektrofotometru smo nekaj ml raztopine prefiltrirali skozi 10 μm filter in določen volumen filtrata ustrezno redčili.

Vsebnost v tabletah je bila: 100,08 mg, 103,26 mg in 101,93 mg, kar pomeni, da ustrezajo predpisu v farmakopeji, ki pravi, da mora biti vsebnost učinkovine v tableti v intervalu od 85 do 115% glede na predpisano vsebnost.

4.2. Sproščanje pentoksifilina iz ogrodnih tablet iz ksantana

Ksantan je polielektrolit s pK_a 3.1, zato na sproščanje iz ogrodnih tablet iz ksantana vplivata tako pH kot tudi ionska moč. Najprej smo test raztapljanja FO izvajali v pufrih s standardnim dodatkom NaCl. Količino sproščene učinkovine ob določenem času smo preračunali iz izmerjenih absorbanc. Hitrost sproščanja učinkovine smo predstavili grafično.

Ker so se nam tablete pri raztapljanju prilepile na dno posode (slika 33), smo ponovili sproščanje s tableto v mrežici.



Slika 33: Prilepljena tableta - viden je suh del

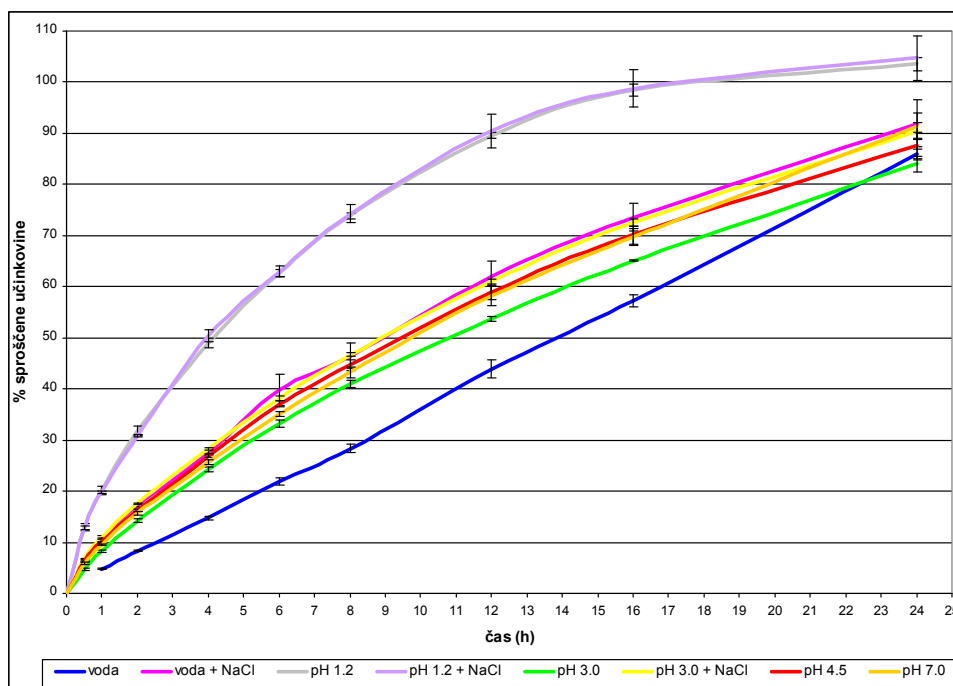
Na koncu smo izvedli test raztapljanja FO še pri ionski moči $I = 0,2 \text{ M}$, da bi opazovali le vpliv pH na hitrost sproščanja učinkovine.

4.2.1. Sproščanje v pufrih s standardnim dodatkom NaCl

Ksantan najpočasneje nabreka pri pH 1.2 ne glede na prisotnost NaCl v raztopini. Zato je gelski plašč v začetku tanek in sproščanje učinkovine najhitrejše (graf 1). Pri pH 1.2 so COOH skupine na stranskih verigah povečini neionizirane, zato tudi dodatek NaCl nima dodatnega vpliva. Ogradna tableta sprošča učinkovino najpočasneje v vodi, saj se tukaj verige ksantana najhitreje razvijajo iz urejene oblike v neurejeno in tvorijo interakcije z

vodnimi molekulami. Gelski plašč nastane hitro in je bolj debel kot v katerem koli drugem mediju, kar ima za posledico daljšo difuzijsko razdaljo za vodo, ki difundira v tableto in raztaplja učinkovino, ter daljšo pot za difuzijo raztopljene učinkovine iz tablete. Gonilo difuzije učinkovine iz tablete je koncentracijski gradient. Pri ostalih medijih je hitrost sproščanja podobna, vendar zaradi prilepljenih tablet in neprimerljivosti površin tablet, s katerih je potekalo sproščanje, iz teh podatkov o vplivu pH nismo mogli ničesar sklepati (graf 1). Dodatek NaCl v vodo in v medij s pH 3.0 pospeši sproščanje učinkovine iz tablete. Razlog za to je senčenje negativnih nabojev COO^- na stranskih verigah, kar favorizira urejeno obliko ksantana, ki zaseda manjši volumen. Verige so manj raztegnjene, tvorijo manj medsebojnih interakcij ter zato večje pore v gelski rešetki za difuzijo učinkovine.

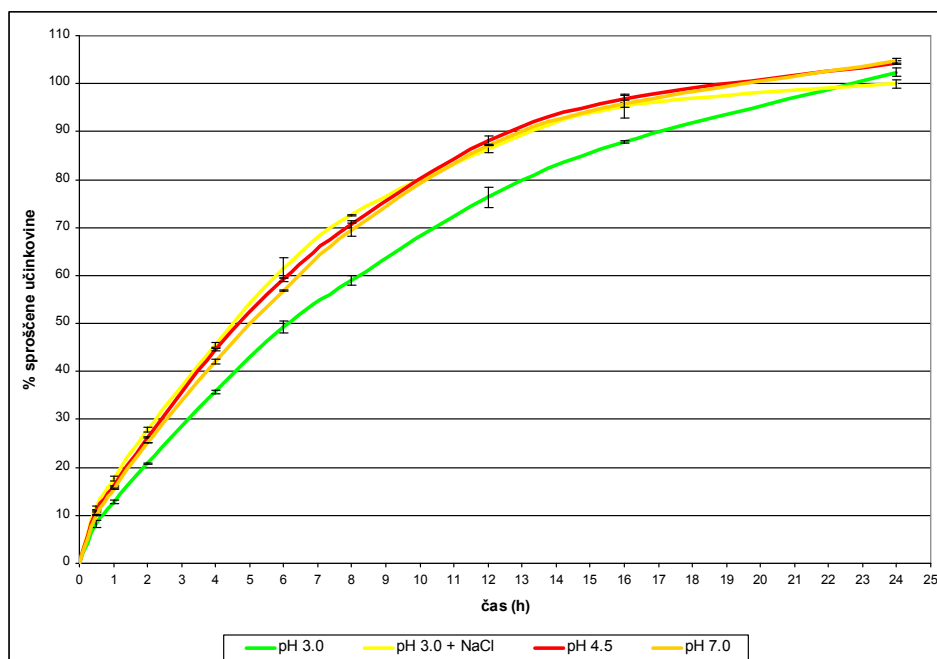
Graf 1: Hitrost sproščanja PF iz ogrodnih tablet iz ksantana v pufrih s standardnim dodatkom NaCl



4.2.2. Sproščanje v mrežici

S pomočjo mrežice, v katero smo dali tableto, smo preprečili njeno prilepljenje na dno posode med sproščanjem. Ker smo tablete stiskali pozimi, je bila njihova trdnost okoli 50 N. Kot smo kasneje ugotovili, ima na hitrost sproščanja učinkovine vpliv tudi trdnost tablete, zato rezultate 1. serije in 2. serije tablet med sabo težko primerjamo.

Graf 2: Hitrost sproščanja PF iz ogrodnih tablet iz ksantana pri puffih s standardnim dodatkom NaCl - v mrežici



Dodatek NaCl povzroči hitrejše sproščanje v mediju s pH 3.0, kar je enako kot pri 1. seriji. Ogrodna tableta v mediju s pH 3.0 + NaCl sprosti najmanj učinkovine v primerjavi z ostalimi tremi mediji. Pri pH 4.5 je hitrost sproščanja, ocenjena grafično, v prvih 8 urah večja kot v mediju s pH 7.0, potem pa se hitrosti praktično izenačita. Glede na to, da imata oba medija zelo podobno ionsko moč ($\sim 0,1$ M), gre tu za vpliv pHja. Ksantan je pri pH 7.0 bolje topen kot pri 4.5, ogrodna tableta hitreje nabreka in počasneje sprošča učinkovino.

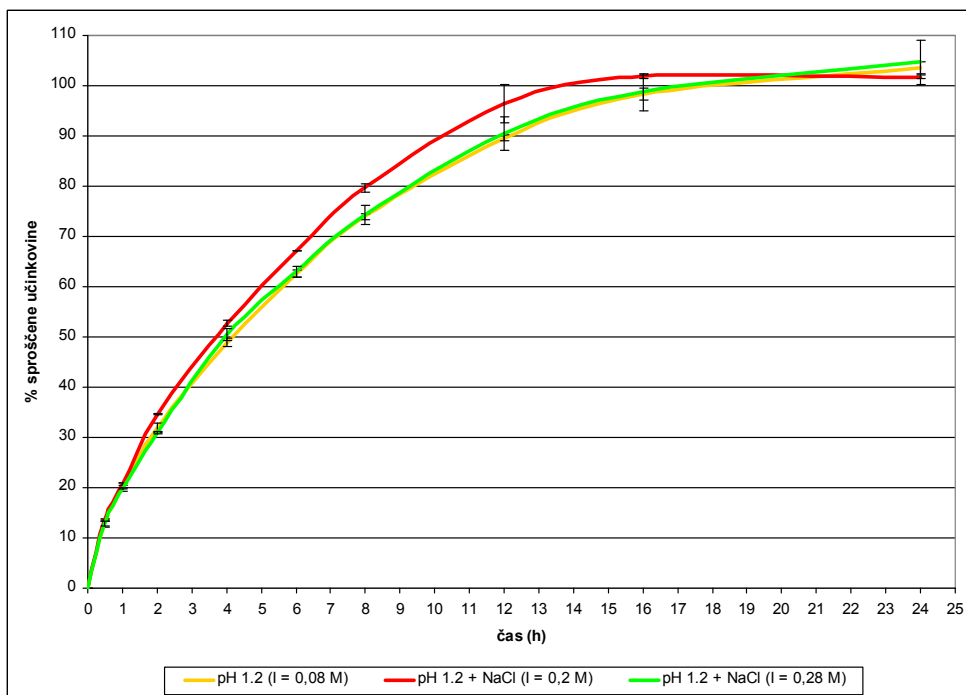
4.2.3. Sproščanje pri ionski moči $I = 0,2$ M

Nakazan vpliv pHja (pH 4.5 in pH 7.0) pri raztapljanju 2. serije tablet, smo hoteli proučiti tudi za pH 1.2 in 3.0. Test raztapljanja FO smo zato izvedli v mrežici, da smo preprečili prilepljenje tablet. Vpliv ionske moči pa smo izenačili za vse pufre tako, da smo jih pripravili pri isti ionski moči 0,2 M. Ionska sestava posameznih pufrov je ostala enaka, kar pomeni, da smo ionsko moč fosfatnega pufra 4.5 in 7.0 povečali s povečanjem koncentracije posameznih komponent pufra in ne z dodatkom NaCl.

Tablete, za katere smo izvedli preskus raztapljanja, so bile tablete 3. serije s trdnostjo (~ 90 N), ki je bila primerljiva trdnosti 1. serije. Ko smo primerjali rezultate sproščanja s serijo 1, smo ugotovili, da so razlike med serijami v pH 1.2 in pH 1.2 + NaCl velike. Ker je bila

trdnost enaka, je edini možen razlog prilepljenje tablet. Glede na to, da ionska moč nima vpliva na hitrost sproščanja pri pH 1.2 (praktično enaka hitrost pri $I = 0,08\text{ M}$ in $I = 0,28\text{ M}$), lahko trdimo, da gre pri $I = 0,2\text{ M}$ za vpliv povečanja površine tablete (graf 3).

Graf 3: Vpliv neprilepljenosti tablet na hitrost sproščanja PF pri pH 1.2

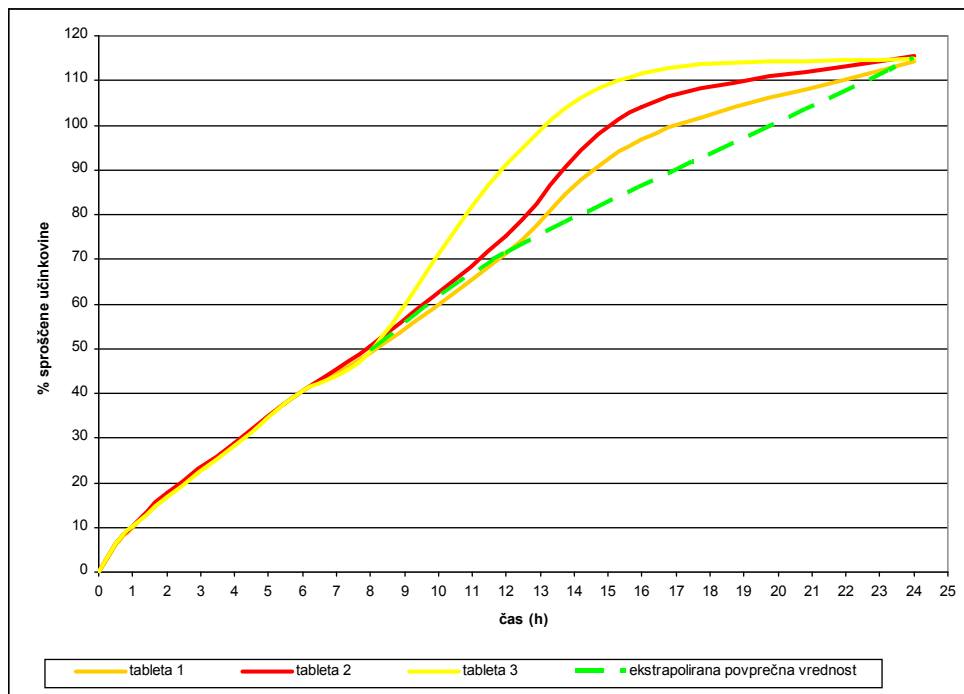


Z mrežico smo ponovili tudi test raztapljanja v prečiščeni vodi in vodi z dodatkom NaCl ($I = 0,2\text{ M}$). Tablete v vodi je med raztapljanjem »pograbilo« veslo, saj so po približno 8 urah splavale. Hidrodinamski tok zaradi mešanja z veslom je pospešil odplavljanje verig ksantana s površine tablete, kar je imelo za posledico hitrejšo erozijo in tanjšo gelsko plast. Krajša pot za difuzijo je na grafu vidna kot mnogo hitrejše sproščanje učinkovine. Hitrost sproščanja med 8h in 24h smo zato ekstrapolirali. Ekstrapolacijo prikazuje zelena črtkana črta (graf 4).

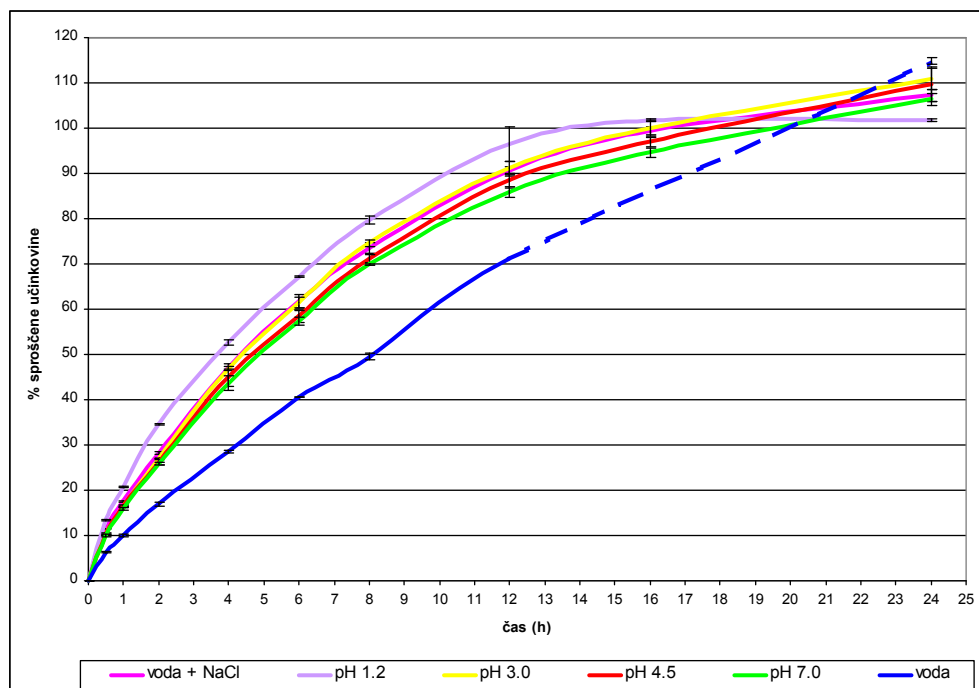
Pri raztapljanju FO pri ionski moči $I = 0,2\text{ M}$ (graf 5) smo ugotovili, da vpliv koncentracije soli prevlada nad vplivom pH. Izjema je le pH 1.2, kjer je razlika v hitrosti glede na ostale medije očitna. Razlike v hitrosti sproščanja niso nič bolj izrazite kot pri pH 4.5 in 7.0 pri $I = 0,1\text{ M}$. Rahel trend se nakazuje med 8h in 16h ($\text{pH } 7.0 < \text{pH } 4.5 < \text{pH } 3.0$), vendar glede na standardno deviacijo razlike niso dovolj velike za kakršne koli dokončne sklepe. Prav

tako bi moralo biti potemtakem sproščanje v prečiščeni vodi z NaCl (pH ~ 5.7) nekje med pH 7.0 in 4.5, kar pa opazimo le na koncu med 21. in 24h.

Graf 4: Hitrost sproščanja PF v prečiščeni vodi in ekstrapoliran del krivulje

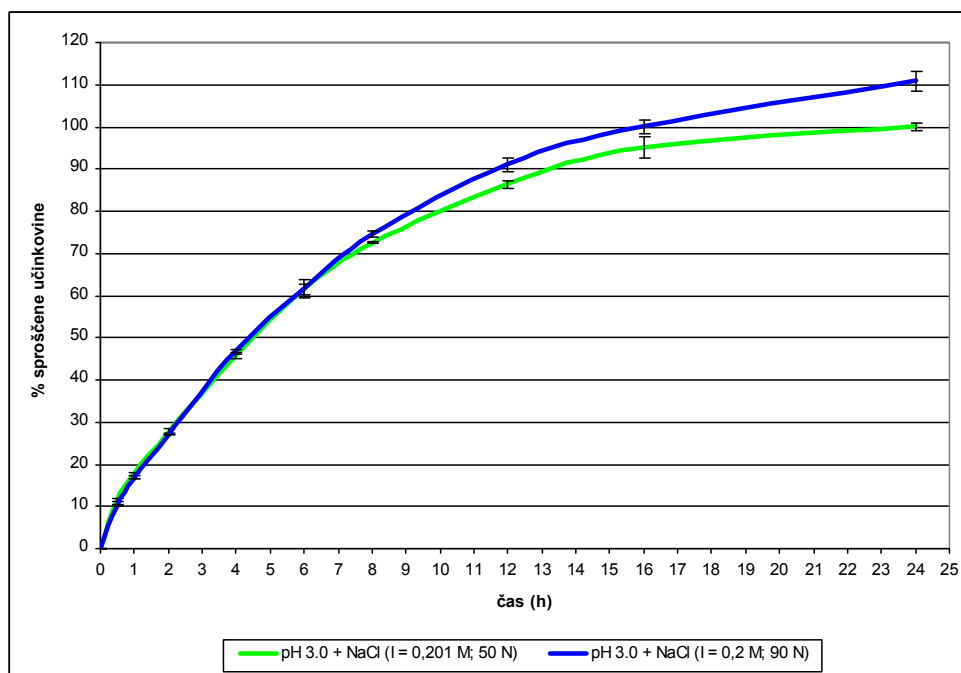


Graf 5: Hitrost sproščanja PF iz ogrodnih tablet iz xan pri I = 0,2 M



Graf 6 prikazuje vpliv trdnosti tablete na hitrost sproščanja. Razlike so vidne predvsem v 2. polovici krivulj od 9. ure naprej, kjer je hitrost sproščanja iz tablet z nižjo trdnostjo počasnejše, kar je lahko nekoliko presenetljivo. Možen razlog za to je večja poroznost tablete. Voda hitreje pronica v notranjost in hitreje omoči ksantan. Gelski plašč okoli tablete hitreje nastaja, pot za difuzijo je daljša v primerjavi z tableto z višjo trdnostjo.

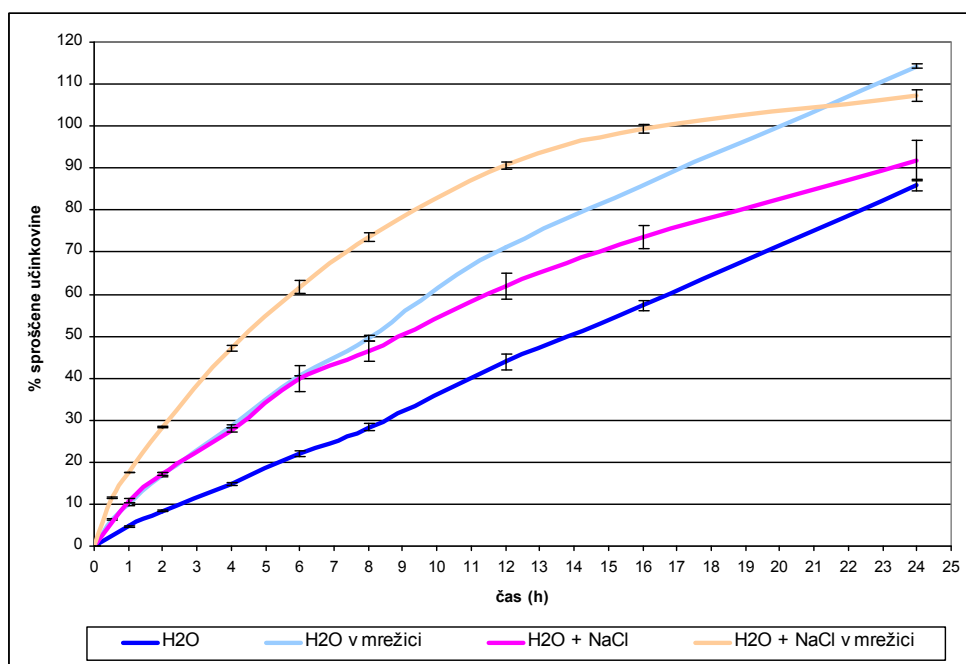
Graf 6: Vpliv trdnosti tablet na hitrost sproščanja PF



Graf 7 prikazuje vpliv povečanja površine na hitrost sproščanja pentoksifilina. Povečanje površine gre na račun preprečitve lepljenja tablet na dno posode. Razlika je tudi v končnem % sproščene učinkovine, saj je pri prilepljenih tabletah običajno dobro viden suh, še neomočen del tablete (slika 30). To pomeni, da je potrebno pri sproščanju vedno paziti na to, da se tablete ne prilepijo.

Iz rezultatov raztapljanja FO lahko sklepamo, da na gelsko strukturo ksantana vpliva predvsem ionska moč medija. Izjema je pH 1.2, pri katerem ionska moč nima vpliva. Hitrosti sproščanja so $\text{pH } 1.2 > \text{pH } 3.0 \approx \text{pH } 4.5 \approx \text{pH } 7.0 > \text{prečiščena voda}$.

Graf 7: Vpliv povečanja površine na hitrost sproščanja PF

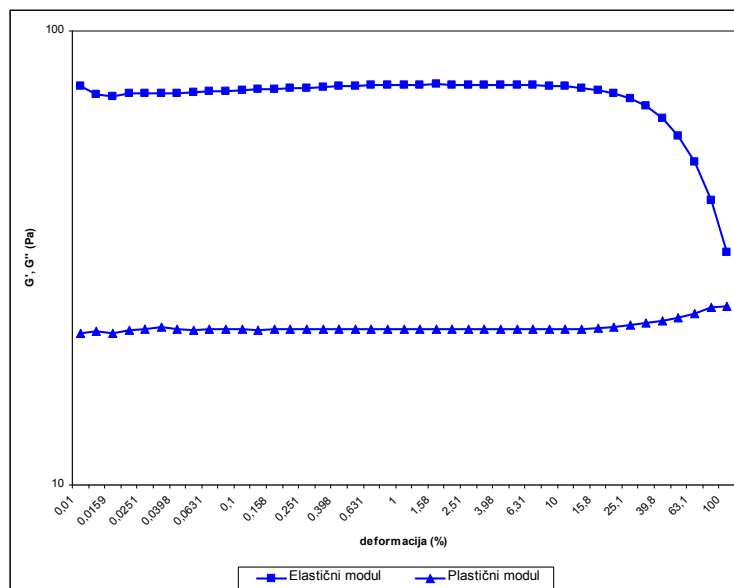


4.3. Reometrija

4.3.1. Amplitudni test

S pomočjo amplitudnega testa smo opredelili linearno viskoelastično območje (LVO) za 1% ksantan v prečiščeni vodi pri 37°C. Rezultate smo predstavili grafično na log/log skali (graf 8). Meje LVO, ki so med ~ 0,025-10% strižne deformacije, smo za vse vzorce določili s pomočjo krivulje G' , ki je običajno bolj občutljiv in hitreje zapusti LVO. Vrednosti G' so višje kot za G'' , kar pomeni, da elastični odziv snovi prevladuje nad viskoznim oz. plastičnim. $G' > G''$ nakazuje gelski značaj disperznega sistema. Ker je kritična vrednost strižne deformacije okoli 10%, gre za šibko gelsko strukturo (26).

Graf 8: Amplitudni test za 1% Xan v prečiščeni vodi



4.3.2. Frekvenčni test

Literatura navaja priporočila glede izvajanja frekvenčnih testov za snovi, ki imajo kompleksno fizikalno-kemijsko sekundarno strukturo, kamor spadajo tudi geli, in sicer da izberemo deformacijo $\gamma_A \leq 1\%$ (25). Glede na priporočila in opravljen amplitudni test smo nadaljnje frekvenčne teste izvajali pri strižni deformaciji $\gamma_A = 0,1\%$ v frekvenčnem območju $\nu = 0,628 - 628$ Hz ($\omega = 0,1 - 100$ rad/s) in pri temperaturi 37°C .

Namen reološkega vrednotenja koloidnih raztopin ksantana je bil primerjava rezultatov reometrije z rezultati preskusov raztapljanja FO. Rezultate frekvenčnih testov smo predstavili grafično v log/log skali. Iz grafov smo tudi ocenili razlike med G' in G'' v posameznih medijih. Vrednosti G' in G'' smo uporabili kot merilo za čvrstost gela iz ksantana v posameznem mediju. Pri stabilnih disperzijah in gelih tvorijo molekule zaradi medmolekulskih povezav tridimenzionalno mrežo. G' in G'' sta v frekvenčnih testih zato skoraj vzporedni ravni liniji, skorajda frekvenčno neodvisni oz. z zelo majhnim naklonom čez celotno frekvenčno območje. G' opisuje čvrstost oz. konsistenco snovi – višje kot so vrednosti G' , bolj je snov čvrsta (25).

Pričakovali smo korelacijo med hitrostjo sproščanja učinkovine iz ogrodne tablete iz ksantana in čvrstostjo gela v posameznem mediju – bolj čvrst gel naj bi predstavljal večjo bariero za difuzijo učinkovine, zato bi naj bilo sproščanje le-te počasnejše.

Med pripravo 2% gelov iz ksantana smo ugotovili, da je ksantan zaradi svoje polisaharidne strukture zelo ugodno mikrobiološko gojišče, saj so imeli geli v medijih z višjim pH velikokrat že po 24h mešanju na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi spremenjen vonj (po kvasu).

Vseeno smo reološko ovrednotili 2% nekonzervirane gele ter 1%, 2% in 4% gele iz ksantana, konzervirane s pulvis konzervans. Gele smo pripravili v medijih z enako sestavo kot so bili mediji, v katerih smo izvedli preskus raztapljanja FO. Pred reometrijo smo s Pasteur-jevo pipeto iz vzorca, nanesenega na merilni sistem, posrkali mehurčke, ki bi motili meritve (poslabšali ponovljivost).

Ksantan je polianion s pK_a 3.1. Vsaka stranska veriga nosi eno do dve $COOH$ skupini, odvisno od deleža piruvatnih skupin. Stopnja ionizacije $COOH$ skupin je odvisna od pH medija – v kislem bo nizka in v nevtralnem oz. bazičnem visoka. Večja stopnja ionizacije $COOH$ skupin pomeni večji elektrostatski odboj med stranskimi verigami, ksantan preide iz urejene v razvejano, neurejeno obliko. Zanimalo nas je, kako so teoretično ionizirane stranske verige ksantana pri različnih pH vrednostih. Zato smo po *Hendersen-Hasselbachovi enačbi* /21/ za šibke elektrolite izračunali odstotek ioniziranih $COOH$ skupin glede na pH (tabela V).

Tabela V: Delež ioniziranih $COOH$ skupin v ksantanu glede na pH medija

pH	1.2	3.0	4.5	7.0
% COO^-	1,2	44,3	96,2	~100

Glede na literaturne podatke, da je ksantan v urejeni obliki v obliki dvojne vijačnice, lahko sklepamo, da se pri nizkih koncentracijah ksantana (verige imajo dovolj prostora, da se razvijejo in raztegnejo), nizki ionski moči (ionska moč favorizira urejeno obliko) in visokem pH, ksantan nahaja v denaturirani obliki. Obratno je pri nizkem pH, kjer so $COOH$ skupine neionizirane. Teoretično bi lahko bil ksantan pri tem pH v obliki dvojne vijačnice.

Delež piruvatnih skupin v ksantanu je odvisen od seva bakterije in pogojev fermentacije. Pri komercialno dostopnem ksantanu je delež, računano na suho snov, 1,0-5,7% (1). Na Inštitutu Jožef Stefan Ljubljana je bila izvedena 1H NMR analiza ksantana proizvajalca

Sigma-Aldrich. Namen analize je bil določiti stopnjo substitucije stranskih verig z acetilno skupino in piruvatom, saj teh podatkov v analizi dokumentaciji proizvajalca ni. Rezultati so pokazali, je stopnja substitucije z acetilno skupino 0,5, stopnja substitucije s piruvatom pa 0,35, kar pomeni, da ima vsaka druga stranska skupina acetilno skupino ter vsaka tretja dodaten COO^- zaradi piruvata, vendar se vsebnost enega in drugega razlikuje tudi od serije do serije istega proizvajalca.

Od števila (ioniziranih) COOH skupin v ksantanu je odvisno število Na^+ in K^+ , potrebnih za senčenje negativnih nabojev. Med Na^+ in K^+ ni razlik v vplivu na reološke lastnosti raztopin ksantana (8). Literatura pa navaja, da je konformacija ksantana odvisna od ionske moči medija. To drži v primeru, ko imamo le NaCl , kjer je $I = c(\text{NaCl})$:

$$I = 1/2 \cdot ([\text{Na}^+] \cdot 1^2 + [\text{Cl}^-] \cdot 1^2), \text{ ker je } [\text{Na}^+] = [\text{Cl}^-] \Rightarrow I = [\text{Na}^+] = c(\text{NaCl})$$

in je odvisnost res neposredna. Pri fosfatnem pufru pH 7.0 pa korelacija z ionsko močjo ne drži popolnoma, saj zaradi 2- naboja HPO_4^{2-} iona ni direktne odvisnosti med ionsko močjo in koncentracijo K^+ in Na^+ ionov:

$$I = 1/2 \cdot ([\text{Na}^+] \cdot 1^2 + [\text{K}^+] \cdot 1^2 + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] \cdot 1^2 + [\text{HPO}_4^{2-}] \cdot 2^2).$$

Pri ionski moči 0,1 M za fosfatni pufer s pH 4.5 iz KH_2PO_4 je $[\text{K}^+] = 0,1$ M. Pri ionski moči 0,1 M za fosfatni pufer s pH 7.0 iz KH_2PO_4 in KNaHPO_4 pa je $[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 0,078$ M. Zato bi bilo bolj pravilno trditi, da je konformacija ksantana odvisna od koncentracije v mediju prisotnih kationov. Pri tem je potrebno upoštevati, da že sam praškast ksantan vsebuje 3,6 – 14,3% enovalentnih in 0,085-0,17% dvovalentnih soli računano na suho snov (1).

Glede na literaturne podatke in teoretična izhodišča na čvrstost gela vpliva torej:

- *koncentracija ksantana* – več kot je molekul v raztopini, več interakcij tvorijo med sabo in obratno; koncentracija vpliva tudi na stopnjo razvitja dvojne vijačnice – višje kot so koncentracije, manj prostora imajo verige ksantana, da se razpletejo in nižje kot so koncentracije, več verig bo lahko v obliki enojne vijačnice;
- *pH medija* – pri nizkem pH bo ksantan v obliki dvojne vijačnice, zato bo navidezno nižja koncentracija verig ksantana, tvorile bodo manj interakcij, zato bo gel manj čvrst; pri višjem pH bo več COOH skupin ioniziranih, večji bo elektrostatski odboj med verigami, ki bo silil molekule ksantana v razvitje dvojne vijačnice in preprečeval interakcije verig med sabo;

- *ionska moč oz. koncentracija kationov v mediju* – pri nizkih koncentracijah ni zadostnega senčenja negativnih nabojev, prevlada odboj med verigami, zato je gel manj čvrst; višje koncentracije kationov s senčenjem favorizirajo urejeno obliko ksantana;
- *priprava gela* – višja kot je temperatura priprave, večji delež ksantana bo v neurejeni obliki, med tem ko nizke temperature favorizirajo obliko dvojne vijačnice. Glede na to, da smo mi gel pripravljali pri sobni temperaturi in ga potem postavili za vsaj 4 dni v hladilnik, lahko trdimo, da so se med sosednjimi verigami ksantana delno razvitih dvojnih vijačnic, vzpostavile interakcije (sliki 6 in 7).

Grafi, ki sledijo na straneh 56-64, predstavljajo rezultate oscilacijskih testov, ki naj bi potrdili ali ovrgli opisana teoretična stališča. Predstavljeni so v log/log skali. *Elastični modul G'* je predstavljen s kvadratki (zgornja črta), *plastični G''* pa s trikotniki (spodnja črta). Ker meritve potekajo od višjih kotnih hitrosti proti nižjim, je skala za G' in G'' na desni strani.

Gele v medijih s standardnim dodatkom NaCl smo naredili iz 1. serije ksantana (kupljenega leta 2009), iz katerega smo prav tako izdelali ogrodne tablete za preskus raztapljanja FO. Graf 9 predstavlja rezultate 2% nekonzerviranih gelov iz ksantana. To so prvi geli, ki smo jih pripravljali z metodo počasnega dodajanja praškastega ksantana mediju med mešanjem na magnetnem mešalu. Največjo čvrstost je izkazoval gel pri pH 4.5. Rezultati kažejo, da je tukaj največ interakcij med verigami – dovolj visoka koncentracija K^+ , da pride do senčenja negativnih nabojev in vzpostavitev povezav med molekulami ksantana. Med geloma v mediju s pH 1.2 in 1.2 + NaCl praktično ni razlik. Zaradi neioniziranosti COOH skupin pri ksantanu dodatek soli nima vpliva na G' in G'' . V mediju s pH 3.0 je ob dodatku soli viden premik modulov G' in G'' k višjim vrednostim. Zaradi dodatka NaCl pride do senčenja negativnih nabojev in zmanjšanja elektrostatskih odbojev med verigami ter posledično večje čvrstosti gela. Podoben trend je tudi pri gelu v prečiščeni vodi in vodi z dodatkom NaCl, vendar o kakšnih večjih razlikah v čvrstosti ne moremo trditi zaradi velike standardne deviacije modulov za vodo. Čvrstost gela pri pH 7.0 je nižja, kot kaže prevladujejo odbojne sile med verigami.

Ker so bili geli mikrobiološko nestabilni, smo jih nato konzervirali. Graf 10 (a-c) prikazuje vpliv dodatka konzervansa na gelsko konsistenco. Čeprav so koncentracije konzervansa zelo nizke, je vpliv na strukturo gela merljiv. Prav tako je vpliv enake koncentracije konzervansa v medijih različen. Modula G' in G'' sta za konzerviran gel višja, največje razlike so pri pH 7.0.

Vsi nadaljnji oscilacijski testi so bili izvedeni na konzerviranih gelih.

Graf 11 predstavlja mehanski spekter 1% ksantana v medijih s standardnim dodatkom NaCl. Gel pri pH 4.5 izkazuje najbolj čvrsto konsistenco, sledi mu gel pri pH 7.0. Razlika med njima je zaradi razlike v % ionizacije COOH skupin ter koncentraciji kationov v mediju – pri pH 7.0 je ioniziranih skoraj 100% COOH skupin (tabela V), pri pH 4.5 pa 96%, koncentracija kationov pa je v mediju s pH 4.5 višja (0,1 M) kot v mediju s pH 7.0 (0,078 M). To pomeni večje senčenje negativnih nabojev COO^- skupin pri pH 4.5 ter ugodnejše interakcije med verigami ksantana. Medij s pH 3.0 ima podobno nizko ionsko moč kot prečiščena voda, zato sta gela po čvrstosti podobna. Dodatek NaCl v pH 3.0 dvigne vrednosti G' in G'' , dodatek NaCl prečiščeni vodi pa module presenetljivo zniža, čeprav je ionska moč obeh medijev praktično enaka. Verjetno je v prečiščeni vodi z dodatkom NaCl ksantan pretežno v urejeni, dvojnovijačni obliki, ki zavzema manjši volumen in tvori manj interakcij. Opazimo tudi večji naklon G' in G'' pri pH 1.2 in 1.2 + NaCl, kar nakazuje bolj na koloidno raztopino ksantana kot na gel. Ksantan je pri pH 1.2 neioniziran, v urejeni, dvojnovijačni obliki. Hidratacija verig je zaradi nizke ionizacije majhna, ksantan se slabše hidratira in raztaplja ter tvori koloidno disperzijo.

Poudariti moramo, da so razlike med 1% geli dejansko zelo majhne, čeprav log/log skala daje drugačen vtis. Reološke meritve pri 1% ksantanu so bolj namenjene proučevanju same molekulske strukture ksantana. Korelacijo s sproščanjem naredimo bolj težko, saj je gel šibek in kvečjemu predstavlja erozijsko plast, ki na sproščanje PF nima vpliva.

Do podobnih ugotovitev kot pri nekonzerviranih 2% gelih iz ksantana lahko pridemo tudi pri 2% konzerviranih gelih (graf 12). Gel v mediju s pH 4.5 je najbolj čvrst, sledi medij s pH 3.0 + NaCl, kjer je glede na medij s pH 3.0 viden premik modulov G' in G'' navzgor. Premik je viden tudi pri prečiščeni vodi z NaCl. Gel v prečiščeni vodi je skoraj tako šibek kot pri pH 1.2. Visoka standardna deviacija pri nekonzerviranemu 2% gelu v prečiščeni vodi nakazuje na eksperimentalno napako, tako da so dejanske vrednosti nekonzerviranega

2% ksantana v prečiščeni vodi verjetno bolj podobne nekonzerviranemu 2% gelu pri pH 7.0. 2% konzervirani gel v pH 7.0 je bolj čvrst kot nekonzerviran, tako da obstajajo interakcije med molekulami ksantana in molekulami metil ter propil parahidroksibenzoata. Koncentracija kationov pri pH 7.0 je prenizka za nevtralizacijo negativnih nabojev, zato je gel po čvrstosti primerljiv z gelom pri pH 3.0 ($I = 0,001 \text{ M}$), kjer prav tako pred privlačnimi prevladujejo odbojne sile med verigami ksantana.

Rezultati se delno ujemajo z rezultati raztapljanja FO. Dodatek NaCl v mediju s pH 3.0 in prečiščeni vodi povzroči tvorbo bolj čvrstega gela, ki (verjetno) počasneje nastaja in je tanjši. Enako je v mediju s pH 1.2, kjer prav tako kot pri sproščanju ni razlik ob dodatku NaCl.

4% geli so že tako gosti, da kljub več dnevnem odzračevanju v hladilniku, mehurčki iz gelov niso oddifundirali. Naredili smo le gele v prečiščeni vodi, pH 4.5 in 1.2, saj nas je zanimalo, ali se zaporedje modulov gelov v teh medijih pri višji koncentraciji ksantana kaj spremeni. Rezultate predstavlja graf 13. Zaradi visoke standardne deviacije meritev (zaradi mehurčkov v vzorcih) iz grafa ne moremo narediti natančnih sklepov, lahko pa opišemo trende. Gel pri pH 4.5 je še vedno najčvrstejši. Zanimiv je premik modulov gela pri pH 1.2 k tako visokim vrednostim v primerjavi z G' in G'' 4% ksantana v prečiščeni vodi.



Slika 34: Mehurčki v 4% xan

Podobne rezultate je dobila tudi Helena Flajšman pri svojem diplomskem delu, kjer je eksperimentalno dokazala, da je 1% gel pri pH 1.2 najmanj čvrst v primerjavi s pH 7.0 in 4.5, 5% gel (primerljivost z našim 4%) pri pH 1.2 pa je bil bolj čvrst kot pri 4.5 in 7.0 (30). Iz tega lahko sklepamo, da tvori ksantan pri pH 1.2 (urejena oblika, dvojna vijačnica) močnejše interakcije pri višjih koncentracijah. Dvojne vijačnice so pri bolj koncentriranem gelu bolj skupaj, zaradi urejenosti se lepše prilegajo in tvorijo bolj čvrst gel.

Graf 14 predstavlja primerjavo vrednosti G' in G'' za 1%, 2% in 4% gele v prečiščeni vodi. Pričakovano so moduli višji z višjo koncentracijo, saj je več interakcij med polimernimi verigami. Odnos med koncentracijo ter G' in G'' ni linearen, saj se moduli pri 2x višji koncentraciji ne povečajo za 2x. Poleg tega se zaporedje modulov glede na pH in koncentracijo spreminja.

Gele v medijih z različnim pH pri ionski moči 0,2 M, prav tako kot ogrodne tablete za test raztapljanja FO, smo naredili iz 2. serije ksantana (kupljen 2006), ker je ksantana iz 1. serije zmanjkalo. Geli pri pH 3.0, 4.5 in 7.0 in v prečiščeni vodi z NaCl so reološko praktično enaki (graf 15). Odstopa le pH 1.2. Ti rezultati se ujemajo z rezultati raztapljanja FO, kjer so med mediji v hitrosti sproščanja učinkovine iz ogrodne tablete zelo majhne razlike. Trdimo lahko, da je gel, ki nastane, po konsistenci v vseh medijih (razen pH 1.2, ki se razlikuje tudi po hitrosti sproščanja) pri $I = 0,2$ M enak. Manjše razlike v hitrosti sproščanja so posledica različne topnosti ksantana v odvisnosti od pH in zato v različni hitrosti nabrekanja ogrodnih tablet.

Po primerjavi reoloških rezultatov gelov iz 1. serije in 2. serije ksantana smo ugotovili, da je gel pri pH 4.5 pri $I = 0,1$ M bolj čvrst kot gel pri 0,2 M, ter da je gel pri pH 7.0 in $I = 0,1$ M manj čvrst kot pri 0,2 M. Predvidevali smo, da G' in G'' pri naraščanju ionske moči medija do neke točke naraščata, potem pa padeta na neko vrednost, ki je enaka ne glede na naraščanje I in ne glede na pH medija (razen pH 1.2). Trditev, da postane viskoznost ksantana pri neki določeni I neodvisna od povečevanja I podajajo tudi literaturni viri (5, 7). Razlog za to je, da se ksantan nahaja v maksimalno urejeni obliki, na katero ionska moč od neke točke dalje (ko so zasenčeni vsi negativni naboji na stranskih verigah) nima več vpliva.

Zato smo naredili gele pri pH 4.5 in 7.0 z mediji z različnimi ionskimi jakostmi (graf 16 in 17). Ne glede na ionsko moč so bili geli reološko enaki. Po primerjavi gela pri 4.5 z ionsko močjo 0,1 M iz 1. serije ksantana in 2. serije ksantana pa smo ugotovili, da seriji nista ekvivalentni. Verjetno gre pri 2. seriji za manjšo stopnjo substitucije s piruvatom ali pa je zaradi starosti že prišlo do delne hidrolize ketala s piruvično kislino. Potrditev reološke neenakosti med vzorci ksantana iz različnih serij navajajo tudi drugi avtorji (34). Zaključimo lahko, da med geli iz 2. serije ksantana v medijih s pH 4.5 in ionsko jakostjo

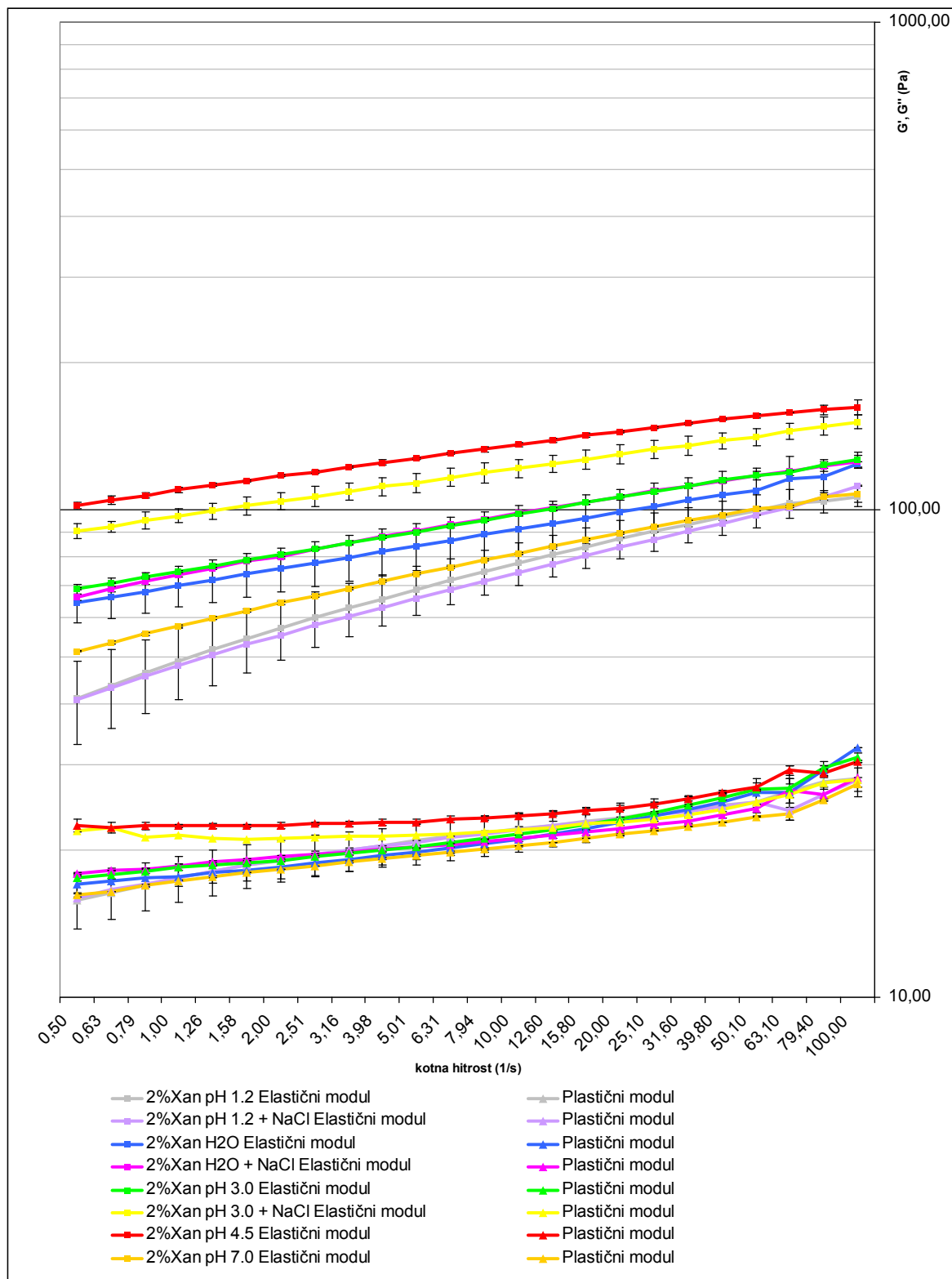
med 0,05 – 0,2 M ni razlik. Prav tako ni razlik med geli iz 2. serije ksantana v medijih s pH 7.0 in ionsko jakostjo med 0,15 in 0,4 M.

Zanimalo nas je tudi, ali ima sam pentoksifilin vpliv na strukturo gela. Graf 18 predstavlja vpliv PF na čvrstost gelov pri medijih s standardnim dodatkom NaCl. Masno razmerje ksantan : PF je v gelih enako kot v tableti (1 : 0,25), le enkrat pa smo naredili gel v prečiščeni vodi s PF v razmerju 1 : 0,5. Efekt PF je podoben efektu ionske moči, saj čvrstost gela naraste. Zelo visoko so moduli G' in G'' za gele v prečiščeni vodi.

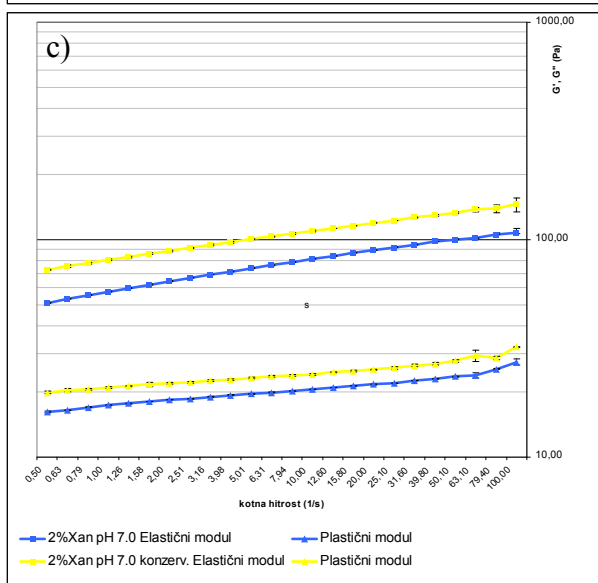
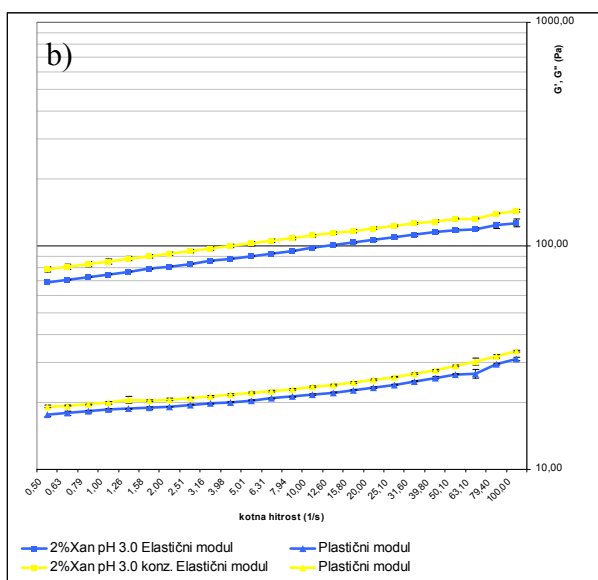
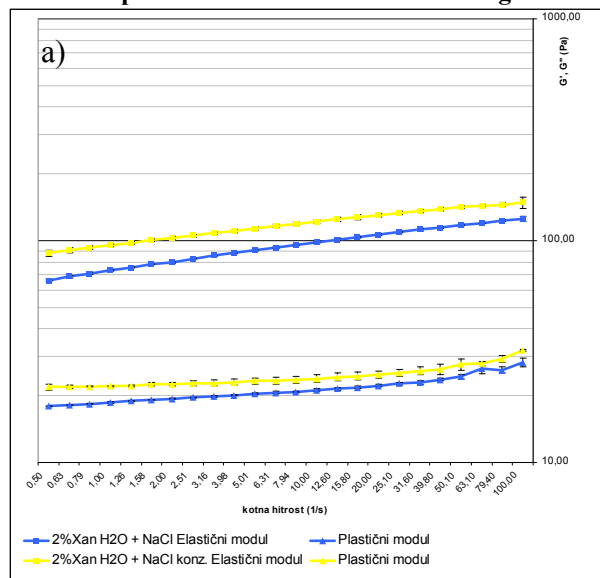
Pentoksifilin je zelo šibka baza s pK_b 12,74 (35). Interakcije COOH skupin in OH skupin ksantana s PF so možne, kar bi bil lahko razlog za počasno sproščanje PF v prečiščeni vodi. Moduli gela v mediju s pH 7.0 so se prav tako pomaknili navzgor v primerjavi s ksantanom brez PF, med tem ko so se moduli gelov pri pH 4.5 in prečiščeni vodi z NaCl pomaknili navzdol.

Zanimalo nas je tudi, ali ima na reološke lastnosti gela vpliv tudi staranje gela. Izbrali smo 2% konzerviran ksantan v pH 1.2 in pH 1.2 z NaCl, ker po literaturnih podatkih pride v mediju s pH, nižjim od 3.0, do hidrolize ketala s piruvično kislino in deacetilacije (1). Rezultate predstavljata graf 19 a in b. Pri obeh gelih je viden upad modulov G' in G'' po 7 tednih, po 7 dneh pa praktično ni nobenih razlik, kar pomeni, da je gel 1 teden kemijsko stabilen tudi pri tako nizkem pH.

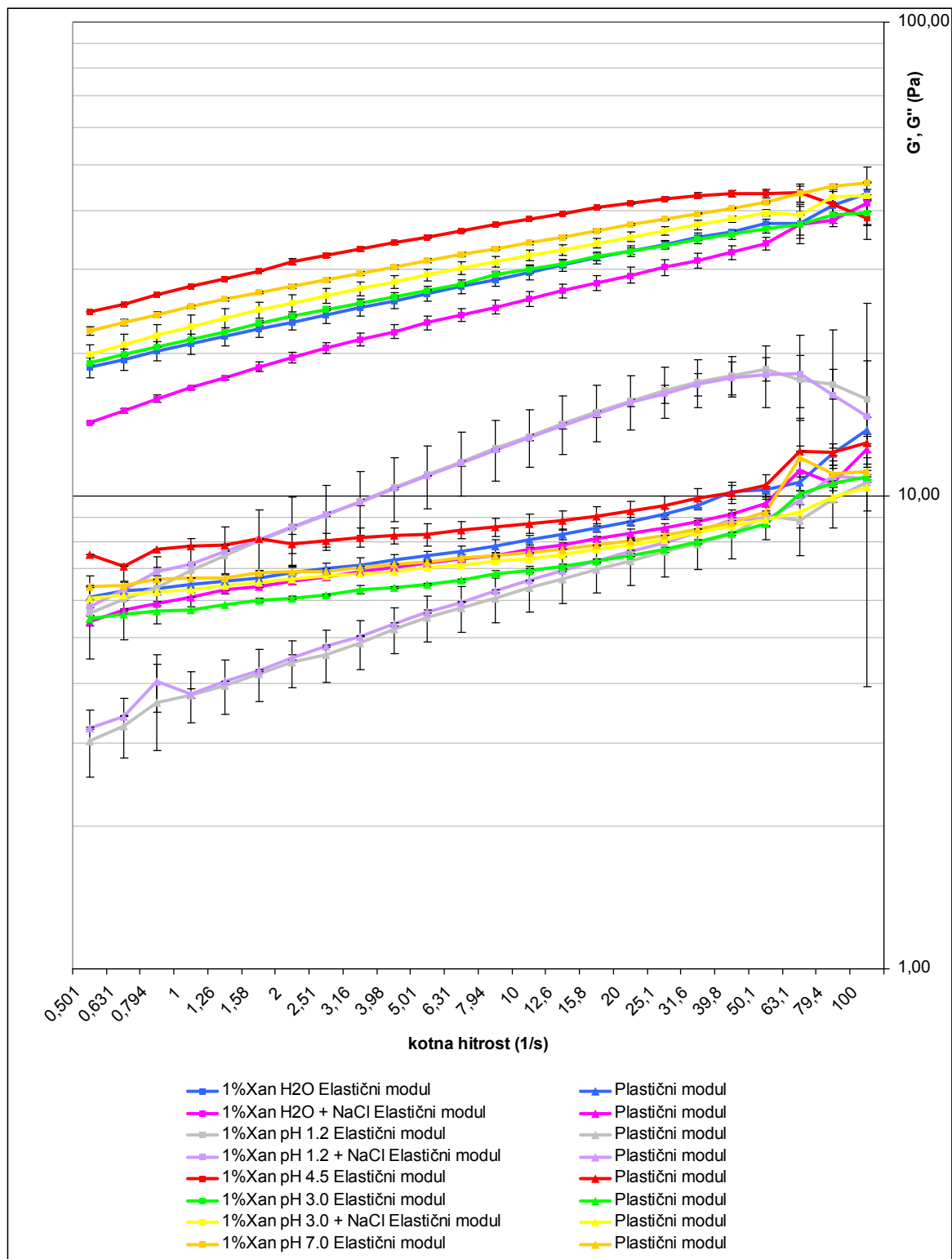
Graf 9: Mehanski spekter 2% gelov iz ksantana v pufrih s standardnim dodatkom NaCl, brez dodatka konzervansa



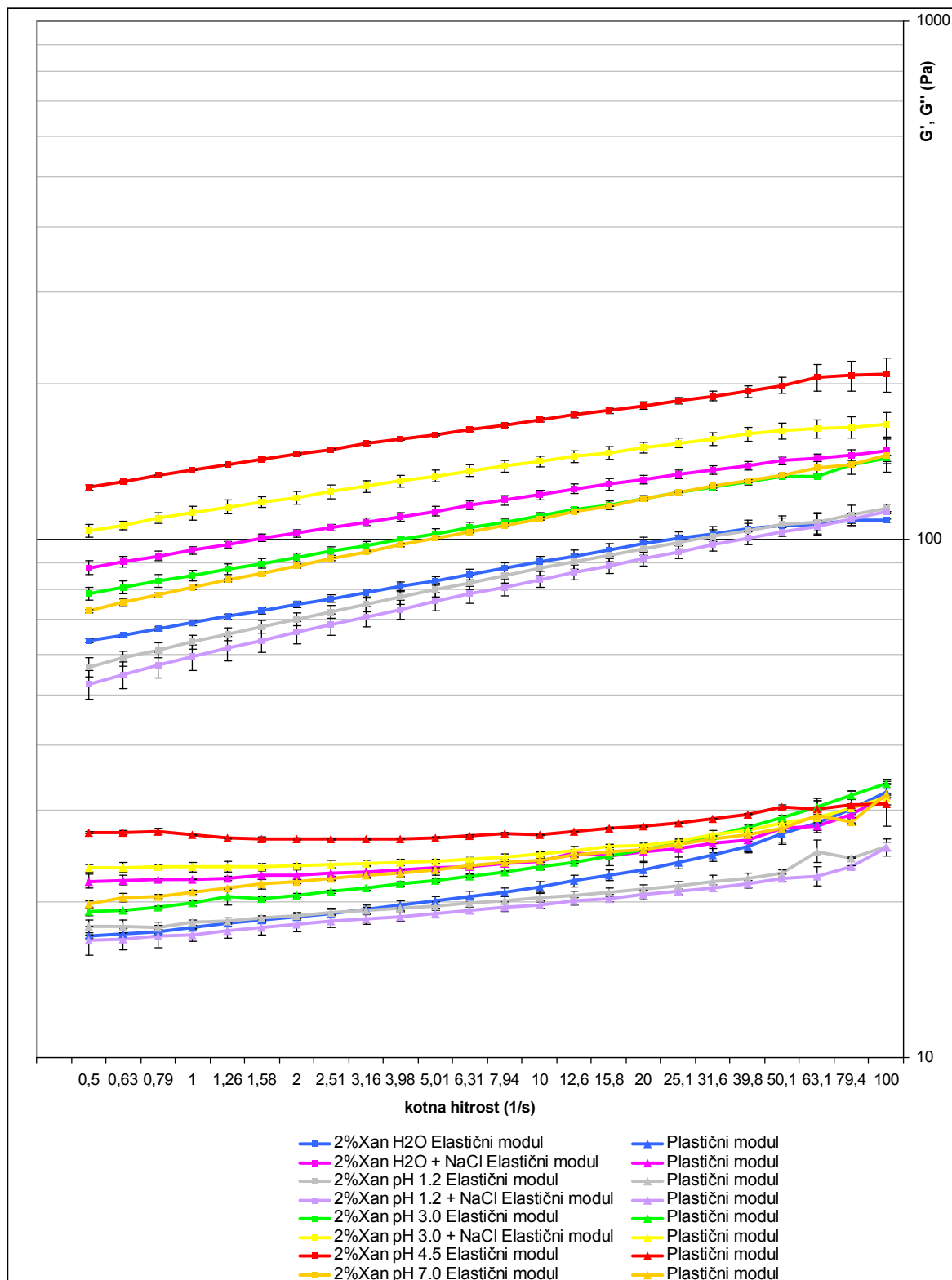
Graf 10: Vpliv konzervansa na čvrstost 2% gelov iz ksantana



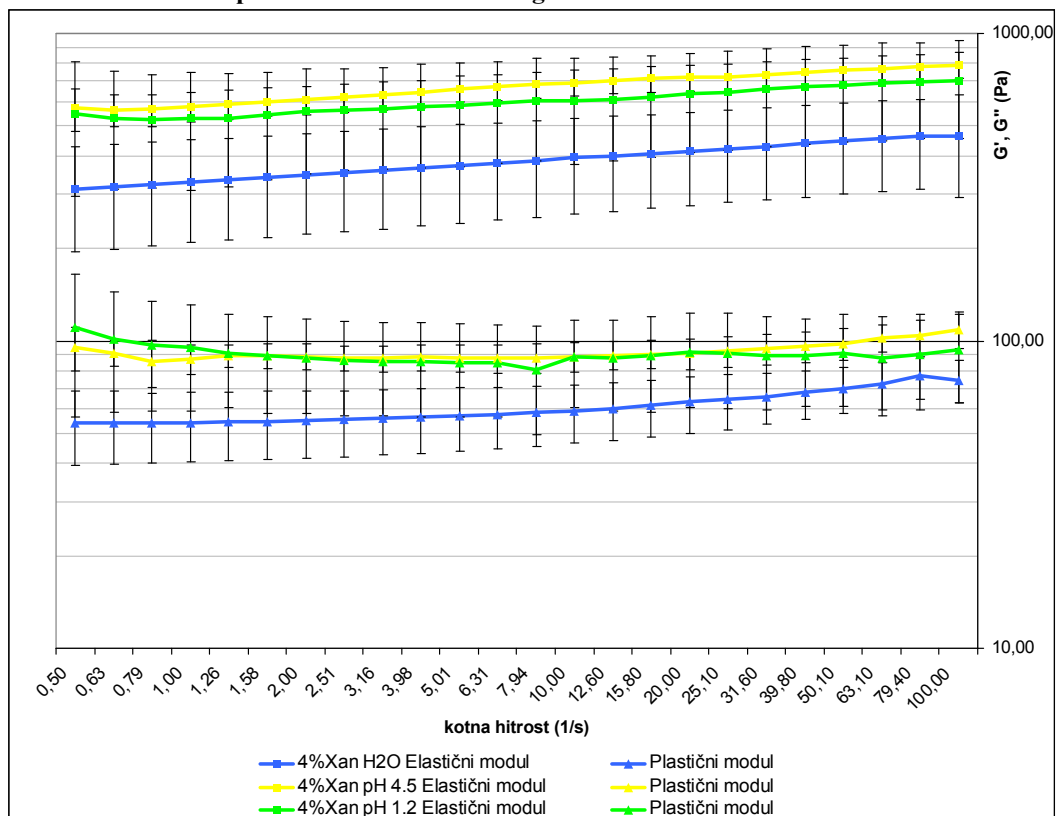
Graf 11: Mehanski spekter 1% gelov iz ksantana v pufrih s standardnim dodatkom NaCl in dodatkom konzervansa



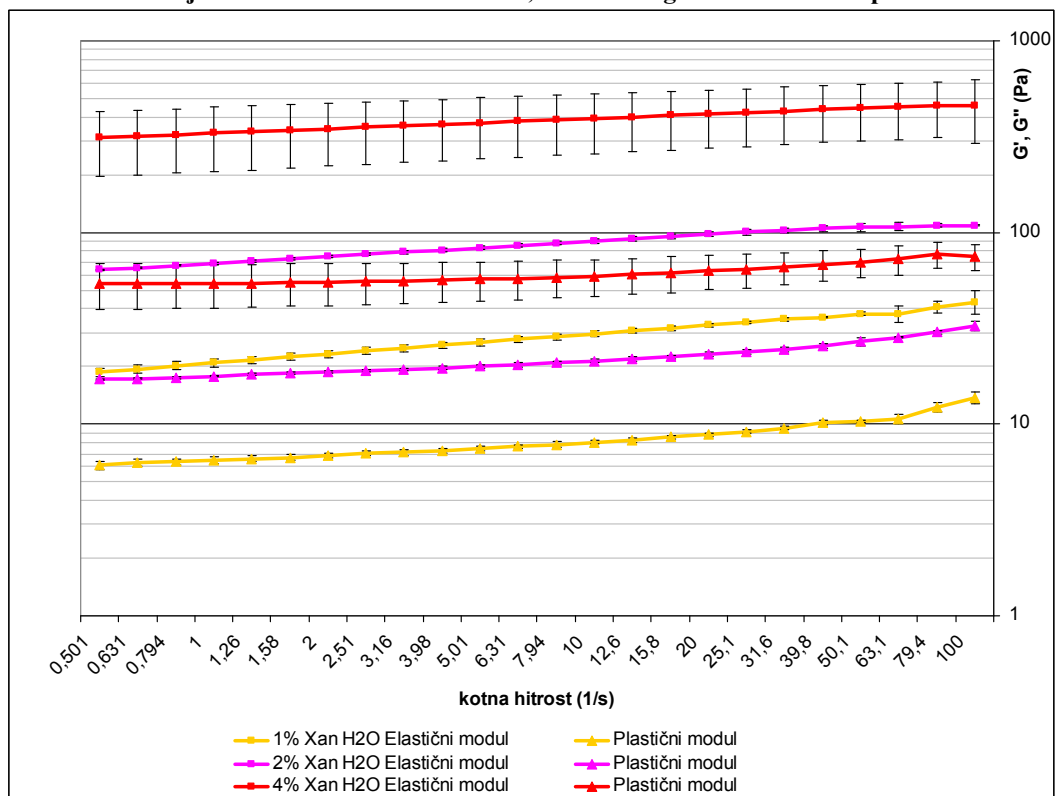
Graf 12: Mehanski spekter 2% gelov iz ksantana v pufrih s standardnim dodatkom NaCl in dodatkom konzervansa



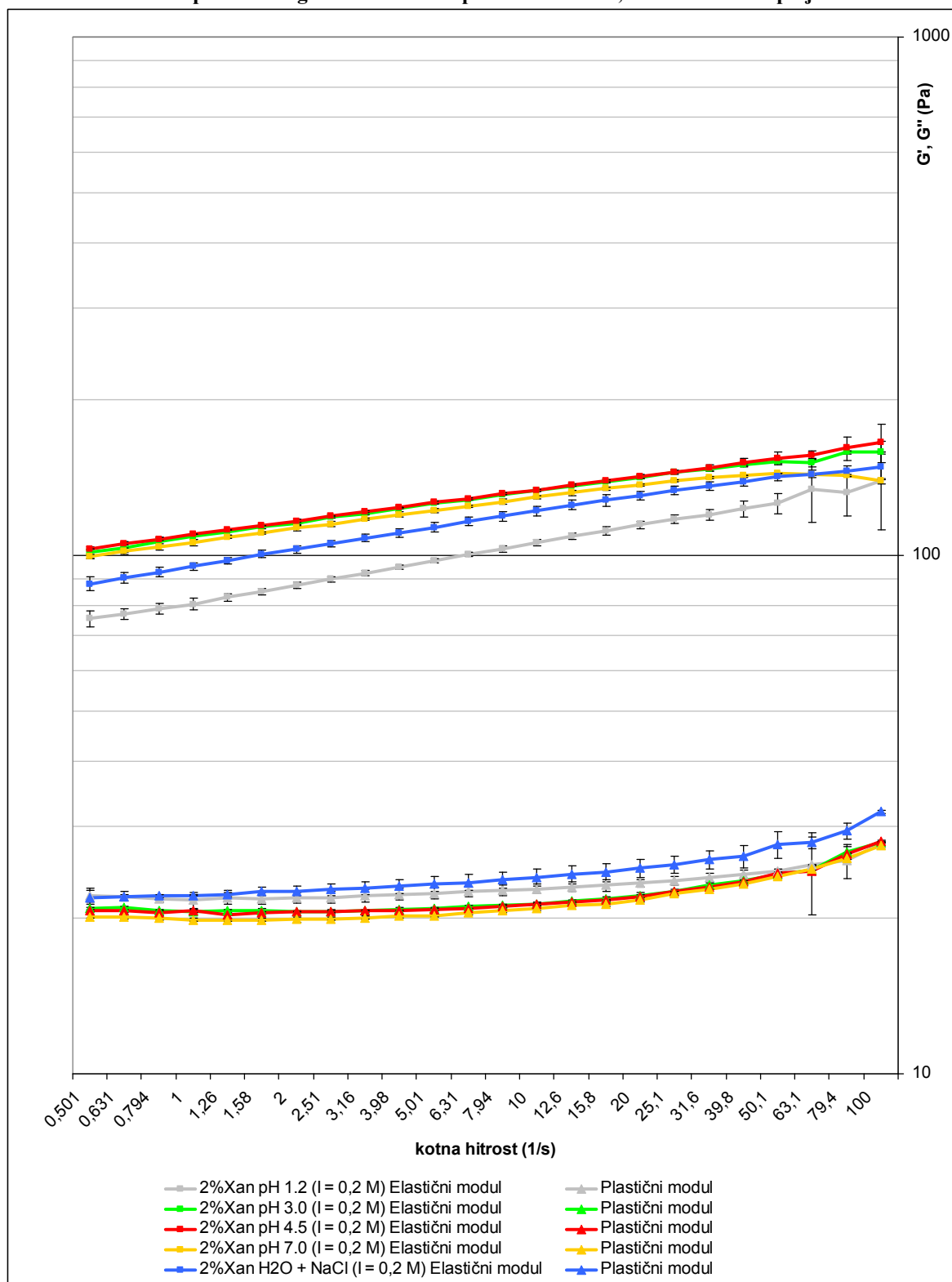
Graf 13: Mehanski spekter konzerviranih 4% gelov iz ksantana



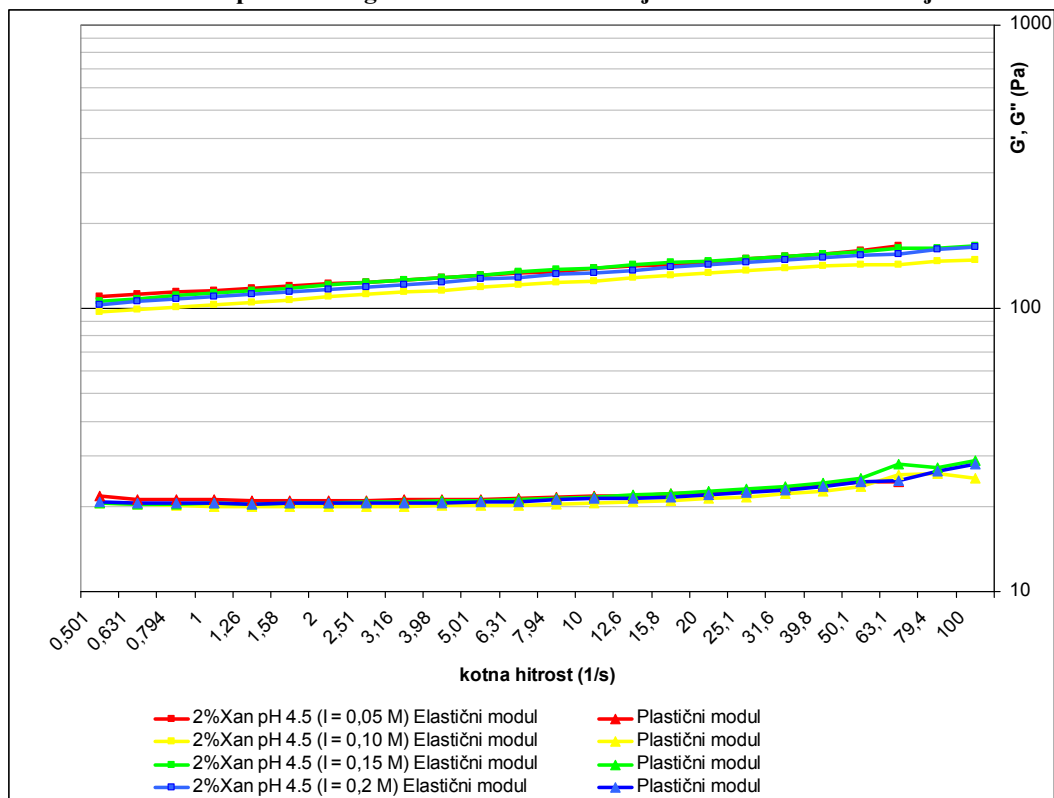
Graf 14: Primerjava modulov G' in G'' za 1%, 2% in 4% gele iz ksantana v prečiščeni vodi



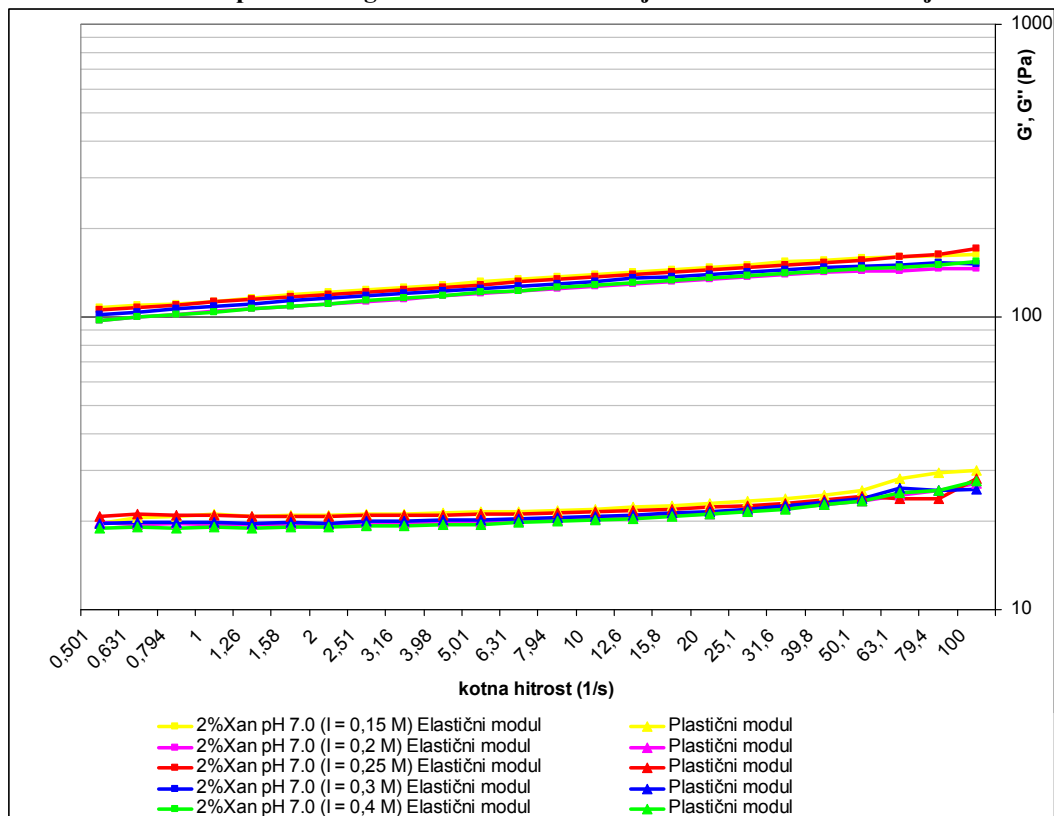
Graf 15: Mehanski spekter 2% gelov iz ksantana pri ionski moči 0,2 M in različnih pH-jih



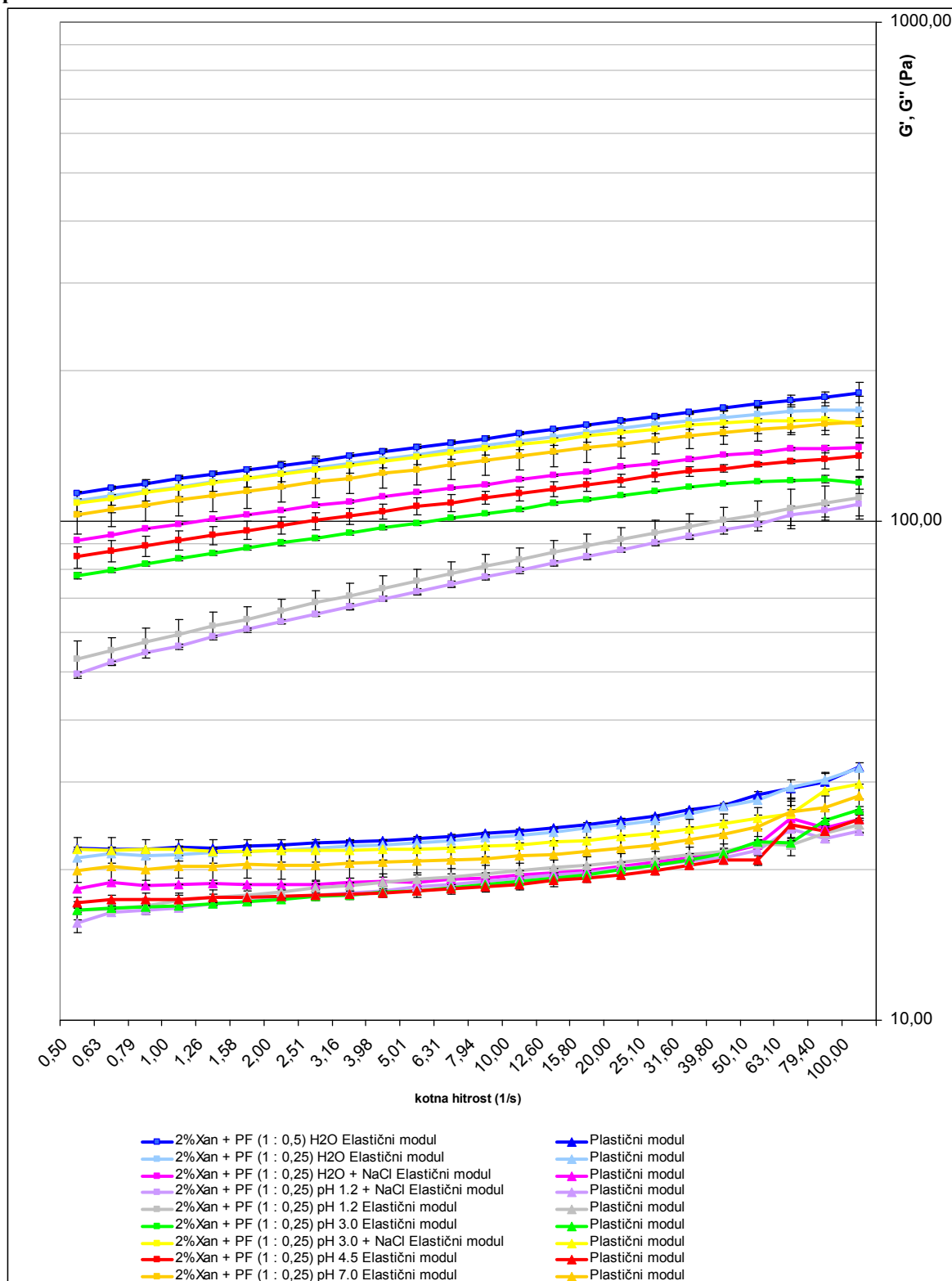
Graf 16: Mehanski spekter 2% gelov iz ksantana v medijih z različnimi ionskimi jakostmi in pH 4.5



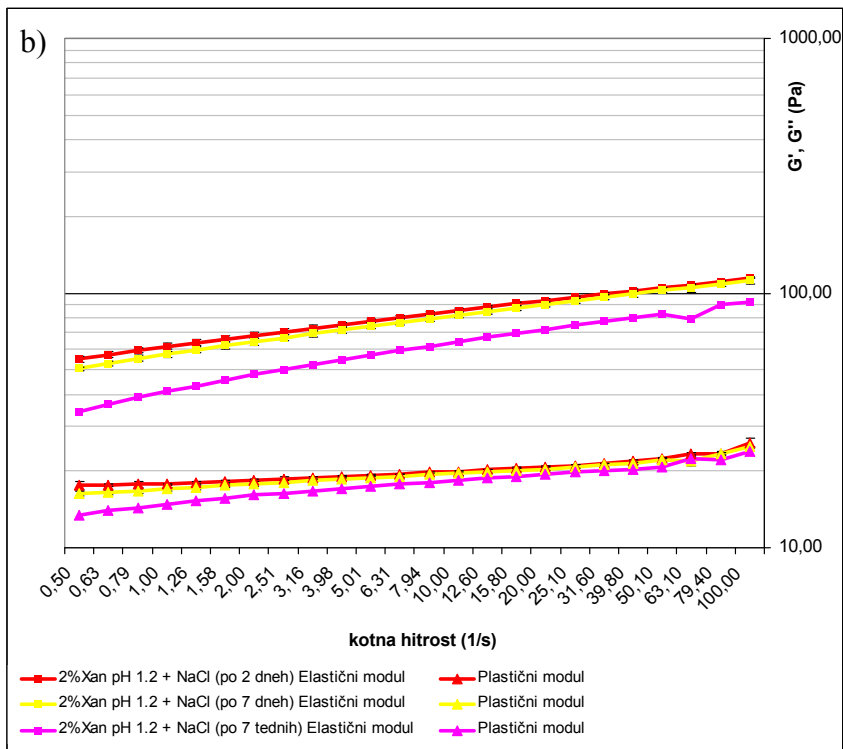
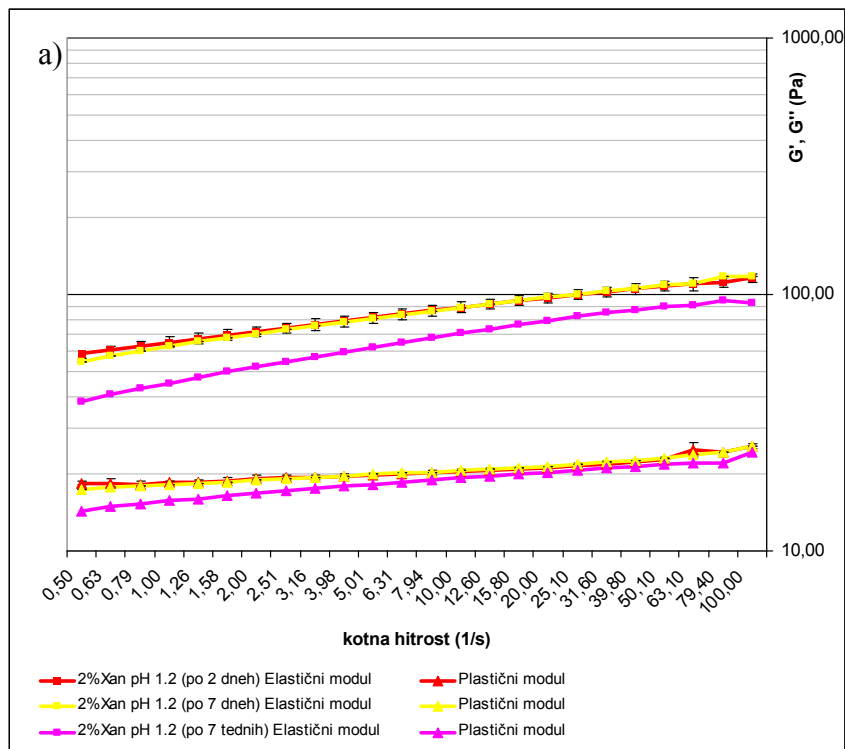
Graf 17: Mehanski spekter 2% gelov iz ksantana v medijih z različnimi ionskimi jakostmi in pH 7.0



Graf 18: Mehanski spekter 2% gelov iz ksantana v medijih s standardnim dodatkom NaCl in dodanim pentoksifilinom



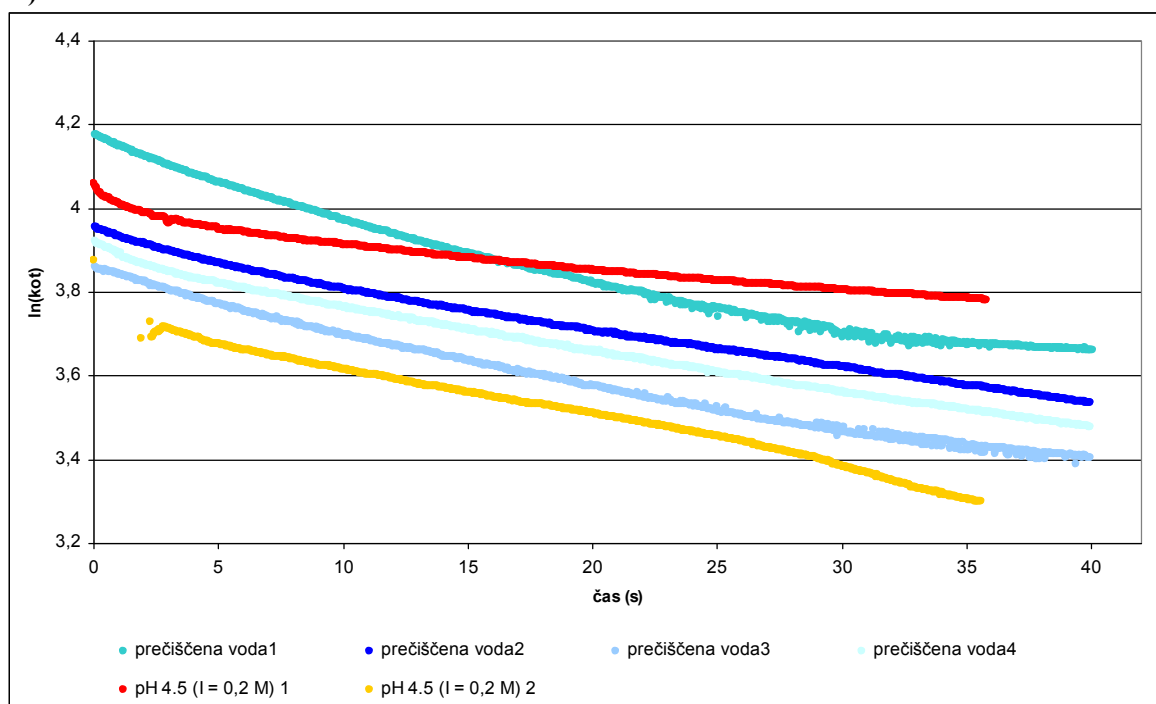
Graf 19: Vpliv staranja gela na G' in G'' pri 2% gelu iz ksantana in pH 1.2 in 1.2 + NaCl



4.4. Hitrost omočenja tablet

Rezultati določanja hitrosti omočenja so imeli znotraj enega medija prevelike razlike, zato se na razlike med mediji ni dalo ničesar sklepati. Graf 20 predstavlja hitrosti omočenja tablete s prečiščeno vodo (modri odtenki) ter z medijem pH 4.5 ($I = 0,2$ M) (rdeča in oranžna črta). Iz istih razlogov se v teorijo omočenja nismo poglobljali. Morda bi se razlike pokazale pri avtomatskem apliciranju standardnega volumna kapljice, saj le-tega pri ročni aplikaciji kapljice nismo mogli nadzorovati.

Graf 20: Razlike v hitrosti omočenja tablete (začetni del krivulje) s prečiščeno vodo in pH 4.5 ($I = 0,2$ M)



5. SKLEPI

Na čvrstost gela iz ksantana vpliva:

- *koncentracija ksantana* – več kot je molekul v raztopini, več interakcij tvorijo med sabo in obratno; koncentracija vpliva tudi na stopnjo razvitja dvojne vijačnice – višje kot so koncentracije, manj prostora imajo verige ksantana, da se razpletejo in nižje kot so koncentracije, več verig bo v obliki enojne vijačnice;
- *pH medija* – pri nizkem pH bo ksantan v obliki dvojne vijačnice, posledično bo navidezno nižja koncentracija verig ksantana, tvorile bodo manj interakcij, zato bo gel manj čvrst; efekt pa je drugače izražen pri višjih koncentracijah. Pri višjem pH bo več COOH skupin ioniziranih, večji bo elektrostatski odboj med verigami, ki bo silil molekule ksantana v razvitje dvojne vijačnice in preprečeval interakcije verig med sabo;
- *ionska moč oz. koncentracija kationov v mediju* – pri nizkih koncentracijah ni zadostnega senčenja negativnih nabojev, prevlada odboj med verigami, zato je gel manj čvrst; višje koncentracije kationov s senčenjem favorizirajo urejeno obliko ksantana;
- *priprava gela* – višja kot je temperatura priprave, večji delež ksantana bo v neurejeni obliki, med tem ko nizke temperature favorizirajo obliko dvojne vijačnice.

Boljša primerljivost hidrogelov iz ksantana s tistimi, ki nastanejo pri preskusu raztapljanja bi bila, če bi le-te pripravljali pri 37°C (mešanje v termostatisrani kadički), saj smo preskus raztapljanja izvajali pri 37°C. Prav tako hidrogelov ne bi smeli hraniti v hladilniku, saj so sistemi iz ksantana temperaturno občutljivi. Hidrogelov ne bi smeli konzervirati in oz. bi morali za boljšo primerljivost vgraditi konzervans v ogrodno tableto v enaki koncentraciji kot smo ga v hidrogel.

Rezultati reometrije se le delno ujemajo z rezultati raztapljanja FO. Na difuzijo učinkovine ne vpliva le čvrstost gela, temveč tudi hitrost njegovega nastajanja, kar je vidno pri reometriji hidrogela in hitrostjo sproščanja v prečiščeni vodi. Gel je po konsistenci šibek, vendar se zaradi najboljše topnosti ksantana zaradi nizke ionske jakosti prečiščene vode verige tukaj najhitreje razpletajo in tvorijo debelo gelsko bariero. Prav tako ne moremo izključiti interakcij med ksantanom in PF v prečiščeni vodi, saj PF vpliva na konsistenco gela iz ksantana.

Dodatek NaCl v mediju s pH 3.0 in prečiščeni vodi povzroči nastanek bolj čvrstega gela zaradi senčenja negativnih nabojev na stranskih verigah. Verige ksantana se počasneje

razvijajo iz dvojne vijačnice, zato je gelska plast tanjša v primerjavi s prečiščeno vodo ali medijem, ki vsebuje le HCl s pH 3.0. Pričakovali bi počasnejše sproščanje, vendar je le-to hitrejše.

Gelska plast okoli tablete se najpočasneje tvori v mediju s pH 1.2, kjer je ksantan zelo slabo topen. Reološko je ta gel pri nižjih koncentracijah (1%, 2%) tudi najmanj čvrst, kar se ujema z našo predpostavko, da bo manj čvrst gel hitreje sproščal učinkovino.

Geli pri ionski moči 0,2 M in pH 3.0, 4.5 in 7.0 in v prečiščeni vodi z NaCl so reološko praktično enaki. Odstopa le pH 1.2. Ti rezultati se ujemajo z rezultati raztapljanja FO, kjer so med mediji v hitrosti sproščanja učinkovine iz ogrodne tablete zelo majhne razlike. Gel, ki nastane, je po konsistenci v vseh medijih (razen pH 1.2, ki se razlikuje tudi po hitrosti sproščanja) pri $I = 0,2$ M enak. Manjše razlike v hitrosti sproščanja so posledica različne topnosti ksantana v odvisnosti od pH in zato v različni hitrosti nabrekanja ogrodnih tablet.

Verjetno bi bil vpliv pH medija na hitrost raztapljanja FO bolj izražen pri nižji ionski moči in bolj trdnih tabletah, kjer bi bilo sproščanje učinkovine bolj nadzorovano z raztapljanjem ksantana. Zanimivo bi bilo opazovati tudi sproščanje netopne učinkovine v odvisnosti od pH.

Direktno korelacijo konsistence gela s sproščanjem učinkovine bi dobili, če bi primerjali hitrost sproščanja učinkovine iz z učinkovino napolnjenih hidrogelov, pripravljenih v različnih medijih. V našem primeru igra pri sproščanju veliko vlogo hitrost nastanka gelskega sloja in ne samo njegova konsistenca.

Ker je ksantan naravna snov, sestava od vzorca do vzorca zelo variira. Zato rezultatov reometrije ne moremo posploševati za vsak ksantan. Oscilacijski testi so tudi veliko bolj občutljiva metoda za vrednotenje gelskega sloja kot metoda merjenja hitrosti sproščanja učinkovine iz FO, zato se razlike, ugotovljene pri reometriji, na hitrosti sproščanja ne vidijo.

6. LITERATURA

1. Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E: Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* 2000; 18: 549-579.
2. Palaniraj A, Vijayakumar J: Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering* 2011; 106: 1-12.
3. Katzbauer B: Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability* 1998; 59: 81-84.
4. European Pharmacopoeia 7th Edition, monografija: Xanthan gum (Xanthani gummi), EDQM, Strasbourg, 2011.
5. Talukdar MM, Kinget R: Swelling and drug release behaviour of xanthan gum matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 120: 63-72.
6. Lapasin R, Prici S: *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. Blackie Academic & Professional, London 1995.
7. Rochefort WE, Middleman S: Rheology of Xanthan Gum: Salt, Temperature and Strain Effects in Oscillatory and Steady Shear Experiments. *Journal of Rheology* 1987; 31(4): 337-369.
8. Pelletier E, Viebke C, Meadows J, Williams PA: A Rheological Study of the Order-Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum. *Biopolymers* 2001; 59: 339-346.
9. Rozman B, Baumgartner S, Gašperlin M: Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemih. *Farmacevtski Vestnik* 2005; 56: 110 (http://www.sfd.si/modules/catalog/products/prodfile/fv2_2005.pdf).
10. Moris JV, Mackie AR, Wilde PJ, Kirby AR, Clare E, Mills N, Gunning AP: Atomic Force Microscopy as a Tool for Interpreting the Rheology of Food Biopolymers at the Molecular Level. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 2001; 34(1): 3-10.
11. Camesano TA, Wilkinson KJ: Single Molecule Study of Xanthan Conformation Using Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules* 2001; 2: 1184-1191.
12. Capron I, Brigand G, Muller G: About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. *Polymer* 1997; 38(21): 5289-5295.
13. Milas M, Reed WF, Printz S: Conformations and flexibility of native and renatured xanthan in aqueous solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 1996; 18: 211-221.

14. Bergmann D, Furth G, Mayer C: Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules* 2008; 43: 245-251.
15. Quinn FX, Hatakeyama T, Takahashi M, Hatakeyama H: The effect of annealing on the conformational properties of xanthan hydrogels. *Polymer* 1994; 35(6): 1248-1252.
16. Fujiwara J, Iwanami T, Takahashi M, Tanaka R: Structural change of xanthan gum association in aqueous solutions. *Thermochimica Acta* 2000; 325-353: 241-246.
17. Blanco MD, Olmo RM, Teijón JM: Hydrogels. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare USA, Inc. 2007, 2021-2036.
18. Kozjek M: Proučevanje sproščanja vodotopne učinkovine iz hidrofilnih in lipofilnih ogrodnih tablet. Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2007.
19. Sereno NM, Hill SE, Mitchell JR: Impact of the extrusion process on xanthan gum behaviour. *Carbohydrate Research* 2007; 342: 1333-1342.
20. Iijima M, Shinozaki M, Hatakeyama T, Takahashi M, Hatakeyama H: AFM studies on gelation mechanism of xanthan gum hydrogels. *Carbohydrate Polimers* 2007; 68: 701-707.
21. <http://www.formularium.si/>
22. Baumgartner S: Farmacevtske oblike s prirejenim sproščanjem – študijsko gradivo. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
23. Wen H, Park K: Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery. Theory to practice. Willey & Sons, Inc. USA, 2010; 89-91.
24. Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA: Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 2000; 3(6): 198-204.
25. Mezger TG: The Rheology Handbook; for users of rotational and oscillatory rheometers. Vincentz 2006, Hannover.
26. Zupančič Valant A. Uvod v reologijo. FKKT 2007, Ljubljana.
27. Planinšek O, Srčič S. Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. FFA, Ljubljana 2007.
28. Kladnik R. Visokošolska fizika 1. del; Mehanski in toplotni pojavi. DZS, Ljubljana 1989.

29. Žumer M, Zupančič Valant A, Florjančič U, Mesec A. Seminar iz aplikativne reologije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, FKKT, Katedra za kemijsko inženirstvo, 1997.
30. Flajšman H: Proučevanje nabrekanja tablet iz ksantana z oscilacijsko reometrijo in magnetnim resonančnim slikanjem. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2009.
31. Sovinc N: Prednosti sinergizma med ksantanom in semensko sluzjo rožičevca za izdelavo tablet s podaljšanim sproščanjem. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2006.
32. European Pharmacopoeia 7th Edition, poglavje 2.9.3., EDQM, Strasbourg, 2011.
33. <http://www.usp.org/>
34. Choppe E, Puaud F, Nicolai T, Benyahia L: Rheology of xanthan solutions as a function of temperature, concentration and ionic strength. Carbohydrate Polymers 2010; 82: 1228-1235.
35. http://www.chemicaldictionary.org/dic/P/Pentoxifylline_138.html