

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA KREJAČ

**IZDELAVA IN REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV  
IZ ALGINATA, KSANTANA IN KARAGENANA**

**PREPARATION AND RHEOLOGICAL EVALUATION OF  
ALGINATE, XANTHAN AND CARRAGEENAN HYDROGELS**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner, mag. farm..

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge, Tatjani Hrovatič za praktične nasvete in pomoč pri delu v laboratoriju, mag. farm. Romani Rosič za pomoč pri merjenju reologije ter dr. Mirjam Gosenica za pomoč pri ternarnih faznih diagramih.

Hvala tudi staršem, Borutu in prijateljem za vso podporo pri študiju in izdelavi diplomske naloge.

### **Izjava**

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

Aleksandra Krejač

Predsednik diplomske komisije: *prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.*

Član diplomske komisije: *asist. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.*

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

# KAZALO

<b>1. UVOD</b>	<b>10</b>
<b>1.1. NARAVNI POLIMERI</b>	<b>10</b>
1.1.1. ALGINATI	10
• Priprava raztopine natrijevega alginata (NA)	12
1.1.2. KSANTAN (XAN)	13
1.1.3. KARAGENANI (CARR)	15
• Priprava raztopine CARR	17
• Uporaba CARR	18
<b>1.2. REOLOGIJA</b>	<b>18</b>
1.2.1. Idealne Newtonske viskozne tekočine	19
1.2.2. Idealne elastične snovi	20
1.2.3. Viskoelastične snovi	21
• Viskoelastične trdne snovi	22
• Viskoelastične tekočine	22
1.2.4. Merjenje viskoelastičnih lastnosti sistemov	22
1.2.5. Dinamični – oscilatorni testi	23
<b>2. NAMEN DELA</b>	<b>25</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNO DELO</b>	<b>26</b>
<b>3.1. MATERIALI</b>	<b>26</b>
<b>3.2. NAPRAVE</b>	<b>26</b>
<b>3.3. POSTOPKI IN METODE</b>	<b>27</b>
3.3.1. Priprava medijev	27
3.3.2. Priprava hidrogelov iz alginata	28
3.3.3. Priprava hidrogelov iz ksantana (XAN)	29
3.3.4. Priprava hidrogelov iz karagenana (CARR)	32
3.3.5. Reološko vrednotenje hidrogelov	34
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>36</b>
<b>4.1. ROTACIJSKO VREDNOTENJE VISKOZNOSTI</b>	<b>36</b>
4.1.1. Viskoznostni diagram vzorcev iz alginata (NA)	36
4.1.2. Viskoznostni diagram vzorcev iz ksantana (XAN)	38

4.1.3.	<i>Viskoznostni diagram vzorcev iz karagenana (CARR)</i>	39
<b>4.2.</b>	<b>OSCILACIJSKO VREDNOTENJE VISKOZNOSTI</b>	<b>41</b>
4.2.1.	<i>Reološka opredelitev sistemov NA v mediju brez CaCl<sub>2</sub></i>	43
4.2.2.	<i>Reološka opredelitev sistemov NA v mediju s CaCl<sub>2</sub></i>	44
4.2.3.	<i>Reološka opredelitev sistemov XAN v mediju brez/s CaCl<sub>2</sub></i>	46
4.2.4.	<i>Reološka opredelitev sistemov CARR v mediju brez KCl/CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O</i>	52
4.2.5.	<i>Reološka opredelitev sistemov CARR v mediju s KCl/Cal<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O</i>	55
<b>5.</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>62</b>

## POVZETEK

Alginat, ksantan in karagenan so biološki polimeri anionskega značaja, ki v vodi nabrekajo in tvorijo viskozne raztopine ali čvrste gele. Alginat je linearen polimer, sestavljen iz homogenih odsekov D-manuronske in L-guluronske kisline in odsekov, kjer se kislini izmenjujeta. Njegova pomembna lastnost je tvorba dveh vrst gelov, kislinskega v kislem okolju in ionskega v prisotnosti večvalentnih kationov. Ksantan je polisaharid, mikrobiološkega izvora. Primarno strukturo tvori pentasaharidni fragment, sestavljen iz dveh glukoznih enot in dveh manoznih enot ter ene glukuronske kisline. Sekundarno strukturo predstavljata dve verigi ksantana, prepleteni v dvojno vijačnico, medtem ko je obstoj terciarne strukture še vedno predmet raziskav. Ksantan v vodi nabreka in tvori čvrste gele. Karagenani so anionski polimeri, ki so komercialno dostopni v treh vrstah:  $\kappa$  (kapa),  $\iota$  (jota) in  $\lambda$  (lambda). Kemijsko so sestavljeni iz linearnih, delno sulfatiranih, ponavljajočih se disaharidnih enot galaktoze in 3,6-anhidrogalaktoze. Kapa in jota karagenan sta gelirajoča polimera zaradi vsebnosti 3,6-anhidrogalaktoze, lambda karagenan pa slednje ne vsebuje in je močno sulfatiran, zato po mnenju strokovnjakov ne more tvoriti gelov.

Namen diplomske naloge je bil reološko ovrednotiti hidrokele oziroma raztopine iz alginata, ksantana in karagenana v različnih medijih. Izvedli smo rotacijske in oscilacijske teste. Z rotacijskimi smo preverili vpliv vrste polimera, koncentracije polimera, vrste medija in priprave vzorca na njegovo viskoznost. Ugotovili smo, da se v vseh vzorcih z naraščanjem koncentracije polimera viskoznost povečuje. Ostalih dejavnikov pa ne moremo tako posplošiti, saj so rezultati za vsak proučen polimer specifični. Z oscilacijsko reometrijo smo tako za polimerne raztopine kot za hidrokele izmerili in primerjali elastični ( $G'$ ) in plastični ( $G''$ ) modul 3 % vzorcev alginata v vodi, v vodi z ionsko močjo 0.2 M, v simuliranem intestinalnem soku in v simuliranem intestinalnem soku z ionsko močjo 0.2 M, 0.5 % vzorcev ksantana v vodi in v vodi z ionsko močjo 0.01 M ter 3 % vzorcev karagenana v vodi, v vodi z ionsko močjo 0.2 M, v simuliranem intestinalnem soku, v simuliranem intestinalnem soku z ionsko močjo 0.2 M in v simuliranem želodčnem soku. Ker so alginati, ksantan in karagenani anionski polimeri, nas je zanimal vpliv pH-ja in ionske moči na čvrstost nastalih gelov oziroma na viskoznost polimernih raztopin.

V zadnjem delu smo polimernim raztopinam alginata in ksantana dodali  $\text{CaCl}_2$  in raztopinam karagenana KCl oziroma  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ter z oscilacijskimi testi proučili vpliv dodanih ionov na strukturo polimera. V alginatu se kalcijevi ioni izmenjujejo z natrijevimi

ioni s soli guluronskih kislin ter povežejo odseke guluronskih kislin med seboj. Zvišata se vrednosti dinamičnih modulov  $G'$  in  $G''$  in potrdili smo nastanek gelske strukture. Molekula ksantana hitreje in učinkoviteje nabreka v vodi, ki smo ji dodali  $\text{CaCl}_2$ . Prisotni kalcijevi ioni ne povzročajo prečnega premreženja molekul ksantana, temveč senčijo negativno nabite karboksilne kisline na trisaharidnih stranskih verigah in zmanjšajo odboj med molekulami. Dokazali smo, da kalcijevi ioni ne premrežijo molekul ksantana, pač pa stabilizirajo njegovo neurejeno strukturo. Enovalentni kalijevi ioni so po teoriji bistveni pri nastanku čvrste gelske strukture kapa karagenana, dvovalentni kalcijevi ioni pa pomagajo pri tvorbi intermolekularnih in intramolekularnih vezi med molekulami jota karagenana. Naši rezultati ne sledijo temu pravilu, saj so vrednosti dinamičnih modulov kapa karagenana z dodanim  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  višje od dinamičnih modulov kapa karagenana z dodanim  $\text{KCl}$ . Lambda karagenan po mnenju mnogih strokovnjakov zaradi visoke stopnje sulfatiranosti ne more tvoriti gelov. Rezultati naših meritev pa govorijo drugače, saj so visok pH ( $\text{pH} = 6.8$ ), visoka ionska moč ( $\mu = 0.2 \text{ M}$ ) in dodatek  $\text{KCl}$  privedli do nastanka gelske strukture.

V diplomski nalogi smo nekatere teorije lahko potrdili, druge pa smo morali ovreči. Razlog je lahko v različni pripravi vzorcev oziroma razlikah v izbranih surovinah, ki so organskega izvora.

## ABSTRACT

Alginate, xanthan and carrageenan are biological polymers with anionic character. They can swell in water and there they form a viscous solution or solid gels. Alginate is linear polymer, composed of homopolymeric D-mannuronic and L-guluronic acid blocks and heteropolymeric blocks where the monomers alternate. An important feature is the formation of two types of gel, an acid gel in acidic environment and ionotropic gel in the presence of multivalent cations. Xanthan is polysaccharide with microbiological source. Primary structure is formed by fragment of pentasaccharide, composed from two glucose units, two mannose units and one glucuronic acid. Secondary structure is consisted from two xanthan chains that are twisted into a double helix. However existence of the tertiary structure is still being studied. Xanthan swell in water and there they form solid gels. Carrageenans are anionic polymers that are in commercial way available in three different types:  $\kappa$  (kappa),  $\iota$  (iota) and  $\lambda$  (lambda). Their chemical composition is build from sulfated and non-sulfated linear repeating galactose units and 3,6-anhydrogalactose. Kapa and iota carrageenans can bind water and form gel, because they contain 3,6-anhydrogalactose. Lambda carrageenan is highly sulfated and therefore less likely to form gel structure.

Purpose of these thesis was rheological evaluation of alginate, xanthan and carrageenan hydrogels or polymer solutions in different mediums. We performed rotation and oscillatory tests. With rotation tests we have examed the impact of type of polymer, concentration of polymer, type of medium and sample preparation. We found out that the viscosity of all samples increases with increasing concentration. We can not generalize other factors, because each sample leads to different result. With the method of oscillated rheometry for polymer solutions and hydrogels we checked changing of elastic ( $G'$ ) and plastic ( $G''$ ) modul: in 3 % of alginate samples in the water and in the water with ionic strength 0.2 M, in 0.5 % of xanthan samples in the water and in the water with ionic strength 0.2 M and in 3 % of carrageenan samples in the water, in the water with ionic strength 0.2 M, in the simulated intestinal juice, in the simulated intestinal juice with ionic strength 0.2 M and in the simulated gastric juice. Alginate, xanthan and carrageenan are anion polymers. For that reason we want to find out the influence of pH and the influence of the ionic strength on the gel strength and viscosity of polymeric solutions.

In the last part we added  $\text{CaCl}_2$  in alginate and xanthan polymer solution and KCl or  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in carrageenan solution and determined their structure with the oscillation test.

Calcium ions are exchanged with sodium ions from salt of guluronic acid units in alginate solution and section of guluronic acid units linked to each other. The values of the dynamic modules  $G'$  in  $G''$  increased and we approved the formation of gel structure. Xanthan showed substantially faster and more extensive swelling in the water than in the presence of the calcium ions. The presence of calcium ions in the solution does not cause crosslinking of xanthan polymer but it causes charge screening of ionized groups on the trisaccharide side chain of xanthan leading to lower inter-molecular repulsion. Potassium ions are in theory essential in order to form gel structure with kappa carrageenan and the divalent calcium ions help form bonds between molecules of iota carrageenans. Lambda carrageenan is highly sulfated and therefore less likely to form a gel structure. Our results came to the different conclusions where high pH (pH = 6.8), high ionic strength ( $\mu = 0.2$  M) and adding KCl made the gel structure.

In the thesis we have made some theories confirmed, others not. This may be due to different sample preparation or differences in selected raw materials which are of organic source.



## SEZNAM OKRAJŠAV

ZU – zdravilna učinkovina

M –  $\beta$ -D-manuronska kislina

G –  $\alpha$ -L-guluronska kislina

pH – potenca vodikovih ionov (negativni desetiški logaritem molarne koncentracije vodikovih ionov)

pKa – negativni desetiški logaritem disociacijske konstante Ka

Tm – temperatura konformacijskega prehoda

$\mu$  – ionska moč

FO – farmacevtska oblika

LVE – linearni viskoelastični odziv

NA – natrijev alginat

NA LF – Protanal LF 10/60

NA LS – Protanal LF 10/60 LS

CA – kalcijev alginat

XAN – ksantan

CARR – karagenan

CARR  $\iota$  – karagenan jota

CARR  $\kappa$  – karagenan kapa

CARR  $\lambda$  – karagenan lambda

$\omega$  – kotna hitrost

D – strižna hitrost

$\eta$  – viskoznost

$\gamma$  – strižna deformacija

SEC – Size exclusion chromatography, izključitvena kromatografija

MALLS – Multi-Angle Light Scattering, sipanje svetlobe pri različnih kotih

# 1. UVOD

## 1.1. Naravni polimeri

Polimeri so makromolekule, ki so sestavljene iz ponavljajočih se manjših monomernih enot. Kemijsko reakcijo, pri kateri se povežeta dve ali več monomernih enot, odcepi pa se manjša molekula, imenujemo polimerizacija. Polimere delimo na naravne in sintezne, homopolimere (npr. škrob, celuloza) in heteropolimere (npr. nukleinske kisline), ... Naravni polimeri se nadalje delijo na polisaharide (npr. celuloza, škrob, hitin) in proteine (1).

V farmacevtski industriji prevladuje uporaba sinteznih polimerov, saj so lastnosti naravnih polimerov slabše poznane, prisotna je večja verjetnost pojava nečistot in variabilnosti med serijami surovine. Prav tako lahko pride do omejitev v proizvodnji. Po drugi strani je prednost naravnih polimerov netoksičnost, cena in neomejen dnevni vnos v človeško telo, zato njihova uporaba v farmacevtski industriji v zadnjih letih narašča. Uporabljajo se zlasti kot zgoščevala, stabilizatorji, veziva in pri izdelavi farmacevtskih oblik s prirejenim sproščanjem ZU.

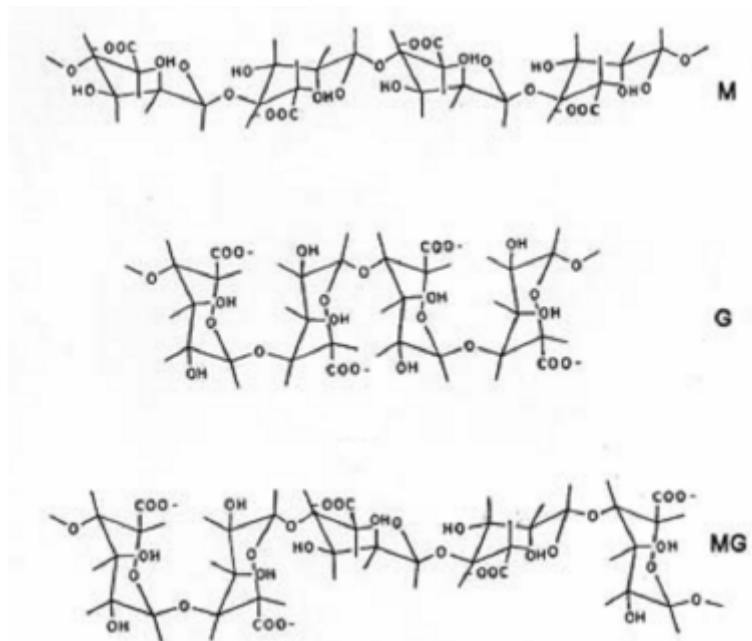
Najpogosteje uporabljeni naravni polimeri v farmacevtski industriji (2):

- Alginat (alginate)
- Dekstran (dextran)
- Gelan (gellan)
- Hitosan (chitosan)
- Karagenani (carrageenans)
- Ksantan (xanthan)
- Pektin (pectin)
- Semenska sluz rožičevca (locust bean gum)

### 1.1.1. ALGINATI

Alginska kislina je naraven polisaharid, ki se v glavnem nahaja v različnih vrstah rjavih morskih alg, in sicer v obliki kalcijevih, natrijevih, magnezijevih, barijevih in stroncijevih soli. Kemijsko je linearen, nerazvejan polisaharid sestavljen iz monomernih enot (običajno 100–3000),  $\beta$ -D-manuronske (M) in  $\alpha$ -L-guluronske (G) kisline, povezanih z 1,4-glikozidno vezjo (3). G in M enota se skupaj povezujeta v poli-M in poli-G odseke ter v MG odseke, kjer se kislini izmenjujeta (Slika 1). Delež, porazdelitev in dolžina teh odsekov določa fizikalne in kemijske lastnosti alginatnih molekul (4). Fizikalne lastnosti alginata, med katerimi je tudi viskoznost, so odvisne od molekulske mase in sestave polimera (M/G razmerje, dolžina

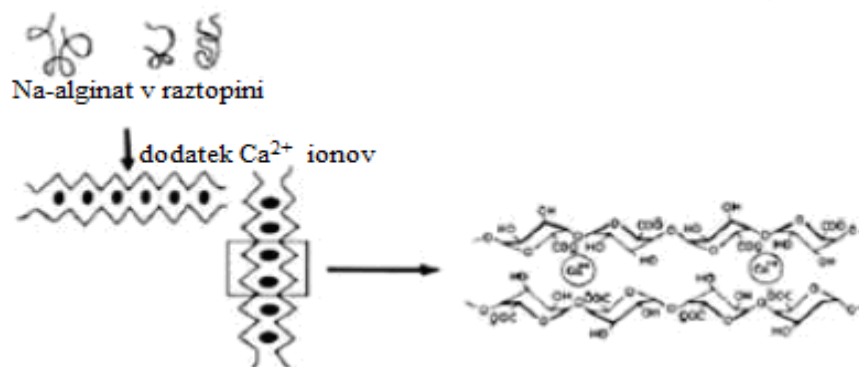
posameznih odsekov). Neionizirana alginska kislina je v vodi netopna, topnost alginata pa je odvisna od pH in od vrste prisotnih ionov (3).



Slika 1: Struktura polimanuronskega (poli-M) in poliguluronskega (poli-G) bloka alginata ter bloka, kjer se manuronska in guluronska kislina izmenjujeta (MG) (3)

Alginat lahko tvori dve vrsti gelov:

- **KISLINSKI GEL:** nastane takrat, ko pH raztopine počasi pade pod pKa guluronske kisline ( $pK_a = 3.65$ ) in manuronske kisline ( $pK_a = 3.38$ ). Ta gel je stabiliziran z intramolekularnimi vodikovimi vezmi, njegovo čvrstost pa določa predvsem delež G odsekov (3,5).
- **IONSKI (IONOTROPNI) GEL:** nastane v prisotnosti večvalentnih kationov, kot so npr.  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ . Izjema je  $Mg^{2+}$ , ki tako kot monovalentni ioni, tvori v vodi viskozne koloidne raztopine (3).  $Ca^{2+}$  se izmenjujejo z  $Na^+$  s soli guluronskih kislin ter povežejo odseke guluronskih kislin med sabo. Nastane urejena tridimenzionalna struktura, dodatno stabilizirana z vodikovimi vezmi, imenovana »škatla za jajca« (Slika 2). Razlog, da so za geliranje potrebni G-odseki, najdemo v njihovi prostorski razporeditvi kisikovih atomov v hidroksilnih in karboksilnih skupinah, zaradi katere imajo veliko afiniteto do večvalentnih kationov (izjema je  $Mg^{2+}$ ).  $Zn^{2+}$  ioni pa naj bi premreževali G-odseke in MG-odseke (3, 6).



Slika 2: Shematski prikaz nastanka strukture »škafila za jajca« (3)

Zelo pomembna lastnost alginata je njegova topnost v vroči in hladni vodi, kjer tvori koloidno raztopino ali gel. To lastnost izkoriščata prehrabena in farmacevtska industrija, kjer se uporablja kot emulgator, stabilizator ter tvorilec gela ali filma (7). V prehrabeni industriji je pomemben nastanek kislinskega alginatnega gela v kislem želodčnem soku, ki se kasneje v debelem črevesju encimsko razgradi (3,8). Alginat je poleg vseh ugodnih lastnosti tudi biokompatibilen, biorazgradljiv in netoksičen, zato je v farmacevtski industriji pogosto rabljen kot ogrodni polimer za izdelavo ogrodnih sistemov, mikrokapsul, oblog za vlažno celjenje ran, raztopin za okularno in peroralno aplikacijo (3),...

Za vodne raztopine alginata je značilna psevdoplastičnost, kar pomeni da viskoznost z naraščajočo strižno hitrostjo pada. Viskoznost raztopine je odvisna od koncentracije alginata in od dolžine molekule oziroma od števila monomernih enot v verigi. Daljša kot je veriga, večja je viskoznost vodne raztopine pri podobnih koncentracijah. V vodnih raztopinah alginata je gibljivost molekul zlasti okoli glikozidnih vezi v G odsekih ovirana kar prispeva k togosti molekule in povečanju viskoznosti raztopine. Tudi temperatura pomembno vpliva na odziv vodne raztopine alginata do strižnih sil. V splošnem namreč velja, da zvišanje temperature za 1 °C zmanjša viskoznost za približno 2,5 % (4).

- **Priprava raztopine natrijevega alginata (NA)**

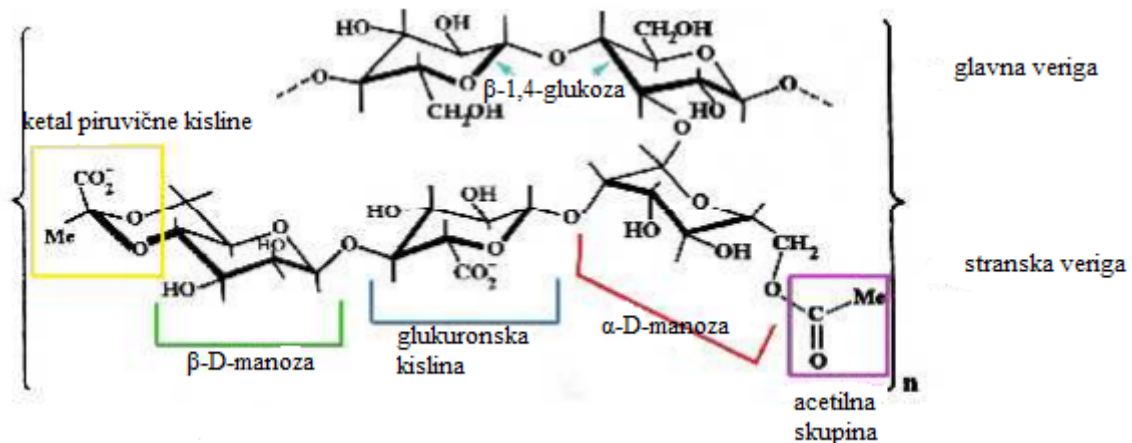
Priprava vzorcev vedno vpliva na njegove lastnosti. Podjetje FMC BioPolymer, ki je proizvajalec našega NA, navaja sledeči postopek priprave raztopine, po katerem smo pripravili vzorce tudi mi. Praškast NA je potrebno počasi dodajati v vrtinec mešajoče se vode, da preprečimo nastanek večjih kep. Raztopino je potrebno mešati vsaj 30 min oziroma dlje, odvisno od količine dodanega NA. NA je manj dovzeten za mikrobne napade v primerjavi z ostalimi ogljikovimi hidrati. Kljub vsemu pa se jim zaradi izognitve depolimerizaciji tekom

shranjevanja dodajajo različni konzervansi, kot so sorbinska kislina, kalijev sorbat, natrijev benzoat. NA je dovzeten tudi za hidrolizo in depolimerizacijo v kislem in bazičnem okolju ali po daljši izpostavljenosti povišani temperaturi, med tem ko v nevtralnem okolju pri sobni temperaturi ostanejo stabilni (4).

### 1.1.2. KSANTAN (XAN)

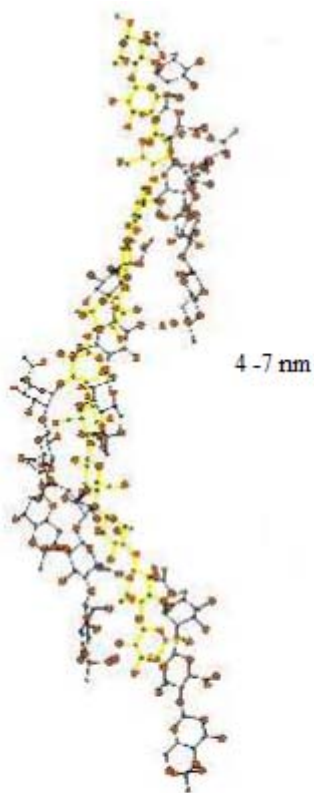
XAN je anionski bakterijski eksopolisaharid, ki ga izolirajo iz bakterije *Xanthomonas campestris*. Slednja je povzročiteljica številnih bolezni pri rastlinah, ne pa pri ljudeh (9).

Glavno verigo sestavljajo  $\beta$ -D-glukozne enote povezane z  $\beta$ -1,4-glikozidno vezjo, kot pri celulozi. Na vsako drugo glukozo je pripet trisaharid  $\beta$ -D-manoza,  $\beta$ -1,4-D-glukuronska kislina in  $\alpha$ -1,2-D-manoza (Slika 3). Manoza pripeta na osnovno verigo je na mestu 6 pogosto acetilirana, na terminalno manozo pa je na mestu 4 ali 6 pripet piruvat (9,10). Glukuronska kislina in piruvat dajeta molekuli anionski značaj (2), ki pa je na trgu običajno prisotna v obliki kalijevih ali natrijevih soli. Primarno strukturo z molsko maso  $10^6$  g/mol torej tvori pentasaharidni fragment.



Slika 3: Primarna struktura XAN (11)

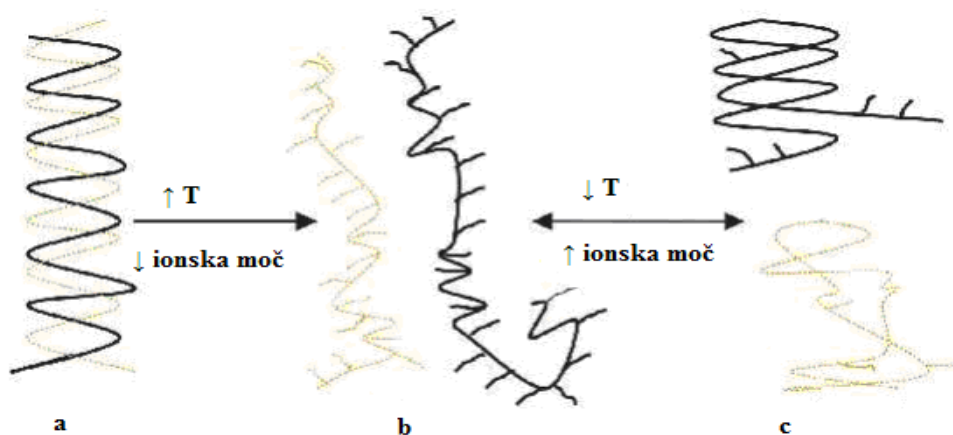
Sekundarna struktura XAN prehaja v odvisnosti od temperature in ionske moči iz urejene preko neurejene v renaturirano obliko. Večina novejših člankov podpira idejo dvojne vijačnice, kjer pride do prepleta dveh verig XAN. Molekula XAN se v mediju z visoko ionsko močjo in pri sobni temperaturi praviloma nahaja v urejeni, nativni konformaciji (Slika 4). Zaradi dodatka ionov pride do senčenja nabojev na nabitih stranskih verigah. Te se zato tesno prilegajo glavni verigi in jo preko vodikovih vezi stabilizirajo v obliki rigidne palice (9, 11).



Slika 4: Dvojna 5x zavita simetrična desnosučna vijačnica (11)

Molekula je tako odporna na kemijsko in encimsko razgradnjo. Šele močno povišanje temperature ali znižanje ionske moči povzroči prehod v neurejeno stanje.  $T_m$  je odvisna od koncentracije polimera in ionske moči raztopine (12) ter v prečiščeni vodi znaša približno 50–60 °C, v prečiščeni vodi z ionsko močjo 0.1 M pa se  $T_m$  dvigne na 80 °C (2). Prevladovati pričnejo elektrostatske odbojne sile med negativno nabitimi stranskimi verigami, ki se ne prilegajo več glavni verigi ampak štrlijo navzven (9). Dvojne vijačnice pri temperaturi 80-100 °C ireverzibilno razpadejo na posamezne verige – denaturirana oblika (2). Znižanje temperature oziroma povišanje ionske moči privede do nastanka urejene renaturirane konformacije, ki jo sestavlja zgolj ena veriga XAN. Le-ta ponovno tvori dvojno vijačnico, ki pa je bistveno manj popolna, z mnogo zavoji in deli verige, ki segajo iz osnovne strukture, v primerjavi z nativno konformacijo (9). Prehod iz denaturirane v renaturirano obliko je reverzibilen. V renaturiranem stanju prevladujejo intramolekularne interakcije (Slika 5) (11).

Delež nastale enojne oziroma dvojne vijačnice je odvisen tudi od vrste vzorca, pogojev med fermentacijo, postopkov čiščenja po fermentaciji in od pogojev priprave raztopine za raziskavo (11, 13).



Slika 5: Terciarna oz. v literaturi imenovana tudi sekundarna struktura XAN: a – urejena (nativna), b – neurejena (denaturirana), c – urejena (renaturirana) (11)

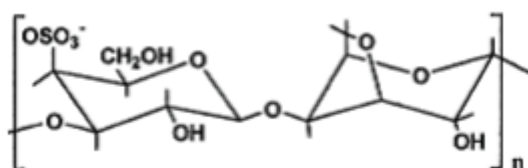
Na strukturo XAN pomembno vpliva že prej omenjena temperatura, pri kateri pripravljamo raztopino. Viskoznost pripravljene raztopine pada vse do temperature priprave pri 40 °C, nato pa sigmoidno naraste vse do 60 °C od koder naprej spet pada. To temperaturno obnašanje je povezano s konformacijskimi spremembami XAN (prehod urejene v neurejeno obliko) in s padcem rigidnosti  $\beta$ -1,4- D-glukuronske kisline v temperaturnem območju 40–60 °C (13).

XAN je zelo dobro topen v vroči in hladni vodi, saj lahko kot polielektrolit veže molekule vode (2, 13). Raztopine XAN so že pri nizkih koncentracijah dokaj viskozne kar izkoriščajo v mnogih industrijskih panogah. V prehrabeni in kozmetični industriji se uporablja kot zgoščevalo ter stabilizator suspenzij in emulzij, v farmaciji se uporablja kot pomožna snov (zgoščevalo, stabilizator emulzij, sredstvo za izdelavo FO s prirejenim sproščanjem) v peroralnih in dermalnih FO (2, 12, 13).

### 1.1.3. KARAGENANI (CARR)

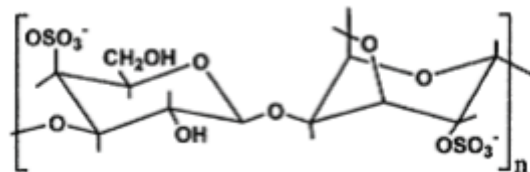
CARR so naravni anionski polisaharidi, ki jih pridobivamo z ekstrakcijo nekaterih vrst rdečih morskih alg razreda Rhodophyceae. Ekstrakcija poteka v bazičnem vodnem okolju (2). Na tržišču so CARR dostopni v obliki stabilnih natrijevih, kalijevih in kalcijevih soli ali še pogosteje kot mešanica le-teh. Komercialno so najbolj pogosto uporabljeni  $\kappa$  (kapa),  $\iota$  (jota) in  $\lambda$  (lambda). Kemijsko so sestavljeni iz linearnih, delno sulfatiranih, ponavljajočih se disaharidnih enot galaktoze in 3,6-anhidrogalaktoze, ki se izmenjaje povezuje z  $\alpha$ -1,3- in  $\beta$ -1,4-glikozidnimi vezmi. Glede na število in lego sulfatnih skupin na galaktozni enoti ločimo tri glavne skupine CARR (15).

**KAPA KARAGENAN (CARR  $\kappa$ )** je sestavljen iz ponavljajoče disaharidne enote  $\beta$ -1,3-D-galaktoze-4-sulfata in  $\alpha$ (1,4)-3,6-anhidro-D-galaktoze (Slika 6) (16). Povprečna molekulska masa znaša 400-600 kDa oz.  $0.4-0.6 \times 10^6$  g/mol (2). CARR  $\kappa$  v vodnem mediju veže molekule vode in tako tvori krhek, rigiden gel. Dodatek kalijevih ionov čvrstost gela poveča a le do določene meje, ko se struktura CARR  $\kappa$  prične preoblikovati v tesne agregate, ki iztisnejo vodo na površino (4).



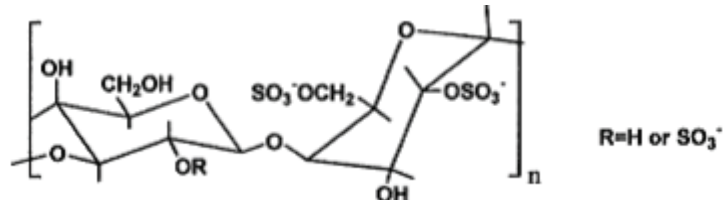
Slika 6: Disaharidna enota CARR  $\kappa$  (2)

**JOTA KARAGENAN (CARR  $\iota$ )** ima dve sulfatni skupini v vsaki ponavljajoči se disaharidni enoti  $\beta$ -1,3-D-galaktoze-4-sulfata in  $\alpha$ (1,4)-3,6-anhidro-D-galaktoze-2-sulfata (Slika 7) (16). Povprečna molekulska masa je 400-600 kDa oz.  $0.4-0.6 \times 10^6$  g/mol (2). Tudi CARR  $\iota$  veže molekule vode, a nastali gel je elastičen, še posebej v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  ionov. Divalentni kalcijevi ioni namreč povezujejo molekule CARR  $\iota$  med sabo in le-te tvorijo vijačnico. Dve sulfatni skupini preprečujeta tvorbo agregata in posledičen iztis vode na površino, kot se to zgodi pri CARR  $\kappa$ . Dodatek  $\text{Ca}^{2+}$  ionov povzroči nastanek dodatnih vezi in poveča se stabilnost gela (14).



Slika 7: Disaharidna enota CARR  $\iota$  (2)

**LAMBDA KARAGENAN (CARR  $\lambda$ )** je sestavljen iz disaharida  $\beta$ -1,3-D-galaktoze-2-sulfata in  $\alpha$ -1,4-D-galaktoze-2,6-disulfata (Slika 8) (16). Povprečna molekulska masa znaša od 400 do 800 kDa oz.  $0.4-0.8 \times 10^6$  g/mol (2). Disaharidna enota vsebuje kar tri sulfatne skupine zaradi česar je manjša verjetnost tvorbe gela. CARR  $\lambda$  po doslej znanih podatkih iz člankov in knjig ne tvori gela, ampak le poveča viskoznost raztopin.



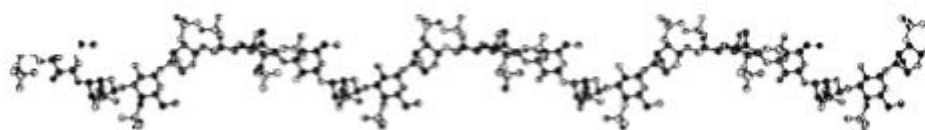
Slika 8: Disaharidna enota CARR  $\lambda$  (2)

Prikazane strukture ponavljajočih se enot na slikah 6, 7 in 8 so idealizirane. Realni vzorci so mnogokrat drugače substituirani, saj imamo kljub nadzorovanem gojenju alg še vedno opravka z naravnimi polisaharidi, kar lahko posledično privede do medserijske variabilnosti (2). Število in položaj zaestrene sulfatne skupine na disaharidni enoti je glavna razlika med CARR  $\kappa$ ,  $\iota$  in  $\lambda$  ter vpliva na njihove lastnosti. Večja kot je stopnja zaestrenih sulfatnih skupin CARR, nižja je temperatura raztapljanja in manjša je čvrstost nastalega gela oziroma le-ta sploh ne nastane (CARR  $\lambda$ ) (4). CARR  $\kappa$  in  $\iota$  sta gelirajoča polimera, saj vsebujeta 3,6-anhidrogalaktozne enote, ki so za geliranje bistvene. CARR  $\lambda$  pa slednjih ne vsebuje ter je močno sulfatiran, zato ne more tvoriti gelov (2).

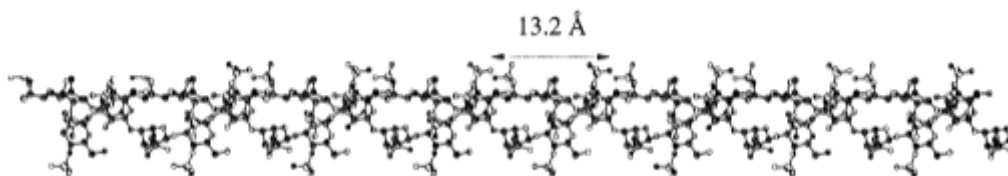


- **Priprava raztopine CARR**

Vsi CARR se pripravljajo v hladni vodi, nato pa se nastala raztopina segreje nad temperaturo 80 °C, pri kateri se CARR popolnoma raztopijo. Na temperaturo raztapljanja pa vplivajo tudi dodani  $K^+$  in  $Ca^{2+}$  ioni ali druge soli prisotne v vodi, ki temperaturo raztapljanja nekoliko zvišajo (4). V procesu ohlajanja tvorita CARR  $\kappa$  in  $\iota$  dvojno vijačnico. CARR  $\kappa$  preide iz linearne verige (Slika 9) preko dvojne vijačnice (Slika 10) do med seboj povezanih dvojnih vijačnic. Pri CARR  $\iota$  pa se proces ustavi pri nastanku dvojne vijačnice (14). Geli iz CARR so torej termoreverzibilni (4). Znano je, da CARR  $\kappa$  daje najmočnejše gele s  $K^+$  ioni, CARR  $\iota$  pa s  $Ca^{2+}$  ioni. Divalentni kalcij lahko tvori intramolekularne in intermolekularne vezi med sulfatnimi skupinami CARR  $\iota$ , enovalentni kalij pa povzroči nastanek intermolekularnih povezav med CARR  $\kappa$ , in sicer najprej povzroči nastanek ionske vezi med  $K^+$  in  $SO_4^{2-}$  D-galaktoznega ostanka, kar vodi do nastanka sekundarne elektrostatske vezi med  $K^+$  in kisikovim mostom anhidro-D-galaktoze. Ostali enovalentni ioni, kot sta  $Na^+$  in  $Li^+$ , lahko tvorijo zgolj ionske vezi s sulfatnimi skupinami (15).



Slika 9: Enojna vijačnica CARR (2)



Slika 10: Dvojna vijačnica CARR (2)

Raztopine in geli iz CARR, ki so pripravljani v kislih medijih, so po mnenju strokovnjakov stabilni vse do temperature 37 °C. Višja temperatura naj bi povzročila depolimerizacijo in posledično padec viskoznosti ter porušitev gelske strukture. Zato se priporoča dodatek kislih komponent šele v zadnji stopnji priprave (4, 17).

Pri pripravi gelov iz CARR smo se srečali z dvema pojavoma, ki sta opisana tudi v člankih.

- **GEL S SINEREZO (»GEL WITH SYNERESIS«)** - homogen gel z vodno plastjo na gladini. Ta pojav je značilen za gele iz CARR  $\kappa$  po dodatku večje količine  $Ca^{2+}$  oziroma  $K^+$  ionov.

- **GRUDIČAST GEL (»PARTIAL GEL«)** - raztopina z agregati gelske strukture. Do tega pojava lahko pride tako pri pripravi gela iz CARR  $\kappa$  kot iz CARR  $\iota$  z dodanim  $K^+$  oziroma  $Ca^{2+}$  (15).

Oba pojava smo podkrepili s primeri v delu z rezultati in razpravo naše diplomske naloge.

- **Uporaba CARR**

CARR so široko uporabni v prehrambeni in kozmetični industriji v obliki zgoščeval, emulgatorjev, stabilizatorjev in ojačevalcev okusa (18). Najdemo jih lahko v mlečnih izdelkih, mesnih izdelkih, v zobnih pastah, v osvežilcih zraka itd. (14). Tudi v farmaciji so CARR že dokaj dobro poznani. Uporabljajo se kot pomožne snovi pri izdelavi različnih neparanternih FO na primer tablet, kapsul, suspenzij, emulzij, krem, losjonov, gelov, svečk, kapljic za oči. V zadnjem času pa narašča zanimanje za njihovo uporabo pri izdelavi FO s prirejenim sproščanjem, saj imajo sposobnost povečanja viskoznosti, tvorbe gelov in so dokazano varni (19).

## 1.2. Reologija

Reologija je veda, ki proučuje tokovno obnašanje in deformacijo snovi. Njeno ime izhaja iz grških besed rheos, kar pomeni teči in logos, kar pomeni veda. Reologija ima pomembno vlogo v farmaciji in kozmetiki, saj nam omogoča razjasniti notranje strukture farmacevtskih sistemov, spremljanje fizikalne stabilnosti in vrednotenje kakovosti vhodnih materialov in nastalih produktov pri industrijskih procesih, obnašanje snovi pod vplivom temperature, interpretacijo in kontrolo laboratorijskih poskusov in drugo. Preiskave reoloških lastnosti snovi segajo od pravih kapljev, preko poltrdnih teles in vse do trdnih snovi (20, 21, 22)

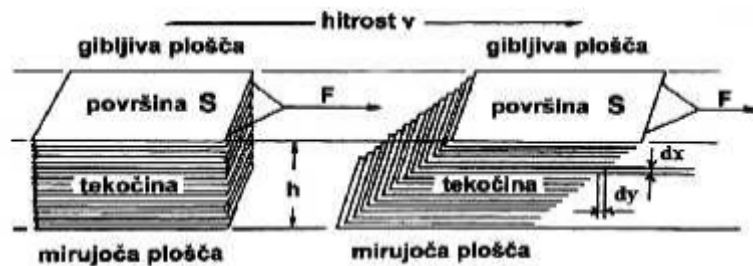
Tokovno obnašanje snovi najlažje prikažemo z reogrami, kjer predstavimo odvisnost strižne napetosti ( $\tau$ ) od strižne hitrosti ( $D$ ) ali pa s t.i. viskoznostnimi diagrami, kjer prikažemo odvisnost viskoznosti ( $\eta$ ) od strižne hitrosti ( $D$ ). S slednjimi smo prikazali rezultate rotacijskih testov v diplomski nalogi. Viskoznost predstavlja notranjo upornost tekočin pri pretakanju (20).

Vse vrste strižnega obnašanja snovi, ki jih lahko opisujemo z reologijo, lahko gledamo kot na obnašanje med dvema ekstremoma: tok idealno viskoznih tekočin na eni in deformacija idealno elastičnih trdnih snovi na drugi strani. Obnašanje realnih snovi temelji na kombinaciji obojega, viskoznega in elastičnega dela, zato opišemo snovi kot viskoelastične (23).

### 1.2.1. Idealne Newtonske viskozne tekočine

Viskoznost idealne tekočine je lastnost snovi in je odvisna le od temperature in atmosferskega tlaka, neodvisna pa od delovanja sile na sistem (smer, jakost in čas mehanske obremenitve) in njenega trajanja. Med idealne tekočine sodijo voda, olje, med, organska topila, glicerol, polimerne raztopine, polimerne taline linearnih polimerov itd. Z naraščanjem temperature viskoznost tekočine pada zaradi povečanja Brownovega gibanja osnovnih molekul. Čim bolj je tekočina viskozna, tem bolj je temperaturno občutljiva (20, 21).

Osnovne reološke parametre idealno viskoznih tekočin predstavlja enostaven model (Slika 11). Med dvema vzporednima ploščama s površino  $S$  [m<sup>2</sup>] in medsebojno razdaljo  $h$  [m] je preiskovana tekočina. Spodnja plošča miruje, zgornjo premikamo z določeno silo  $F$  [N] in hitrostjo  $v$  [m/s] (20). Predpostavimo, da se preiskovana tekočina adherira na obe plošči in ne zdrsava ter da je tok laminaren (23). Izberemo si dve sosednji plasti, ki sta razmaknjeni za  $dx$  prečno glede na smer gibanja. Razlika v hitrosti med gibanjem teh dveh sosednjih plasti je  $dv$  (20).



Slika 11: Model za razlago osnovnih reoloških parametrov (20)

Definiramo:

- **strižno deformacijo  $\gamma$  (shear strain)**

$$\gamma = \frac{dy}{dx} = \tan \varphi \cong \varphi$$

$y$  - premik,  $x$  - višina oz. debelina

(Enačba 1)

Sila, ki deluje v smeri ploskve, je *strižna sila*. Odgovorna je za spremembo oblike telesa. Njeno delovanje povzroči določen premik plasti, kar opišemo s *strižno deformacijo* (strig), oziroma deformira snov iz prvotne lege za kot  $\varphi$  (20, 23).

Po prenehanju delovanja mehanske sile se lahko atomi (molekule) vrnejo v prvoten položaj. V tem primeru govorimo o *prožni ali elastični deformaciji*, ki pomeni razteg kemijskih vezi med atomi. Polimerne molekule lahko elastično raztezamo v širšem območju, trdne snovi pa zelo težko. Če se atomi med delovanjem sile preveč odmaknejo in se niso sposobni vrniti na

prvoten položaj, ali če pride do njihovega preurejanja in posledično do prekinitve kemijskih vezi, opredelimo deformacijo kot *plastično ali trajno*. Vrsta deformacije je torej odvisna od zgradbe sistema ter od velikosti in trajanja deformacije (20).

- **strižna napetost  $\tau$  (shear stress)**

$$\tau = \frac{F}{S} \quad \text{enota: Pa} = \text{N/m}^2 \quad (\text{Enačba 2})$$

Je kvocient sile F in površine S.

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

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dx} = \frac{v}{h} \quad [\text{s}^{-1}] \quad \text{enota: } [\text{s}^{-1}] \quad (\text{Enačba 3})$$

Je merilo tekočinske deformacije oziroma kvocient diferenciala hitrosti in razmika med sosednjima tekočinskima plastema (20).

- **viskoznost  $\eta$  (viscosity)**

Ločimo:

**Dinamična viskoznost** je sorazmernostni faktor med strižno napetostjo in strižno hitrostjo ter predstavlja notranjo upornost tekočin pri pretakanju. Opisuje jo Newtonov zakon.

$$\frac{F}{S} = \eta \cdot \frac{dy}{dx} \Rightarrow \tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \text{enota: } [\text{Pa}\cdot\text{s}] \quad (\text{Enačba 4})$$

**Kinematična viskoznost** je kvocient med dinamično viskoznostjo in gostoto sistema pri točno določeni temperaturi (20).

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad \text{enota: } [\text{mm}^2/\text{s}] \quad (\text{Enačba 5})$$

### 1.2.2. Idealne elastične snovi

Idealno elastično telo lahko ponazorimo z odzivom vzmeti. Pod vplivom strižnih sil se telo deformira elastično, pri tem pa se akumulira za deformacijo potrebna energija, ki omogoča popolno obnovo telesa po prenehanju delovanja strižnih sil (21). Za definicijo osnovnih pojmov uporabimo model dveh vzporednih plošč (Slika 11).

Definiramo:

**Strižna deformacija  $\gamma$  in strižna hitrost  $\dot{\gamma}$  (D)** sta definirani na enak način, kot je opisano pri idealnih Newtonskih viskoznih tekočinah (Enačba 1 in 3).

### - strižni modul G (shear modulus)

Pri elastičnem obnašanju je strižna mehanska napetost v linearni zvezi z deformacijo. To pomeni, da ob razbremenitvi telesa popusti napetost v snovi in deformacija se sorazmerno zmanjša. To premosorazmernost opisuje Hookov zakon (Slika 12):

$$\tau = \frac{F}{S} = G \cdot \varphi \quad (\text{Enačba 6})$$

$\tau$  – strižna napetost, enota je [Pa]

$\varphi$  – kot zasuka

G – strižni modul, enota je [Pa]

Kadar imamo opravka z zelo majhnimi strižnimi deformacijami, lahko kot zasuka  $\varphi$  izrazimo kar s strižno deformacijo  $\gamma$ . Takrat se Hookov zakon glasi:  $\tau = G \cdot \gamma$  (Enačba 7)



Slika 12: Odvisnost strižne napetosti od deformacije – Hookov zakon (20)

Hookov zakon velja le v tistem območju, kjer je mehanska napetost linearno odvisna oziroma premosorazmerna z deformacijo. Že majhno povečanje zunanje sile povzroči relativno veliko deformacijo, ne pa tudi napetosti. Preidemo v območje plastične deformacije (20, 24).

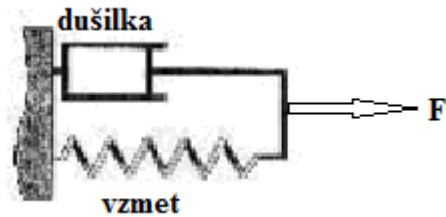
### 1.2.3. Viskoelastične snovi

Viskoelastični sistemi so reološko zelo kompleksni, saj kažejo viskozno in elastično obnašanje. Med obremenitvijo se del energije izgublja in se pretvarja v toploto zaradi viskoznega trenja, del energije pa sistem shrani kot elastično telo. Po razbremenitvi shranjena energija omogoča vrnitev viskoelastičnih sistemov v prvotno obliko, in sicer za tisti delež, ki pripada elastičnosti. Viskozna komponenta sledi Newtonovem zakonu (Enačba 4), elastična pa Hookovem (Enačba 7) (20). Ali se bo določena snov odzivala bolj elastično ali bolj viskozno pa ni odvisno le od vrste snovi, temveč tudi od časa trajanja obremenitve (21).

Odziv viskoelastičnih snovi na strižno silo lahko ponazorimo s pomočjo mehanskih modelov, ki prikazujejo viskozen odziv z dušilko, elastičnega pa z vzmetjo. Vzmet predstavlja idealno elastično snov za katero velja Hookov zakon, dušilka pa ponazarja odziv idealne tekočine, za katero velja Newtonov zakon (21).

- **Viskoelastične trdne snovi**

Viskoelastične trdne snovi lahko predstavimo s Kelvin - Voigtovim mehanskim modelom, kjer sta osnovna elementa vzmet in dušilka povezana vzporedno. Deformacija dušilke je enaka deformaciji vzmeti, medtem ko je napetost, ki deluje na sistem, enakomerno porazdeljena po obeh osnovnih elementih (21).



Slika 13: Kelvin - Voigtov mehanski model (11)

- **Viskoelastične tekočine**

Predstavimo jih lahko z Maxwellovim mehanskim modelom, kjer sta vzmet in dušilka vezani zaporedno. Strižna napetost v obeh elementih je enaka celotni na sistem delujoči strižni napetosti, deformacija celotnega sistema pa je enaka vsoti deformacij obeh komponent (21).



Slika 14: Maxwellov mehanski model (11)

### 1.2.4. Merjenje viskoelastičnih lastnosti sistemov

S pomočjo reometrije lahko merimo in vrednotimo reološke parametre. Poznamo več različnih naprav in metod, s katerimi lahko merjene sisteme ocenimo, kot so viskozimetri in reometri (20). Merjenje mehanskih lastnosti viskoelastičnih snovi je odvisno od tega, za kaj nameravamo uporabiti pridobljene rezultate in od razpoložljivosti opreme. Za dobro ponovljivost pridobljenih rezultatov je pomembno, da meritve izvajamo pri pogojih majhnih strižnih deformacij. Na ta način namreč zagotovimo, da se bo snov na strižno silo odzvala v območju linearnega viskoelastičnega odziva (LVE), reološke količine pa bodo relativno enostavno merljive. Namen meritev je določiti delež viskoznega in elastičnega doprinosa k viskoelastičnemu odzivu snovi, zato jih izvajamo pri t.i. nedestruktivnih strižnih pogojih.

Meritve izvajamo s pomočjo dveh merilnih tehnik, in sicer:

- dinamični ali oscilatorni testi,

- statični testi ali testi lezenja in obnove (21).

### 1.2.5. Dinamični – oscilatorni testi

Oscilatorno testiranje z dovolj majhno amplitudo deformacije omogoča določitev 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 v snovi vzpostavi časovno odvisna napetost (22).

Definiramo:

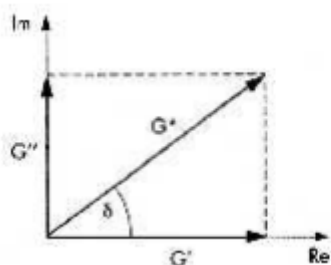
- **elastični modul ali modul shranjene energije  $G'$  (storage modulus)**, enota je [Pa]

Je merilo elastičnega obnašanja sistema in karakterizira njegovo upiranje preoblikovanju. Podaja količino energije, ki jo sistem reverzibilno shrani in je ob koncu obremenitve v celoti na razpolago za vzpostavitev prvotne oblike vzorca.

- **viskozni modul ali plastični modul ali modul energijskih izgub  $G''$  (loss modulus)**, enota je [Pa]

Opisuje viskozno obnašanje sistema in predstavlja tisto energijo, ki jo sistem ireverzibilno odda okolici, zato je zanj izgubljena.

- **kompleksni strižni modul  $G^*$** , enota je [Pa]



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

(Enačba 8)

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

(Enačba 9)

Slika 15: Vektorski diagram  $G'$ ,  $G''$  in vsote  $G^*$  (21)

$G^*$  je vektorska vsota elastičnega in plastičnega modula.

Za idealno trdno telo je:  $G'' = 0$  in  $\varphi = 0^\circ$ , kar pomeni, da je  $G^* = G' = G$

Za idealno tekočino je:  $G' = 0$  in  $\varphi = 90^\circ$ , kar pomeni, da je  $G^* = G''$  in  $G''/\omega = \eta$

- **fazni zamik**, je brez enote

$$\tan \varphi = G'' / G'$$

(Enačba 10)

Tanges faznega zamika je enak kvocientu med viskoznim in elastičnim modulom. Za viskoelastične snovi velja, da je  $0^\circ < \varphi < 90^\circ$

- **kompleksna viskoznost**, enota je [Pa.s]

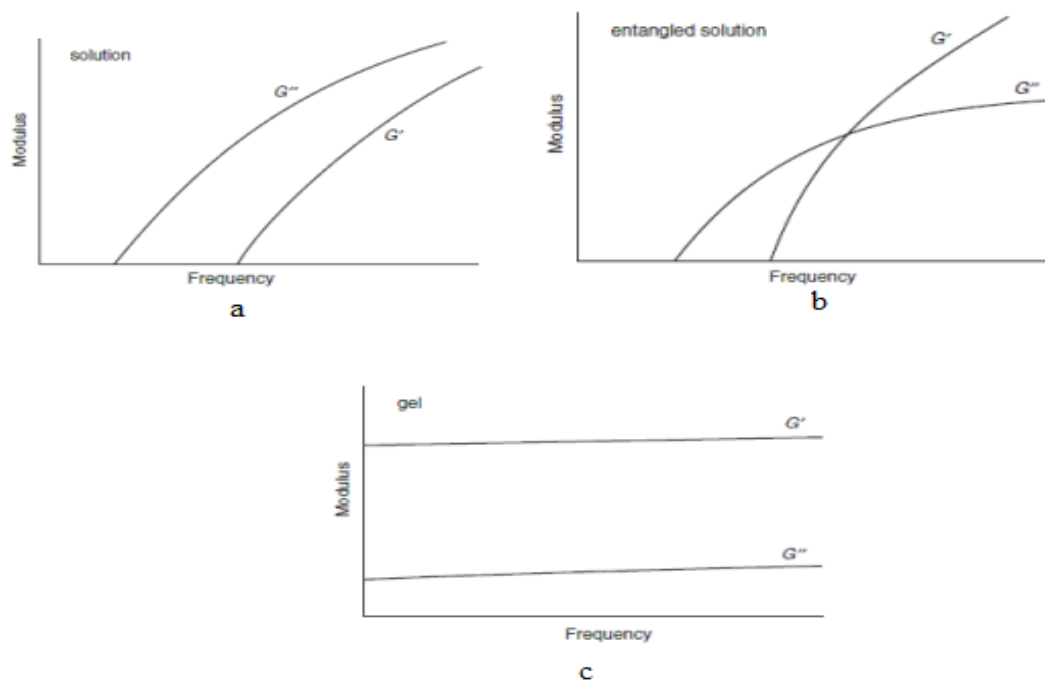
$$\eta^* = G^* / \omega$$

(Enačba 11)

*Kompleksna viskoznost* predstavlja celoten odpor snovi proti toku (21).

Z oscilatornimi testi dobimo podatke o strukturiranosti in jakosti nastalih gelov oziroma polimernih disperzij. Z naraščanjem števila in moči interakcij med molekulami polimera se večajo vrednosti dinamičnih modulov. Slednji morajo biti izmerjeni v območju LVE, da ne pride do porušitve strukture (9). V tem območju sta parametra  $G'$  in  $G''$  konstantna, kljub spremembi v velikosti in hitrosti deformacije, ki pa sta izredno majhni (25). V primeru, da bi bile deformacije dovolj velike, preidemo izven območja LVE in takrat postaneta  $G'$  in  $G''$  odvisna od deformacije in časa. Zaradi tega dejstva meritve vedno poskušamo izvajati v območju LVE (9).

Glede na vrednosti dinamičnih modulov lahko opišemo tri vrste sistemov. Razredčena raztopina makromolekul izkazuje  $G'' > G'$  znotraj celotnega frekvenčnega območja. Z večanjem koncentracije makromolekul dobimo raztopino s prepletenimi polimernimi verigami (angl. entangled), za katero je značilno presečišče v katerem je  $G' = G''$  oziroma  $\tan \varphi = 1$ . V frekvenčnem območju pod točko prekrižanja se sistem obnaša kot tekočina (viskozen material), nad točko prekrižanja kot trdna snov (elastičen material) (25). Pri šibkeje strukturiranih sistemih se točka prekrižanja pojavlja pri višjih frekvencah (9). Kadar imamo opravka z gelom, velja da je  $G' > G''$ , oba modula pa sta relativno neodvisna od frekvence. Popolno neodvisnost dobimo le v primeru tvorbe idealnih premreženj, na primer pri nastanku kovalentno premreženih polimerov (25).



Slika 16: Tri vrste sistemov, ki se razlikujejo na osnovi frekvenčnega testa: a – razredčena raztopina, b – premrežena raztopina, c – gel (25)



## 2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela bo izdelati in reološko ovrednotiti hidrogelne na osnovi naravnih polimerov. Uporabili bomo več naravnih anionskih polimerov, ki se med seboj razlikujejo v vrsti in razmerju monomernih enot, funkcionalnih skupinah pripetih nanje, stopnji substitucije in molekulski masi. Našteti parametri so izredno pomembni za lastnosti in strukturo nastalega hidrogela.

V prvem delu diplomskega dela bomo pripravili 0.5 %, 1 %, 3 % in 5 % raztopine oz. hidrogelne iz dveh vrst NA, in sicer NA LF (protanal LF 10/60) in NA LS (protanal LF 10/60 LS), 0.5 %, 1 % in 3 % hidrogelne iz XAN ter 3 % hidrogelne oz. raztopine iz treh vrst CARR (gelcarin GP-379 NF – jota, gelcarin GP-911 NF – kapa in gelcarin GP-209 NF – lambda) v različnih medijih in po različnih postopkih priprave. Polimere bomo poskusili raztopiti v prečiščeni vodi, v simuliranem želodčnem soku, v simuliranem intestinalnem soku (pH = 6.8), v prečiščeni vodi z ionsko močjo 0.2 oz. 0.01 M in v simuliranem intestinalnem soku z ionsko močjo 0.2 M. Reološke lastnosti pripravljenih vzorcev bomo proučili z rotacijsko in oscilacijsko viskozimetrijo. Ker so NA, XAN in CARR anionski polimeri, na strukturo hidrogela vplivata pH in ionska moč.

Nato bomo pripravljenim vzorcem NA in XAN dodali dvovalentne kalcijeve ione v različnih koncentracijah in izvedli oscilacijske teste. Na podlagi dobljenih rezultatov bomo poskušali ugotoviti, v kolikšni meri kalcijevi ioni vplivajo na čvrstost nastalih gelov. Prav tako bomo med sabo primerjali vrednosti dobljenih dinamičnih modulov in poskušali ugotoviti, kakšen vpliv imajo na strukturo polimerov temperatura priprave, pH in ionska moč medija ter količina dodanega kalcija.

Na koncu bomo pripravili še gele iz CARR, katerih sestavo bomo razbrali iz ternarnih faznih diagramov, in jih reološko ovrednotili. Na ta način bomo poskusili ugotoviti, katere soli in v kakšni koncentraciji vplivajo na tvorbo gelov, ter koliko so rezultati, opisani v literaturi, ponovljivi.

### 3. EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1. Materiali

- Natrijev alginat
  - Protanal LF 10/60 (FMC BioPolymer), natrijeva sol alginske kisline, belo rumen prašek, brez vonja in okusa, razmerje G/M  $\approx 65/75$  / 25–35 %, viskoznost = 20–70 mPa (1 % raztopina, T = 20 °C), povprečna velikost delcev  $\approx 250 \mu\text{m}$ .
  - Protanal LF 10/60 LS (FMC BioPolymer), natrijeva sol alginske kisline, belo rumen prašek, brez vonja in okusa, razmerje G/M  $\approx 35-45$  / 55–65 %, viskoznost = 20–70 mPa (1 % raztopina, T = 20 °C), povprečna velikost delcev  $\approx 250 \mu\text{m}$ .
- Ksantan (Sigma – Aldrich, USA)
- Karagenani (FMC BioPolymer)
  - Kapa ( $\kappa$ ): GELCARIN GP-911 NF. Kemijsko ime: kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze, enote so med seboj povezane z  $\alpha$ -1,3- in  $\beta$ -1,4-glikozidnimi vezmi. Izgled: rjav prašek, brez vonja in okusa. Molska masa: 400 000–600 000 g/mol.
  - Jota ( $\iota$ ): GELCARIN GP-379 NF. Kemijsko ime: kopolimer D-galaktoze-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze-2-sulfata, enote so med seboj povezane z  $\alpha$ -1,3- in  $\beta$ -1,4-glikozidnimi vezmi. Izgled: rjav prašek, brez vonja in okusa. Molska masa: 400 000–600 000 g/mol.
  - Lambda ( $\lambda$ ): VISCARIN GP-209 NF. Kemijsko ime: kopolimer D-galaktoze-2-sulfata in D-galaktoze-2,6-disulfata, enote so med seboj povezane z  $\alpha$ -1,3- in  $\beta$ -1,4-glikozidnimi vezmi. Izgled: rjav prašek, brez vonja in okusa. Molska masa: 400 000–600 000 g/mol.
- Natrijev klorid (NaCl, Merck KGaA, Nemčija)
- Klorovodikova kislina (HCl 1M, Merck KGaA, Nemčija)
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck KGaA, Nemčija)
- Natrijev hidroksid (NaOH 1M, Merck KGaA, Nemčija)
- Kalcijev klorid (CaCl<sub>2</sub>, brezvoden, Riedel-De Haën, Nemčija)
- Kalcijev klorid, dihidrat (CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, Merck KGaA, Nemčija)
- Kalijev klorid (KCl, Merck KGaA, Nemčija)
- Prečiščena voda (pripravljena na Fakulteti za farmacijo)

#### 3.2. Naprave

- Analitska tehtnica Mettler Toledo A6245, Švica

- Magnetno mešalo IKA WERKE, Nemčija
- Magnetno mešalo z grelcem IKA WERKE, Nemčija
- Ultrazvočna kadička PIO SONIS 4, Iskra, Slovenija
- pH meter Mettler Toledo MA235, Švica
- Avtomatske pipete BIOHIT 100–1000 ml, Finska
- Hladilnik Gorenje, 4 °C, Slovenija
- Reometer z nastavlljivo strižno napetostjo Anton Paar Physica MCR 301, senzorski sistem stožec – ploščica CP50-2

### 3.3. Postopki in metode

#### 3.3.1. Priprava medijev

Medije smo pripravili tako, da smo odpipetirali ustrezen volumen HCl oziroma NaOH ali zatehtali ustrezno maso soli in dodali prečiščeno vodo do oznake na bučki (Tabela I). Po potrebi smo uravnali pH na  $\pm 0.05$  predpisane enote.

Tabela I: Sestava osnovnih medijev

Ime medija	Sestava (1 liter)	Ionska moč [M]
Prečiščena voda	H <sub>2</sub> O	0
Simuliran intestinalni sok (pH = 6.8 ± 0.05)	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> v 250 ml H <sub>2</sub> O, 77.0 ml 0.2 M NaOH, do oznake dopolniš s preč. H <sub>2</sub> O	0.0808
Simuliran želodčni sok	2.0 g NaCl v nekaj ml H <sub>2</sub> O, 80 ml 1 M HCl, do oznake dopolniš s preč. H <sub>2</sub> O	0.0742

Medije z želeno ionsko močjo smo pripravili tako, da smo s pomočjo enačbe za ionsko moč preračunali njihovo sestavo (Tabela II).

Enačba za **ionsko moč**:

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i \cdot i^2 \quad (\text{Enačba 12})$$

$\mu$  – ionska moč, enota je [mol/l]

$c$  – koncentracija ionov, enota je [mol/l]

$i$  – naboj iona

Tabela II: Sestava medijev z ionsko močjo 0.2 M

Ime medija	Sestava (1 liter)	Ionska moč [M]
Prečiščena voda z $\mu = 0.2$ M	11.7 g NaCl v 200 ml H <sub>2</sub> O,	0.2

	dopolniš do oznake s preč. H <sub>2</sub> O	
Simuliran intestinalni sok z $\mu$ = 0.2 M	6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 6.975 g NaCl v 250 ml H <sub>2</sub> O, 77 ml 0.2 M NaOH, do oznake dopolniš s preč. H <sub>2</sub> O	0.2

### 3.3.2. Priprava hidrogelov iz alginata

#### Priprava hidrogelov iz natrijevega alginata (NA)

Po navodilu podjetja FMC BioPolymer, ki je proizvajalec našega NA, smo pripravili raztopine po sledečem postopku. Najprej smo na kartico zatehtali ustrezno maso NA (dve vrsti: NA LF – Protanal LF 10/60 in NA LS – Protanal LF 10/60 LS), nato smo v čašo odpipetirali ustrezen volumen medija (Tabela III), dodali magnet in položili na magnetno mešalo. Ob stalnem mešanju smo mediju počasi dodajali prašek NA. Slednji se je ob mešanju raztapljal približno 4 ure. Nato smo čaše umaknili z magnetnega mešala in jih pustili stati čez noč pri sobni temperaturi, da so iz vzorcev oddifundirali mehurčki zraka.

Priprava homogenih vzorcev NA v simuliranem želodčnem soku ni uspela. Nastala je namreč raztopina, v kateri so bili dispergirani beli kosmiči. Najverjetneje je kisel pH povzročil obarjanje NA. Pripravo vzorcev v simuliranem želodčnem soku smo opustili.

Tabela III: Sestava vzorcev iz NA

Koncentracija NA (m/V)	Masa NA [g]	Volumen medija [ml]	Vrsta medija
0.5 % NA LF	0.25	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda z $\mu = 0.2$ M / sim.int.sok z $\mu = 0.2$ M
0.5 % NA LS	0.25	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda z $\mu = 0.2$ M / sim.int.sok z $\mu = 0.2$ M
1 % NA LF	0.50	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda z $\mu = 0.2$ M / sim.int.sok z $\mu = 0.2$ M
1 % NA LS	0.50	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda z $\mu = 0.2$ M / sim.int.sok z $\mu = 0.2$ M
3 % NA LF	1.50	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda z $\mu = 0.2$ M / sim.int.sok z $\mu = 0.2$ M
3 % NA LS	1.50	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda

			z $\mu = 0.2 \text{ M}$ / sim.int.sok z $\mu = 0.2 \text{ M}$
5 % NA LF	2.50	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$ / sim.int.sok z $\mu = 0.2 \text{ M}$
5 % NA LS	2.50	50	Voda / sim.int.sok / sim.žel.sok / voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$ / sim.int.sok z $\mu = 0.2 \text{ M}$

### Priprava hidrogelov iz kalcijevega alginata (CA)

Najprej smo pripravili 3 % (m/V) raztopino  $\text{CaCl}_2$ , tako da smo na precizni tehtnici v čolniček zatehtali ustrezno količino  $\text{CaCl}_2$  (brezvoden) in jo kvantitativno prenesli v 100 ml merilno bučko, dopolnili s prečiščeno vodo do oznake ter počakali, da se je raztopila. Sledila je priprava 3 % raztopine NA v vodi, v vodi z  $\mu = 0.2 \text{ M}$ , v simuliranem intestinalnem soku in v simuliranem intestinalnem soku z  $\mu = 0.2 \text{ M}$ , po prej opisanem postopku. Raztopinam NA, ki so se mešale na magnetnem mešalu, smo s kapalko počasi dodajali ustrezen volumen 3 % raztopine  $\text{CaCl}_2$  in iskali točko, pri kateri bi opazili tvorbo čvrstega gela. Po dodatku ustrezne količine  $\text{CaCl}_2$  (Tabela IV) smo vzorce mešali še dodatno uro na minimalni hitrosti. Nato smo čaše umaknili z magnetnega mešala in jih pustili čez noč mirovati pri sobni temperaturi.

Tabela IV: Sestava vzorcev iz CA

Koncentracija NA (m/V)	Volumen medija [ml]	Volumen dodane 3 % raztopine $\text{CaCl}_2$ [ml]
3 % NA LF	50 ml $\text{H}_2\text{O}$	2.5
3 % NA LS	50 ml $\text{H}_2\text{O}$	2.0
3 % NA LF	50 ml $\text{H}_2\text{O}$ z $\mu = 0.2 \text{ M}$	1.8
3 % NA LS	50 ml $\text{H}_2\text{O}$ z $\mu = 0.2 \text{ M}$	1.2
3 % NA LF	50 ml sim.int.sok	Izoboritev soli
3 % NA LS	50 ml sim.int.sok	Izoboritev soli
3 % NA LF	50 ml sim.int.sok z $\mu = 0.2 \text{ M}$	Izoboritev soli
3 % NA LS	50 ml sim.int.sok z $\mu = 0.2 \text{ M}$	Izoboritev soli

### 3.3.3. Priprava hidrogelov iz ksantana (XAN)

#### Priprava hidrogelov iz XAN brez dodatka $\text{CaCl}_2$

Hidrogele iz XAN smo želeli pripraviti v koncentracijah 0.5 % in 3 %, in sicer v sledečih medijih: v vodi, simuliranem intestinalnem soku, simuliranem želodčnem soku, vodi z  $\mu = 0.2 \text{ M}$  in simuliranem intestinalnem soku z  $\mu = 0.2 \text{ M}$ . Največjo težavo pri pripravi predstavlja

homogenost vzorcev, zlasti 3 %. XAN se raztaplja zelo počasi in tvori viskozne raztopine že pri nizkih koncentracijah. Pri pripravi 3 % vzorcev XAN pride namreč ob dodatku vode h XAN do nastanka grudic, znotraj katerih ostane velik del XAN neomočen. Ta pojav je posledica delne hidratacije in razpletanja verig ter nastanka gelske plasti le na površini delcev. Slednja pa preprečuje ločevanje praškastih delcev v notranjosti in njihovo hidratacijo. Potrebne so velike strižne sile pri mešanju XAN, da preprečimo nastanek neželenih grudic.

Raztopine XAN smo pripravili po naslednjem postopku:

**- metoda počasnega dodajanja XAN mediju med mešanjem na magnetnem mešalu**

Mediju smo med hitrim mešanjem na magnetnem mešalu počasi dodajali praškast XAN. Med dodajanjem praška v medij se je naša raztopina pričela zgoščevati in posledično smo morali zmanjšati hitrost mešanja. Po potrebi smo nastale grudice XAN razgradili s spatulo, da se je ves XAN lahko omočil z vodo. Vzorce smo mešali 3 ure in jih čez noč pustili mirovati. Eno paralelo vzorcev smo shranili pri sobni temperaturi, drugo paralelo pa smo postavili v hladilnik (4 °C). S tem smo želeli preveriti, ali ima temperatura, pri kateri hranimo vzorce, vpliv na strukturne lastnosti nastalega gela.

Tabela V: Sestava vzorcev iz XAN

Koncentracija XAN (m/V)	Masa ksantana [g]	Vrsta medija	Volumen medija [ml]
0.5 %	0.25	Voda/sim.int.sok/sim.žel.sok/voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$ /sim.int.sok z $\mu = 0.2 \text{ M}$	50
3 %	1.50	Voda/sim.int.sok/sim.žel.sok/voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$ /sim.int.sok z $\mu = 0.2 \text{ M}$	50

**Priprava hidrogelov iz XAN z dodanim  $\text{CaCl}_2$**

Pri pripravi hidrogelov z dodanim  $\text{CaCl}_2$  smo se srečali z nekaj težavami. Poslužili smo se večih postopkov priprave in iskali najprimernejšega.

**- POSTOPEK A**

Najprej smo posnemali postopek priprave, po katerem smo pripravili hidrokele iz CA. V 3 % raztopine XAN v vodi oz. v vodi z  $\mu = 0.2 \text{ M}$  smo med mešanjem na magnetnem mešalu kapljali 3 % raztopine  $\text{CaCl}_2$ . Volumen raztopine  $\text{CaCl}_2$ , ki naj bi privedel do nastanka gelske strukture, smo preračunali iz podatkov povzetih po diplomskem delu Helene Flajšman (26).

Ker med 3 % vzorci XAN, brez in z dodanim  $\text{CaCl}_2$ , nismo opazili nobenih razlik v reoloških lastnostih, smo se poslužili drugega postopka priprave 0.5 % vzorcev XAN s  $\text{CaCl}_2$ .

#### - POSTOPEK B

V drugem postopku smo izračunali volumen raztopine  $\text{CaCl}_2$ , ki naj bi privedel do nastanka gelske strukture, iz podatkov, ki smo jih našli v članku »Promotion and inhibition of xanthan weak-gel rheology by calcium ions« (27). 0.5 % vzorce smo pripravili po metodi počasnega dodajanja XAN mediju med mešanjem na magnetnem mešalu. Nato smo prvi seriji vzorcev dokapljali ustrezne volumne 5 % raztopine  $\text{CaCl}_2$  pri sobni temperaturi, jih mešali še nadaljnjih 30 minut, ter jih prenesli za približno 3 ure v hladilnik. Čez noč so vzorci mirovali pri sobni temperaturi (**postopek 1B**). Drugo serijo 0.5 % vzorcev XAN pa smo po 30 minutnem mešanju pri sobni temperaturi prenesli na vodno kopel s temperaturo 80 °C, kot je navedeno v članku (27), in jih pokrite mešali še dodatno uro in pol. Nato smo vzorcem ob mešanju in segrevanju dokapljali ustrezne volumne 5 % raztopine  $\text{CaCl}_2$  in mešali še 30 minut. Homogene vzorce smo pustili stati pri sobni temperaturi, da so se ohladili, nato smo jih prenesli za približno 3 ure v hladilnik in jih čez noč pustili mirovati pri sobni temperaturi (**postopek 2B**).

#### - POSTOPEK C

Za primerjavo smo pripravili vzorce še po tretjem postopku, ki je bil povsem identičen pripravi iz članka (27). Edina razlika s prejšnjim postopkom je bila v tem, da se raztopina  $\text{CaCl}_2$  ni kapljala v raztopino XAN, ampak smo najprej posebej pripravili 50 ml 1 % raztopine XAN in 50 ml raztopine  $\text{CaCl}_2$  z ustrezno koncentracijo. K raztopinam XAN smo prilili raztopine  $\text{CaCl}_2$  in 100 ml dobljene raztopine mešali 1 uro pri sobni temperaturi oziroma na vodni kopeli s temperaturo 80 °C. Po 30 minutnem mirovanju pri sobni temperaturi smo eno serijo vzorcev za 3 ure prenesli v hladilnik ter jih nato vrnili na sobno temperaturo, drugo serijo pa smo pustili čez noč v hladilniku. Želeli smo namreč preveriti, ali nizka temperatura kakorkoli vpliva na strukturo vzorca oziroma na njegovo viskoznost.

Tabela VI: Sestava vzorcev XAN s  $\text{CaCl}_2$

Raztopina XAN (m/V)	Medij	Raztopina $\text{CaCl}_2$	Temperatura priprave	Temperatura shranjevanja
50 ml 1%	Voda / voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$	50 ml 5 mM	25 °C / 80 °C	25 °C / 4 °C
50 ml 1%	Voda / voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$	50 ml 6 mM	25 °C / 80 °C	25 °C / 4 °C
50 ml 1%	Voda / voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$	50 ml 7 mM	25 °C / 80 °C	25 °C / 4 °C
50 ml 1%	Voda / voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$	50 ml 15 mM	25 °C / 80 °C	25 °C / 4 °C

50 ml 1%	Voda / voda z $\mu = 0.2 \text{ M}$	50 ml 100 mM	25 °C / 80 °C	25 °C / 4 °C
----------	-------------------------------------	--------------	---------------	--------------

### 3.3.4. Priprava hidrogelov iz karagenana (CARR)

#### Priprava hidrogelov iz CARR brez dodanega $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / KCl

Hidrogele CARR smo pripravili po postopku opisanem v članku »Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions« (15). Najprej smo praškast CARR  $\iota / \kappa / \lambda$  počasi dodali v čašo z vodo / simuliranim intestinalnim sokom / simuliranim želodčnim sokom / vodo z  $\mu = 0.2 \text{ M}$  / simuliran intestinalni sok z  $\mu = 0.2 \text{ M}$ , ki se je pri veliki hitrosti mešal na magnetnem mešalu. Vzorce smo mešali 30 minut, nato pa smo jih prenesli na vodno kopel s temperaturo 80 °C in jih 2 uri pokrite mešali. CARR je bil v simuliranem želodčnem soku in pri visoki temperaturi nestabilen. Po dvournem segrevanju je nastala svetlo rjava raztopina (Slika 17), ki po ohladitvi na sobno temperaturo ni tvorila gelske strukture. Uporabili smo drug postopek priprave.



Slika 17: 3 % vzorec CARR v simuliranem želodčnem soku, pripravljen pri  $T = 80^\circ\text{C}$

S pomočjo podatkov iz članka (15) smo pripravili dve paraleli vzorca v želodčnem soku pri nižji temperaturi, in sicer eno smo pripravili pri sobni temperaturi, drugo pa na vodni kopeli s temperaturo 40 °C. Pripravljene 3 % vzorce CARR smo pustili čez noč mirovati pri sobni temperaturi. Obe paraleli vzorcev smo s pomočjo reoloških meritev primerjali med sabo in proučili vpliv temperature na dinamične module.

#### Priprava hidrogelov iz CARR z dodanim $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / KCl

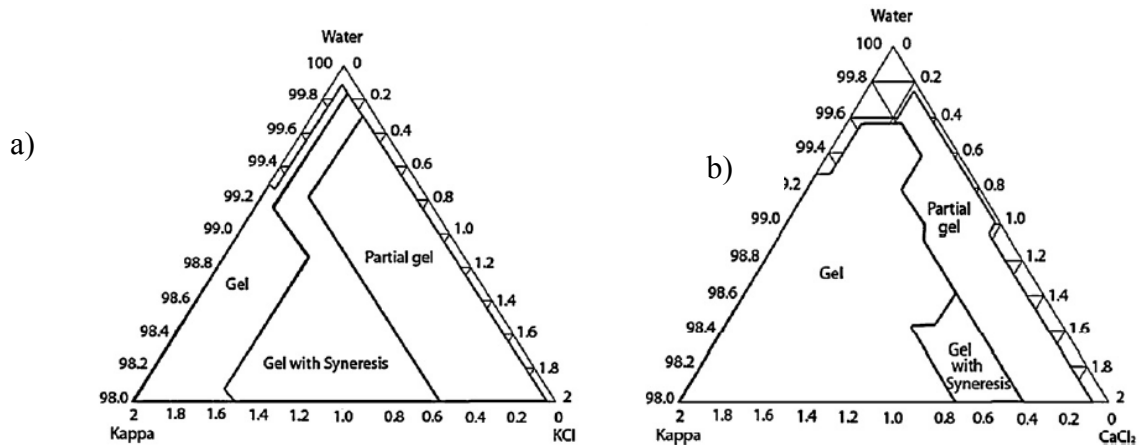
Priprave vzorcev smo se lotili po navodilu iz članka (15), kjer so bili vzorci opisani s ternarnimi faznimi diagrami. V slednje smo vrisali točke, katerih sestava predvideva nastanek gelov (Slika 18). Sledila je njihova priprava.

Najprej smo vse tri komponente (voda, CARR,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  oz. KCl) natehtali na precizni tehtnici, nato smo pri veliki hitrosti mešanja na magnetnem mešalu vsuli v vodo  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  oz. KCl. Sledil je dodatek ustreznega CARR in nadaljnje mešanje vse dokler ni nastala homogena raztopina. Slednjo smo prenesli na vodno kopel s temperaturo 80 °C in jo dobro



pokrito mešali 2 uri. Nato smo vzorce odstavili iz vodne kopeli in mešala ter jih pustili čez noč mirovati pri sobni temperaturi.

Na koncu smo se še lotili priprave 0.4 % vzorcev CARR  $\kappa$  brez/s KCl in 0.4 % vzorcev CARR  $\iota$  brez/s  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Njihova priprava je bila povsem enaka zgoraj opisani. Koncentracijo dodanih ionov smo z vsakim vzorcem povečevali, in sicer v območju 0.0–0.2 g, ter proučevali reološke lastnosti nastalih raztopin oziroma gelov.



**1) CARR  $\kappa$  + KCl**

Voda: 98.8%  
CARR  $\kappa$ : 1.0 %  
KCl: 0.2 %

\*prečvrst gel za merjenje

**2) CARR  $\kappa$  + KCl**

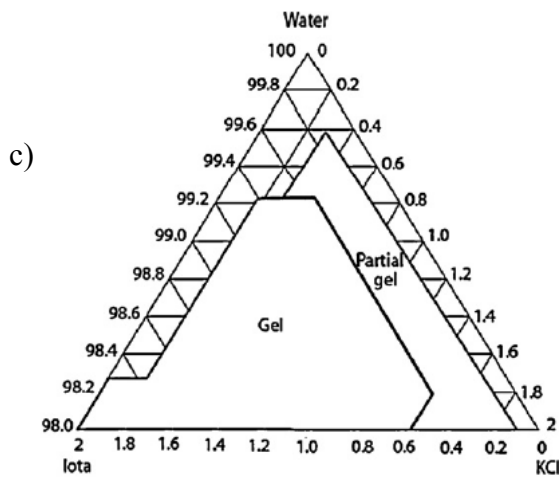
Voda: 99.0 %  
CARR  $\kappa$ : 0.9 %  
KCl: 0.1 %

**1) CARR  $\kappa$  +  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$**

Voda: 98.8%  
CARR  $\kappa$ : 1.0 %  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.2 %

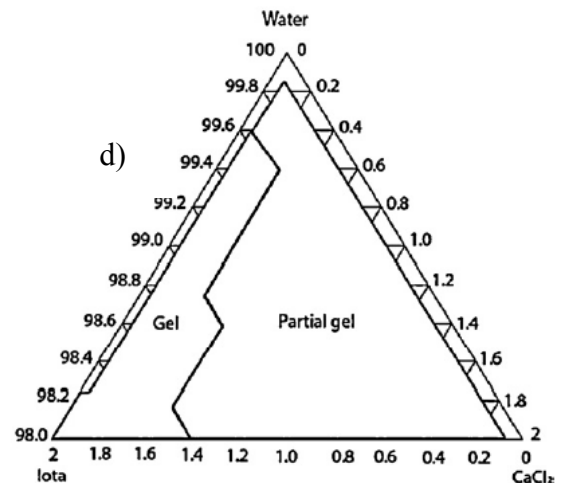
**2) CARR  $\kappa$  +  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$**

Voda: 99.0 %  
CARR  $\kappa$ : 0.9 %  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.1 %



**CARR  $\iota$  + KCl**

Voda: 98.6 %  
CARR  $\iota$ : 1.1 %  
KCl: 0.3 %



**CARR  $\iota$  +  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$**

Voda: 98.6 %  
CARR  $\iota$ : 1.1 %  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.3 %

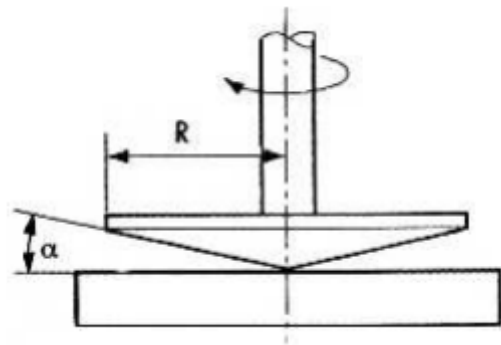
Slika 18: Ternarni fazni diagrami vodnih raztopin CARR  $\kappa$  (a in b) in CARR  $\iota$  (c in d) v prisotnosti KCl oz.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (15)

### 3.3.5. Reološko vrednotenje hidrogelov

Rotacijske in oscilacijske teste smo izvajali s pomočjo rotacijskega reometra z nastavljivo strižno napetostjo Anton Paar Physica MCR 301 (Slika 19), s senzorskim sistemom stožec – ploščica (CP50 – 2, premer  $2R = 49.961$  mm,  $\alpha = 2,001$  °) (Slika 20). Z oscilacijskim merjenjem dinamične viskoznosti in viskoelastičnih modulov določamo jakost povezav med molekulami polimerov, z rotacijsko reometrijo pa opazujemo razpad struktur pod vplivom različno velikih strižnih sil (9).



Slika 19: Reometer Anton Paar Physica MCR 301



Slika 20: Senzorski sistem stožec – ploščica (11)

Vzorci smo v tanki plasti nanesti na spodnjo statično ploščo, nato smo spustili stožec na ustrezno višino ter s spatulo odstranili odvečen vzorec, ki se je iztisnil iz merilnega sistema. Vse meritve rotacijskih testov smo izvajali pri temperaturi 25 °C in strižni hitrosti (D) 1–100  $s^{-1}$ .

#### Amplitudni test

Amplitudni testi predstavljajo prvi korak k opredelitvi viskoelastičnega obnašanja snovi. S pomočjo slednjih določimo območje LVE, znotraj katerega so reološke lastnosti snovi neodvisne od amplitude strižne deformacije. Znotraj tega območja smo izbrali parametre merjenja frekvenčnega testa.

## **Frekvenčni test**

Ko smo določili strižno deformacijo znotraj LVE, smo lahko začeli z izvedbo frekvenčnih testov. Nedestruktivni oscilacijski testi omogočajo materialu, da pri majhnih strižnih deformacijah ohrani svojo strukturo. Odziv materiala je tako posledica neporušene strukture in predstavlja »prstni odtis« materiala. Frekvenčne teste smo izvedli pri sinusno spreminjajoči frekvenci  $\nu = 0.628 - 628$  Hz oziroma  $\omega = 0.1 - 100$  rad/s ( $\omega = 2\pi\nu$ ) in temperaturi 25 °C. Pri teh pogojih smo pomerili vse pripravljene vzorce, da bi lahko neposredno primerjali rezultate med sabo ter beležili spreminjanje elastičnega (G') in plastičnega (G'') modula. Elastični in plastični modul nam je izračunala Physica programska oprema iz povprečja treh meritev.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Rotacijsko vrednotenje viskoznosti

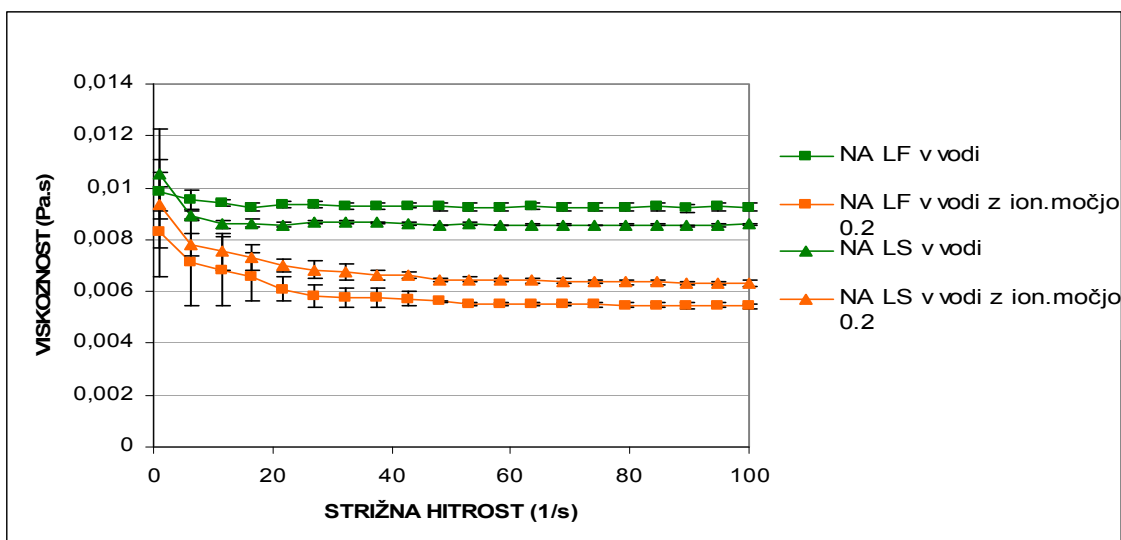
Najprej smo izvedli meritve klasične rotacijske viskoznosti z uporabo sistema stožec – ploščica, kjer smo merili viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti. Izmerili smo viskoznost različno koncentriranih polimernih vzorcev v različnih medijih in proučevali, kako se viskoznost spreminja v odvisnosti od vrste polimera, koncentracije polimera ter od vrste medija. Meritve smo izvedli pri temperaturi 25 °C in strižni hitrosti (D) 1–100 s<sup>-1</sup>.

#### 4.1.1. Viskoznostni diagram vzorcev iz alginata (NA)

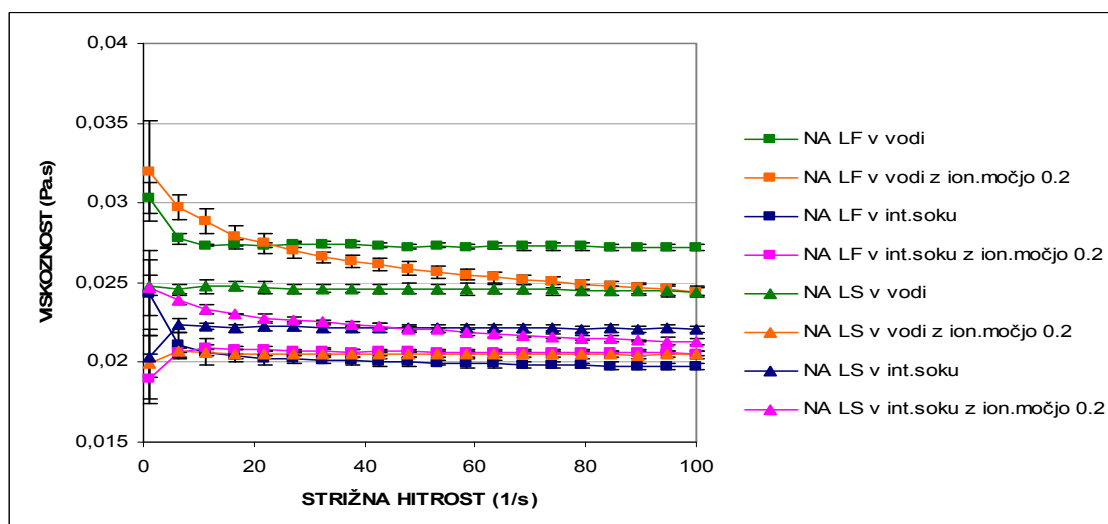
Vzorci iz NA smo želeli pripraviti v vodi, v simuliranem intestinalnem soku in v simuliranem želodčnem soku, a v slednjem je prišlo najverjetneje do oboritve polimera. V kisli raztopini so plavali beli kosmiči, ki se tudi po večurnem mešanju niso raztopili. Pripravo teh vzorcev smo opustili.

Najprej smo pomerili viskoznost manj koncentriranim vzorcem tipa Protanal LF 10/60 (NA LF) in Protanal LF 10/60 LS (NA LS). Oba tipa NA se razlikujeta v deležu G in M enot. Ugotovili smo, da je pri 0.5 % vzorcih NA v vodi viskoznostna krivulja NA LF nekoliko višja od krivulje NA LS, v vodi z  $\mu = 0.2$  M pa je ravno obratno (Slika 21). Večje razlike v viskoznosti lahko opazimo pri 1 % vzorcih NA pripravljenih v različnih medijih (Slika 22). Viskoznost 0.5 in 1 % vzorcev je najvišja v vodi, sledi viskoznost v vodi z  $\mu = 0.2$  M ter v ostalih medijih. Razlog največji viskoznosti obeh tipov (NA LF in NA LS) v vodi je lahko v najvišji stopnji hidratiranosti polimernih molekul. Prisotnost monovalentnih ionov v mediju torej ni povzročila porasta viskoznosti.

Nadalje smo ugotovili, da visok pH medija (simuliran intestinalni sok pH = 6.8) zniža viskoznost NA, čeprav bi se lahko zaradi povečanja negativnega naboja na molekuli viskoznost tudi zvišala. V članku (5) je navedeno splošno načelo, da viskoznost vodnih raztopin alginata narašča z nižanjem pH vrednosti do neke meje, kjer se alginat obori.



Slika 21: Viskoznostni diagram 0.5 % NA LF in NA LS

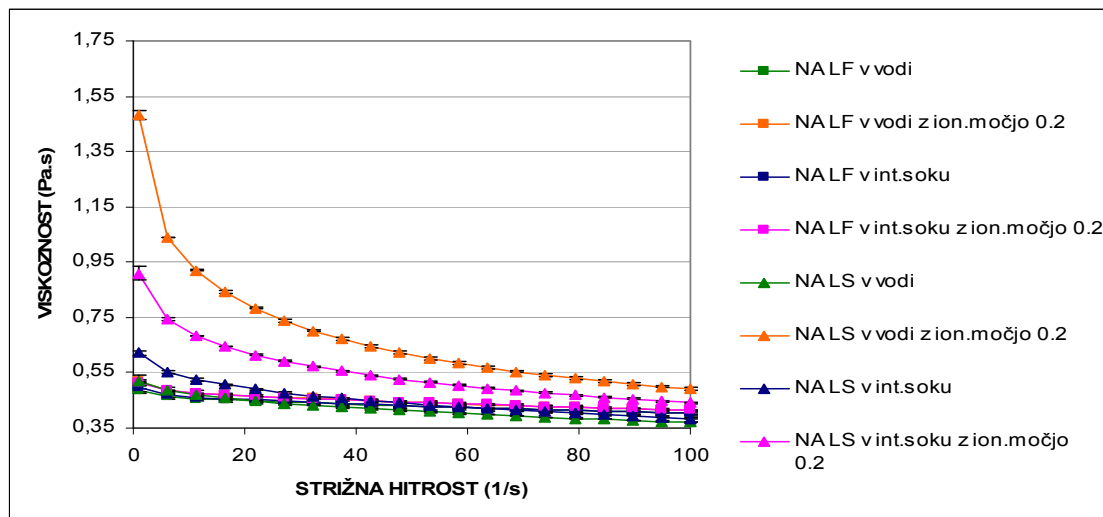


Slika 22: Viskoznostni diagram 1 % NA LF in NA LS

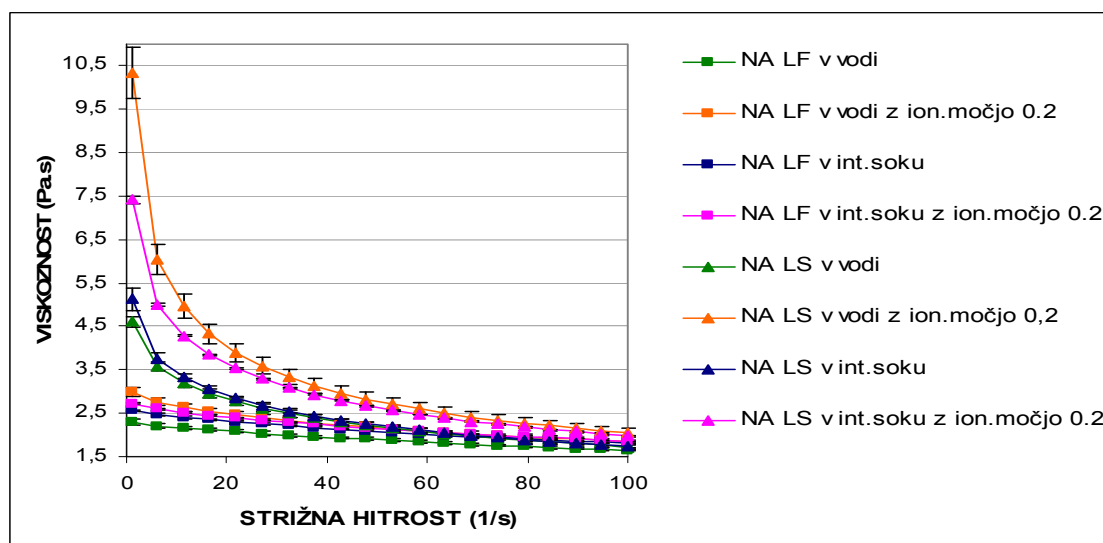
Pri bolj koncentriranih, 3 in 5 %, vzorcih NA (Slika 23 in 24) so viskoznosti vzorcev tipa NA LS v vseh medijih višje od viskoznosti tipa NA LF, kar je ravno obratno od obnašanja nižje koncentriranih vzorcev, kjer pa so razlike v viskoznosti vendarle zelo majhne. NA LS ima večji delež manuronske kisline (60 %) od tipa NA LF (30 %). Enote M so v polimeru urejene linearno, urejenost G pa je upognjena in zato so M odseki daljši od G odsekov. Daljša veriga znotraj istega volumna medija posledično veže več vode in viskoznosti tipa NA LS so večje od viskoznosti tipa NA LF.

Vpliv zvišane ionske moči v vodi je pri 3 in 5 % vzorcih ravno nasproten glede na manj koncentrirane vzorce. Pri bolj koncentriranih vzorcih senčenje negativno nabitih

funkcionalnih skupin NA z monovalentnimi ioni sicer zmanjša interakcije molekul polimera z vodo, a povečajo se interakcije molekul polimera med sabo. In če je teh pri bolj koncentriranih vzorcih več, potem viskoznost vzorca naraste. Podobno se zgodi tudi v simuliranem intestinalnem soku, zlasti pri tistem z  $\mu = 0.2$  M.



Slika 23: Viskoznostni diagram 3 % NA LF in NA LS



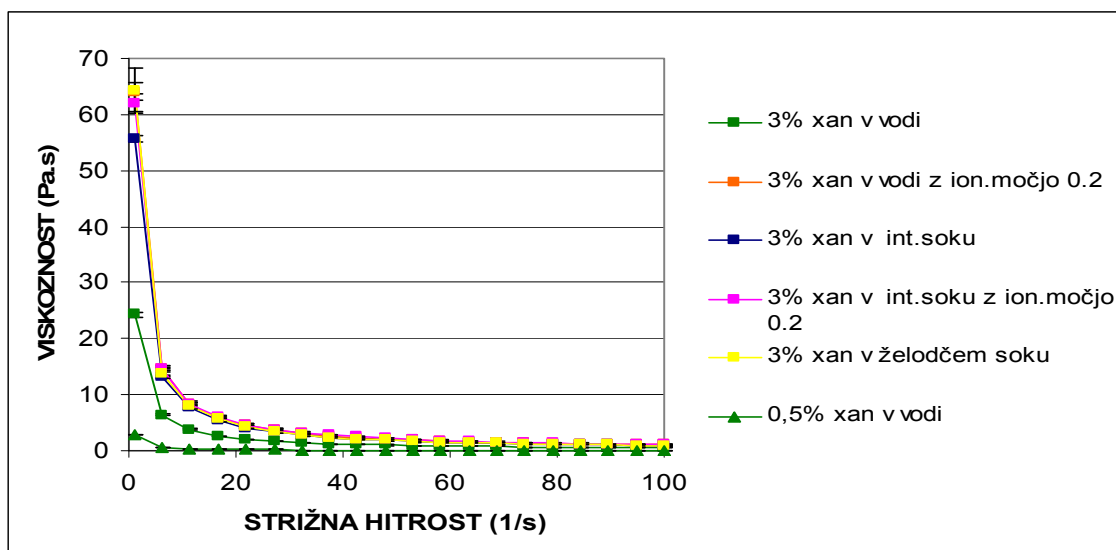
Slika 24: Viskoznostni diagram 5 % NA LF in NA LS

#### 4.1.2. Viskoznostni diagram vzorcev iz ksantana (XAN)

Pripravili smo 3 % vzorce XAN. Iz viskoznočnega diagrama (Slika 25) lahko razberemo, da je viskoznost XAN v vodi precej nižja od viskoznosti v ostalih medijih. Najverjetneje je razlog v nastanku različnih struktur XAN v različnih medijih. V vodi se karboksilne skupine trisaharidne enote XAN ionizirajo in močno hidratirajo. Zaradi negativnega naboja na

stranskih karboksilnih skupinah pride med njimi do elektrostatskega odboja. Interakcije med polimernimi molekulami so šibke in viskoznost nizka. V simuliranem želodčnem soku (pH = 1.55) pride do nevtralizacije negativnega naboja na karboksilnih skupinah stranskih trisaharidnih verig in lahko se vzpostavijo interakcije med dvojnimi vijačnicami native strukture XAN, kar privede do povečanja viskoznosti. Podobno se zgodi v medijih z ionsko močjo 0.2 M, kjer  $\text{Na}^+$  povzročijo senčenje negativno nabitih karboksilnih skupin na stranskih verigah in odboj med molekulami XAN se zmanjša. Posledično se vzpostavijo različne interakcije in viskoznost naraste.

V simuliranem intestinalnem soku (pH = 6.8) viskoznost nekoliko pade v primerjavi z viskoznostjo v želodčnem soku. Razlog je v višjem pH-ju, ki povzroči delno ionizacijo karboksilnih skupin XAN in odboj med njimi. Ta efekt pa zmanjšajo ioni v simuliranem intestinalnem soku ( $\mu = 0.08 \text{ M}$ ) in v simuliranem intestinalnem soku z  $\mu = 0.2 \text{ M}$  po principu senčenja  $-\text{COO}^-$  skupin z  $\text{Na}^+$  ioni. Velja torej, da tvori XAN močnejše interakcije v medijih z dodanimi elektroliti.



Slika 25: Viskoznočni diagram 0.5 % in 3 % XAN

#### 4.1.3. Viskoznočni diagram vzorcev iz karagenana (CARR)

V idealnem primeru ima CARR  $\kappa$  eno, CARR  $\iota$  dve in CARR  $\lambda$  tri sulfatne skupine na ponavljajočo se trisaharidno enoto. Posledično sta CARR  $\kappa$  in  $\iota$  gelirajoča polimera, CARR  $\lambda$  pa po mnenju strokovnjakov ne more tvoriti gelov, ampak le raztopine s prepletenimi polimernimi verigami (angl. entangled) (2).

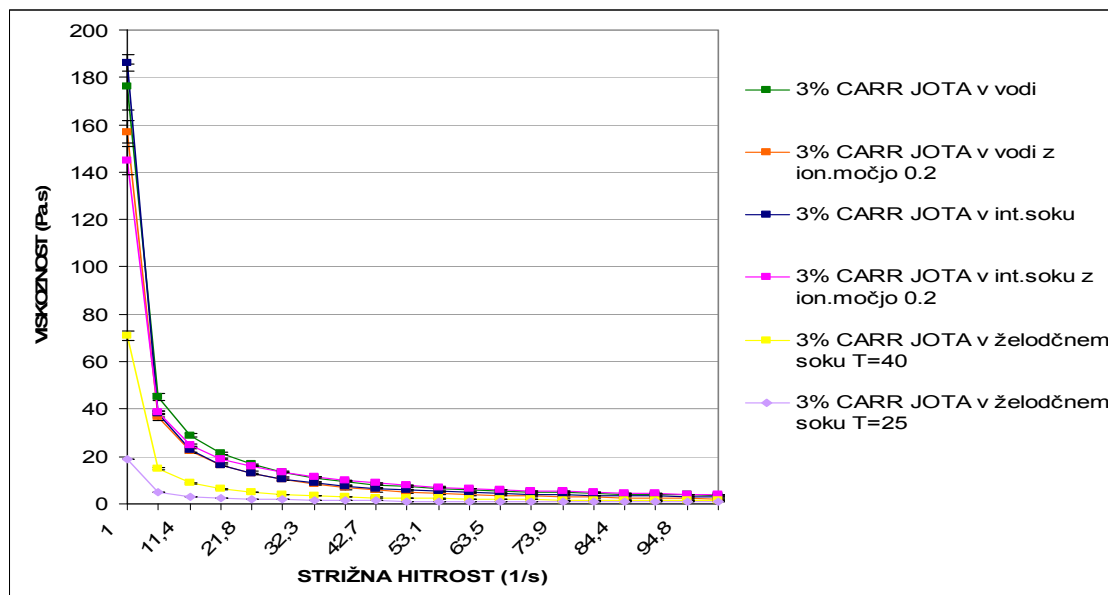
### - Vpliv temperature na viskoznost vzorcev iz CARR

Vzorci smo pripravljali na vodni kopeli s temperaturo 80 °C. Pri vzorcih pripravljenih v želodčnem soku pa smo naleteli na težavo. Segrevanje vzorcev CARR v kislem mediju je privedlo do njihove nestabilnosti, kar se je izražalo kot negeliranje. Po literaturnih podatkih je prišlo najverjetneje do depolimerizacije (17).

S pomočjo podatkov navedenih v članku Caprona s sodelavci (17), kjer so vzorce CARR v kislem mediju pripravljali pri 37 °C, smo sklenili pripraviti vzorce pri sobni temperaturi in na vodni kopeli s  $T = 40$  °C. Pri teh temperaturah naj ne bi prišlo do nestabilnosti vzorcev CARR in res so nastali homogeni geli oziroma viskozne raztopine. Iz naših opažanj lahko zaključimo, da temperatura pomembno vpliva na tvorbo gela v želodčnem soku. Pri 80 °C gel ne nastane, pri 40 °C pa CARR  $\kappa$  in  $\iota$  tvorita gelsko strukturo.

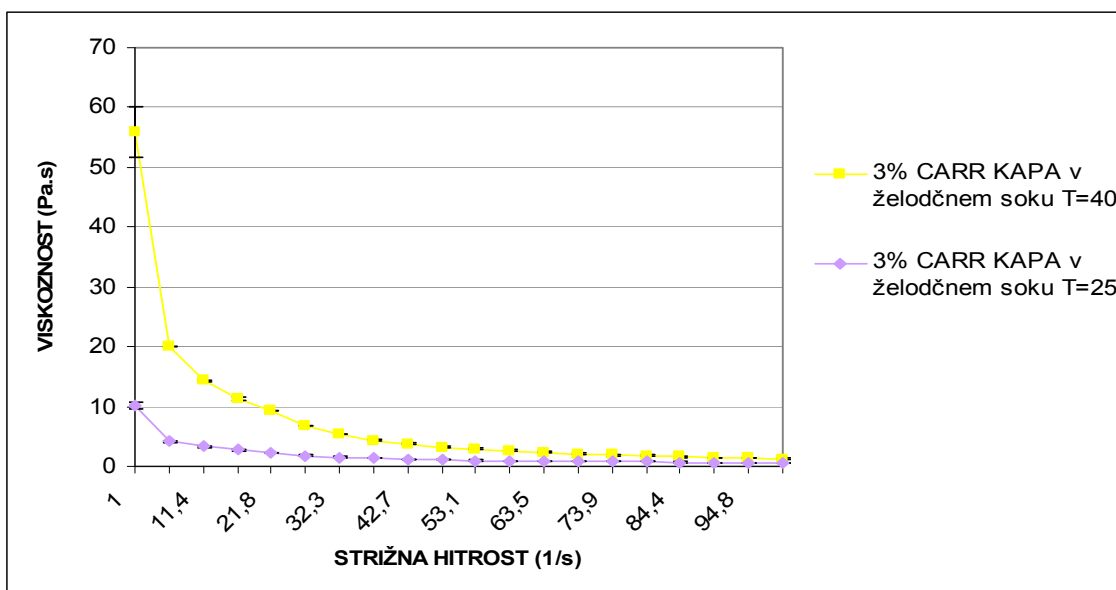
### - Vpliv medija na viskoznost vzorcev iz CARR

Visok pH intestinalnega soka ( $\text{pH} = 6.8$ ) in prisotnost monovalentnih ionov ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ugodno vplivajo na čvrstost nastalega gela, saj so pri CARR  $\iota$  in  $\lambda$  viskoznostne krivulje v simuliranem intestinalnem soku z  $\mu = 0.2$  M in v vodi z  $\mu = 0.2$  M najvišje (Slika 26 in 28). Na videz najbolj čvrsti geli pa so nastali pri CARR  $\kappa$  v vodi, v vodi z  $\mu = 0.2$  M, v simuliranem intestinalnem soku in v simuliranem intestinalnem soku z  $\mu = 0.2$  M. Te gele je bilo povsem nemogoče reološko ovrednotiti, saj je vzorec ob spuščanju stožca na ploščico izhajal iz reže. V reži so ostali le še koščki gela, ki pa so bili premajhni za pravilno določitev viskoznosti.

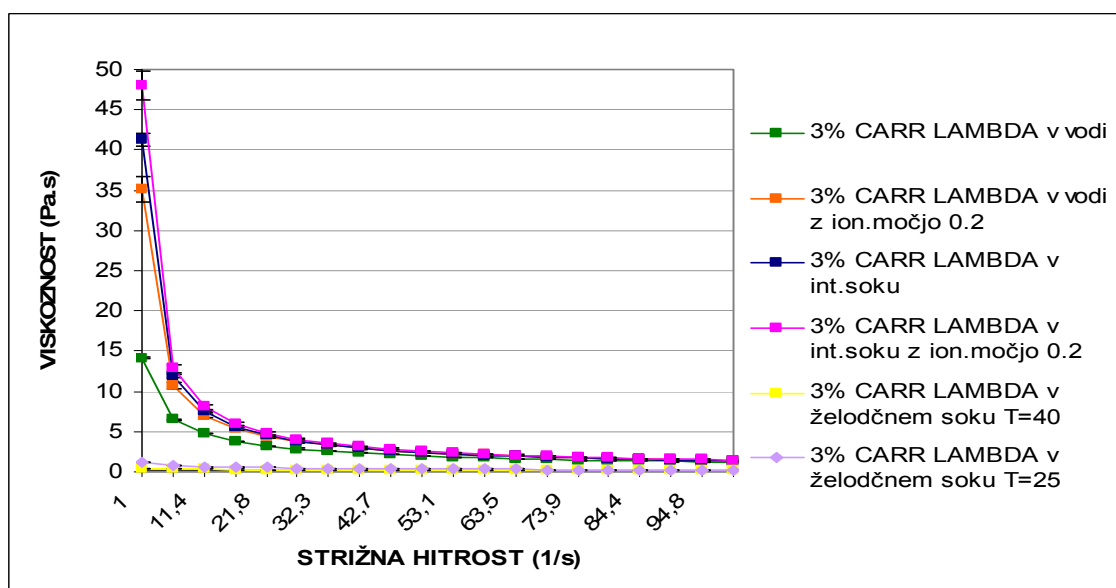


Slika 26: Viskoznostni diagram 3 % CARR  $\iota$





Slika 27: Viskoznostni diagram 3 % CARR  $\kappa$



Slika 28: Viskoznostni diagram 3 % CARR  $\lambda$

## 4.2. Oscilacijsko vrednotenje viskoznosti

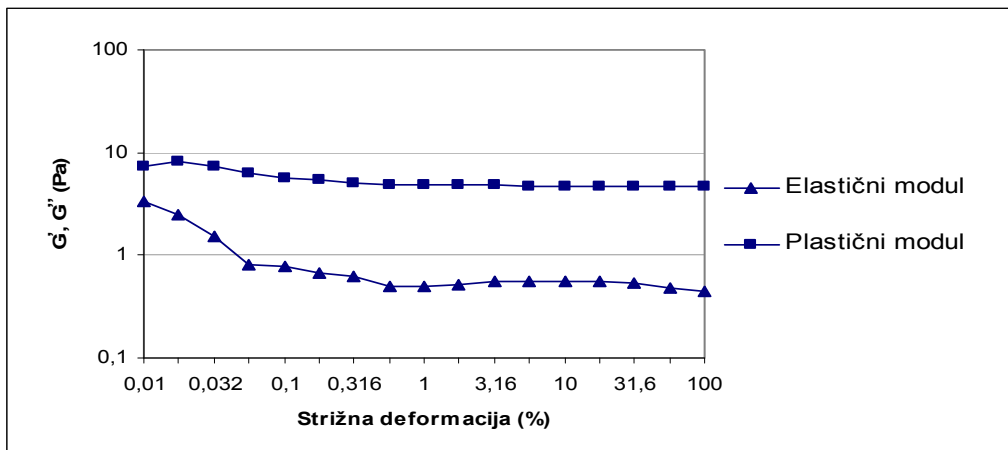
### AMPLITUDNI TEST

Pri vrednotenju sistemov z oscilacijsko reometrijo je potrebno najprej določiti meje linearnega viskoelastičnega odziva (LVE), znotraj katerega ne bo prišlo do porušitve notranje strukture. Amplitudni test smo izvajali pri kotni hitrosti 10 rad/s, temperaturi 25 °C in sinusno spreminjajoči se deformaciji v deformacijskem območju  $\gamma = 0.01 - 100 \%$ . Meje LVE smo za vse vzorce določili s pomočjo krivulje elastičnega modula  $G'$ , ki je običajno bolj občutljiv od

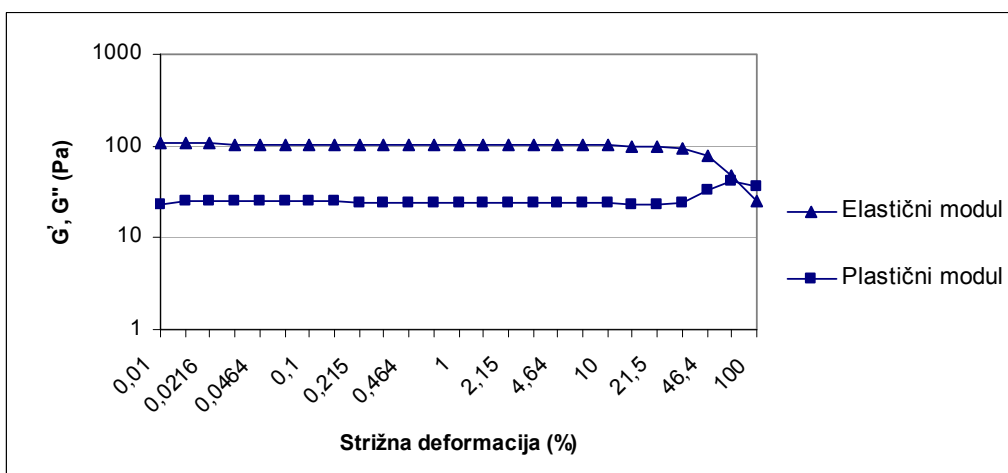
krivulje plastičnega modula  $G''$ . Rezultate smo predstavili grafično na log/log skali in nekaj primerov je prikazanih na slikah 29–31.

Meje LVE:

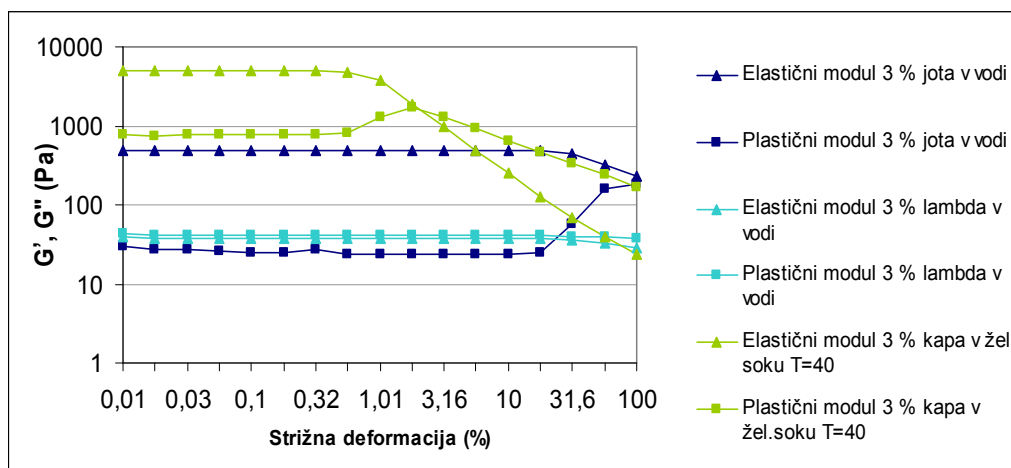
- NA v vseh medijih 0.1–10 %
- CA v vseh medijih 0.1–5 %
- XAN brez/z dodanim  $\text{CaCl}_2$  v vseh medijih 0.1–10 %
- CARR  $\tau$  v vodi 0.1–10 %, v vodi z  $\mu = 0.2 \text{ M}$  0.1–5 %, v simuliranem želodčnem soku 0.1–1 %
- CARR  $\kappa$  v simuliranem želodčnem soku 0.1–0.5 %
- CARR  $\lambda$  v vseh medijih 0.1–10 %
- CARR  $\tau$ ,  $\kappa$  in  $\lambda$  v vodi z dodatkom  $\text{KCl} / \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , s sestavo razbrano iz ternarnih faznih diagramov: LVE v območju 0.1–10 %



Slika 29: Amplitudni test za 3 % NA v prečiščeni vodi



Slika 30: Amplitudni test za 3 % XAN v prečiščeni vodi



Slika 31: Amplitudni test za 3 % CARR

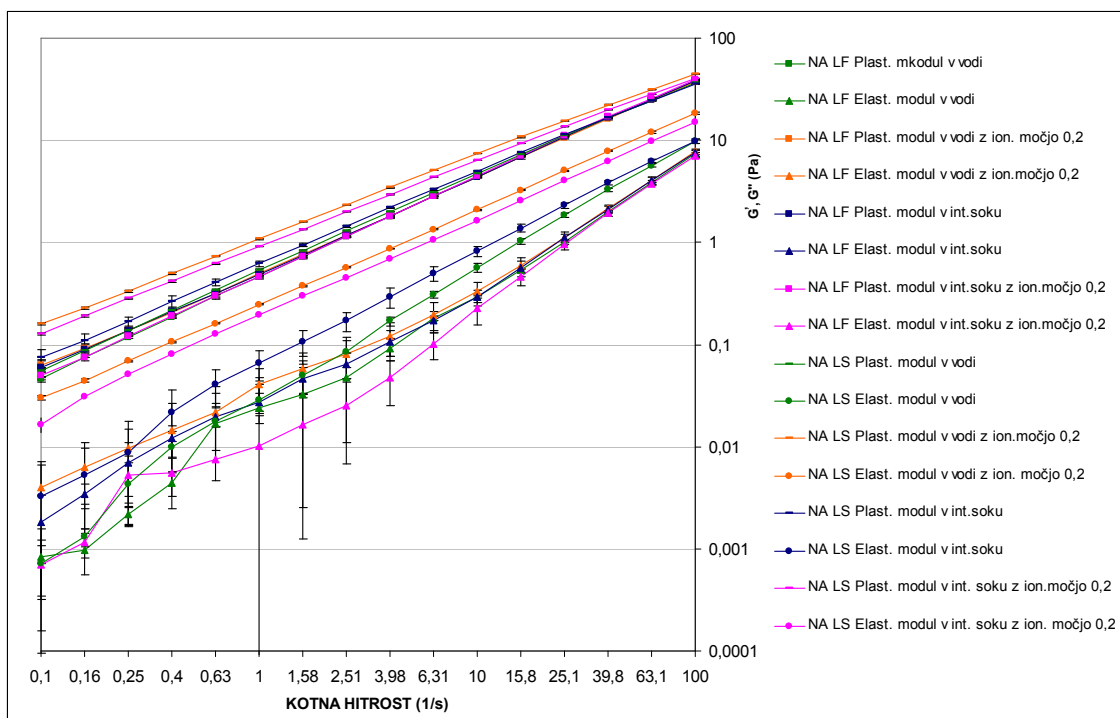
## FREKVENČNI TEST

Frekvenčne teste smo glede na opravljene amplitudne teste izvajali znotraj LVE, in sicer pri strižni deformaciji 0.1 %, v frekvenčnem območju od 0.1 do 100 rad/s in pri temperaturi 25 °C. Rezultate frekvenčnih testov smo predstavili grafično v log/log skali. Vrednosti  $G'$  in  $G''$  so dobljene iz povprečja treh meritev. Iz grafov smo ocenili vpliv polimera, medija, postopka priprave in dodanega  $\text{CaCl}_2$  /  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{KCl}$  na vrednost  $G'$  in  $G''$ . Vrednosti  $G'$  in  $G''$  sta nam služili kot merilo za čvrstost nastalega gela.

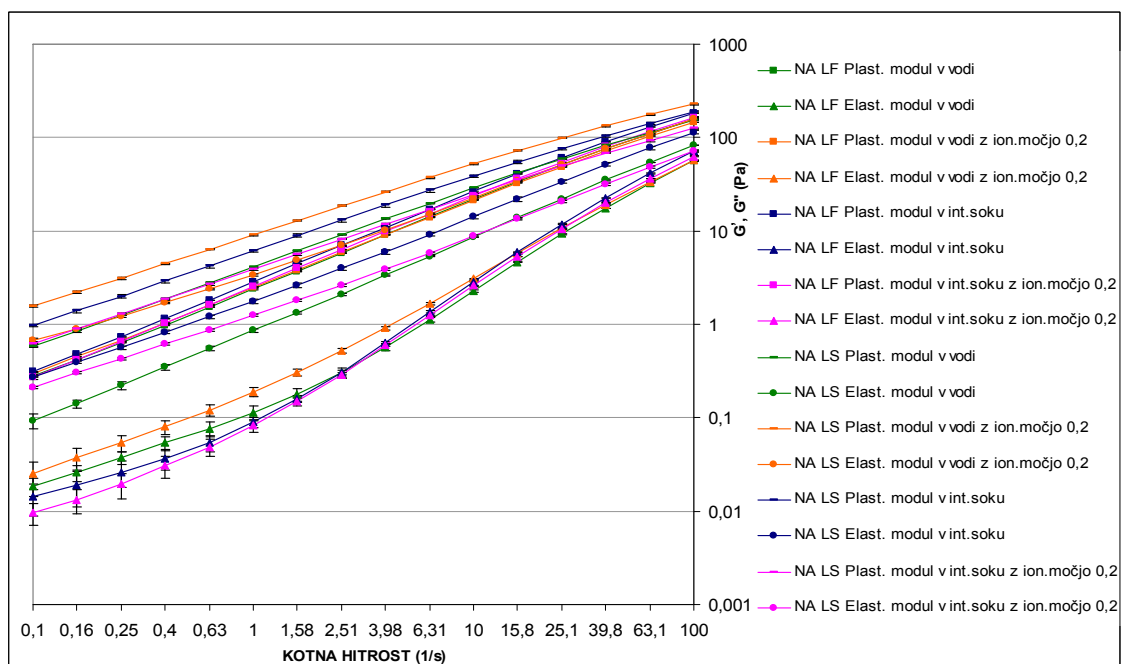
### 4.2.1. Reološka opredelitev sistemov NA v mediju brez $\text{CaCl}_2$

Pripravili smo 0.5, 1, 3 in 5 % raztopine NA LF in NA LS v različnih medijih. Iz grafov na slikah 32 in 33 lahko opazimo, da  $G'$  in  $G''$  z naraščanjem kotne hitrosti naraščata približno vzporedno.  $G''$  je nad  $G'$  tako pri 3 kot pri 5 % vzorcih NA v vseh medijih, kar kaže na viskozno polimerno raztopino. Prav nikjer v frekvenčnem območju ni prišlo do prekrivanja teh dveh krivulj, zato ne moremo govoriti o nastanku raztopine s prepletenimi polimernimi verigami. Lahko pa potrdimo, da z večanjem koncentracije NA naraščajo vrednosti  $G'$  in  $G''$ . Dobljeni rezultati so v skladu s pričakovanji, saj NA ni sposoben tvorbe gela.

Vzorci NA LS imajo v vseh medijih višje dinamične module od vzorcev NA LF, kar pomeni, da tvorijo bolj viskozno raztopino. Na dobljeno viskoznost pomembno vpliva delež M enot, ki znaša pri tipu NA LS 60 % in pri tipu NA LF 30 %. M enote so v polimeru urejene linearno, kar pomeni, da vežejo več vode in nastanejo bolj viskozne raztopine. Rezultati rotacijskih testov (Slika 23 in 24) in frekvenčnih testov (Slika 32 in 33) so v skladu z našimi pričakovanji.



Slika 32: Frekvenčni test 3 % NA LF in NA LS v različnih medijih



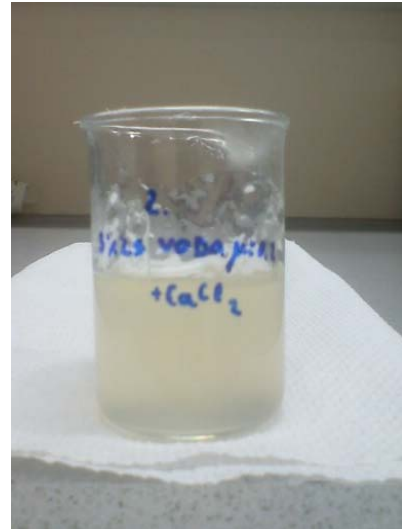
Slika 33: Frekvenčni test 5 % NA LF in NA LS v različnih medijih

#### 4.2.2. Reološka opredelitev sistemov NA v mediju s $\text{CaCl}_2$

Da bi proučili, kdaj in kako pride do ionotropnega geliranja, smo v 3 % vzorce NA dodali 3 % raztopine  $\text{CaCl}_2$ . Meritve je bilo mogoče izvesti le vzorcem pripravljenim v vodi in v vodi z  $\mu = 0.2 \text{ M}$ , saj so v simuliranem intestinalnem soku nastali nestabilni vzorci, medtem ko v

simuliranem želodčnem soku nismo uspeli pripraviti niti raztopine NA. Razlog za izbiro 3 % vzorca NA je v tem, da dodatek  $\text{CaCl}_2$  v 1 % vzorcu ni privedel do nastanka homogenega gela, nastali so le manjši agregati gelske strukture, ki so se posedli na dnu čaše. Sklepamo lahko, da so  $\text{Ca}^{2+}$  ioni zreagirali s vso guluronsko kislino, ki je bila na voljo v 1 % vzorcih. Vzorci alginata so najverjetneje gelirali po sledečem mehanizmu. Najprej so vodne molekule vdrle v polimer in povečale razdalje med polimernimi verigami. Dodani dvovalentni  $\text{Ca}^{2+}$  ioni pa so se zamenjali z  $\text{Na}^+$  s soli guluronskih kislin v razmerju 1 : 2 ter povezali odseke guluronskih kislin med sabo. Nastala je tridimenzionalna struktura imenovana »škafca za jajca« stabilizirana z vodikovimi vezmi (3).

3 % vzorci NA vsebujejo zadostno količino guluronske kisline, ki z dodanimi  $\text{Ca}^{2+}$  ioni tvorijo ionski oziroma ionotropni gel. Nastali geli so mlečno bele barve, kar je posledica izmenjave ionov in nastanka CA, ki je v vodi netopen (Slika 34).

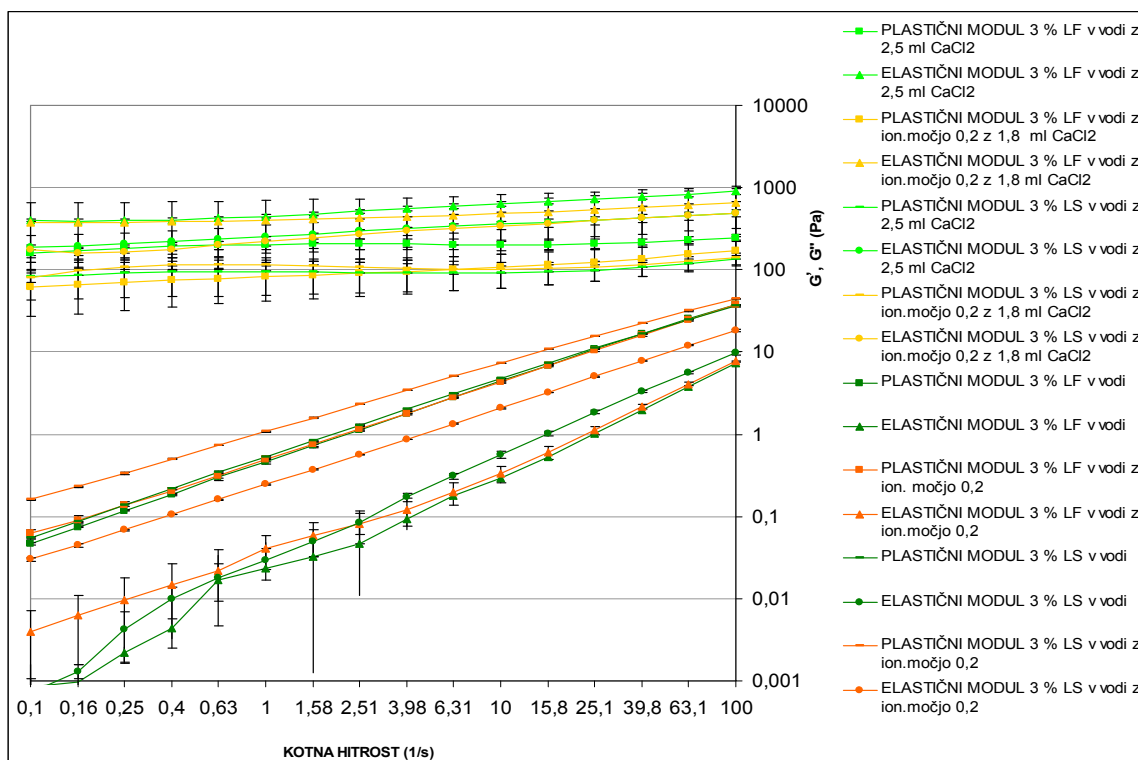


Slika 34 : Hidrogel iz CA mlečno bele barve

Graf na sliki 35 zelo nazorno prikazuje zvišanje  $G'$  in  $G''$  po dodatku  $\text{CaCl}_2$  v celotnem frekvenčnem območju v primerjavi z osnovno 3 % raztopino NA.  $G'$  se je po dodatku  $\text{CaCl}_2$  bolj povišal kot  $G''$ , zato sedaj velja, da je  $G' \square G''$  v celotnem frekvenčnem območju, kar opisuje gelsko strukturo.

Prisotnost elektrolitov v mediju je ugodno vplivala na nastanek gelske strukture CA. Pri vzorcih pripravljenih v vodi z  $\mu = 0.2 \text{ M}$  je zadoščal dodatek 1.8 ml 3 % raztopine  $\text{CaCl}_2$ , medtem ko smo vzorcem NA v vodi morali dodati 2.5 ml 3 % raztopine  $\text{CaCl}_2$  za nastanek gelske strukture. Iz tega lahko zaključimo, da elektroliti, ki so prisotni v vodi, s senčenjem negativno nabitih funkcionalnih skupin NA olajšajo nastanek ionotropnega gela v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  ionov.

Če nadalje primerjamo še oba tipa NA med sabo lahko opazimo, da ima NA LF oba dinamična modula višja od NA LS. Razlog se skriva v deležu guluronske kisline, ki znaša pri prvem približno 70 %, pri drugem pa 40 %. Kot smo že povedali je guluronska kislina bistvena pri nastanku tridimenzionalne strukture.



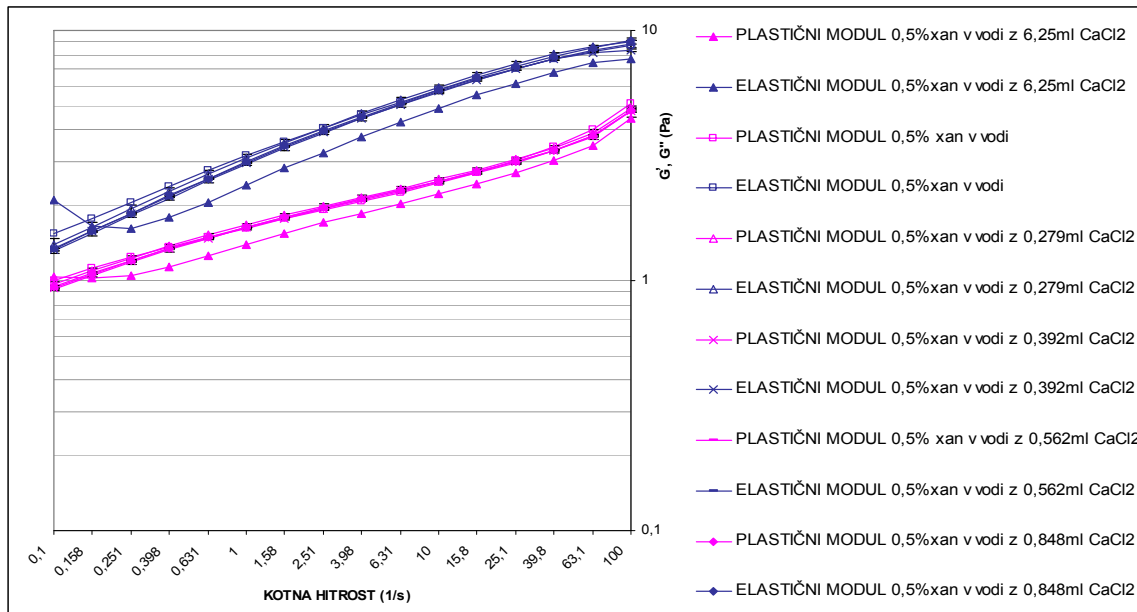
Slika 35: Frekvenčni test 3 % NA LF in NA LS z dodatkom  $\text{CaCl}_2$

#### 4.2.3. Reološka opredelitev sistemov XAN v mediju brez/s $\text{CaCl}_2$

Vzorcem XAN, ki smo jih pripravili po treh različnih postopkih, smo dodali raztopino  $\text{CaCl}_2$  in spremljali obnašanje  $G'$  in  $G''$  v odvisnosti od kotne hitrosti. Na vsakem grafu (Slika 36, 37, 38 in 39) smo prikazali še dinamične module 0.5 % vzorcev XAN v prečiščeni vodi brez dodanega  $\text{CaCl}_2$ , s čimer smo želeli preveriti, ali po dodatku  $\text{CaCl}_2$  res pride do nastanka bolj čvrstega gela.

##### - Vzorci pripravljani po postopku 1B

Graf na sliki 36 prikazuje reološke rezultate 0.5 % vzorcev XAN z dodanim  $\text{CaCl}_2$ , ki so pripravljani po postopku 1B. Dodan  $\text{CaCl}_2$  ni povzročil opaznih sprememb v vrednostih  $G'$  in  $G''$  modulov, zgolj pri dodatku 6.25 ml 5 % raztopine  $\text{CaCl}_2$  krivulji obeh modulov opazno padeta, saj pride najverjetneje do razredčitve vzorca. Volumen vzorca je porasel kar za 12.5 %, iz 50 ml na 56.25 ml. Molekula XAN se pri sobni temperaturi obnaša kot toga palica, ki ne sprejema  $\text{Ca}^{2+}$  v svojo strukturo.



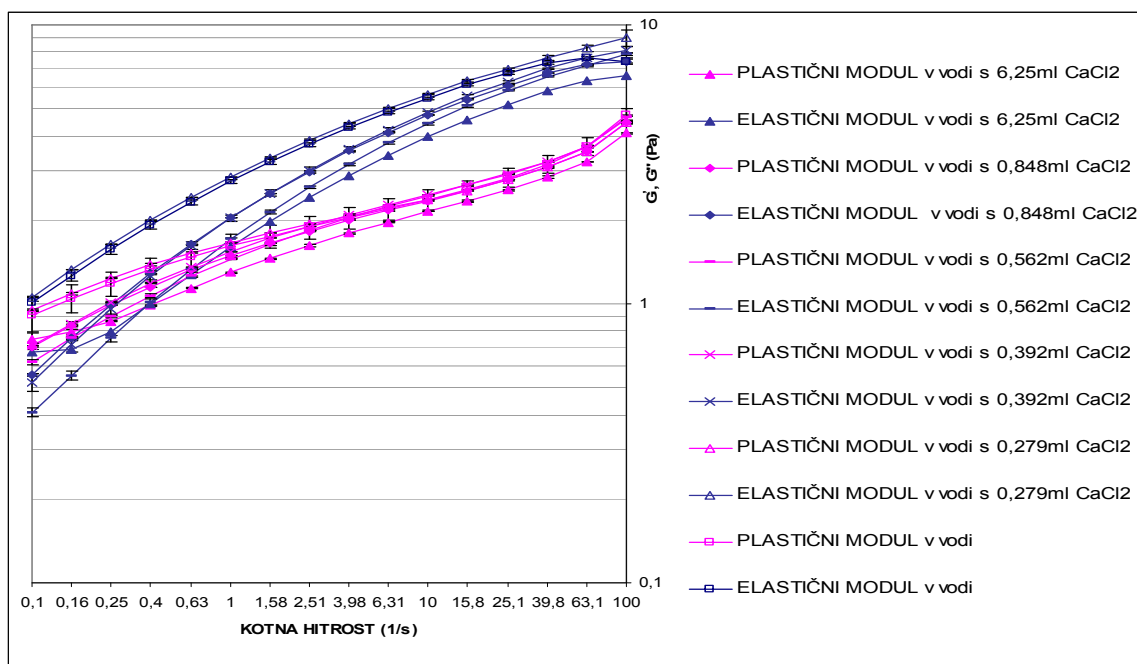
Slika 36: Frekvenčni test 0.5 % XAN v prečiščeni vodi brez/s 5 % raztopino CaCl<sub>2</sub>,  
pripravljen po postopku 1B

#### - Vzorci pripravljene po postopku 2B

Vzorci pripravljene po postopku 2B smo segrevali na vodni kopeli s  $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in jim po kapljicah dodali ustrezne volumne 5 % raztopine CaCl<sub>2</sub>. Iz članka (27) smo pridobili pomembno informacijo o pripravi raztopin XAN pri  $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri kateri bi naj Ca<sup>2+</sup> ioni tvorili s XAN bolj čvrste gele. Višja kot je temperatura priprave, večji delež XAN bo v neurejeni obliki. Prevladovati pričnejo elektrostatske odbojne sile med negativno nabitimi stranskimi verigami, ki se ne prilegajo več glavni verigi, ampak štrlijo navzven. Višje koncentracije Ca<sup>2+</sup> pa naj bi s senčenjem negativnih nabojev favorizirale urejeno obliko XAN, ki pa je bistveno manj popolna od prvotne native konformacije.

Rezultati kažejo na delno porušenje native konformacije, saj lahko na sliki 37 opazimo padec dinamičnih modulov v celotnem frekvenčnem območju. Tako vrednosti G' kot G'' so se znižale glede na vrednosti obeh modulov vzorca pripravljenega pri sobni temperaturi po postopku A.

Vpliv dodanega CaCl<sub>2</sub> je iz grafa na sliki 37 težko pojasniti. Vrednost dinamičnih modulov pri vzorcih z dodanim CaCl<sub>2</sub> je nižja od vrednosti pri vzorcih brez CaCl<sub>2</sub>. Najverjetneje so nerazumljivi rezultati posledica neustreznega postopka priprave (postopek B), ki je privedel do razredčenja vzorca, saj kažejo rezultati vzorcev pripravljenih po postopku C povsem drugačno sliko.



Slika 37: Frekvenčni test 0.5 % XAN v prečiščeni vodi brez/s 5 % razt. CaCl<sub>2</sub>, pripravljen po postopku 2B

#### - Vzorci pripravljene po postopku C

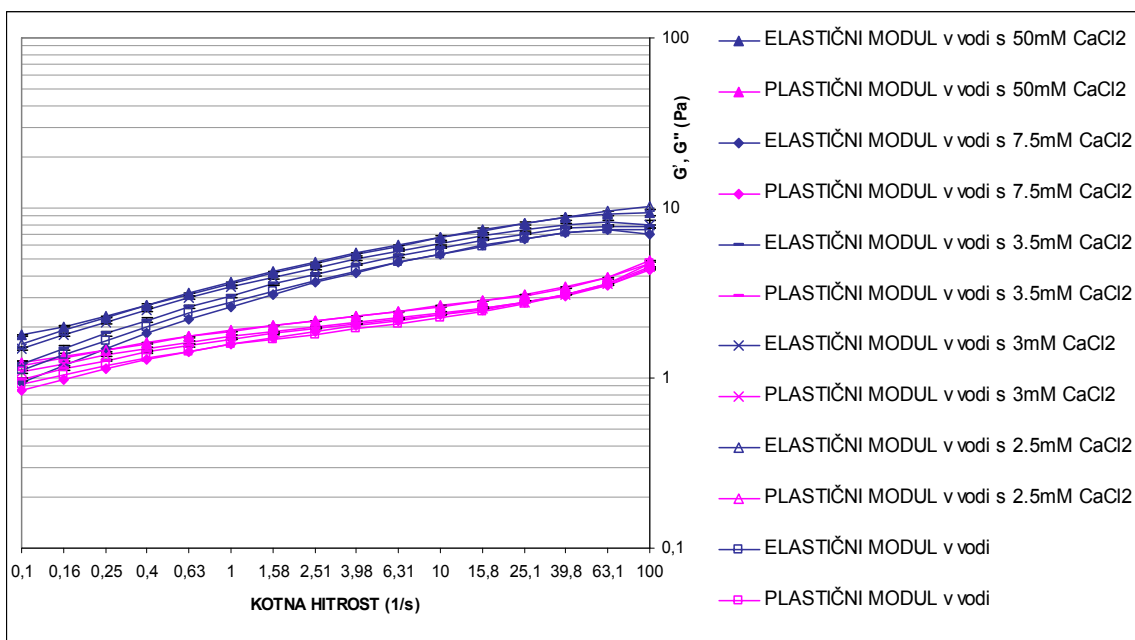
Razlika v pripravi vzorcev po postopku C je bila sledeča: najprej smo pripravili 50 ml 1 % raztopine XAN, v katero smo dolili 50 ml raztopine CaCl<sub>2</sub> ustrežne koncentracije. Prednost tega postopka je v nerazredčenju vzorca in v predhodni pripravi raztopine CaCl<sub>2</sub> z ustrežno molarostjo. Na ta način smo dosegli stalno koncentracijo vzorcev XAN in pozorno iskali optimalno koncentracijo Ca<sup>2+</sup> ionov, ki bi privedla do nastanka najbolj čvrstega gela.

Razmerja med XAN in CaCl<sub>2</sub> nismo mogli izračunati, saj nismo imeli podatkov za izračun molekulske mase XAN.

Na slikah 38 in 39 smo na grafih prikazali rezultate vzorcev pripravljenih po postopku C na vodni kopeli s T = 80 °C. Vrednosti G' in G'' so nekoliko nižje od vrednosti vzorcev pripravljenih pri sobni temperaturi. Povišana temperatura priprave verjetno poruši nativno konformacijo XAN. Slednji preide v neurejeno konformacijo, ki se po znižanju temperature ne more več povsem vrniti v začetno obliko. Posledično sta vrednosti elastičnih in plastičnih modulov nižji.

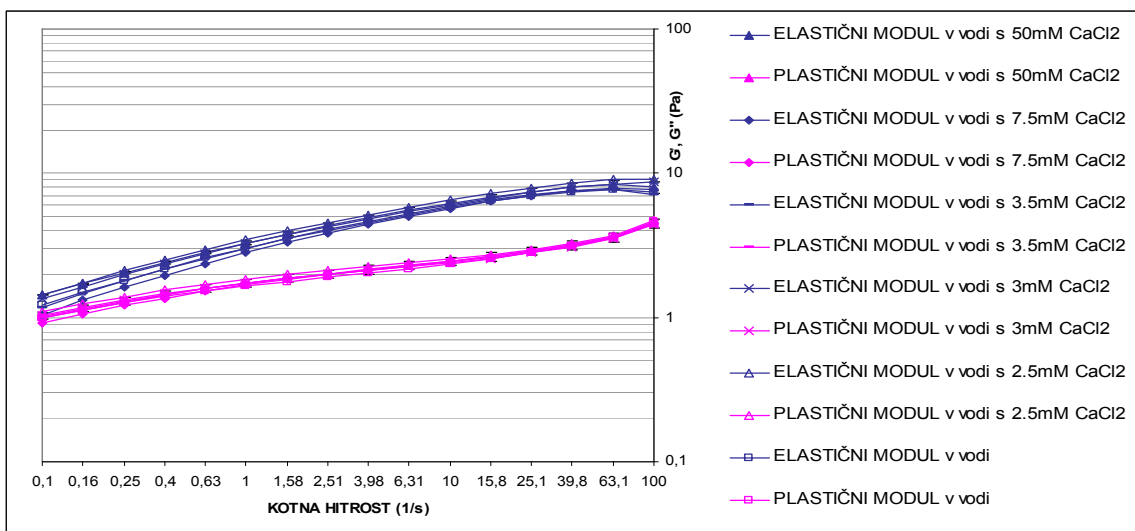
Rezultati iz grafa na sliki 38 nam podajajo sliko o vplivu CaCl<sub>2</sub> na čvrstost gela. Najvišje vrednosti dinamičnih modulov smo izmerili pri vzorcu z dodatkom 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, nato sledita vzorca z dodatkom 3 mM in 50 mM CaCl<sub>2</sub>.





Slika 38: Frekvenčni test 0.5 % XAN v prečiščeni vodi brez/s CaCl<sub>2</sub>, pripravljen po postopku C

Graf na sliki 39 prikazuje frekvenčno odvisnost dinamičnih modulov za vzorce pripravljene po postopku C in na vodni kopeli s  $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter čez noč shranjene v hladilniku. Zanimalo nas je tudi, ali ima znižana temperatura shranjevanja (12 h) kakšen vpliv na čvrstost nastalih gelov. Reološki testi niso pokazali nobenih večjih razlik v vrednostih dinamičnih modulov med vzorci shranjenimi pri sobni temperaturi in vzorci shranjenimi v hladilniku ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Iz tega lahko sklepamo, da temperatura shranjevanja ne vpliva na čvrstost nastalih gelov.

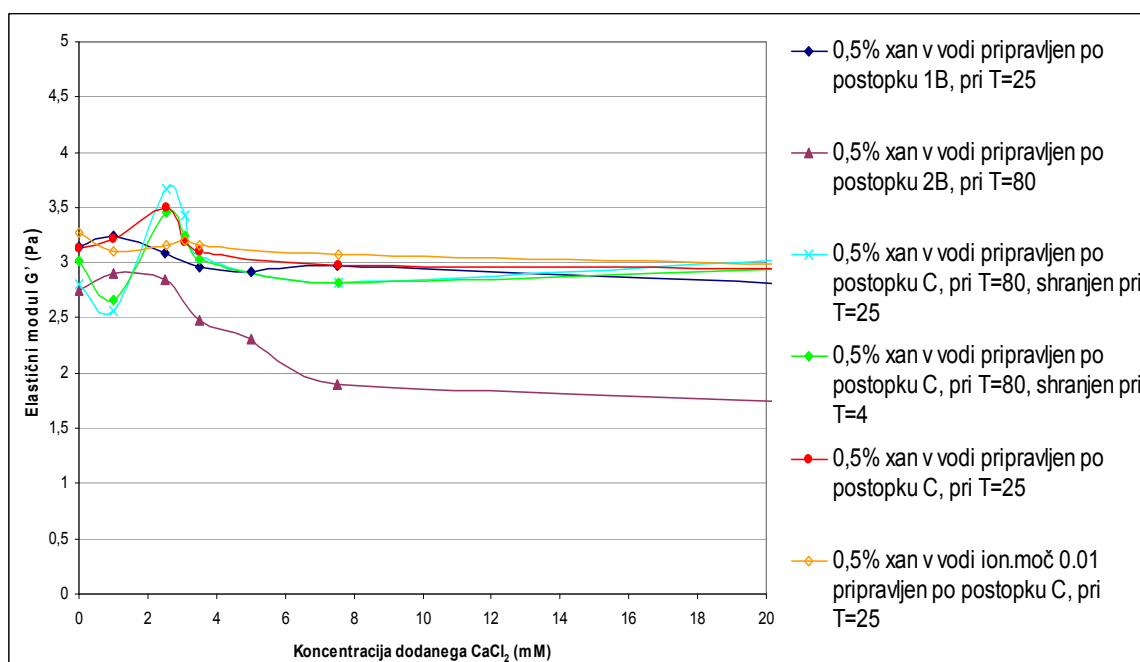


Slika 39: Frekvenčni test 0.5 % XAN v prečiščeni vodi brez/s CaCl<sub>2</sub>, shranjen čez noč v hladilniku, pripravljen po postopku C

Da bi na vzorcih 0.5 % XAN ugotovili vpliv  $\text{Ca}^{2+}$ , smo to prikazali kot obnašanje elastičnega modula  $G'$  v odvisnosti od koncentracije dodanega  $\text{CaCl}_2$  na sliki 40. Vse krivulje prikazujejo porast  $G'$  v območju 0–5 mM dodanega  $\text{CaCl}_2$ , nato sledi padec  $G'$  v območju 5–10 mM dodanega  $\text{CaCl}_2$ , potem pa vrednosti  $G'$  rahlo padajo pri vzorcih pripravljenih po postopku B in se ustalijo pri vzorcih pripravljenih po postopku C pri  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$  ter rahlo naraščajo pri vzorcih pripravljenih po postopku C pri  $T = 80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Kot smo že večkrat omenili, je na čvrstost naših vzorcev pomembno vplival postopek priprave z ustrežno temperaturo in koncentracija dodanega  $\text{CaCl}_2$ . Obnašanje krivulje  $G'$  0.5 % vzorca XAN v vodi, pripravljenega po postopku C pri  $T = 80\text{ }^\circ\text{C}$ , je najbolj podobno krivulji, ki smo jo zasledili v članku (27). Dokazati smo namreč želeli, ali proučevani XAN obstaja kot dvojna ali enojna vijačnica. Morris in sodelavci so z oscilacijsko reometrijo raziskovali učinek  $\text{Ca}^{2+}$  na gele iz XAN. Pripravili so gele iz XAN v koncentraciji 5 g/l v 10 mN NaCl. Z dodatkom NaCl so želeli stabilizirati XAN verige v urejeni konformaciji, in sicer preko senčenja nabojev na negativnih stranskih verigah. Gelom so dodajali raztopino  $\text{CaCl}_2$  v koncentraciji 0–100 mN (0–50 mM) ter merili  $G'$  in  $G''$  v odvisnosti od kotne hitrosti. Ugotovili so, da dosežeta dinamična modula maksimum pri koncentraciji 7.5 mN (3.75mM)  $\text{CaCl}_2$  (stehiometrično razmerje  $\text{Ca}^{2+} : \text{COO}^- = 1 : 2$ ) in minimum pri 15 mN (7.5 mM)  $\text{CaCl}_2$  (stehiometrično razmerje  $\text{Ca}^{2+} : \text{COO}^- = 1 : 1$ ). Zanesljivih dokazov, zakaj rigidnost gela z naraščajočo koncentracijo  $\text{CaCl}_2$  od 7.5 do 15 mN pada, niso uspeli najti. Predvidevali so, da se je z naraščanjem koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  zmanjševala gostota negativnega naboja XAN. Pri koncentraciji 7.5 mM je po njihovem mnenju morda prišlo do delnega obarjanja molekul XAN.

Naši rezultati kažejo, da je krivulja 0.5 % XAN pripravljenega po postopku C pri  $T = 80\text{ }^\circ\text{C}$ , dosegla vrh po dodatku 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , nato je sledil strm padec do vrednosti 7.5 mM  $\text{CaCl}_2$  z nadaljnjim rahlim porastom do vrednosti 50 mM dodanega  $\text{CaCl}_2$ . Krivulje vzorcev pripravljenih po drugih postopkih dosežejo svoje maksimume pri 2.5 oziroma 3 mM dodanega  $\text{CaCl}_2$ , ki pa so nižji ( $G' \square 3,67\text{ Pa}$ ).



Slika 40: Odvisnost  $G'$  od koncentracije dodanega  $\text{CaCl}_2$  pri  $\omega = 1 \text{ s}^{-1}$  za 0.5 % vzorce XAN v vodi, pripravljene po različnih postopkih

XAN je anionski polimer z značilno substituiranostjo osnovne verige, na katero so pripeti trisaharidi  $\beta$ -D-manoza –  $\beta$ -1,4-D-glukuronska kislina –  $\alpha$ -1,2-D-manoza. V vodi so karboksilne skupine na trisaharidnih stranskih verigah ionizirane in močno hidratirane. Že majhna količina  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  povzroči senčenje negativno nabitih karboksilnih skupin, odboj med molekulami se zmanjša in pojavi se možnost vzpostavitve različnih interakcij med molekulami XAN. To pomeni, da je XAN v nativni obliki najverjetneje kot dvojna vijačnica. Slednja pri povišani temperaturi ireverzibilno razpade na posamezne verige (denaturirana oblika), ki ob znižanju temperature in/ali povišanju ionske moči ponovno tvorijo dvojno vijačnico, ki pa jo sestavlja zgolj ena molekula XAN, in je bistveno manj popolna. To hipotezo lahko potrdimo z rezultati na sliki 40, kjer lahko opazimo, da so pri točki 0 mM  $\text{CaCl}_2$  vrednosti  $G'$  vseh vzorcev pripravljenih pri 80 °C nižje od tistih pripravljenih pri sobni temperaturi. Po dodatku  $\text{CaCl}_2$  pa krivulje vzorcev pripravljenih pri 80 °C po postopku C presežejo krivulje vzorcev pripravljenih pri sobni temperaturi. Dobljeni rezultati so potrdili naša predvidevanja, da lahko  $\text{Ca}^{2+}$  ioni stabilizirajo neurejeno obliko XAN, in sicer s senčenjem nabojev na nabitih stranskih verigah. Priprava 0.5 % vzorcev XAN po postopku C pri 80 °C in po dodatku 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$  nam je dala najbolj čvrste gele.

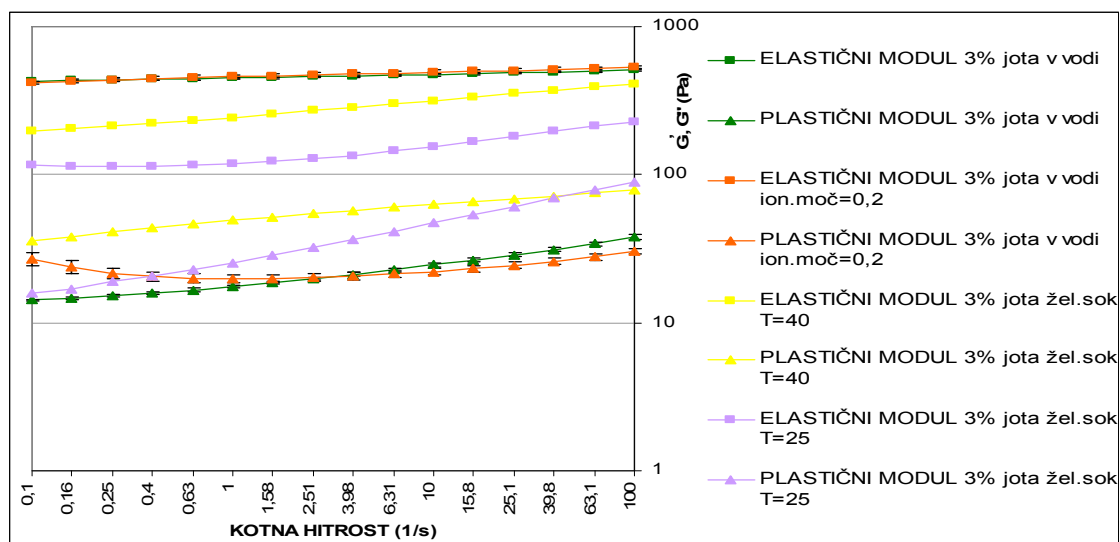
Rezultati  $G'$  v članku (27) so bili kar 7x večji od naših, a tudi meritve so bile izvedene pri 5 °C in v mediju z dodatkom 10 mM NaCl. Mi smo izvedli meritve pri 25 °C. Nizka temperatura je morda privedla do nastanka bolj čvrste strukture in višjih vrednosti  $G'$ .

#### **4.2.4. Reološka opredelitev sistemov CARR v mediju brez KCl/CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O**

V teoriji pri nastanka gela v vodi preide struktura CARR  $\kappa$  iz linearne verige preko dvojne vijačnice do med seboj povezanih dvojnih vijačnic. Pri CARR  $\iota$  naj bi se proces nastanka gela ustavil pri tvorbi dvojne vijačnice. Znano je, da daje CARR  $\kappa$  najmočnejše gele s  $K^+$  ioni, CARR  $\iota$  pa s  $Ca^{2+}$  ioni. Divalentni kalcij lahko tvori intramolekularne in intermolekularne vezi s sulfatnimi skupinami CARR  $\iota$ , enovalentni kalij povzroči nastanek intermolekularnih povezav med CARR  $\kappa$ , monovalentni ioni kot sta  $Na^+$  in  $Li^+$  pa tvorijo zgolj ionske vezi s sulfatnimi skupinami (15).

##### **- Jota karagenan (CARR $\iota$ )**

Iz grafa na sliki 41 je razvidno, da CARR  $\iota$  v vodi, v vodi z  $\mu = 0.2$  M in v simuliranem želodčnem soku v celotnem frekvenčnem območju tvori čvrste gele, saj je  $G' \gg G''$ . V simuliranem intestinalnem soku pa so nastali prečvrsti geli za izvedbo oscilacijskih testov, saj jih je stožec ob spuščanju izvrgel iz sistema. Edina možnost bi bila zamenjava sistema stožec – ploščica s sistemom ploščica – ploščica, a pojavil bi se upravičen dvom o primerljivosti rezultatov med obema sistemoma. Zato smo se raje odločili, da bomo oscilacijske teste izvajali le s sistemom stožec – ploščica in proučili dobljene rezultate. Najvišje vrednosti  $G'$  sta dosegla vzorca pripravljena v vodi in v vodi z  $\mu = 0.2$  M. Frekvenčno odvisni krivulji dinamičnega modula  $G'$  ležita ena na drugi. Iz tega lahko sklepamo, da prisotnost  $Na^+$  v vodi z  $\mu = 0.2$  M ne vpliva bistveno na strukturo gela. Ker je  $Na^+$  majhen ion, je sposoben zgolj tvorbe ionskih vezi s sulfatnimi skupinami (15), te pa v našem primeru niso pripomogle k opaznemu porastu  $G'$  modula. Krivulji  $G'$  in  $G''$  v simuliranem želodčnem soku sta nižji od krivulj v vodi, saj je molekula CARR tako kot vsak polisaharid nestabilna v močno kislem mediju. Najverjetneje je prišlo do depolimerizacije CARR, kot navajajo v članku. Capron s sodelavci še meni, da je stopnja depolimerizacije odvisna od pH in temperature (17). Naše vzorce smo pripravili pri sobni temperaturi in na vodni kopeli s  $T = 40$  °C.



Slika 41: Frekvenčni test 3 % CARR  $\tau$  v različnih medijih

### - Kapa karagenan (CARR $\kappa$ )

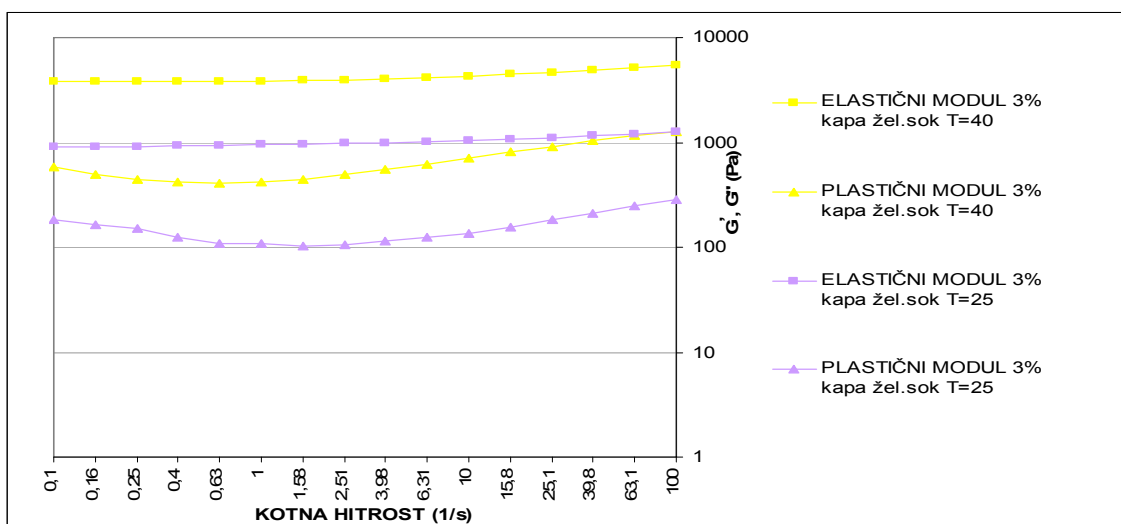
Na sliki 42 imamo prikaz frekvenčno odvisnih dinamičnih modulov CARR  $\kappa$  v simuliranem želodčnem soku. Rastopine in geli CARR so stabilni v nevtralnem in šibko kislem okolju. Molekula CARR je v močno kislem okolju izjemno občutljiva na visoko temperaturo, saj le-ta privede do ireverzibilne porušitve strukture. Zato je potrebna posebna pazljivost pri njihovi pripravi. Rešitev, ki jo je našel Capron s sodelavci v članku (17), je v znižanju temperature priprave iz 80 °C, kjer smo pripravljali vzorce CARR v vseh ostalih medijih, na 37 °C, ali v dodatku kislih sestavin v zadnji stopnji priprave. Mi smo se poslužili prve rešitve in na vodni kopeli s  $T = 40$  °C pripravili čvrste homogene gele. Hkrati smo pripravili tudi gele pri sobni temperaturi in primerjali rezultate med sabo. Iz dobljenih rezultatov, ki nazorno prikazujejo višje vrednosti  $G'$  in  $G''$  gelov pripravljenih pri  $T = 40$  °C od tistih pripravljenih pri  $T = 25$  °C, lahko sklepamo, da je  $T = 40$  °C zelo ugodna za pripravo hidrogelov v simuliranem želodčnem soku.

Geli v ostalih medijih (v vodi, vodi z  $\mu = 0.2$  M, simuliranem intestinalnem soku, simuliranem intestinalnem soku z  $\mu = 0.2$  M) so bili pretrdi za izvedbo oscilacijskih testov, kar pomeni, da so geli pripravljani v simuliranem želodčnem soku celo strukturno najšibkejši.

Ekström in sodelavci, katerih izsledki dela so omenjeni v članku (17) trdijo, da se CARR  $\kappa$  precej bolj razgrajuje v simuliranem želodčnem soku kot CARR  $\tau$ , ki je manj občutljiv na kislinsko hidrolizo. Predvidevajo namreč, da lahko  $\text{Na}^+$  ioni iz želodčnega soka tvorijo več ionskih vezi s CARR  $\tau$  kot  $\kappa$ , kar bi naj privedlo do večje neobčutljivosti do kislega okolja. Najprej so pripravili vzorce CARR  $\tau$  in  $\kappa$  v vodnem mediju z dodatkom 0.3 % KCl. Sledil je

dodatek raztopine HCl s pH = 1.2 in po treh urah izvedba izključitvene kromatografije (SEC) ter sipanje svetlobe pri različnih kotih (MALLS). Rezultati so bili sledeči: povprečna molekulska masa CARR  $\iota$  je bila kljub dodatku KCl, ki naj bi pripomogel k tvorbi bolj čvrstega gela CARR  $\kappa$ , večja od povprečne molekulske mase CARR  $\kappa$ , kar potrjuje teorijo, da se CARR  $\kappa$  bolj razgrajuje v kislem mediju.

Naši rezultati ne sledijo pravilu, ki ga opisuje članek. Vrednosti  $G'$  pri CARR  $\kappa$  so kar 10-krat višje od vrednosti  $G'$  pri CARR  $\iota$  v kislem okolju želodčnega medija. Morda je prišlo do napake pri izvedbi oscilacijskega testa, ki ga je bilo izredno težko izvesti. Geli, ki so nastali v simuliranem želodčnem soku, so bili izjemno čvrsti in jih je bilo potrebno razrezati na tanke lističe. Te smo položili na merilni sistem, kjer jih je stožec večkrat izvrgel. Izvedli smo le eno uspešno meritev, zato je dvom v njeno pravilnost povsem upravičen.



Slika 42: Frekvenčni test 3 % CARR  $\kappa$  v simuliranem želodčnem soku

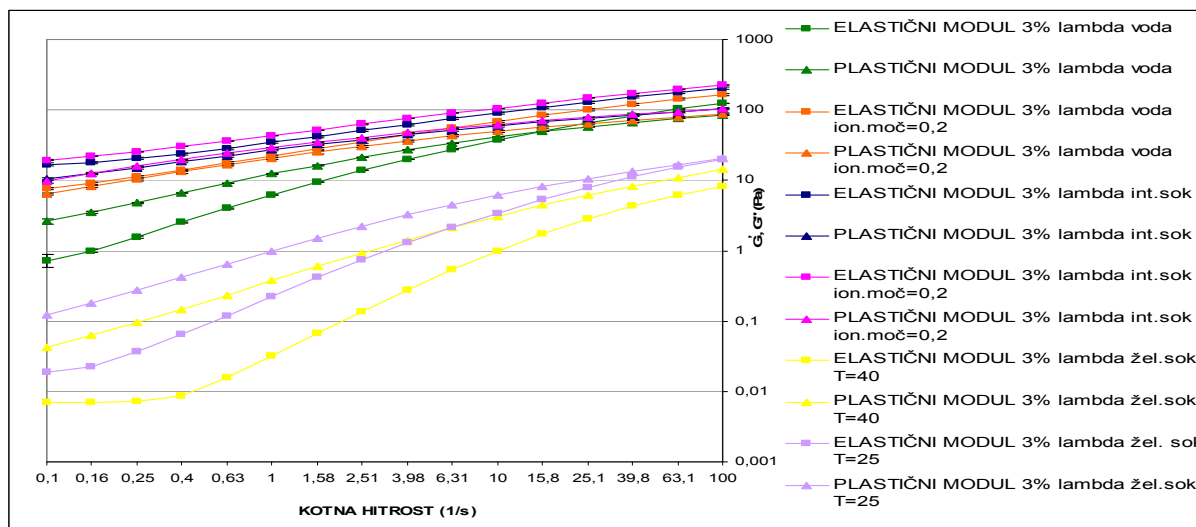
### - Lambda karagenan (CARR $\lambda$ )

CARR  $\lambda$  je kopolimer D-galaktoze-2-sulfata in D-galaktoze-2,6-disulfata. V idealnem primeru ima kar tri sulfatne skupine na ponavljajočo se disaharidno enoto. Več člankov navaja, da CARR  $\lambda$  zaradi močne sulfatiranosti ni sposoben geliranja. Po mnenju strokovnjakov lahko nastanejo le zelo viskozne raztopine (4). Naši rezultati to trditev potrjujejo le delno.

CARR  $\lambda$  (Slika 43) pripravljen v simuliranem želodčnem soku ne tvori gelske strukture, ampak viskozno raztopino. Na te krivulje temperatura priprave ne povzroča omembe vrednih razlik. CARR  $\lambda$  pripravljen v vodi povzroči nastanek raztopine s prepletenimi polimernimi verigami, saj lahko opazimo pri  $\omega = 15.6 \text{ s}^{-1}$  presečišče krivulj  $G'$  in  $G''$ . V frekvenčnem območju pod točko prekrivanja se vzorec obnaša kot tekočina (viskozen material), nad točko

prekrižanja pa kot trdna snov (elastičen material). Točka prekrižanja se je pojavila v območju višjih frekvenc, kar pripisujejo šibkeje strukturiranim sistemom. CARR  $\lambda$  je v prisotnosti monovalentnih ionov v simuliranem intestinalnem soku tvoril nekoliko čvrstejšo strukturo kot v vodi, čeprav o pravem gelu še ne moremo govoriti. Krivulje dinamičnih modulov sicer nakazujejo nastanek šibke gelske strukture, a vrednosti dinamičnih modulov so kar nekajkrat nižje od vrednosti pri CARR  $\kappa$  in  $\iota$ .

Vodne raztopine CARR so stabilne v nevtralnem in šibko kislem okolju, in sicer v pH območju 4–9. V tem območju se molekule CARR obnašajo kot polielektroliti, saj imajo v svoji strukturi različno število sulfatnih skupin, na katere se lahko vežejo nasprotno nabite molekule. pH simuliranega intestinalnega soka, ki znaša 6.8, in prisotnost monovalentnih ionov, kot sta  $K^+$  in  $Na^+$ , ugodno vplivajo na nastanek gelske strukture CARR. Mehanizem, ki privede do nastanka šibke gelske strukture CARR  $\lambda$ , ni poznan. Znano pa je, da je tudi CARR  $\lambda$  tako kot vsak polisaharid, občutljiv na kombinacijo kislega okolja in visoke temperature. Krivulje dinamičnih modulov CARR  $\lambda$  (Slika 43) so tako najvišje v simuliranem intestinalnem soku in v vodi z  $\mu = 0.2$  M ter najnižje v simuliranem želodčnem soku.

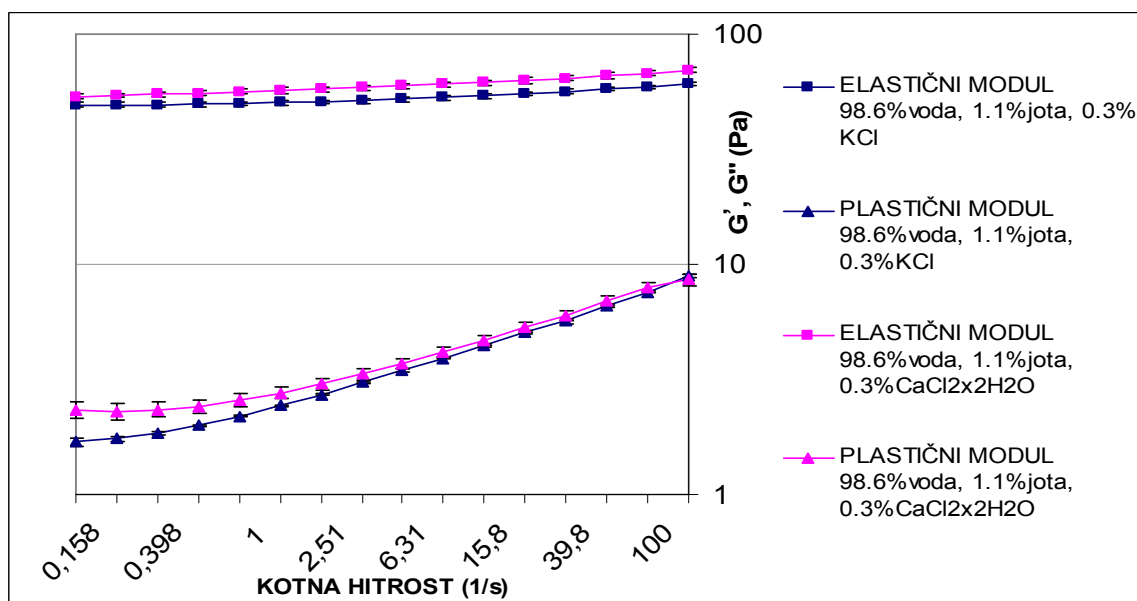


Slika 43: Frekvenčni test 3 % CARR  $\lambda$  v različnih medijih

#### 4.2.5. Reološka opredelitev sistemov CARR v mediju s KCl/ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

V naslednjem sklopu diplomske naloge smo pripravili gele s sestavo razbrano s ternarnih faznih diagramov in jih reološko ovrednotili. Najprej smo pripravili gele CARR  $\iota$  z dodanim KCl oziroma  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Dobili smo homogene gele za katere velja, da je  $G' \square G''$  v

celotnem frekvenčnem območju. Vrednosti dinamičnih modulov gela z dodanim  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  so le malo višje od dinamičnih modulov gela z dodanim KCl (Slika 44).

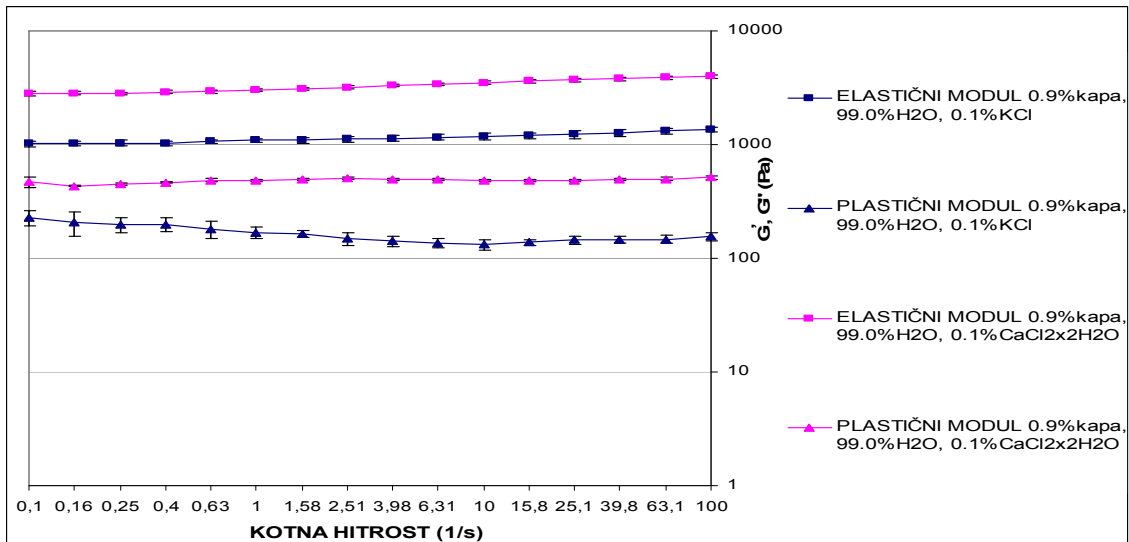


Slika 44: Frekvenčni test CARR 1 s sestavo razbrano iz ternarnarnih faznih diagramov

Slika 45 prikazuje frekvenčno odvisno obnašanje dinamičnih modulov gelov CARR  $\kappa$  z dodanim KCl oziroma  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Tudi v tem primeru smo lahko potrdili prisotnost gelske strukture, saj je  $G' \gg G''$  v celotnem frekvenčnem območju in pri obeh vrstah vzorcev. Smo se pa srečali s pojavom gela s sinerezo, ki ga omenjajo mnogi članki. Pri tem pojavu, ki je značilen za CARR  $\kappa$ , pride ob dodatku večje količine  $\text{Ca}^{2+}$  ali  $\text{K}^+$  ionov do nastanka homogenega gela z vodno plastjo na gladini. Polimerne verige CARR  $\kappa$  se ob povišani koncentraciji ionov tesno povežejo med sabo in iztisnejo ven vodo (15).

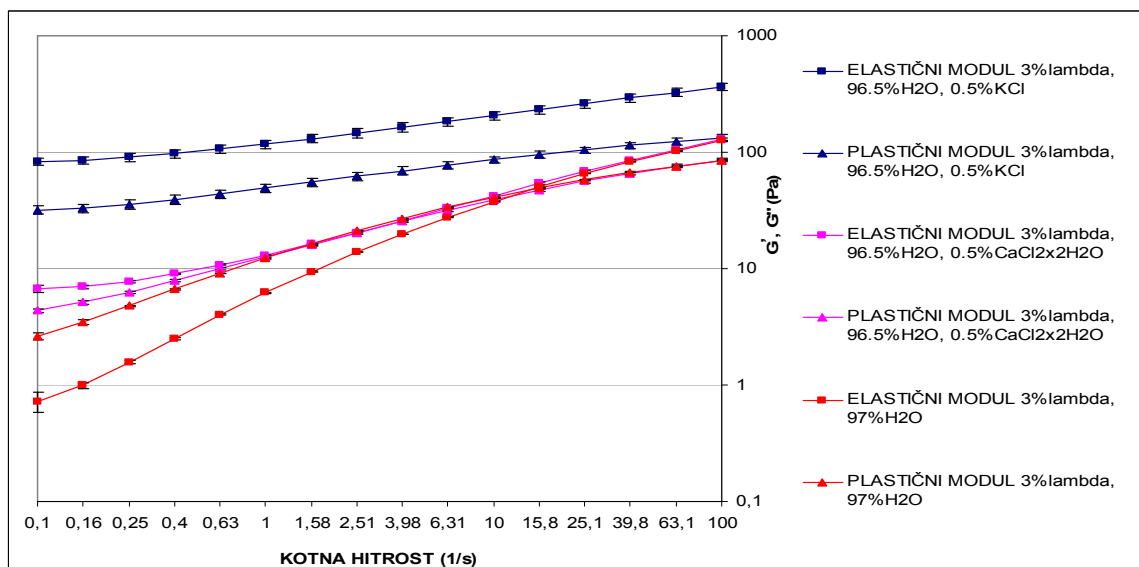
Dinamična modula CARR  $\kappa$  z dodanim  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sta pri naših vzorcih (Slika 45) višja od dinamičnih modulov CARR  $\kappa$  z dodanim KCl. Rezultati so nekoliko presenetljivi, saj strokovnjaki trdijo (15), da daje CARR  $\kappa$  najmočnejše gele s  $\text{K}^+$  ioni. Morda je bila težava v nehomogenem vzorcu, pojav gela na dnu čaše in vodne faze na gladini.





Slika 45: Frekvenčni test CARR  $\kappa$  s sestavo razbrano iz ternarnih faznih diagramov

Glede na to, da ternarnih faznih diagramov za CARR  $\lambda$  v strokovni literaturi nismo našli, smo pripravljnim 3 % vodnim raztopinam CARR  $\lambda$  dodali 0,5 m/m % KCl oziroma  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in jih reološko ovrednotili. Prisotnost ionov je opazno zvišala vrednost dinamičnih modulov.  $G'$  in  $G''$  se v vzorcu z dodanim  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  skoraj v celotnem frekvenčnem območju prekrivata, kar pomeni, da je nastala zelo viskozna raztopina. Nekoliko višje so vrednosti dinamičnih modulov vzorca z dodanim KCl, kjer velja  $G' \square G''$  v celotnem frekvenčnem območju. Nastala je šibka gelska struktura. Kljub temu da v mnogih člankih zatrjujejo, da CARR  $\lambda$  ne tvori gelske strukture, naši rezultati dokazujejo nasprotno. Z dvigom pH medija v šibko alkalno območje (pH 5–8) in dodatkom monovalentnih kationov ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) smo dokazali, da lahko pridemo do nastanka zelene mrežne strukture.

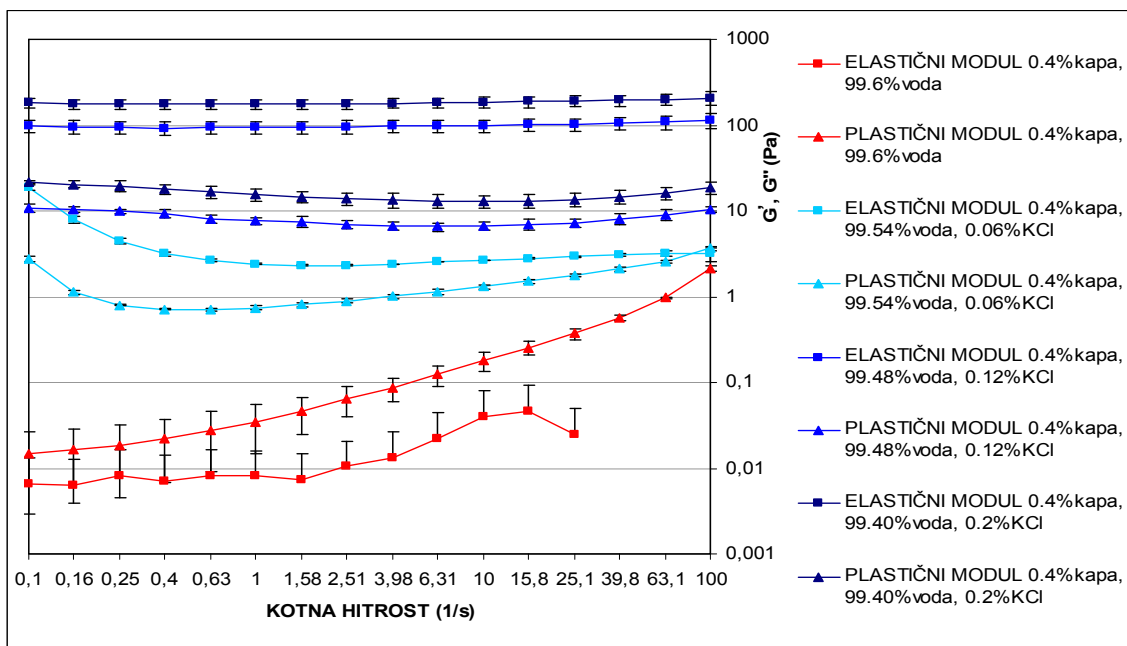


Slika 46: Frekvenčni test CARR  $\lambda$  z dodatkom KCl/ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

V zadnjem delu diplomske naloge smo pripravili 0,4 % vodne raztopine CARR  $\kappa$  in  $\iota$  z dodatkom naraščajočih količin KCl oziroma  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Podoben poskus so opravili Thrimowithana in sodelavci ter ga opisali v članku. Najprej so pripravili osnovno raztopino CARR, ki so jo na vodni kopeli s  $T = 80^\circ\text{C}$  mešali dve uri. Posebej so pripravili raztopino KCl oziroma  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , s katero so razredčili osnovno raztopino. Meritve so izvedli pri  $22^\circ\text{C}$  (15). Pomembna razlika z našo izvedbo je v njihovem merilnem sistemu ploščica – ploščica, ki daje po njihovem mnenju (15), nekoliko višje rezultate za dinamične module od merilnega sistema stožec – ploščica.

Pri CARR  $\kappa$  brez in z dodatkom 0.06 m/m % KCl smo dobili tekoče raztopine, kjer sta  $G'$  in  $G''$  pri izvedbi amplitudnega testa v celotnem območju strižne deformacije nihala. Bilo je nemogoče določiti LVE, zato smo izbrali območje, ki so ga določili v članku (0.1–10 %). Relevantnost rezultatov je posledično precej vprašljiva.

Dodatek  $\text{K}^+$  ionov povzroči intermolekularno premreženje molekul CARR  $\kappa$  (15), kar je razvidno iz grafa na sliki 47, kjer so krivulje  $G'$  nad krivuljami  $G''$ , a šele po dodatku 0.12 m/m % KCl.  $G'$  je ob zvišanju količine dodanega KCl iz 0.06 na 0.12 m/m % pri  $\omega = 1\text{ s}^{-1}$  narastel iz 2.415 na 93.65 Pa, kar pomeni za približno 40-krat. Po dodatku večjih količin KCl ni prišlo več do tako občutnih sprememb. Razlog je v nastanku gela z vodno plastjo na gladini. Dodatek presežka  $\text{K}^+$  ionov privede do tesne povezave polimernih verig CARR  $\kappa$  med sabo in iztisa vode iz notranje strukture.

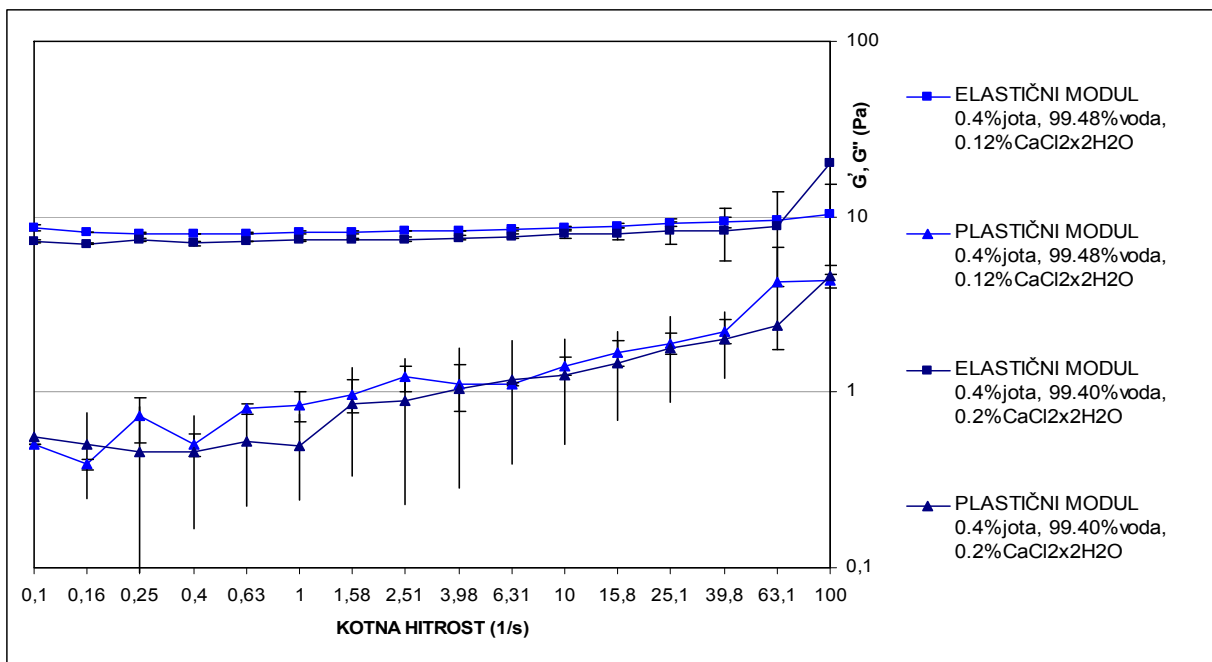


Slika 47: Frekvenčni test CARR  $\kappa$  z dodatkom KCl

Pri 0.4 % CARR  $\tau$  v vodi in v vodi z dodanim 0.06 m/m %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  smo dobili sistem z agregati gelske strukture, ki so v trenutku iztekli iz merilnega sistema in jih ni bilo mogoče reološko ovrednotiti. Nastali sistem se imenuje grudičast gel in lahko nastane pri pripravi CARR  $\kappa$  ali  $\tau$  z dodanim  $\text{K}^+$  ali  $\text{Ca}^{2+}$ . Količina dodanih ionov je namreč premajhna za nastanek homogenega gela. Šele dodatek večje količine  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.12 in 0.2 m/m %) je privedel do nastanka gostejših vzorcev.

Iz grafa na sliki 48 je razvidno, da je  $G'$  za oba vzorca v celotnem frekvenčnem območju višji od  $G''$ , iz česar lahko sklepamo, da je nastal vzorec z gelsko strukturo. Iz grafa je prav tako razvidno rahlo znižanje krivulje  $G'$  ob dodatku 0.2 m/m %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , glede na krivuljo  $G'$  ob dodatku 0.12 m/m %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Ta pojav lahko razložimo s podobnim pojasnilom kot pri CARR  $\kappa$ . Tudi v tem primeru je CARR  $\tau$  povzročil nastanek maksimalno prečno premreženje polimernih verig že ob dodatku 0.12 m/m %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Vsako nadaljnje zviševanje koncentracije dodanega  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pa je zmanjšalo čvrstost nastalega gela.

Naši rezultati se kar dobro ujemajo z rezultati, ki so jih dobili v članku (15) in potrjujejo nastanek najbolj čvrstih gelov 0.4 % CARR  $\kappa$  po dodatku 0.12 m/m % KCl oziroma 0.4 % CARR  $\tau$  po dodatku 0.12 m/m %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .



Slika 48: Frekvenčni test CARR  $\tau$  z dodatkom  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

## 5. SKLEPI

### Na podlagi reoloških proučevanj alginata lahko zaključimo:

- Z večanjem koncentracije alginata narašča viskoznost in vrednost dinamičnih modulov  $G'$  in  $G''$ .
- NA LS vsebuje večji delež M (60 %), ki znotraj istega volumna bolj nabreka od G. Posledično so 3 in 5 % vzorci tipa NA LS bolj viskozni od vzorcev tipa NA LF.
- Dodatek  $\text{CaCl}_2$  k 3 % vzorcem NA povzroči porast dinamičnih modulov in nastanek ionskega oziroma ionotropnega gela. Velja  $G' \square G''$  v celotnem frekvenčnem območju tako za NA LF kot za NA LS. Nekoliko čvrstejši je gel NA LF zaradi večjega deleža G enot.

### Predlogi, mnenja, težave:

Lahko bi uporabili nekoliko drugačen postopek priprave NA v kislem mediju, ki morda ne bi privedel do nastanka nestabilnih vzorcev. Najprej bi pripravili vodno raztopino NA, ki bi ji v zadnji stopnji priprave počasi in previdno dodali kislino sestavino. Če bi nam priprava uspela, bi dobili kislinski gel.

### Na podlagi reoloških proučevanj XAN lahko zaključimo:

- Na čvrstost nastalega gela iz XAN vpliva koncentracija XAN, kajti več kot je molekul v raztopini, več interakcij tvorijo med sabo in obratno.
- Nizek pH medija in/ali prisotnost  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$  so ugodno vplivali na čvrstost nastalega gela iz XAN, saj povzročijo nevtralizacije nabojev na  $-\text{COOH}$  stranskih skupin trisaharidnih verig. Vzpostavijo se povezave med dvojnimi vijačnicami native strukture XAN.
- Krivulja  $G'$  0.5 % vzorca XAN, ki smo mu dodali raztopino  $\text{CaCl}_2$  v koncentracijskem območju 0–50 mM, kaže posebno obliko z maksimumom pri 2.5 mM in minimumom pri 7.5 mM. Na obliko krivulje pomembno vpliva tudi postopek in temperatura priprave vzorca, kar potrjuje našo hipotezo, da imamo XAN na začetku v obliki dvojne vijačnice.

**Predlogi, mnenja, težave:**

Pri pripravi XAN z dodanim  $\text{CaCl}_2$  smo se srečali s težavo, kako pravilno pripraviti vzorec. Poslužili smo se kar treh različnih postopkov priprave z željo najti najbolj ustreznega. Kot najustreznejši se je izkazal postopek C.

**Na podlagi reoloških proučevanj CARR lahko zaključimo:**

- Vodne raztopine CARR so stabilne v pH območju 4–9, v katerem se obnašajo kot polielektroliti. pH simuliranega intestinalnega soka (6.8) in prisotnost monovalentnih ionov ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) so privedli do nastanka čvrstih gelov, ki jih je bilo reološko težko ovrednotiti.
- Vzorcem CARR  $\kappa$  in  $\iota$  s sestavo razbrano iz ternarnih faznih diagramov smo z reološko obdelavo potrdili nastanek gelske strukture.
- 0.4 % vodne raztopine CARR  $\kappa$  dosežejo najmočnejše prečno premreženje in maksimalne vrednosti dinamičnih modulov po dodatku 0.12 m/m % KCl, vodne raztopine CARR  $\iota$  pa po dodatku 0.12 m/m %  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

**Predlogi, mnenja, težave:**

Pri pripravi CARR smo se srečali z dvema pojavoma, gel s sinerezo in grudičast gel, ki sta nam pomagala pri razlagi dobljenih rezultatov. Pomembno je bilo, da se pojava pri laboratorijskem delu nismo ustrašili, ampak smo ga znali smiselno obrazložiti.

## 6. LITERATURA

1. Boyer R: Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana 2005.
2. Pavli M: Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2010
3. Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A: Alginat v dostavnih sistemih s prirejenim sproščanjem. Farmaceutski vestnik 2008; 59, 293
4. <http://www.fmcbiopolymer.com/>, 14.06.2011
5. Bu H, Kjøniksen A, Nyström B: Effects of pH on dynamics and rheology during association and gelation via the Ugi reaction of aqueous alginate. European polymer journal 2005; 41: 1708–1717
6. Aslani P, Kennedy R: Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. Journal of controlled release 1996; 42: 75–82
7. Ribeiro A, Sobral AJFN, Simões SMN, Barros M, Lobo V, Cabral A, Veiga F, Santos C, Estes M: Transport properties of aqueous solutions of sodium alginate at 298.15 K. Food chemistry 2011; 125: 1213–1218
8. De Celis Alonso B, Rayment P, Ciampi E, Ablett S, Marciani L, Spiller R, Norton I, Gowland P: NMR relaxometry and rheology of ionic and acid alginate gels. Carbohydrate Polymers 2010; 82: 663–669
9. Rozman B, Baumgartner S, Gašperlin M: Interakcije ksantana in semenske sluzi rožičevca v vodnih sistemih. Farmaceutski vestnik 2005; 56: 110–114
10. Bergmann D, Furth G, Mayer C: Binding cations by xanthan in aqueous solution. International Journal of Biological macromolecules 2008; 43: 245–251
11. Planinc N: Korelacija med reološkimi lastnostmi in hitrostjo sproščanja iz ogrodnih tablet iz ksantana. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2011.
12. Baumgartner S, Pavli M, Kristl J: Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 69: 698–707
13. García - Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E: Xanthan gum: production, recovery and properties. Biotechnology Advances 2000; 18: 549–579

14. Prajapati S: Carrageenan: A Naturally Occurring Routinely Used Excipient, 2007  
<http://www.pharmainfo.net/>, 19.08.2011
15. Thrimawithana TR, Young S, Dunstan DE, Alany RG: Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. *Carbohydrate Polymers* 2010; 82: 69–77
16. Yuguchi Y, Thuy TTT, Urakawa H, Kajiwara K: Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids* 2002; 16: 515–522
17. Capron I, Yvon M, Muller G: In-vitro gastric stability of carrageenan. *Food Hydrocolloids* 1996; 10: 239–244
18. Basmal J, Sedayu BB, Utomo BSB: Effect of KCl concentration on the precipitation of carrageenan from *E. cottonii* extract. *Journal of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology – Special Edition*: 73–80
19. Kos P: Študij kompleksov med kationsko učinkovino in polianionskimi karagenani za doseganje prirejenega sproščanja. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2010.
20. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007.
21. Zupančič Valant A: Uvod v reologijo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2007.
22. Žumer M, Zupančič Valant A, Florjančič U, Mesec A: Seminar iz aplikativne reologije. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 1997.
23. Mezger GT: *The Rheology Handbook; for users of rotational and oscillatory rheometers*. Vincentz 2006, Hannover.
24. Kladnik R: *Visokošolska fizika 1. del: Mehanski in toplotni pojavi*. DZS, Ljubljana 1985.
25. Ikeda S, Foegeding EA: *Current protocols in food analytical chemistry: Measurement of gel rheology: Dynamic test*, Unit H3.2; 2003.
26. Flajšman H: Proučevanje nabrekanja tablet iz ksantana z oscilacijsko reometrijo in magnetnim resonančnim slikanjem. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2006.
27. Mohammed ZH, Haque A, Richardson RK, Morris ER: Promotion and inhibition of xanthan weak-gel rheology by calcium ions. *Carbohydrate Polymers* 2007; 70: 38–45