

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

META SARA RATEJ

**PROUČEVANJE REOLOŠKIH LASTNOSTI
POLIVINILALKOHOLNIH HIDROGELOV Z
VGRAJENO UČINKOVINO LEVOFLOKSACIN**

**THE STUDY OF RHEOLOGICAL PROPERTIES OF
LEVOFLOXACIN LOADED POLYVINYL ALCOHOL
HYDROGELS**

Ljubljana, 2012

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

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Za pomoč pri merjenju reologije se zahvaljujem mag. farm. Romani Rosič.

Za pomoč v laboratoriju in koristne nasvete se zahvaljujem Tatjani Hrovatič in Mojci Kržan.

Še posebej pa se zahvaljujem svoji družini in Mateju za podporo in spodbudo skozi celoten študij.

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

Meta Sara Ratej

Predsednik diplomske komisije:

prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.

Člani diplomske komisije:

izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

VSEBINA

1. UVOD.....	14
1.1. DEFINICIJA GELA	14
1.2. HIDROGELI IN NABREKANJE	14
1.3. FIZIKALNE LASTNOSTI KEMIJSKO PREMREŽENIH HIDROGELOV	16
1.3.1. Nabrekanje.....	16
1.3.2. Prehod iz sol v gel stanje	16
1.3.3. Mehanske lastnosti	16
1.3.4. Reološke lastnosti.....	17
1.3.5. Spremembe povezane s staranjem.....	17
1.4. UPORABA HIDROGELOV	17
1.5. REOLOGIJA	19
1.5.1. Reološke lastnosti viskoelastičnih snovi	24
1.6. POLIVINILALKOHOL (PVA).....	28
1.6.1. Sinteza PVA	28
1.6.2. Lastnosti PVA	29
1.6.3. Uporaba PVA	31
1.6.4. Hidrogeli iz PVA.....	32
1.6.5. Mehanizem nastanka hidrogela z metodo zamrzovanja in odtajanja	32
1.7. LEVOFLOKSACIN	35
1.7.1. Biofarmacevtske lastnosti levofloksacina	36
1.7.2. Kinoloni	36
2. NAMEN DELA.....	37
3. EKSPERIMENTALNI DEL	38
3.1. MATERIALI	38

3.1.1.	Materiali za pripravo hidrogelov	38
3.1.2.	Materiali za izdelavo pufra	38
3.2.	NAPRAVE.....	38
3.3.	POSTOPKI IN METODE	39
3.3.1.	Priprava hidrogelov	39
3.3.2.	Priprava hidrogelov z levofloksacinom.....	39
3.3.3.	Vrednotenje reoloških lastnosti hidrogelov	41
3.3.4.	Vrednotenje reoloških lastnosti hidrogelov po zamrzovanju	42
3.3.5.	Priprava fosfatnega pufra s pH 7,4 (PBS)	43
3.3.6.	Umeritvena premica levofloksacina	43
3.3.7.	Homogenost porazdelitve levofloksacina po celotnem hidrogelu.....	45
3.3.8.	Sproščanje levofloksacina iz PVA	45
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	46
4.1.	STABILNOST LEVOFLOKSACINA PRI POVIŠANI TEMPERATURI	46
4.2.	REOLOŠKO VREDNOTENJE POLIMERNIH DISPERZIJ	47
4.2.1.	Rotacijsko vrednotenje viskoznosti.....	47
4.2.2.	Oscilatorni testi.....	52
4.3.	VREDNOTENJE HIDROGELOV NAREJENIH Z ZAMRZOVANJEM Z OSCILACIJSKO REOMETRIJO	59
4.3.1.	Reološko vrednotenje 15% PVA z 1,5% levofloksacina pripravljenega z večkratnimi 24 h cikli zamrzovanja in odtajanja.....	59
4.3.2.	Reološko vrednotenje 15% PVA z 1,5% levofloksacina pripravljenega s podaljšanim časom zamrzovanja (48h in 72h)	66
4.3.3.	Primerjava hidrogelov pripravljenih z večkratnim zamrzovanjem in odtajanjem ter gelov, pripravljenih s podaljšanim časom zamrzovanja.....	70

4.4.	SPROŠČANJE LEVOFLOKSACINA IZ PVA DISPERZIJ	75
4.4.1.	Homogenost levofloksacina v PVA disperziji.....	75
4.4.2.	Sproščanje.....	76
4.4.3.	Primerjava sproščanja iz različno debelih disperzij	79
4.5.	SPROŠČANJE LEVOFLOKSACINA IZ HIDROGELOV NAREJENIH Z ZAMRZOVANJEM IN ODTAJANJEM.....	80
5.	SKLEPI.....	83
6.	LITERATURA.....	85

Kazalo slik

Slika 1:	Primer fizikalno premrežene alginske kisline s kalcijevim kloridom in kemijsko premreženega kolagena z glutaraldehidom (3).....	15
Slika 2:	Obloga za vlažno celjenje ran (A), obloga za klasično (suho) oskrbo ran (B)(8).....	18
Slika 3:	Reogrami: a) psevdoplastični (1), Newtonski (2), dilatantni (3) in plastični sistemi (4); b) tiksotropni (A) in reopeksni (B) sistem v obremenilni (O) in razbremenilni fazi (R)(9) ..	21
Slika 4:	Reometer Physica MCR301 na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, Anton Paar (11)	23
Slika 5:	<i>Sistem dveh vzporednih plošč (A), sistem stožec-ploščica (B) in koaksialnih valjev (C)(12)</i>	24
Slika 6:	Območje linearne viskoelastičnosti (12).....	26
Slika 7:	Razlikovanje materialov na osnovi frekvenčnega testa: raztopina (A), raztopina s prepletenimi polimernimi verigami (B) in gel (C) (12).....	27
Slika 8:	Struktura polivinil alkohola (PVA) (13)	28
Slika 9:	Sinteza polivinil alkohola (PVA) (14)	28
Slika 10:	Viskoznost različno koncentriranega PVA (levo) (14).....	30
Slika 11:	Hitrost raztapljanja PVA pri različnih temperaturah (desno) (14).....	30
Slika 12:	Prikaz tvorbe gela med procesom zamrzovanja in odtajanja(17)	33
Slika 13:	Strukture hidrogela pri različnih ciklih zamrzovanja in odtajanja(19)	34

Slika 14: PVA hidrogel pod elektronskim mikroskopom po 2 (A) in 5 (B) ciklih zamrzovanja in odtajanja (17).....	35
Slika 15: Levofloksacin hemihidrat (22).....	35
Slika 16: Gel brez (A) in z levofloksacinom (rumenkast) (B)	41
Slika 17: Fotografija vzorcev PVA hidrogelov po različnih ciklih zamrzovanja: 1x (A), 2x (B) in 3x (C) zamrznjen gel z levofloksacinom.....	42
Slika 18: Merjenje reoloških lastnosti zamrznjenih gelov s sistemom ploščica – ploščica	43
Slika 19: Umeritvena premica za raztopino levofloksacina (A-absorbanca, c- koncentracija).44	
Slika 20: Sproščanje levofloksacina iz zamrznjenega gela	45
Slika 21: Koncentracija levofloksacina v vodi po 30 minutah segrevanja pri različnih temperaturah. Teoretična koncentracija je bila 15 mg/g.	46
Slika 22: Viskoznost 15%, 20% in 25% PVA disperzij.....	47
Slika 23: Viskoznost 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina in 15% PVA disperzije z 3% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.	48
Slika 24: Viskoznost 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 11,25% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.	49
Slika 25: Viskoznost 7,5% PVA disperzije, 7,5% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 7,5% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 7,5% PVA disperzije z 2 g levofloksacina Sestava je podana v Tabeli I.	50
Slika 26: Amplitudni test 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.	53
Slika 27: Amplitudni test 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.....	55
Slika 28: Frekvenčni test 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.	57

Slika 29: Frekvenčni test 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.....	58
Slika 30: Amplitudni test 15% PVA disperzije in 15% PVAhidrogela po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja. Sestava je podana v Tabeli I.....	60
Slika 31: Amplitudni test 15% PVA disperzije in 15% PVA hidrogela z15 mg/g levoflokacina po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja. Sestava je podana v Tabeli I.....	61
Slika 32: Frekvenčni test15% PVA disperzije in 15% PVA hidrogela po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja. Sestava je podana v Tabeli I.....	63
Slika 33: Frekvenčni test 15% PVA disperzije in 15% PVA hidrogela z 15 mg/g levoflokacina po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja v območju $\omega = 0,1 - 100$ 1/s. Sestava je podana v Tabeli I.....	64
Slika 34: Frekvenčni test 15% PVA hidrogela z 15 mg/ml levoflokacina po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja v območju $\omega = 0,01 - 10$ 1/s. Sestava je podana v Tabeli I.	65
Slika 35: Amplitudni test 15% PVA hidrogela pripravljenega s 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjem. Sestava je podana v Tabeli I.	67
Slika 36: Amplitudni test 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina pripravljenega z 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjemSestava je podana v Tabeli I.	68
Slika 37: Frekvenčni test 15% PVA hidrogela pripravljenega z 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjem. Sestava je podana v Tabeli I.	69
Slika 38: : Frekvenčni test 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina pripravljenega z 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjem. Sestava je podana v Tabeli I.	70
Slika 39: Frekvenčni test 2x zamrznjenega 15 % PVA hidrogela in 48 h zamrznjenega 15 % PVA hidrogela. Sestava je podana v Tabeli I.....	71
Slika 40: Frekvenčni test 2x zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina in 48 h zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.	72
Slika 41: Frekvenčni test 3x zamrznjenega 15% PVA hidrogela in 72 h zamrznjenega 15% PVA hidrogela. Sestava je podana v Tabeli I.....	73
Slika 42: Frekvenčni test 3x zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina in 72 h zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.....	74
Slika 43: Homogenost levofloksacina v 15% PVA disperziji. Sestava je podana v Tabeli I...75	75

Slika 44: Homogenost levofloksacina v 11,25% PVA disperziji. Sestava je podana v Tabeli I.	76
Slika 45: Sproščanje levofloksacina iz 11,25% PVA disperzije z 7,5 mg/g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 15 mg/g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 30 mg/g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 7,5 mg/g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina in 15% PVA disperzije z 3% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I. ...	78
Slika 46: Sproščanje levofloksacina iz 11,25% PVA disperzije z 15 mg/g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 30 mg/g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 7,5 mg/g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 15 mg/g po Fickovi kinetiki. Sestava je podana v Tabeli I.....	79
Slika 47: Sproščanje 15 mg/ml levofloksacina iz 15% PVA disperzij različnih debelin. Sestava je podana v Tabeli I.	80
Slika 48: Sproščanje 1,5% levofloksacina iz 15% PVA hidrogela po 1x, 2x in 3x ciklu zamrzovanja in iz 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.	81
Slika 49: Sproščanje 1,5% levofloksacina iz 15% hidrogela po 1x, 2x in 3x ciklu zamrzovanja po Fickovi kinetiki. Sestava je podana v Tabeli I.....	82

Kazalo tabel

Tabela I: Mase PVA, levofloksacina in vode (H ₂ O) v disperzijah.....	40
Tabela II: redčitve levofloksacina za umeritveno premico	44
Tabela III: Primerjava viskoznosti pri strižni hitrosti 0,1 za 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina, 15% PVA disperzije z 3% levofloksacina, 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 3% levofloksacina, 7,5% PVA disperzije, 7,5% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 7,5% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina in 7,5% PVA disperzije z 3% levofloksacina.....	51
Tabela IV: R ₂ za sproščanje po Fickovi kinetiki	79
Tabela V: R ₂ za sproščanje po Fickovi kinetiki iz zamrznjenih gelov	82

POVZETEK

Sodobno celjenje ran temelji na vzdrževanju vlažnega okolja na rani. To lahko dosežemo z oblogami iz hidrogelov, hkrati pa so ustrezen dostavni sistem za protimikrobne učinkovine, ki preprečujejo okužbo na rani.

Polivinilalkohol (PVA) je eden izmed polimerov primernih za pripravo hidrogelov. Naša priprava vzorcev je bila enostavna, brez dodatnih premreževalcev, do njihove tvorbe je prišlo z zamrzovanjem in odtajanjem. Pri tem se povežejo hidroksilne skupine PVA in nastanejo kristalizacijska področja. Kot sam dostavni sistem za protimikrobne učinkovine pa lahko uporabimo tudi polimerne disperzije z vgrajeno protimikrobno učinkovino.

Namen naloge je bil ugotoviti, ali hidrogeli iz PVA nastanejo že s povečevanjem koncentracije polimera in nastanek hidrogela z zamrzovanjem in odtajanjem. Pogledali smo vpliv vgrajene učinkovine na same reološke lastnosti polimernih raztopin in hidrogelov ter samo sproščanje iz polimernih disperzij in hidrogelov. Pri izdelavi smo spreminjali tako koncentracijo polimera kot same učinkovine v disperziji oziroma hidrogelu.

Vsakokrat smo preverili homogenost levofloksacina v hidrogelu in ugotovili, da se je učinkovina enakomerno razporedila po celotni disperziji.

Reološko smo polimerne raztopine vrednotili z rotacijsko in oscilacijsko reometrijo. Z rotacijsko smo preverili vpliv koncentracije PVA v raztopini ter dodatek levofloksacina na viskoznost. Ugotovili smo, da se viskoznost povečuje s povečevanjem koncentracije, hkrati pa tudi dodatek levofloksacina poveča viskoznost disperzije. Pri manj koncentriranih disperzijah nastane Newtonska tekočina, pri bolj pa psevdoplastičen sistem. Z oscilacijsko reometrijo smo tako za polimerne disperzije kot hidrokele pogledali spreminjanje elastičnega (G') in plastičnega (G'') modula pri različnih koncentracijah polimera in levofloksacina. Ugotovili smo, da se s povečevanjem koncentracije (polimera in levofloksacina) povečujeta tako elastični kot plastični modul. S frekvenčnimi testi smo ugotovili, da preizkušani disperzijski sistemi nimajo prave gelske strukture, saj je bil $G'' > G'$ v pretežno celotnem frekvenčnem območju. Po zamrzovanju in odtajanju pa sta se modula obrnila, kar kaže na večjo strukturiranost sistema.

Sproščanje levofloksacina iz polimernih disperzij smo izvajali tudi 14dni, kar je več kot bi se to izvajalo v praksi, ker smo želeli ugotoviti ali se vsa učinkovina sprosti iz disperzije. Ugotovili smo, da se z večanjem koncentracije PVA sproščanje upočasni, tudi večji delež učinkovine ga ne pospeši. Najhitreje se je učinkovina sprostila iz 11,25% PVA z 0,75% levofloksacina.

Sproščanje iz zamrznjenih in odtajanih hidrogelov smo izvajali celo 1 mesec, ker se je samo sproščanje iz hidrogela upočasnilo. Ugotovili smo tudi, da je sproščanje hitrejše iz večkrat zamrznjenih hidrogelov hitrejše kot iz manjkrajt zamrznjenih. Delež sproščene učinkovine iz nezamrznjenega hidrogela po 14 dneh je približno enako deležu sproščene učinkovine iz 3x zamrznjenega hidrogela po 1 mesecu.

ABSTRACT

Modern approach in wound healing is based on moist environment on the wound. Hydrogels are the right system to preserve moist environment and also to incorporate antimicrobial drug in hydrogel to prevent from infection.

Polyvinylalcohol is one of those polymers appropriate for preparing hydrogels. Our method for preparation hydrogels was without cross-linking agents, only freezing and thawing prepared solutions. During freezing and thawing hydrogen bonding links hydroxyl groups of PVA and form crystalites. Appropriate delivering system for antimicrobial drugs are also very polymer dispersions. Polymer dispersions and hydrogels contain no toxic substances for human body or substances which provide antimicrobial action.

Purpose of these thesis was preparation and evaluation of hydrogels prepared only with increasing concentration of PVA and with freezing-thawing method. We investigate effect of drug in polymer dispersion and hydrogel on rheological properties and release of our drug from polymer dispersion and hydrogels. We changed in our polymer dispersion concentration of PVA and concentration of drug.

When the hydrogel was prepared we measured concentration of levofloxacin on three different places in glass and realised that drug is symmetrically arranged.

We measured rheological properties for polymer dispersions with rotation and oscillatory rheology. With first one was investigated effect of increasing concentration of PVA and influence of adding drug in polymer dispersions on our solutions viscosity. We found out that viscosity increases with increasing concentration of PVA, at the same time added drug also increases viscosity. We studied storage (G') and loss (G'') modulus of polymer dispersions and hydrogels for different concentrations of polymer and levofloxacin in polymer solutions and hydrogels. Increasing the concentration of polymer and levofloxacin increases storage (G') and loss (G'') modulus. Dispersions does not have right gel structure, because $G'' > G'$ in almost all frequency area. After freezing and thawing method, modulus changes, that shows us more structural system.

We measured dissolution of levofloxacin from dispersions for 14 days, because we wanted to know if all drug will dissolve from dispersion. Higher concentration of PVA slows dissolution, and also higher concentration of drug does not speeds dissolution. The fastest dissolution was from 11,25% PVA dispersion with 0,75% levofloxacin.

Dissolution from freezed-thawed hydrogel was measured for 1 month, because releasing from hydrogel slows. We also found out that releasing from hydrogels freezed more times was faster than from hydrogels freezed less times. Percentage of realeased drug from non-freezed hydrogels after 14 days was approximately the same percentage of released drug from three times freezed hydrogel after 1 month.

SEZNAM OKRAJŠAV

A: absorbanca

c: koncentracija

DNA: deoksiribonukleinska kislina

γ : strižna hitrost

G': elastični modul

G'': plastični ali viskozni modul

LVE: območje linearne viskoelastičnosti

MRI: slikanje z magnetno resonanco

η : viskoznost

PBS: fosfatni pufer s pH 7,4

PVA: polivinilalkohol

r: stopnja nabrekanja

ϕ_2 : volumski delež polimera v nabreklem stanju

τ : strižna napetost

V_g: volumen gela

V_p: volumen suhega polimera

w₁: masa nabreklega gela

w₀: masa nenabreklega gela

1. UVOD

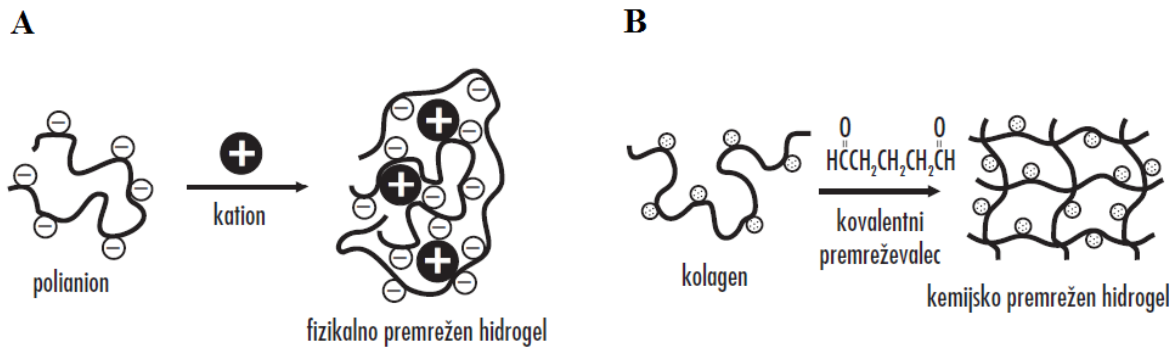
Hidrogeli so tridimezionalne kemijsko ali fizikalno premrežene strukture iz homopolimerov ali kopolimerov, v katere je vključena voda. Premreženost zagotavlja strukturno in fizikalno integriteto hidrogelne mreže. Zaradi svoje fiziološke kompatibilnosti se uporabljajo na različnih področjih, med drugim kot dostavni sistemi zdravilnih učinkovin in pri izdelavi oblog za vlažno celjenje ran. Med polimere, ki tvorijo tovrstne hidrogelne, spada tudi polivinilalkohol (PVA). Gele iz PVA lahko pripravimo na več načinov, med njimi tudi način z zamrzovanjem raztopine (1).

1.1. DEFINICIJA GELA

Gel je poltrden ali trden sistem, v katerem snovi tvorijo tridimenzionalno strukturo, v katero je vključena voda. Tipični polimeri, ki se uporabljajo za tvorbo gelov, so naravne gume (tragakant, karagenan, pektin, agar), polysintezni materiali (metilceluloza, hidroksietilceluloza, hidroksipropil metilceluloza) in sintezni, med katere spada tudi PVA (2).

1.2. HIDROGELI IN NABREKANJE

Hidrogeli so sestavljeni iz štirih osnovnih komponent: polimera, vodne faze, vlažilca in konzervansa. Polimeri fizikalno ali kemijsko vežejo vodo. Hidrofilni polimeri imajo sposobnost nabrekanja in tvorbe gela, pri čemer se ne raztapljajo v vodi. Zaradi kemijskih (ireverzibilni hidrogeli) in fizikalnih (reverzibilni hidrogeli) premreženj je prisotna netopnost in fizikalna integriteta. Pri kemijskem premreženju polimer premrežujejo kovalentne vezi, pri fizikalnem pa so prisotne šibke van der Waalove vezi, vodikove vezi, hidrofobne interakcije ali pa pride le do prepleta verig (Slika 1) (3).



Slika 1: Primer fizikalno premrežene alginske kisline s kalcijevim kloridom in kemijsko premreženega kolagena z glutaralhidom (3)

Polimeri skupaj z vodo tvorijo trdne gelske strukture, ki imajo delno lastnosti tekočin. Takšna struktura omogoča prepustnost snovi v hidrogelu, ki je posledica ujete vode v tridimenzionalni mreži polimera. Pri hidrataciji pride najprej do močnih interakcij med hidrofilinimi skupinami polimera in vodo. To je primarno vezana voda, zaradi česar gel nabreka, pri tem se izpostavijo ostale hidrofилne skupine polimera, ki prav tako reagirajo z vodo, ki pa je sekundarno vezana voda. Primarno vezana voda tvori vezano ali ne-zmrzljivo vodo (non-freezing water). Hidrogel nato zaradi osmotske sile vsrka dodatno vodo, ki zapolni prazne prostore med verigami. Ta voda je prosta ali nevezana (unbound water). V njej se raztaplja učinkovina. Več kot je vezane vode, manj je je na razpolago za raztapljanje učinkovine. Prosta voda za razliko od vezane lahko zmrzne. Nadaljnemu nabrekanju nasprotujejo elastične sile, ki jih predstavljajo kovalentne ali fizikalne povezave v gelski strukturi. Tako gel doseže ravnotežno stanje nabrekanja. Hidrofilnost polimera in stopnja premreženja pogojujeta končno količino vode v gelu (4).

1.3. FIZIKALNE LASTNOSTI KEMIJSKO PREMREŽENIH HIDROGELOV

Strukturo kemijsko premreženega hidrogela definirata izbran polimer in premreževalec. Sama struktura vpliva na stopnjo hidratacije, mehanske lastnosti, permeabilnost in biokompatibilnost (4). Med fizikalne lastnosti spadajo nabrekanje, prehod iz sol v gel stanje, mehanske lastnosti, reološke lastnosti in spremembe povezane s staranjem.

1.3.1. Nabrekanje

Nabrekanje hidrogela je sposobnost absorpcije vode ali raztopine. To sposobnost določajo vrsta monomera in posledično polimera, gostota premreženja polimera ter zunanji dejavniki, kot so: temperatura, ionska moč in pH medija. Bolj hidrofilen polimer in polimer z manjšo gostoto premreženja absorbirata več vode. Nabrekanje lahko proučujemo gravimetrično, izračunamo stopnjo nabrekanja ali pa s slikanjem z magnetno resonanco (MRI) ocenjujemo debelino gelske plasti (5).

1.3.2. Prehod iz sol v gel stanje

Sol stanje je koloidna disperzija delcev v raztopini. Polimerna raztopina lahko prehaja iz sol stanja v gel stanje, kar pa je odvisno od polimera, njegove koncentracije ter temperature. Kritična koncentracija prehoda iz sol stanja v gel je tista, nad katero nastane gel. Ta koncentracija je odvisna od interakcij med polimeri ter med polimerom in topilom, hidrofilnih oz. lipofilnih lastnosti polimera, molekulske mase ter gibljivosti verig (6).

1.3.3. Mehanske lastnosti

Mehanično obnašanje hidrogelov opišemo s plastičnostjo in viskoelastičnostjo. Mehanske lastnosti so odvisne od strukture. Absorbirana voda v strukturi hidrogela je pomembna pri permeabilnosti ter biokompatibilnosti, negativno pa vpliva na mehanske lastnosti hidrogela. Več kot je prisotne vode, šibkejša je struktura hidrogela. Na mehanske lastnosti vpliva tudi stanje vode v hidrogelu. Prosta voda v hidrogelu deluje kot plastifikator, ki zniža temperaturo steklastega prehoda, pri tem pa se poveča mobilnost polimernih verig. Za izboljšanje mehanskih lastnosti hidrogela le-tega premrežimo in kopolimeriziramo s hidrofobnimi monomeri (5).

1.3.4. Reološke lastnosti

Viskoznost hidrogela narašča z višanjem molske mase polimera, koncentracije polimera ter stopnje premreženja. Dodatki elektrolitov, topil, netopil, temperatura vplivajo na interakcije med molekulami polimera ter tako povišajo ali znižajo viskoznost (5).

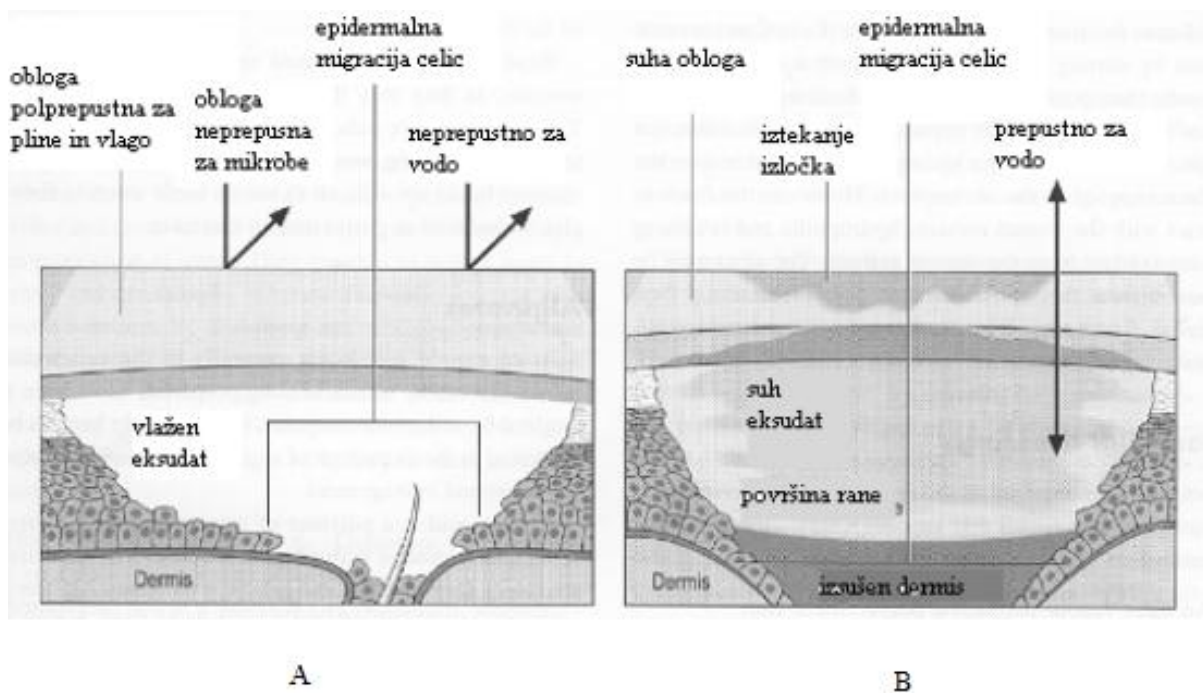
1.3.5. Spremembe povezane s staranjem

Hidrogeli niso v stabilnem ravnotežnem stanju, sčasoma pa začnejo stremeti k vzpostavitvi letega. Pride do porušanja nekovalentnih vezi in preureditve strukture. Lahko pride do polimerizacije, sinereze in zorenja. Do polimerizacije pride zaradi prostih hidroksilnih skupin. Sinereza je skrčenje polimerne mreže in iztisenje vode oziroma raztopine iz por. Pri zorenju polimera (*ang. ripening*) pa pride do raztapljanja in ponovnega obarjanja polimerov zaradi razlik v topnosti (7).

1.4. UPORABA HIDROGELOV

Uporaba hidrogelov na biomedicinskem področju je zelo široka, saj lahko njihove lastnosti spreminjamo s sestavo ali postopkom izdelave. Mehanske lastnosti hidrogelov so primerne za različne načine aplikacije. Najširše področje uporabe hidrogelov so mehke kontaktne leče. Te leče se popolnoma prilagodijo ukrivljenosti očesnega zrkla in omogočajo kisiku dostop do roženice. Obstaja korelacija med vsebnostjo vode v hidrogelu in prepustnostjo za kisik. Pogosta je uporaba v tkivnem inženirstvu, saj je konsistenca hidrogelov zelo podobna človeškemu tkivom. Zaradi nizke medfazne napetosti med hidrogelom in okoliško tekočino ne pride do adsorpcije polimerov iz telesnih tekočin. To je namreč prvi pokazatelj zavračanja tujih snovi ter nekompatibilnost materiala s tkivom (3).

Pomembno področje so tudi sodobne obloge za vlažno celjenje kroničnih ran in opeklin. Vlaga omogoča večjo celično in encimsko aktivnost, posledično se zniža pH, nastane blaga hipoksija, ki stimulira angiogenezo in povzroči nastanek novega kapilarnega mrežja in oskrbo rane s hranivom, kisikom in stimulativnimi mediatorji celjenja (Slika 2). V vlažnem okolju se zmanjša draženje živčnih končičev in umirja bolečino (3).



Slika 2: Obloga za vlažno celjenje ran (A), obloga za klasično (suho) oskrbo ran (B)(8)

Hidrogeli imajo pri vlažni oskrbi ran številne druge prednosti:

- nadomestek manjkajočega tkiva
- ustrezna priprava ležišča rane
- vpijanje gnoja, bakterij in toksičnih sestavin iz rane
- vlaženje, mehčanje in odstranjevanje nekroze, fibrinskih ostankov
- izmenjava plinov (dihanje rane) ter toplotna izolacija
- zaščita pred sekundarno infekcijo (tesen stik obloge z rano)
- manj pogosto in neboleče prevezovanje oblog brez poškodb novega tkiva
- gladka površina oblog iz netkanih materialov
- izboljšana stroškovna učinkovitost sodobnega vlažnega celjenja ran (3)

Hidrogeli v obliki za vlažno celjenje kroničnih ran pospešijo in izboljšajo celjenje kroničnih ran (3).

Hidrogeli se uporabljajo tudi kot dostavni sistemi za prirejeno sproščanje. Njihovo porozno strukturo uravnavamo s gostoto polimernega premreženja ter tako optimiziramo farmakokinetični profil sproščanja učinkovine. Hidrogeli lahko služijo tudi kot depo sistemi za sproščanje učinkovine skozi daljše časovno obdobje. Samo sproščanje učinkovine je nadzorovano na različne načine (3).

1.5. REOLOGIJA

REOLOGIJA izhaja iz grščine, kjer RHEOS pomeni tok in LOGOS veda (9). Reologija je interdisciplinarna veda o tokovnem obnašanju in deformaciji materiala. Omogoča ovrednotenje mehanskih lastnosti tekočin, poltrdnih snovi in viskoelastičnih trdnih snovi. Najpomembnejši pojavi, ki jih obravnava, so:

- strižna odvisnost viskoznosti realnih tekočin
- časovna odvisnost oz. časovna povrnljivost deformacije (značilno za tekočine, poltrdne in trdne snovi)
- pojav razlik v normalnih napetostih pri viskoelastičnih snoveh
- naraščanje viskoznosti pri raztežku, značilno za viskoelastične snovi (10).

Viskoznost (η) je odpor proti drsenju tekočine (notranje trenje tekočine)(Enačba 1):

$$\tau \text{ (Pa)} = \eta \text{ (Pas)} \cdot \gamma \text{ (s}^{-1}\text{)} \quad \text{Enačba 1}$$

Strižna napetost (τ) deluje v smeri strižne sile v smeri strižne ploskve. Strižna hitrost (γ) je sprememba strižne deformacije na enoto časa (10).

Tokovno obnašanje sistemov (tekočin, poltrdnih in trdnih) prikažemo z reogrami in sicer strižno napetost (τ) v odvisnosti od strižne hitrosti (γ) ali viskoznostnimi diagrami, kjer imamo viskoznost (η) v odvisnosti od strižne hitrosti (γ) (Slika 3) (9).

Sisteme razdelimo na Newtonske in nenevtonske (9).

1. Newtonske:

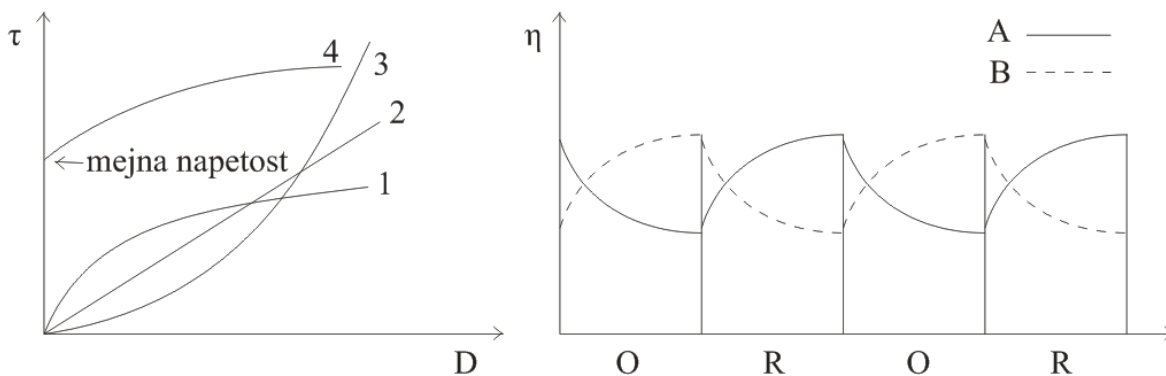
Viskoznost newtonskih tekočin je pri danem tlaku in temperaturi lastnost tekočine, neodvisna od smeri, jakosti in časa delovanja striga (10). Veliko realnih tekočin v določenem območju strižnih hitrosti ali v določenem temperaturnem območju izkazuje newtonsko obnašanje, torej izkazujejo konstantno viskoznost (voda, olje, organska topila, glicerol, polimerne raztopine, polimerne taline linearnih polimerov, suspenzije z nizko vsebnostjo trdnih delcev). Z naraščajočo temperaturo viskoznost tekočine pada zaradi naraščajočega Brownovega gibanja osnovnih delcev. Bolj kot je tekočina viskozna, tem bolj je temperaturno občutljiva (10).

2. Nenevtonske:

Viskoznost nenevtonskih/realnih tekočin pri danem tlaku in temperaturi ni konstantna. Njihova viskoznost se spreminja glede na jakost in smer delovanja strižne sile ali pa je odvisna od časa delovanja striga. Spreminjanje viskoznosti pri konstantnem tlaku in temperaturi je posledica preurejanja notranje strukture tekočine pod vplivom delovanja strižne sile. Delimo jih na časovno neodvisne in časovno odvisne nenevtonske tekočine.

Časovno neodvisne nenevtonske tekočine so psevdoplastične, plastične in dilatantne tekočine. Pri psevdoplastičnih tekočinah je viskoznost pri nizkih strižnih hitrostih konstantna, v območju srednjih strižnih hitrostih (v pogojih delovanja strižnega toka) viskoznost enakomerno upada in doseže neko konstantno vrednost pri zelo visokih strižnih hitrostih. Za plastične tekočine je potrebna določena strižna sila, da tekočina steče. Ko je strižna napetost dovolj velika, omogoči urejanje osnovnih delcev v notranji strukturi v smeri strižne sile, tekočina steče. Strižna napetost pri kateri tekočina steče, je mejna napetost. Pri dilatantnih tekočinah je moč naraščanja viskoznosti z naraščanjem strižne hitrosti ter območje strižnih hitrosti odvisno od koncentracije trdnih delcev, njihove oblike, porazdelitve velikosti delcev ter lastnosti disperznega medija. V visoko koncentriranih suspenzijah ni dovolj tekoče faze, da bi se delci lahko orientirali v smeri toka. Pri nizkih strižnih hitrostih viskoznost suspenzije z naraščanjem strižne hitrosti upada, dokler hitrost toka ni prevelika za urejanje delcev. Nad to

mejo se zopet pojavi neurejenost notranje strukture in viskoznost ob nadaljnem povečevanju strižne hitrosti narašča (10).



Slika 3: Reogrami: a) psevdoplastični (1), Newtonski (2), dilatantni (3) in plastični sistemi (4); b) tiksotropni (A) in reopeksni (B) sistem v obremenilni (O) in razbremenilni fazi (R)(9)

Časovno odvisne nenevtonske tekočine so tiksotropne in reopeksne. Pri tiksotropnih tekočinah viskoznost s časom delovanja striga pada. Če jo izpostavimo konstantni strižni hitrosti viskoznost pada, dokler se osnovni delci tekočine ne uredijo v smeri toka. Če spremenimo strižne pogoje (povečamo strižno hitrost) bo viskoznost zopet padala dokler ni vzpostavljeno ravnotežje med podiranjem in vzpostavljanem notranje strukture. Viskoznost reopeksnih sistemov narašča s časom delovanja striga. Gre za antitiksotropno obnašanje (10).

Te snovi so reološko najbolj kompleksne. Kažejo viskozno in elastično obnašanje. Med mirovanjem v strukturiranih tekočinah notranja mikrostruktura zavzame najugodnejše stanje. med deformacijo te tekočine težijo k povrnitvi stanja v mirovanju. Ta proces je podoben raztegovanju vzmeti iz začetne lege v obliki shrambe energije- elastične sile, ki deluje v smeri povrnitve v začetno lego. Izvor elastičnih sil v fazi mirovanja so linearne ali razvejane polimerne verige z naključno nedeformirano konformacijo ali ne-raztegnjene prepletene polimerne verige (10). Po razbremenitvi se ti sistemi lahko povrnejo v prvotno stanje, v deležu ki pripada elastičnosti. Pri viskoznem delu sistema se energija izgublja, saj se pretvarja v toploto. Pomembna je tako hitrost kot trajanje deformacije, torej so ti sistemi časovno in

napetostno odvisni. V začetni fazi se obnašajo kot trdna snov, z naraščanjem strižne napetosti pa kot tekočina (9).

Idealno trdno telo se pod vplivom strižnih sil deformira elastično, kot vzmet, pri tem se energija akumulira, kar omogoča popolno obnovo telesa po prenehanju delovanja strižne sile. Strižna napetost (τ) je pri tem premosorazmerna strižni deformaciji (γ) (Hookov zakon) (Enačba 2). G je pri tem sorazmernostna konstanta (10).

$$\tau = G \cdot \gamma$$

Enačba 2

Idealna tekočina se deformira ireverzibilno kot dušilka. Potrošena energija se pretvori v toploto in je ni mogoče povrniti po prenehanju delovanja strižne sile, strižna napetost (τ) pa je premosorazmerna hitrosti deformacije ($\dot{\gamma}$) (Newtonov zakon) (Enačba 1).

Pri vrednotenju mehanskih lastnosti viskoelastičnih snovi moramo vedeti, zakaj bomo uporabili rezultate in seveda, kakšno opremo imamo. Da zagotovimo ponovljivost rezultatov moramo meriti pri nizkih strižnih deformacijah, tako zagotovimo, da se bo snov na strižno silo odzvala v območju linearnega viskoelastičnega odziva (LVE). LVE je območje viskoelastičnosti, kjer sta strižna napetost in strižna deformacija v linearni zvezi. Če želimo določiti doprinos elastičnosti in viskoznosti k viskoelastičnosti tekočin in poltrdnih snovi, moramo meritve izvajati pri nedestruktivnih strižnih pogojih, kar lahko izvajamo na dva načina:

- z dinamičnimi testi- oscilatorni testi
- s statičnimi testi- testi lezenja in obnove

Strižna deformacija se s časom spreminja sinusno z določeno frekvenco in amplitudo. Pri oscilatornih testih z dovolj majhno amplitudo strižne deformacije omogoča določiti viskozno in elastično komponentno viskoelastične snovi (10).

Proučevanje reoloških lastnosti tekočin omogočajo različne naprave, izbira ustreznega je odvisna od lastnosti tekočine in namena reološkega proučevanja. Delimo jih na:

- absolutne naprave: rotacijski ter kapilarni reometri in viskozimetri, za katere lahko vrednosti strižnih hitrosti ali strižnih napetosti izračunamo s pomočjo merljivih in nastavljivih količin ter s pomočjo geometrijskih karakteristik izbranega senzorskega sistema (Slika 4)
- relativne naprave: viskozimeter s padajočo kroglico, viskozimeter s turbinskimi mešali, penetrometer, za katere strižni pogoji med meritvijo niso natančno določeni; viskoznost določimo primerjalno glede na tekočino znane viskoznosti ali pa je določena z enotami značilnimi za posamezno napravo (10)

Pri uporabi absolutnih naprav moramo izpolniti naslednje pogoje:

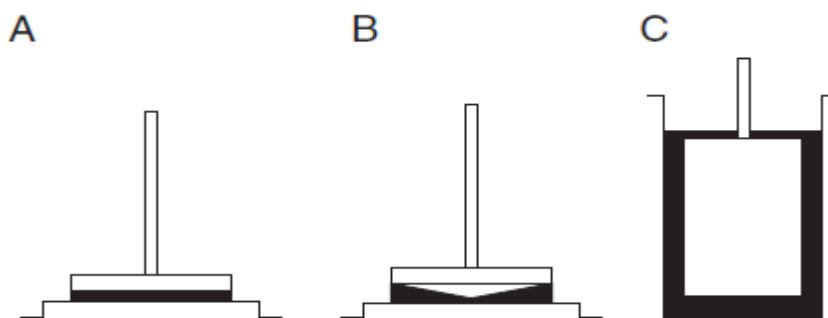
- meritve moramo izvajati v pogojih laminarnega toka
- med meritvijo moramo zagotoviti izotermne pogoje, viskoznost tekočin je zelo odvisna od temperature
- zagotoviti moramo pogoje enostavnega striga in se izogniti vplivom robnih pogojev (10)



Slika 4: Reometer Physica MCR301 na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, Anton Paar (11)

1.5.1. Reološke lastnosti viskoelastičnih snovi

Primeren senzorski sistem za merjenje reoloških lastnosti tekočin izberemo glede na vrsto tekočine, pogoje pri merjenju, temperaturno območje in dodatne zahtevane pogoje. Merjenje pri pogojih enostavnega strižnega toka izvajamo v geometrijsko različnih senzorskih sistemih, kar je odvisno od lastnosti poučevane tekočine. Poznamo sistem dveh vzporednih plošč, sistem stožec-ploščica ter sistem koaksialnih valjev (Slika 5) (10).



Slika 5: Sistem dveh vzporednih plošč (A), sistem stožec-ploščica (B) in koaksialnih valjev (C)(12)

Senzorski sistem dveh vzporednih plošč

Strižna hitrost se spreminja po polmeru plošče in s tem po celotnem vzorcu. Iz izmerjenega oz. nastavljenega navora na ploščo, ki je posledica upora tekočine pri rotaciji ene od plošč, izračunamo strižno napetost na obodu plošče ob znanih dimenzijah. Strižna hitrost na obodu plošče določata kotna hitrost in radij. Ker lahko nastavimo velikost reže med ploščama lahko preprosto določamo različna območja strižnih hitrosti oziroma strižne deformacije. Uporablja se za merjenje visoko viskoznih tekočin in poltrdnih snovi ter koncentriranih suspenzij z večjimi delci (10; 12).

Senzorski sistem stožec-ploščica

Glavna prednost tega sistema je enostavno odmerjanje vzorca in čiščenje merilnega sistema po končani meritvi ter majhne količine vzorca. Zelo pomembno je, da je pri majhnih kotih je strižna hitrost in strižna napetost po celotni reži enaka. Strižna napetost na stožcu izračunamo

s pomočjo merjenega ali nastavljenega navora ob upoštevanju polmera in kota stožca (α), za izračun strižne hitrosti moramo poznati tudi kotno hitrost (ω) (10; 12).

Senzorski sistem koaksialnih valjev

Vzorec damo v režo med valjema. En valj rotira (zunanji ali notranji) drugi (notranji ali zunanji) pa miruje. Strižno napetost izračunamo iz navora na notranji valj pri pogojih strižnega toka ali strižne deformacije pri določeni strižni hitrosti. Za izračun kotne hitrosti moramo poznati kotno hitrost (ω) ter razdaljo med valjema (10; 12).

1.5.1.1. Oscilatorni testi

Pri teh testih se strižna deformacija spreminja s časom sinusno z določeno frekvenco in amplitudo. Pri dovolj majhnih amplitudah strižne deformacije lahko določimo viskozno in elastično komponento viskoelastične snovi pri nedestruktivnih strižnih pogojih. Pri teh meritvah obravnavamo nastavljivo strižno deformacijo kot vsiljeno nihanje. Odziv snovi na vsiljeno strižno deformacijo je periodično nihanje strižne napetosti z določeno frekvenco oziroma kotno hitrostjo (ω) in amplitudo (γ_a) (10).

Elastični modul (Storage modulus) (G') je modul akumulacije energije in je v fazi z vsiljeno strižno deformacijo (Enačba 3).

$$G' = \left(\frac{\tau_a}{\gamma_a} \right) \cdot \cos \delta \quad \text{Enačba 3}$$

Plastični ali viskozni modul (Loss modulus) je modul energetskih izgub v obliki toplote in je izven faze z vsiljeno strižno deformacijo (Enačba 4).

$$G'' = \left(\frac{\tau_a}{\gamma_a} \right) \cdot \sin \delta \quad \text{Enačba 4}$$

Pri oscilatornih meritvah je pomemben parameter fazni zamik ($0^\circ < \delta < 90^\circ$). Tangens tega kota je razmerje med viskoznim in elastičnim modulom (Enačba 5).

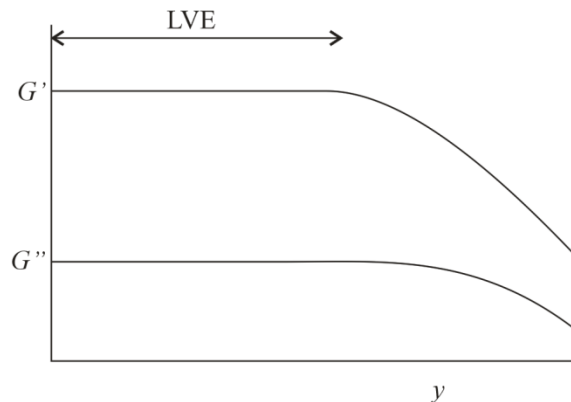
$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Enačba 5}$$

Pri viskoelastičnih snoveh določimo kompleksno viskoznost, ki predstavlja celoten odpor snovi proti toku (Enačba 6).

$$\eta^* = \frac{\tau_a}{\gamma_a \cdot \omega} = \frac{G^*}{\omega}$$

Enačba 6

V območju LVE lahko vse te dinamične količine določimo z reometrom z nastavlljivo strižno hitrostjo ali z reometrom z nastavlljivo strižno napetostjo (Slika 6) (10).

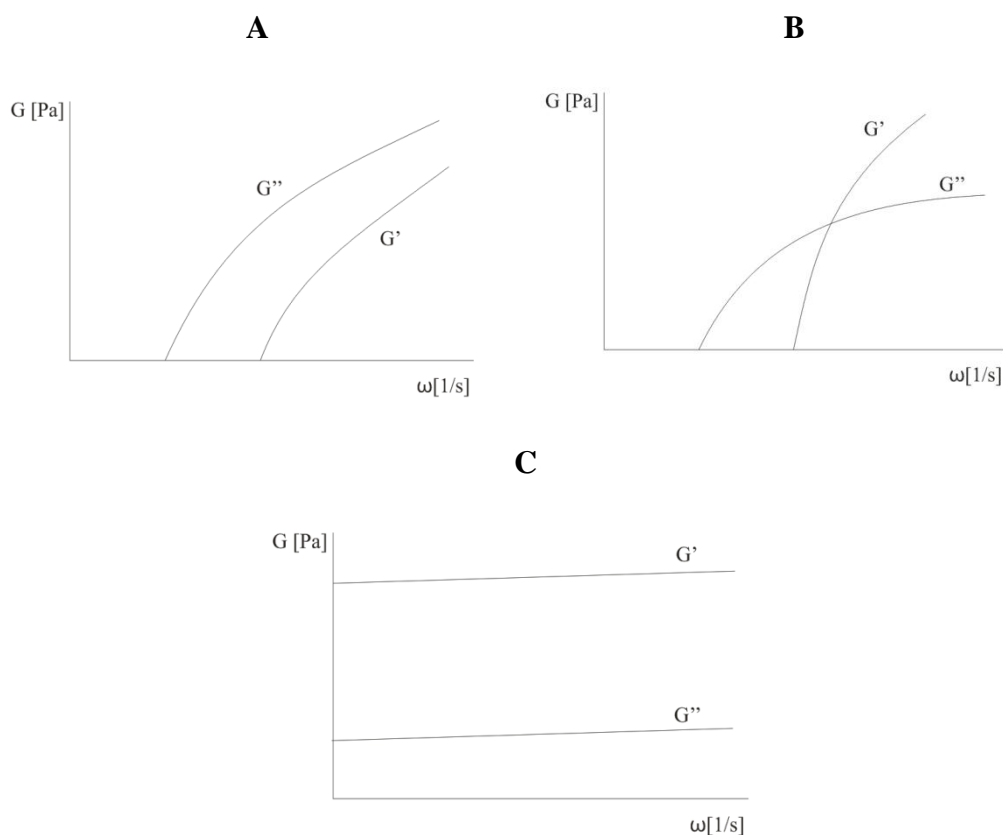


Slika 6: Območje linearne viskoelastičnosti (12)

Frekvenčna odvisnost dinamičnih modulov prikazuje odziv materiala na periodično delovanje strižne deformacije. V praksi smo pogosto omejeni na izvajanje eksperimenta v ožjem frekvenčnem območju. V širokem območju frekvenc se večina snovi odziva podobno, vendar so frekvenčna področja odziva kjer se snov obnaša viskoelastično trdno in viskoelastično tekoče odvisna od lastnosti snovi. Idealna elastična snov ima G'' enak 0, torej se vsa energija shrani. Idealna viskozna snov ima G' enak 0, kar pomeni, da se vsa energija pretvori v toploto. Pri pretežno elastičnih snoveh je $G' > G''$, $\tan \delta < 1$, pri pretežno viskoznih pa je $G'' > G'$, $\tan \delta > 1$. V območju LVE obstaja sorazmerje med aplicirano obremenitvijo in deformacijo. Znotraj tega območja sta G' in G'' konstantna tudi če spreminjamo amplitudo deformacije (10).

1.5.1.2. Opredelitev sistemov glede na reološke meritve

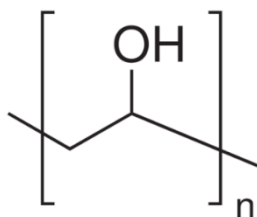
Imamo tri tipe grafov, na podlagi katerih določimo za kakšen sistem gre. Pri razredčeni raztopini je $G'' > G'$ znotraj celotnega frekvenčnega območja (Slika 7A). Za raztopino s prepletenimi polimernimi verigami je značilna točka, kjer sta $G' = G''$ in $\tan \delta = 1$. Pri frekvencah pod presečiščem se material obnaša viskozno (tekoče), nad presečiščem pa se obnaša elastično (trden) (Slika 7B). Pri gelu je $G' > G''$, torej je material pretežno elastičen. Oba modula sta relativno neodvisna od frekvence, popolno neodvisnost pa dobimo le pri gelih, kjer so polimeri kovalentno premreženi (Slika 7C) (12).



Slika 7: Razlikovanje materialov na osnovi frekvenčnega testa: raztopina (A), raztopina s prepletenimi polimernimi verigami (B) in gel (C) (12)

1.6. POLIVINILALKOHOL (PVA)

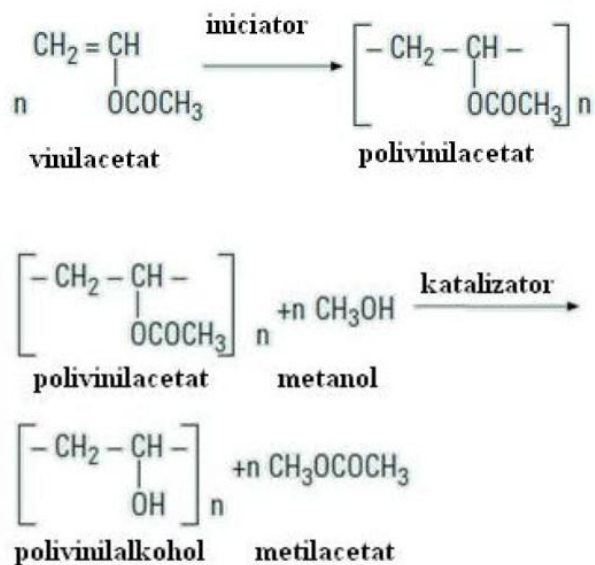
Polivinilalkohol (PVA) je enostavni polimer sestavljen iz monomernih enot vinil alkohola (Slika 8).



Slika 8: Struktura polivinil alkohola (PVA) (13)

1.6.1. Sinteza PVA

PVA pridobivamo le sintezno s polimerizacijo vinilacetata v polivinilacetat, ki ga nato hidroliziramo v polivinilalkohol. Polimerizacija vinil acetata v polivinilacetat poteka v organskem topilu, ponavadi v metanolu (Slika 9). Med polimerizacijo metanol deluje kot povezovalec verig, hkrati pa hlapi in s tem ohlaja sistem med reakcijo. Sledi hidroliza do polivinilalkohola, reagent pri tej reakciji je natrijev hidroksid (14).



Slika 9: Sinteza polivinil alkohola (PVA) (14)

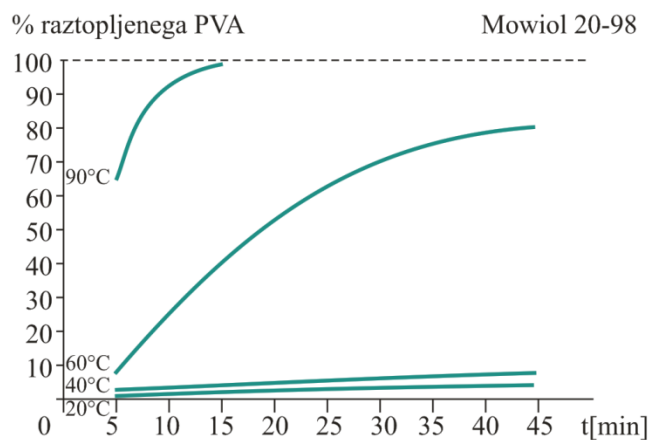
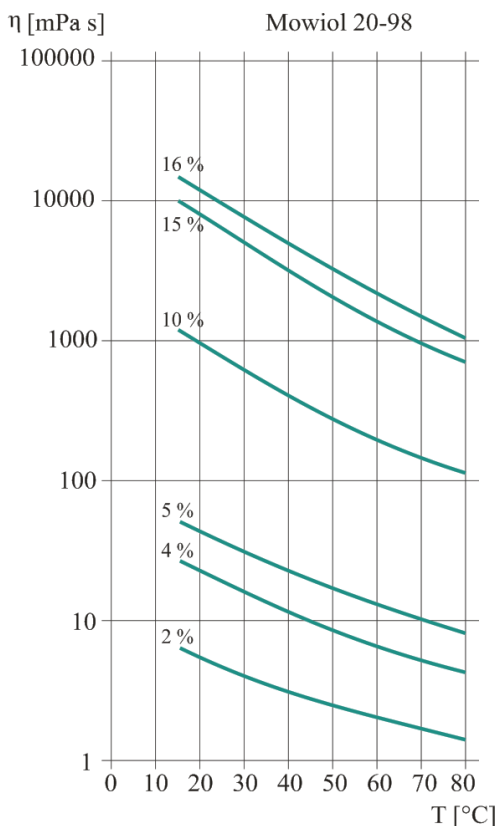
1.6.2. Lastnosti PVA

Sinteza PVA ni popolna, zato vedno ostane nekaj acetilnih skupin v strukturi polivinilalkohola. Več kot je le-teh, boljša je topnost PVA v vodi (Slika 10, Slika 11), saj acetatne skupine pri nižji stopnji hidrolize oslabijo inter in intramolekularne vezi ter olajšajo raztapljanje (14).

Ker je molekulska masa končnega polivinilalkohola skoraj nemogoče pravilno izmeriti, se ponavadi izmeri molekulska masa polivinil acetata in iz nje izračunamo molekulska masa polivinilalkohola. Velikokrat pa sploh nimamo podane molekulske mase PVA ampak viskoznost 4% raztopine pri 20°C ter stopnjo hidrolize (13).

Mowiol[®] je registrirano ime za PVA. Mowiole se razlikujejo po molekularni masi in stopnji hidrolize, kar je razvidno že iz imena (Mowiol[®] 20-98). Prva številka pomeni viskoznost 4% raztopine pri 20°C, druga pa stopnjo hidrolize. Stopnja hidrolize pomeni, koliko OH skupin ni acetiliranih. V nalogi smo uporabili Mowiol[®] 20-98, ki ima torej viskoznost 4% raztopine pri 20°C $20 \pm 1,5$ mPas, stopnjo hidrolize pa $98,4 \pm 0,4$. Njegova molekulska masa je 125000 Da (13).

Viskoznost je odvisna od koncentracije (Slika 10), stopnje polimerizacije in hidrolize, spreminja pa se tudi v odvisnosti od temperature (Slika 11) (13).



Slika 10: Viskoznost različno koncentriranega PVA (levo) (14)

Slika 11: Hitrost raztapljanja PVA pri različnih temperaturah (desno) (14)

Topnost je količina raztopljenega polimera pri določeni temperaturi v določeni časovni točki (Slika 11). Najpogostejše topilo za PVA je voda. Z višanjem temperature se skrajša čas raztapljanja. Tudi stopnja hidrolize vpliva na topnost. Višja kot je stopnja hidrolize močnejše so intermolekularne in intramolekularne vezi, topnost pa je posledično manjša. Za prekinitev teh vezi je potrebno več toplotne energije, zato za raztapljanje potrebujemo daljši čas in temperaturo nad 80°C (14).

Zaradi semikristalinične strukture PVA, le-ta tvori intermolekularne in intramolekularne vodikove vezi. PVA lahko tvori termoreverzibilen hidrogel. Polarne verige PVA se orientirajo ena proti drugi, ponekod se uredijo vzporedno in se povezujejo z vodikovimi vezmi. Znotraj takšne urejene strukture se oblikujejo posamezna kristalizacijska območja. Na kristaliničnost vpliva število acetilnih skupin, ki ostanejo v polimeru, več kot je teh

skupin, manjša je urejenost in kristaliničnost ter boljša topnost. Znatno povišanje temperature poveča tvorbo kristalizacijskih območij (Slika 13) (14).

1.6.3. Uporaba PVA

Uporablja se kot biomaterial, ki posnema ali nadomesti del živega tkiva. Nadomesti ali ponovno vzpostavi funkcijo določenega tkiva v telesu. Ker je v stiku s telesnimi tekočinami, mora biti biokompatibilen, torej ne sme izzvati neželenih učinkov v organizmu in obratno. Biti mora netoksičen, nekancerogen, s primernimi fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi, omogočati mora obdelavo glede na namen uporabe ter biti odporen na razgradnjo (15).

PVA ima te lastnosti, ima enostavno kemijsko strukturo, možnost geliranja in tvorbe filmov. PVA je enostaven za uporabo. Modifikacije njegove strukture dosežemo na enostaven način. V vodi oziroma bioloških tekočinah močno nabreka. Zaradi svoje elastičnosti je zelo podoben tkivu in ga telo ne zavrača (16).

1.6.4. Hidrogeli iz PVA

Premreženje hidrogelov iz PVA lahko dosežemo na različne načine:

- kemijsko premreženje:

Pri kemijskem premreženju uporabljamo različne premreževalce, najpogosteje glutaraldehid, acetaldehid, formaldehid in drugi aldehidi. Ob prisotnosti topila se tvorijo vezi med verigami polivinilalkohola. Premreževalce moramo odstraniti, da v *in vivo* sistemu ne izzovejo neželenih učinkov (1).

- premreženje z γ žarki:

Takšen način premreženja ne povzroča neželenih učinkov *in vivo*. Minimalna doza sevanja že vpliva na stopnjo polimerizacije in koncentracijo polimera v raztopini, ter tako spremeni mehanske lastnosti. Geli narejeni s to metodo imajo rahlejšo strukturo, zato lažje sprejmejo večjo količino vode v svojo strukturo. Slabost te metode je, da v gelu nastajajo zračni mehurčki, ki jih je zelo težko odstraniti (1).

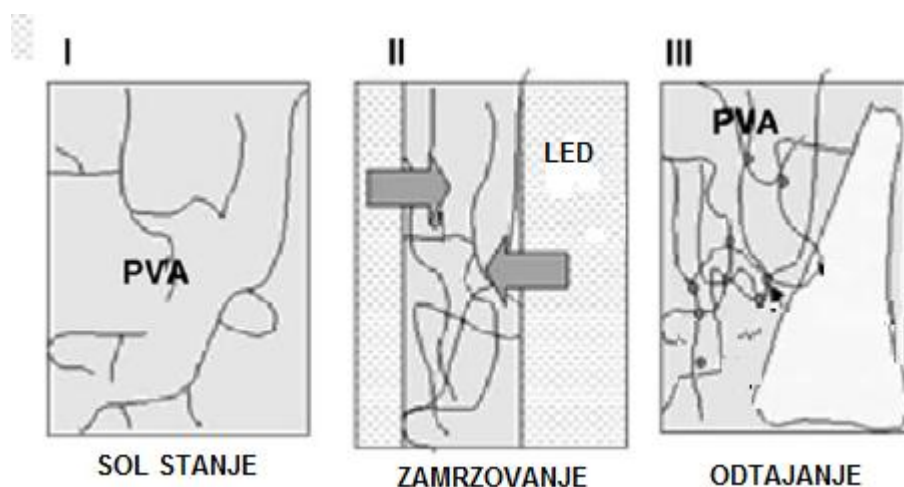
- zamrzovanje in odtajanje:

Pri tej metodi se tvorijo kristalinična področja, ki tvorijo zelo čvrste hidrogelne (1). Mehanizem bo razložen v nadaljevanju.

1.6.5. Mehanizem nastanka hidrogela z metodo zamrzovanja in odtajanja

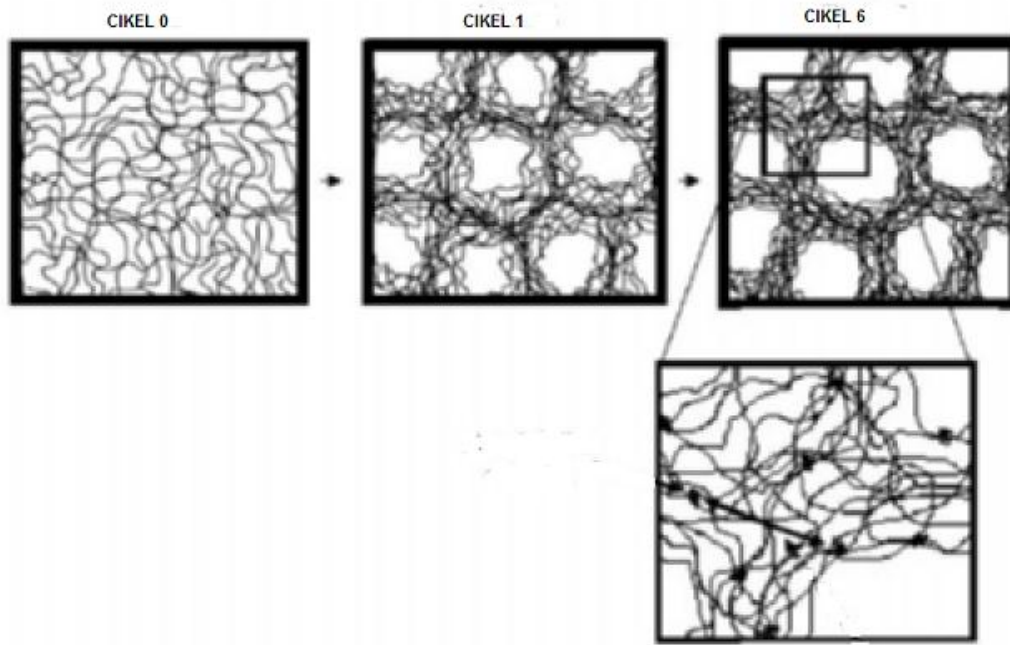
Osnovni mehanizem te metode je nastanek kristaliničnih območij med polimernimi verigami. Ko hidrogel izpostavimo nizkim temperaturam, voda v njem zamrzne in verige PVA niso več prosto gibljive. Z zniževanjem temperature se volumen ledu povečuje, zato se molekule polimera približajo. Molekule polimera se zaradi bližine lahko povežejo med seboj z vodikovimi vezmi (Slika 12). Po prvem ciklu zamrzovanja nastanejo šibkejše povezave. Pri prvem ciklu nastanejo povezave le med bližnjimi verigami, z večanjem števila ciklov pa se povežejo tudi ostale molekule. Pri tem verige polimera agregirajo in nastanejo kristalizacijska območja (Slika 13). Pregled kristalizacijskih območij na molekularnem nivoju nam pove, da so te strukture v plasteh. Med posameznimi verigami polimera so vodikove vezi, med plastmi teh

povezanih verig polimera pa delujejo šibkejšje van der Waalsove vezi. Na obliko urejenih struktur vpliva velikost polimernih verig, molekulsko maso polimera, koncentracija raztopine ter čas zamrzovanja. Pri koncentracijah nižjih od 5% se voda loči od ostale strukture med procesom odtajanja, saj med procesom zamrzovanja nastanejo le intramolekularne vezi, ker so verige preveč narazen. Hidrogel se pri tem ne tvori, tudi po zamrzovanju dobimo bistro raztopino. Številne raziskave poročajo o gelih s koncentracijo višjo od 10%. Pri bolj koncentriranih raztopinah, raztopinah z večjo molekulsko maso so polimerne verige bolj skupaj, mrežna polja so manjša zato je stopnja kristaliničnosti večja (17).



Slika 12: Prikaz tvorbe gela med procesom zamrzovanja in odtajanja(17)

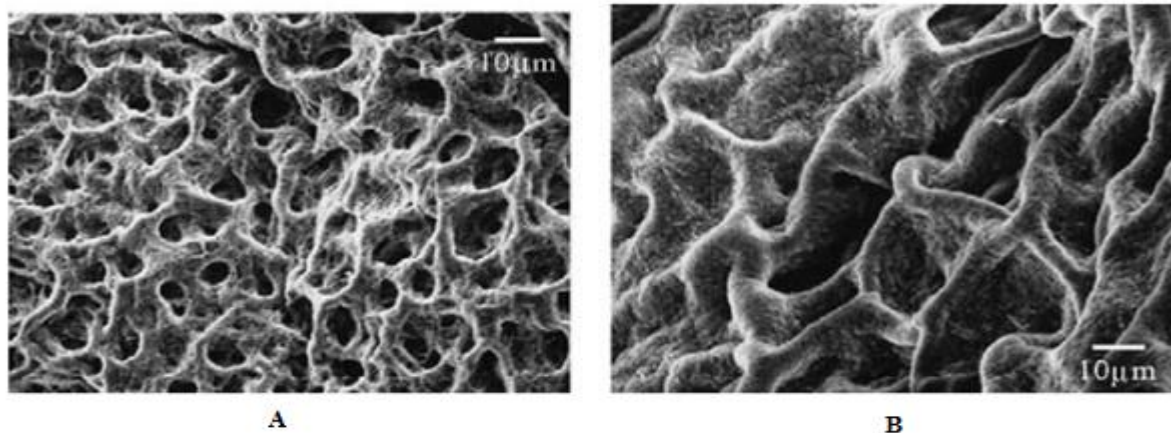
Premreženja nastajajo tako med zamrzovanjem kot odtajanjem. Med zamrzovanjem se polimerne verige približajo in povežejo in nastanejo kristalinična območja, med odtajanjem pa te verige postanejo zopet gibljive, zaradi česar se preuredijo in še dodatno kristalizirajo (18).



Slika 13: Strukture hidrogela pri različnih ciklih zamrzovanja in odtajanja(19)

Da nastane kristalinična struktura vidimo že s prostim očesom, saj prej transparentna raztopina po ciklih zamrzovanja in odtajanja postane neprosojna (6).

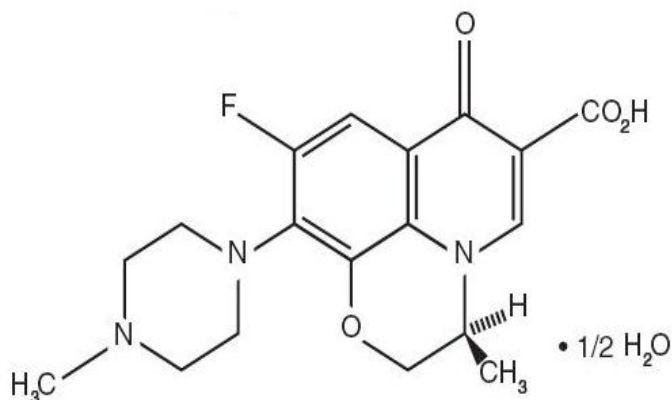
Hidrogel v stiku z vodo/puffrom nabreka, vendar pa je zaradi močnih premreženj, ki nastanejo med zamrzovanjem gel praktično netopen. Bolj kot je hidrogel čvrst (višja koncentracija in večje število ciklov) manj nabreka. Po večjih ciklih zamrzovanja in odtajanja nastanejo stene por v kristalinični strukturi debelejše, pore pa večje (Slika 14)(17).



Slika 14: PVA hidrogel pod elektronskim mikroskopom po 2 (A) in 5 (B) ciklih zamrzovanja in odtajanja (17)

1.7. LEVOFLOKSACIN

Levofloksacin je protimikrobna učinkovina. Po strukturi je kinolon oziroma florokinolon druge generacije. Levofloksacin je S(-) izomer ofoksacina, ki je racemat. Le S(-) izomer je aktivna oblika (20). V industriji se uporablja levofloksacin hemihidrat (Slika 15) (molekulska masa je 370,38 g/mol), ki ima vsebnost levofloksacina 97,6% (21).



Slika 15: Levofloksacin hemihidrat (22)

1.7.1. Biofarmaceutske lastnosti levofloksacina

Levofloksacin je zelo dobro topen v vodi in zelo dobro permeabilen, zato po BCS (Biopharmaceutic Classification System) klasifikaciji spada v skupino BCS I. Topnost levofloksacina je pogojena s pH, zelo dobra je med pH 2-5 okrog 200 mg/ml, največja je med pH 5,5 in 6,5, okrog 300 mg/ml, nad to mejo začne topnost upadati in je najnižja nad pH 7,5, okrog 30 mg/ml (21).

1.7.2. Kinoloni

Kinoloni zavirajo sintezo DNA Gram (-) in Gram (+) bakterij. Ker se strukturno in v načinu delovanja razlikujejo od β -laktamskih antibiotikov in aminoglikozidov se uporabljajo tudi proti bakterijam rezistentnim na β -laktamske antibiotike in aminoglikozide (22).

Kinoloni se vežejo v kompleks DNA-giraza in stabilizirajo konformacijo kompleksa. Uvajanje dodatnih negativnih zavojev se ustavi. Replikacija in transkripcija se ustavita. Vrzeli v DNA verigi inducirajo sintezo popravljajočih encimov (SOS response). Nekoordinirano popravljanje vodi v ireverzibilne poškodbe in celično smrt. Inhibitorji giraze delujejo baktericidno (20).

Levofloksacin deluje na:

Aerobne Gram (+) bakterije:

- *Corynebacterium species*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- Skupina *Viridans streptococci*

Aerobne Gram (-) bakterije:

- *Pneumonas aeruginosa*
- *Serratia marcescens* (22)

2. NAMEN DELA

Pri kroničnih ranah je zelo pomembno zaščititi rano pred vdorom mikroorganizmov. Zato razvijajo hidrokele z vgrajenimi protimikrobnimi učinkovinami, kot je v našem primeru levofloksacin. Pri tem pa je predvsem pomembno zagotoviti sproščanje učinkovine iz hidrogela znotraj terapevtskih koncentracij.

Namen diplomske naloge bo izdelava in vrednotenje PVA hidrogelov izdelanih na dva načina. Prvi način bo raztapljanjem polimera pri povišani temperaturi ter vgradnjo levofloksacina v hidrogel. Drugi način je identičen prvemu, le da jih nato še v večih ciklih zamrzujemo in odtajamo. Pripravili bomo gele v treh različnih koncentracijah PVA in treh različnih koncentracijah levofloksacina. Hidrokele bomo reološko ovrednotili tako hidrokele brez učinkovine kot z učinkovino in sklepali na vpliv levofloksacina na mehanske lastnosti hidrogelov. Ovrednotili bomo uspešnost izdelave hidrogela z vrednotenjem homogenosti porazdelitve levofloksacina po celotnem hidrogelu ter sproščanje levofloksacina iz hidrogela.

Naš cilj diplomske naloge bo ugotoviti, kako na mehanske lastnosti hidrogelov in sproščanje levofloksacina iz njih vplivajo parametri izdelave hidrogelov (koncentracija polimera, koncentracija levofloksacina ter število ciklov zamrzovanja in odtajanja hidrogelov).

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. MATERIALI

3.1.1. Materiali za pripravo hidrogelov

- polivinil alkohol Mowiol[®] 20-98, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija; molekulska masa: 125000 Da, videz: beli kristalčki
- levofloksacin, Lek d.d.
- bidestilirana voda

3.1.2. Materiali za izdelavo pufra

- kalijev klorid (> 99,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (99,5% - 100,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat (> 99,0%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev klorid (> 99,5%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina 37%, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid (> 99,0%), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- bidestilirana voda

3.2. NAPRAVE

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Scherzenbach, Švica
- analitska tehtnica, Mettler Toledo XS205, Scherzenbach, Švica
- magnetno mešalo z grelcem, IKA WERKE, Nemčija
- magnetno mešalo, IKA WERKE, Nemčija
- modularni reometer Physica MCR 301; TruGap[™]READY, Anton Paar;
- nastavek: CP50-2, D=50mm, angle 2°
- nastavek: PP25, D=25mm
- avtomatska pipeta BIOHIT m5000 (500-5000μl), Kemomed, Finska
- pH meter MA234, Mettler Toledo, pH/Ion Analyzer, Schwarzenbach, Švica
- ultrazvočna kadička, Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija
- UV/VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453, Nemčija

3.3. POSTOPKI IN METODE

3.3.1. Priprava hidrogelov

Pripravili smo 7,5% (m/m), 11,25% (m/m), 15% (m/m), 20% (m/m) in 25% (m/m) PVA hidrogel. Natehtali smo ustrežno količino polivinil alkohola v prečiščeni vodi do 50 g. Nato smo to segrevali v vodni kopeli na 80°C na magnetnem mešalu do homogene viskozne raztopine. Raztopljene vzorce smo med mešanjem ohladili na sobno temperaturo. Vzorce smo predhodno in po ohladitvi stehali ter dodali vodo, ki je izhlapela med segrevanjem (Slika 16A).

3.3.2. Priprava hidrogelov z levofloksacinom

Uporabili smo 3 različne m/m koncentracije levofloksacina 0,75%, 1,5% in 3% v treh različnih koncentracijah gela 7,5% (m/m), 11,25% (m/m) in 15% (m/m) gel. Natančne sestave so podane v Tabeli I.

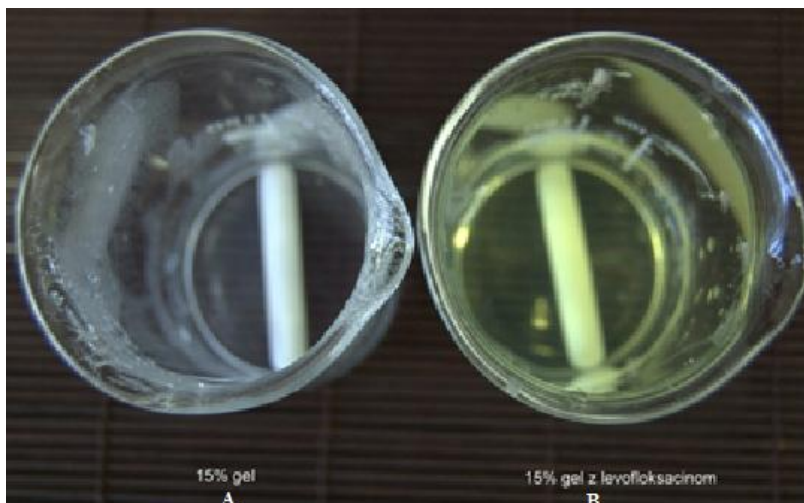
Če praškasti levofloksacin zatehtamo direktno v PVA hidrogel se ne raztopi, zato smo ga predhodno raztopili v delu vode. Vzorce smo pripravili tako, da smo v ohlajen 20% (m/m) PVA vmešali raztopino levofloksacina, da smo dobili koncentracijo 15% (m/m) hidrogel z učinkovino (Slika 16B). Iz 15% (m/m) smo z vmešanjem raztopine levofloksacina dobili 11,25% (m/m) PVA z učinkovino ter iz 11,25% (m/m) smo dobili 7,5% (m/m) PVA z učinkovino.

Na ta način smo učinkovino vgrajevali zato, ker smo pred tem ugotovili, da učinkovina pri višji temperaturi razpada. Levofloksacin smo segrevali v pufru 30 minut pri 25°C, 60°C, 80°C ter 100°C. Ker je koncentracija levofloksacina s segrevanjem padala, smo ga vedno dodali v ohlajen gel ter pri tem zelo močno mešali na magnetnem mešalu, da se je enakomerno porazdelil po celotnem gelu.

Tabela I: Mase PVA, levofloksacina in vode (H₂O) v disperzijah

DISPERZIJA	OSNOVNA DISPERZIJA		DODAN LEVOFLOKSACIN		KONČNI VZOREC			
	m PVA [g]	m H ₂ O [g]	m levofloksacina [g]	m H ₂ O do 16,6 g [g]	m vzorca [g]	% PVA	% levo.	
A	10	40	0	16,6	66,6	15	0	
B			0,5	16,1			0,75	
C			1	15,6			1,5	
D			2	14,6			3	
E	7,5	42,5	0	16,6		11,25	0	
F			0,5	16,1			0,75	
G			1	15,6			1,5	
H			2	14,6			3	
I	5	45	0	16,6			7,5	0
J			0,5	16,1				0,75
K			1	15,6				1,5
L			2	14,6				3

Najoptimalnejšo PVA disperzijo (disperzijo C) smo tudi zamrznili za 24 h, jo odtajali na sobni temperaturi ter nastali hidrogel reološko ovrednotili in tudi spremljali sproščanje učinkovine iz hidrogela. Naredili smo zamrzovanje v 1, 2 in 3 ciklih ter podaljšano zamrzovanje (48 h in 72 h) in hidrogel po vsakem ciklu ovrednotili.



Slika 16: Gel brez (A) in z levofloksacinom (rumenkast) (B)

3.3.3. Vrednotenje reoloških lastnosti hidrogelov

Nastalim hidrogelom brez in z učinkovino smo pomerili reološke lastnosti na reometru Physica MCR 301 s sistemom stožec-ploščica s premerom 50mm(Slika 4). Na spodnjo ploščo smo nanegli vzorec, možne zračne mehurčke smo s spatulo pomaknili na rob, da jih je stožec ob stiku izrinil in tako niso motili meritve. Presežek hidrogela smo odstranili, preden je naprava pričela z meritvijo.

Vzorcem smo najprej pomerili viskoznost z metodo rotacijske reometrije, da smo videli, kako se le ta spreminja s višanjem koncentracije gela in dodatkom učinkovine. Merili smo pri temperaturi 25°C in $\dot{\gamma} = 1 - 100$ 1/s.

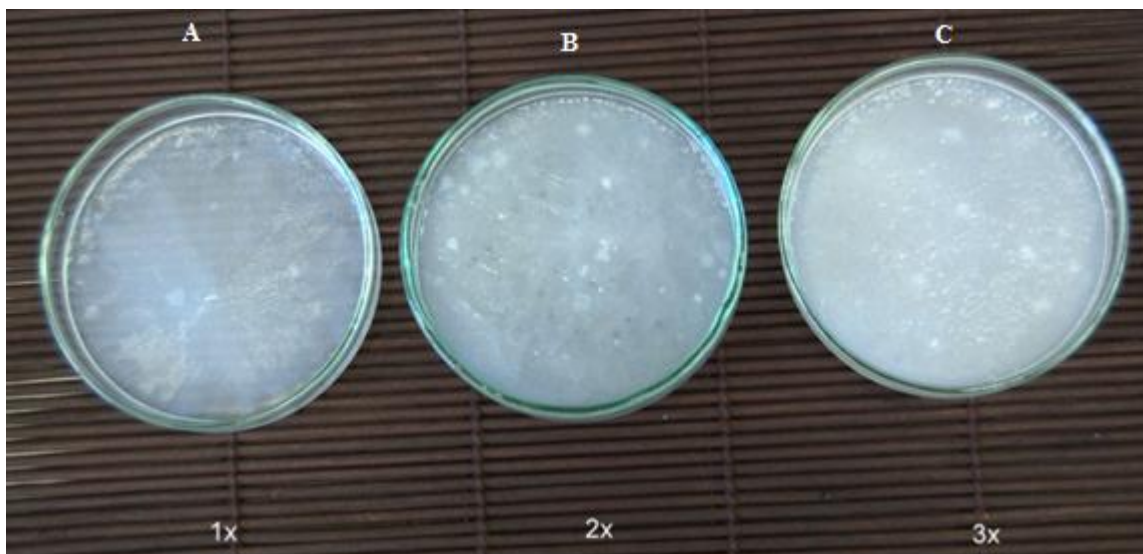
Nato pa smo na enem od vzorcev izvedli amplitudni test, s katerim smo ugotovili območje linearne viskoelastične obnašanja (LVE) našega vzorca. Znotraj tega območja so reološke lastnosti snovi neodvisne od amplitude strižne deformacije. Elastični (G') in plastični (G'') modul smo merili tako, da smo strižno deformacijo zvezno povečevali od 0,01 do 100%, frekvenca oscilacije pa je bila konstantna (10 rad/s). Vse meritve smo izvajali pri temperaturi 25°C.

Znotraj območja linearne viskoelastičnosti (LVE) določenega z amplitudnim testom, smo izvedli frekvenčne teste. Frekvenco smo spreminjali od 100 proti 0,1 rad/s, deformacija (γ) je

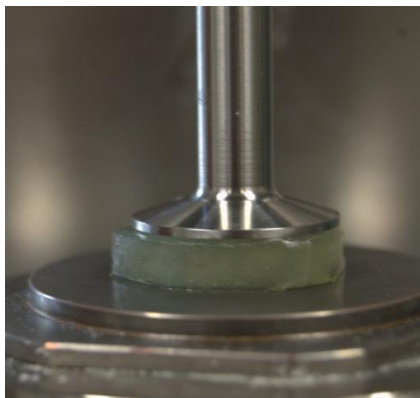
bila 0,1%. Vse vzorce smo merili pod enakimi pogoji, da smo lahko nato primerjali rezultate. Pri frekvenčnem testu smo merili spreminjaje elastičnega (G') in plastičnega (G'') modula.

3.3.4. Vrednotenje reoloških lastnosti hidrogelov po zamrzovanju

Hidrogele smo nalili približno v enako debeli plasti v enake petrijevke ter zamrznili za 24h ter jih nato odtajali približno 4hin jihovrednotili (Slika 17A). Enako smo ponovili pri 2x in 3x zamrznjenihhidrogelih (Slika 17B in C). Hidrogelom smo pomerili reološke lastnosti na reometru Physica MCR 301 (Slika 4) s sistemom ploščica-ploščica s premerom 25mm(Slika 18). Pri teh hidrogelih smo morali poleg ostalih nastavitev nastaviti tudi debelino gela, ki smo ga predhodno izmerili z ravnilom. Tudi tu smo odvečen gel odstranili pred začetkov meritve. Pri teh hidrogelih smo z amplitudnim testomdoločili LVE in znotraj tega še frekvenčni test. Pogoji pri amplitudnem in frekvenčnem testu so bili enaki kot pri vrednoteju hidrogelov s sistemom stožec-ploščica.



Slika 17: Fotografija vzorcev PVA hidrogelov po različnih ciklih zamrzovanja:1x (A), 2x (B) in 3x (C) zamrznjen gel z levofloksacinom



Slika 18: Merjenje reoloških lastnosti zamrznjenih gelov s sistemom ploščica – ploščica

3.3.5. Priprava fosfatnega pufra s pH 7,4 (PBS)

Za fosfatni puffer (PBS) smo zatehtali 0,2 g KCl, 0,24 g KH_2PO_4 , 1,44 g Na_2HPO_4 in 8 g NaCl ter kvantitativno prenesli v 1000 ml bučko. Solem smo dodali približno 800 ml bidestilirane vode ter mešali na magnetnem mešalu, da so se soli raztopile. Raztopino smo z 1M NaOH in 1M HCl umerili na pH 7,4. Na koncu smo dodali še preostalo vodo do 1000 ml.

3.3.6. Umeritvena premica levofloksacina

Raztopine za določitev umeritvene premice smo pripravili v dveh serijah. Na analitski tehtnici smo natehtali približno natančno 50 mg levofloksacina in ga raztopili v 100 ml PBS ter tako dobili koncentracijo 0,5 mg/ml. Nato smo to raztopino ustrezno redčili, da smo dobili koncentracije v tabeli in narisali umeritveno premico.

Tabela II: redčitve levofloksacina za umeritveno premico

c (mg/g)	redčitev (x ml/y ml)	redčitev	c ₁ (mg/g)	c ₂ (mg/g)
0,5			0,505	0,503
0,0125	2,5/100	0,025	0,012625	0,012575
0,01	1/50	0,02	0,0101	0,01006
0,008	4/250	0,016	0,00808	0,008048
0,006	3/250	0,012	0,00606	0,006036
0,005	10/100,10/100	0,01	0,00505	0,00503
0,0025	25/50	0,5	0,002525	0,002515

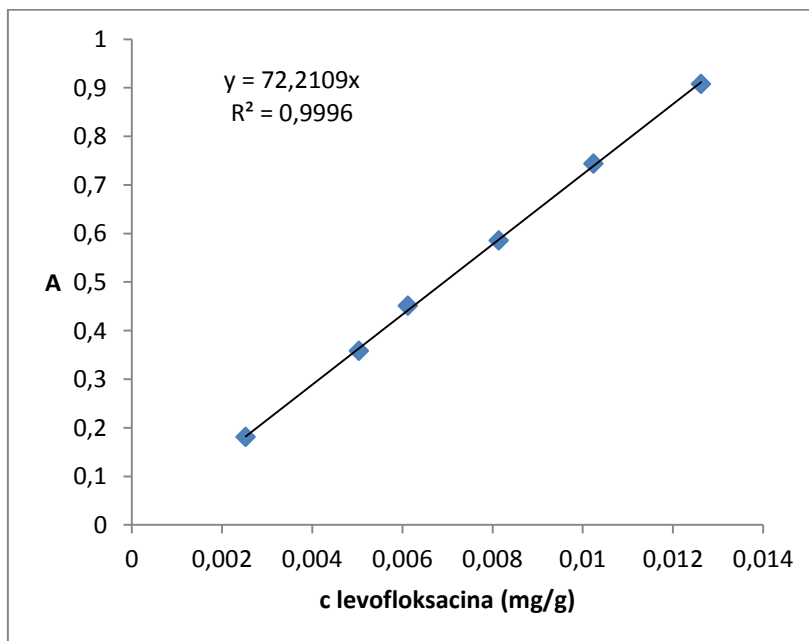
Začetni raztopini (0,5 mg/g) smo pomerili absorpcijski spekter, s katerega smo odčitali absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 287 nm, pri kateri smo nato merili raztopine za določitev umeritvene premice in vzorce homogenosti ter sproščanja učinkovine iz hidrogela.

Enačba umeritvene premice (Enačba 7):

$$A = 72,2109 \cdot c \rightarrow c = \frac{A}{72,2109}$$

Enačba 7

$$R^2 = 0,9996$$



Slika 19: Umeritvena premica za raztopino levofloksacina (A-absorbanca, c- koncentracija)

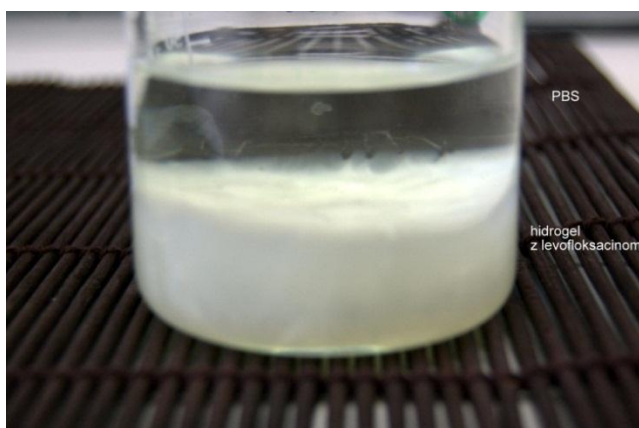
3.3.7. Homogenost porazdelitve levofloksacina po celotnem hidrogelu

Enakomernost porazdelitve levofloksacina po celotnem gelu smo preverili z odvzemom vzorcev iz 3 različnih delov čaše in sicer iz dna čaše, iz sredine in iz vrha. Zatehtali smo približno 1 g gela v 200 ml bučko ter dopolnili s PBS do oznake. Bučke smo dali za nekaj minut v ultrazvočno kadičko, da se je gel popolnoma raztopil v pufru, nato pa smo to raztopino redčili v razmerju 1/10 s PBS. Danim raztopinam smo izmerili A in iz umeritvene premice izračunali koncentracijo levofloksacina v različnih delih vzorca.

3.3.8. Sproščanje levofloksacina iz PVA

3.3.8.1. *Razvoj modela za izvedbo sproščanja levofloksacina*

Gel smo razdelili na približno 3 enake dele. Na vsak del smo dolili pufer in sicer razmerje m hidrogela/m pufru je bil vedno 1:2, torej na 20 g gela smo nalili 40 g pufru, s čimer smo zagotovili sink pogoje in iz njega jemali 5 ml vzorcez avtomatsko pipeto. Vzorce smo odvezemali ob določenih časovnih intervalih. Vsak odvzet volumen vzorca smo nadomestili s PBS ter tako ohranjali sink pogoje, da ni prišlo do nasičenja, s tem smo simulirali pogoje v in vivo, kjer našo učinkovino na rani odplavlja. Vzorce smo po potrebi redčili in nato pomerili njihovo absorbanco na UV-VIS spektrofotometru. Spektrofotometer nam je na podlagi umeritvene premice izračunal koncentracijo sproščene učinkovine. Vsako sproščanje smo izvajali v treh paralelkah.

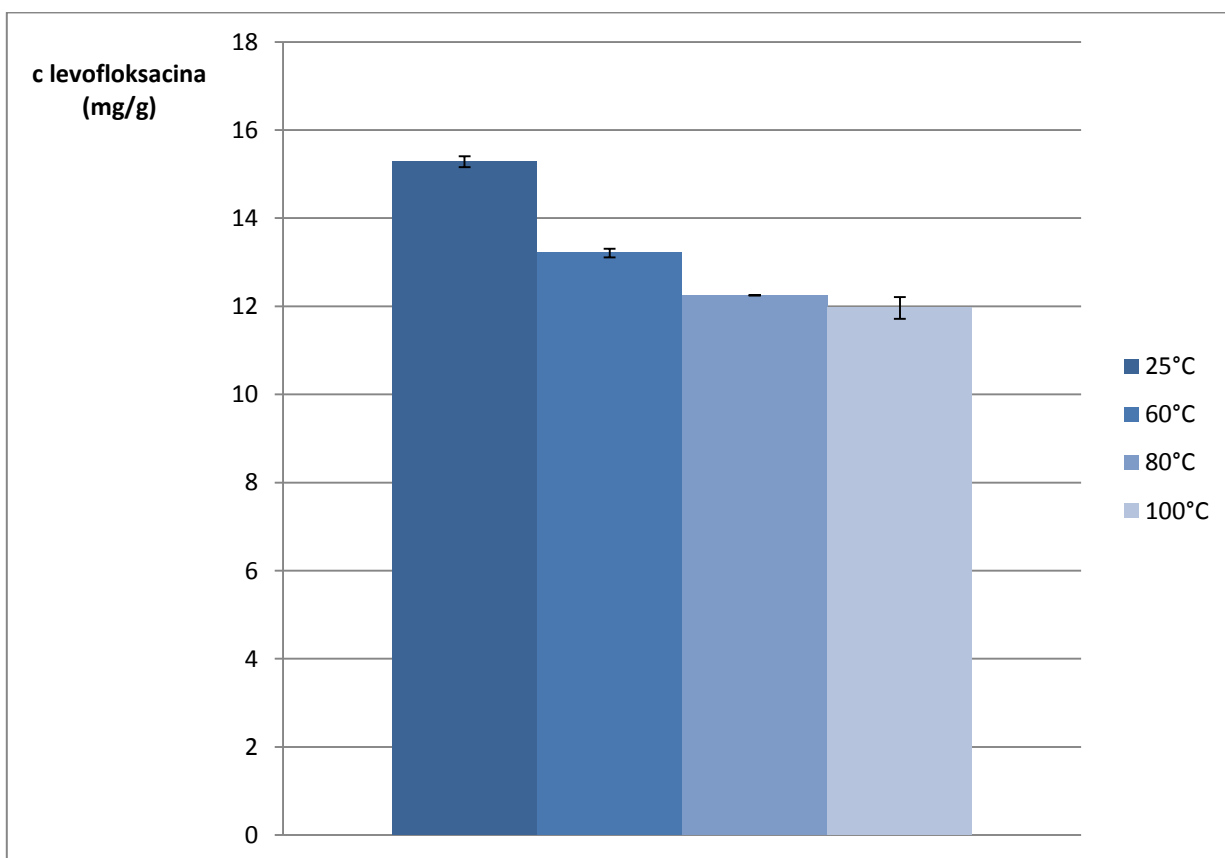


Slika 20: Sproščanje levofloksacina iz zamrznjenega gela

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. STABILNOST LEVOFLOKSACINA PRI POVIŠANI TEMPERATURI

Ker PVA pri sobni temperaturi v vodi ni topen, smo za pripravo hidrogelov razopino morali segreti na temperaturo nad 80°C, zato smo preverili tudi, kaj se dogaja s segrevanjem levofloksacina. Ker njegova koncentracija z višanjem temperature pada (Slika 21) smo se odločili, da bomo levofloksacin dodali gelu pri sobni temperaturi.



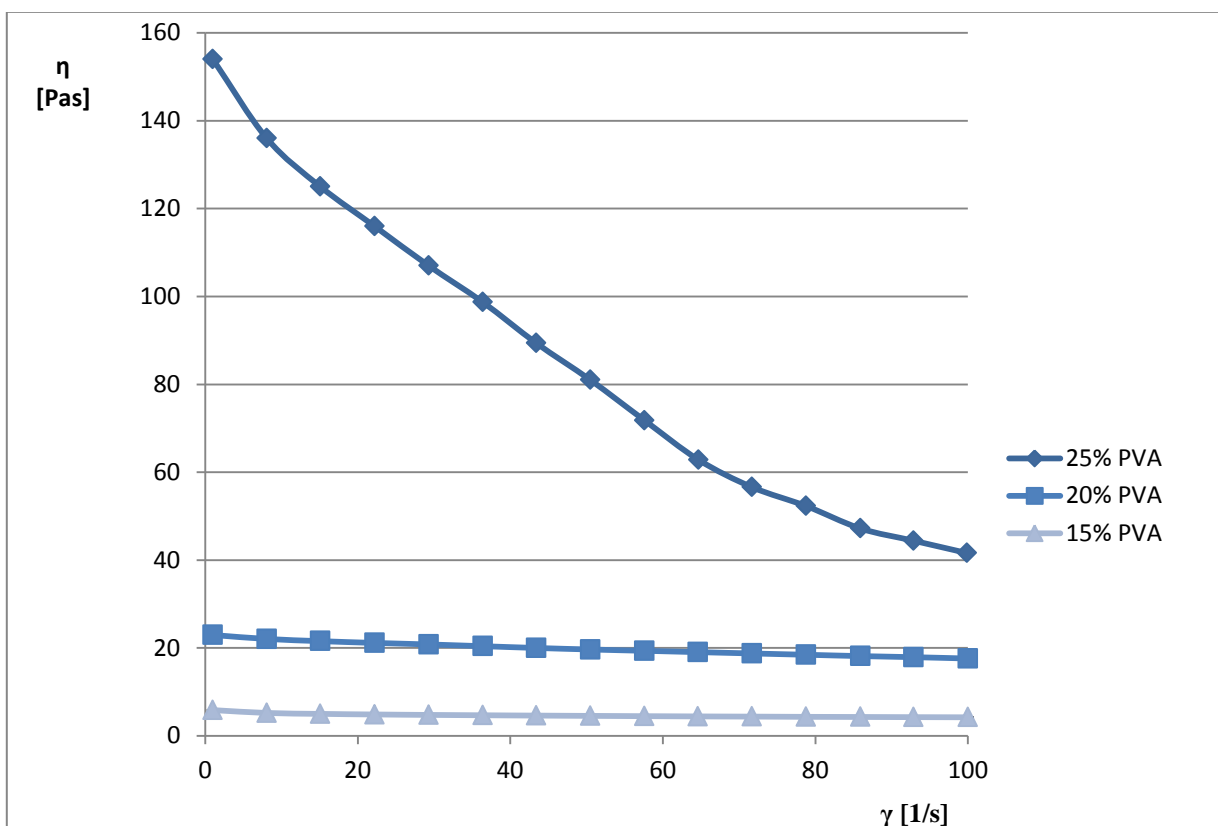
Slika 21: Koncentracija levofloksacina v vodi po 30 minutah segrevanja pri različnih temperaturah. Teoretična koncentracija je bila 15 mg/g.

4.2. REOLOŠKO VREDNOTENJE POLIMERNIH DISPERZIJ

4.2.1. Rotacijsko vrednotenje viskoznosti

4.2.1.1. Viskoznost pri različnih koncentracijah PVA

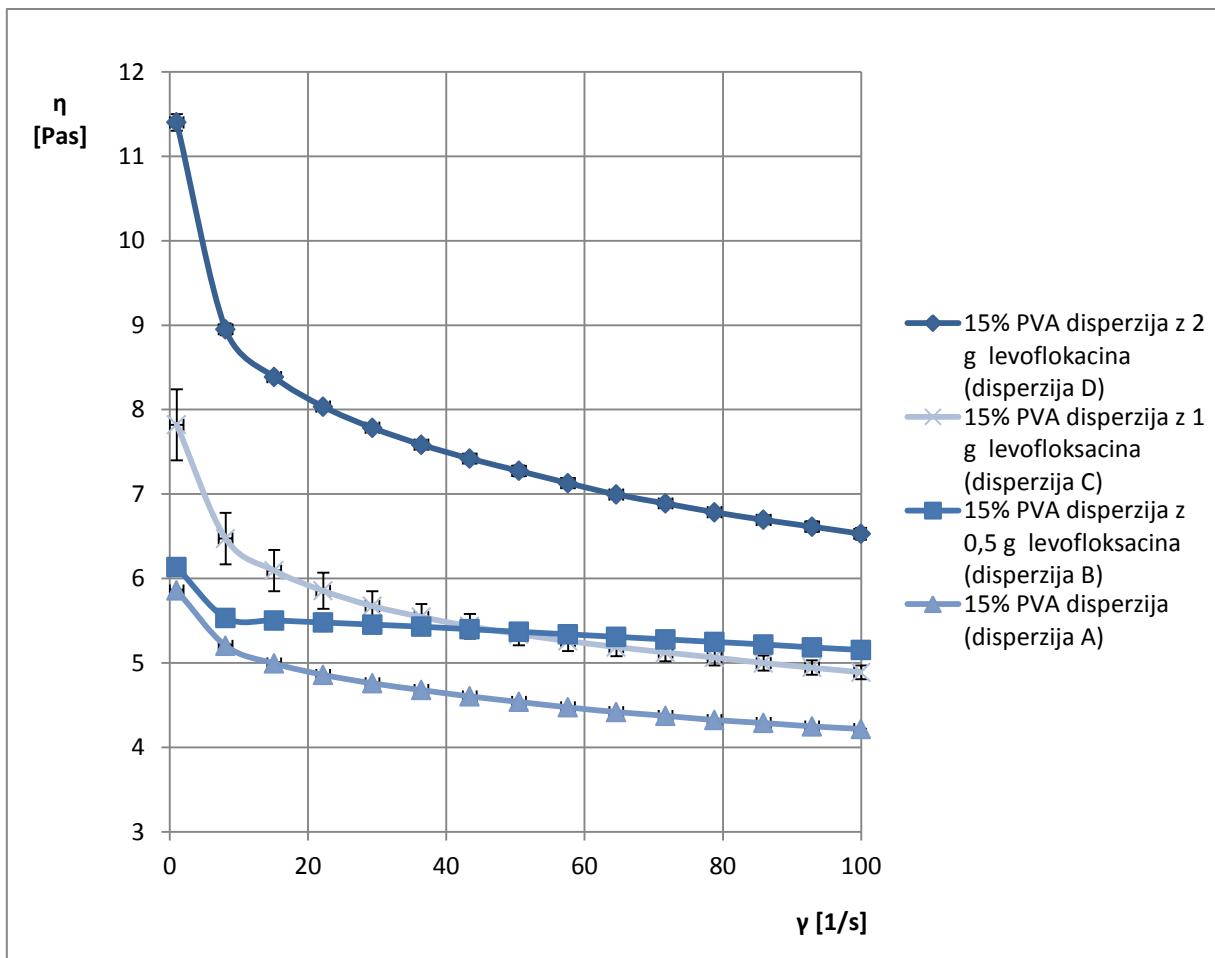
S klasično rotacijsko viskozimetrijo smo pomerili viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti s sistemom stožec– ploščica (Slika 22). S tem smo izmerili viskoznost različno koncentriranih PVA disperzij in spremljali, kako se viskoznost povečuje z večanjem koncentracije PVA. Viskoznost 15% PVA je najnižja, sledi η 20% PVA in nato 25% PVA. Ko koncentracijo PVA povečamo za 5% se η disperzij poveča za faktor 10. Odvisnost viskoznosti (η) od strižne hitrosti (γ) je zelo majhna za 15% in 20% disperzije, zato bi lahko sklepali, da gre za Newtonske tekočine, saj izkazujejo konstantno η neodvisno od γ . 25% sistem pa je že psevdoplastičen, saj η enakomerno upada in doseže neko konstantno vrednost pri visoki γ .



Slika 22: Viskoznost 15%, 20% in 25% PVA disperzij

4.2.1.2. Viskoznost disperzije z dodanim levofloksacinom

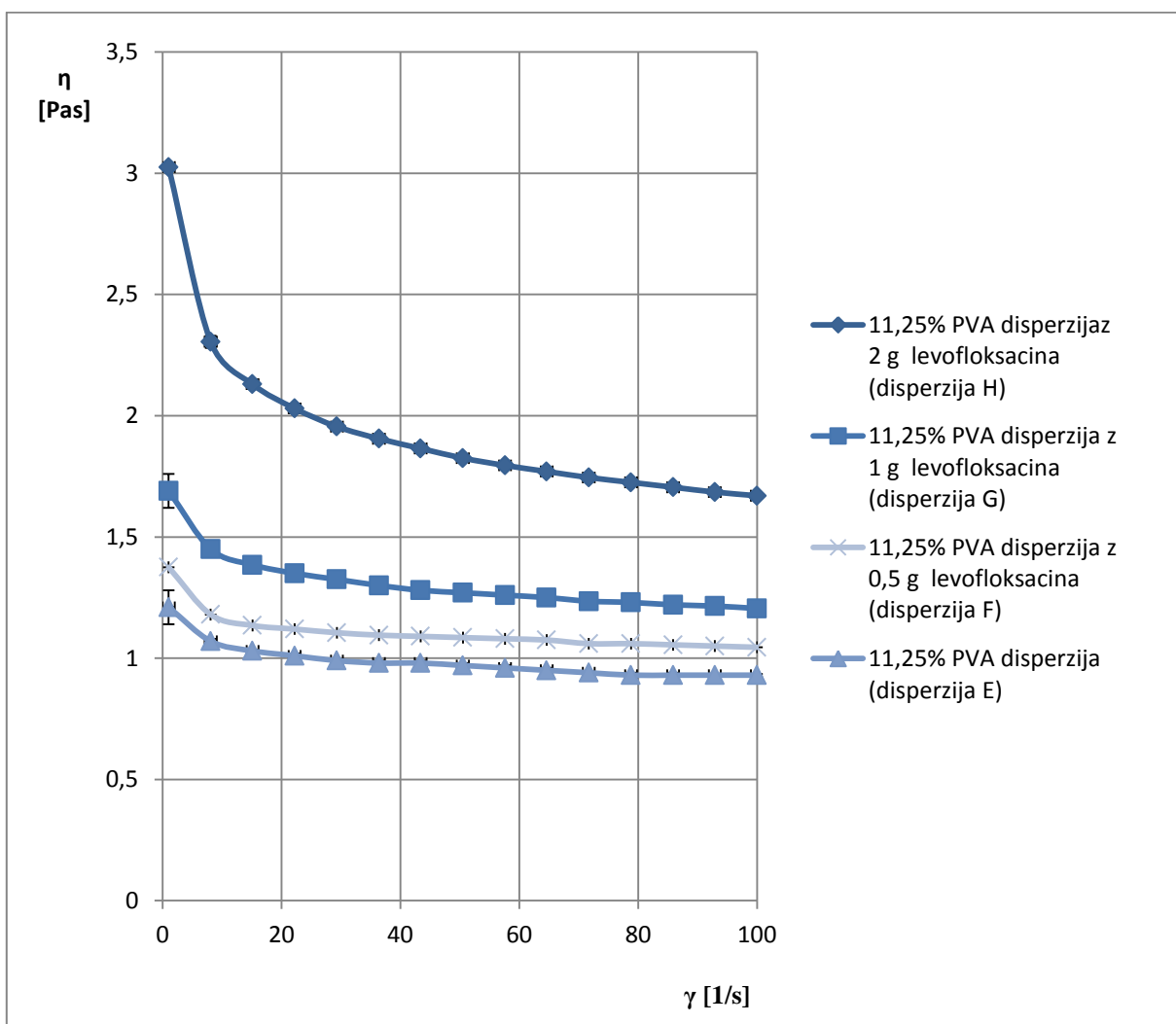
Dodatek levofloksacina k disperziji vpliva na viskoznost le-te, saj jo poveča (Slika 23). Pri 15% PVA se ob dodatku 0,5 g levofloksacina η disperzije glede na η osnovne disperzije poveča za 1 Pas. Po dodatku 1 g levofloksacina je η višja za 2 Pas glede na osnovno disperzijo brez učinkovine. Po dodatki 2 g levofloksacina pa se η glede na osnovno disperzijo poveča za 6 Pas. Iz grafa (Slika 23) lahko sklepamo, da imamo pri 15% PVA disperzij in 15% PVA disperzij z 0,5 g levofloksacina Newtonsko tekočino, pri 15% PVA disperziji z 1 g levofloksacina in 15% PVA disperziji z 2 g levofloksacina pa psevdoplastičen sistem.



Slika 23: Viskoznost 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina in 15% PVA disperzije z 3% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

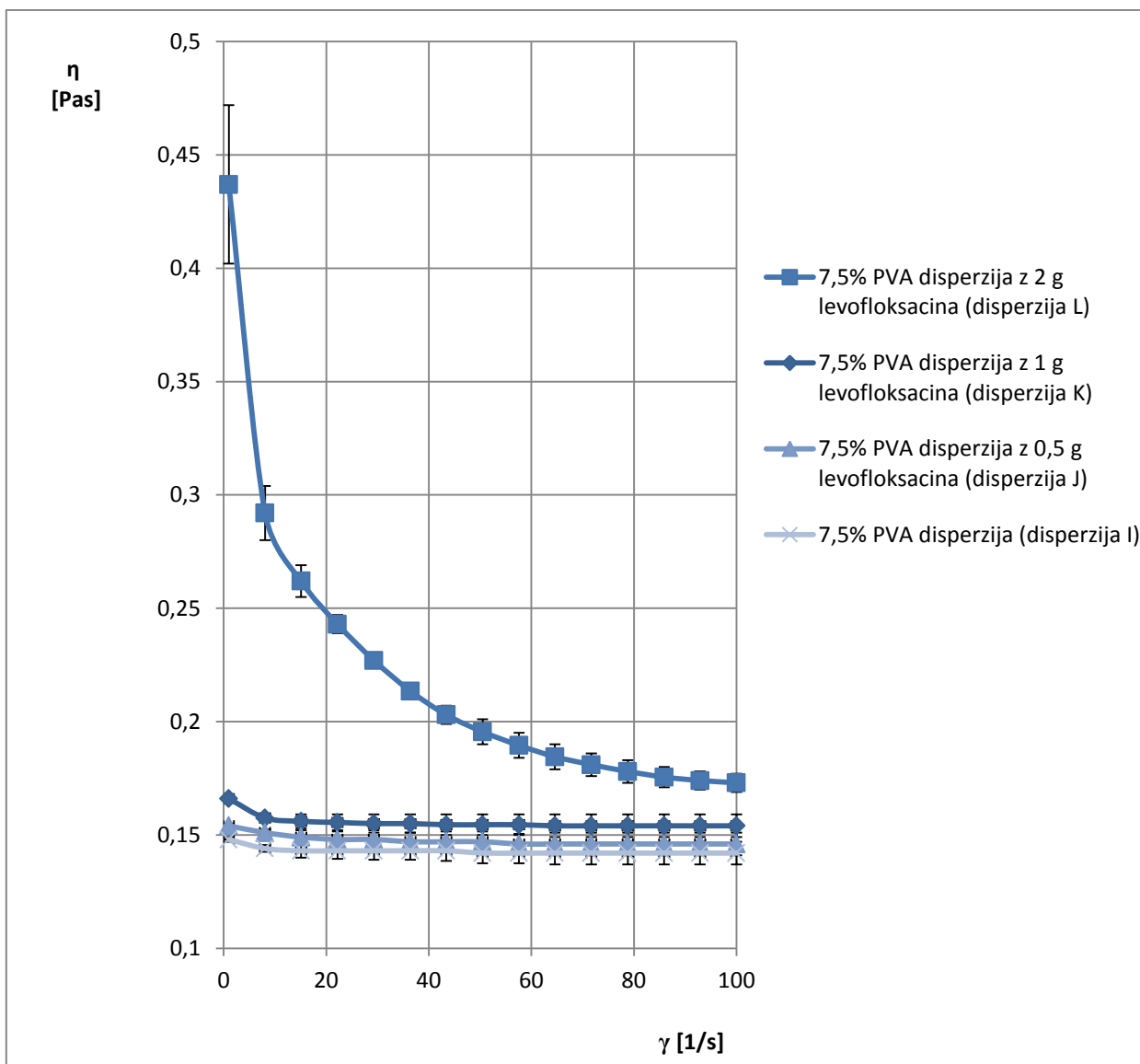
Viskoznost 11,25% disperzije je precej nižja od 15% disperzije (Slika 23, Slika 24). Pri 11,25% PVA disperziji je η 1,21 Pas, pri 15% PVA disperziji pa 5,86 Pas pri $\gamma = 0$ 1/s.

Z povečevanjem koncentracije levofloksacina v 11,25% PVA disperziji η narašča (Slika 24). Po dodatku 0,5 g levofloksacina v disperzijo je η 1,375 Pas, po dodatku 1 g levofloksacina pa 1,69 Pas. Večja sprememba je po dodatku 2 g levofloksacina saj je η 3,025 Pas. Tudi pri 11,25% PVA disperziji z 2 g levofloksacina lahko sklepamo, da gre za psevdoplastičen sistem, pri ostalih sistemih pa za Newtonsko tekočino, saj so η bolj ali manj neodvisne od spreminjanja γ .



Slika 24: Viskoznost 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 11,25% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

Viskoznost 7,5% PVA disperzije (Slika 25) (0,148 Pas) je 10x nižja od η 11,25% PVA disperzije. Med osnovno disperzijo (7,5% PVA disperzija), 7,5% PVA disperzijo z 0,5 g levofloksacina ter 7,5% PVA disperzijo z 1 g levofloksacina so razlike v η zelo majhne. Pri 7,5% PVA disperziji z 2 g levofloksacina se η dvigne na 0,437 Pas. Po dodanih 2 g levofloksacina lahko glede na obliko grafa (Slika 25) sklepamo na psevdoplastičen sistem, pri ostalih pa na Newtonsko tekčino.



Slika 25: Viskoznost 7,5% PVA disperzije, 7,5% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 7,5% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 7,5% PVA disperzije z 2 g levofloksacina Sestava je podana v Tabeli I.

Iz Tabele III lahko razberemo kako se spreminja η s spreminjanjem sestave disperzije. 15% PVA disperzija ima nižjo η kot 15% PVA disperzija z dodanim levofloksacinom. Več kot je dodanega levofloksacina višja je η . Največji skok v η je pri 15% PVA disperziji z 2 g levofloksacina, saj je η glede na osnovno 15% PVA disperzijo višja skoraj za 2x oziroma za 6 Pas. Sorazmerno glede na manjšo η 11,25% PVA disperzije in 7,5% PVA disperzije v primerjavi z 15% PVA disperzijo so tudi η 11,25% PVA disperzij z levofloksacinom in 7,5% PVA disperzij z levofloksacinom nižje od primerljivih 15% PVA disperzij z levofloksacinom. Skoki v η ob dodatku učinkovine pa so podobni.

Viskoznost se v vseh primerih najverjetneje poveča zato ker ima raztopina levofloksacina večjo η kot sam PVA, poleg tega pa to večanje povzročijo tudi večje interakcije med hidrofilnimi skupinami levofloksacina in PVA.

Tabela III: Primerjava viskoznosti pri strižni hitrosti 0,1 za 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina, 15% PVA disperzije z 3% levofloksacina, 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 3% levofloksacina, 7,5% PVA disperzije, 7,5% PVA disperzije z 0,75% levofloksacina, 7,5% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina in 7,5% PVA disperzije z 3% levofloksacina.

	D	C	B	A	H	G	F	E	L	K	J	I
% PVA	15%				11,25%				7,5%			
% uč.	3	1,5	0,75	0	3	1,5	0,75	0	3	1,5	0,75	0
η [Pas]	11,5	8,24	6,135	5,86	3,025	1,69	1,375	1,21	0,437	0,166	0,154	0,148

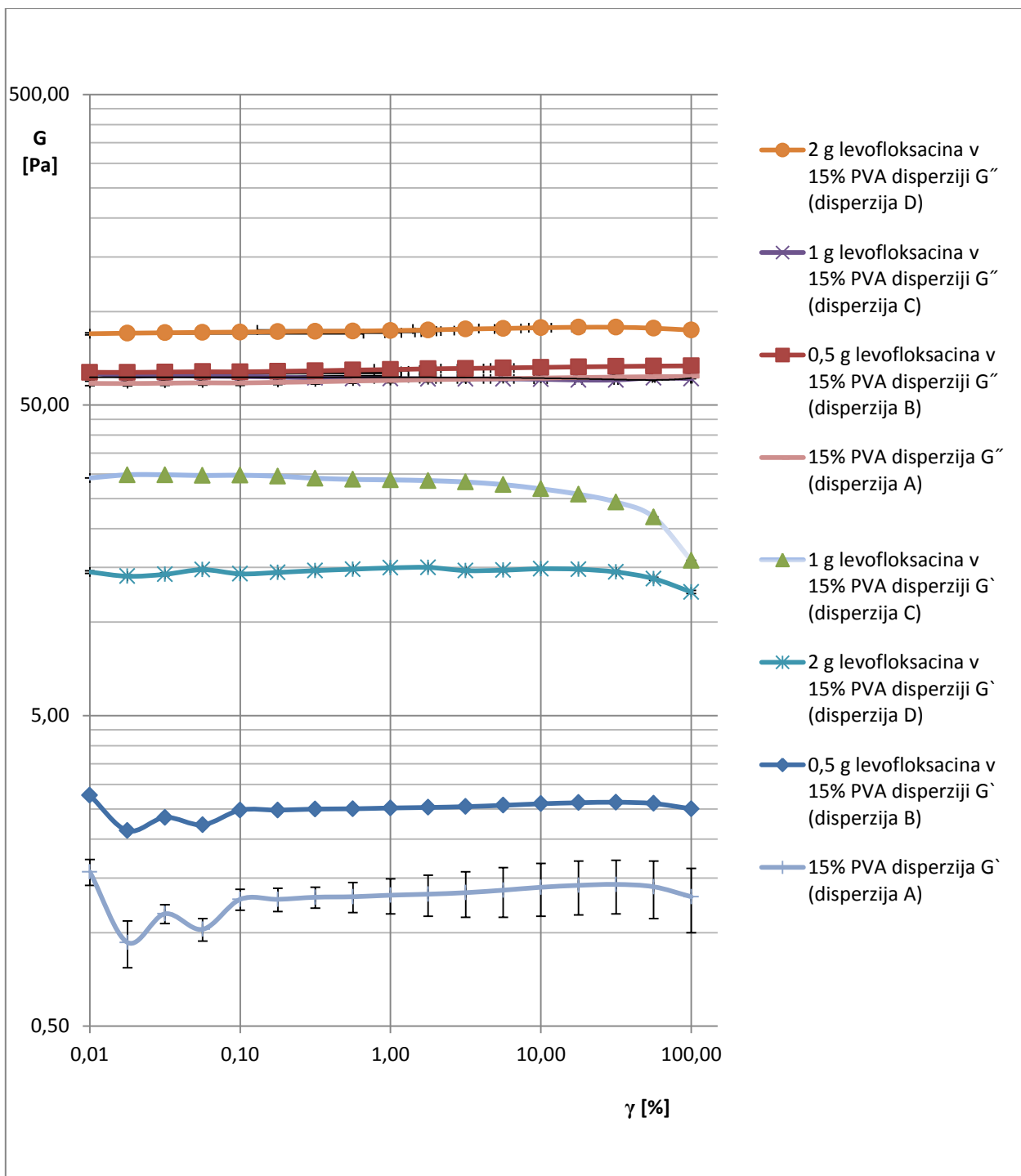
4.2.2. Oscilatorni testi

Z oscilacijsko reometrijo smo pogledali, kakšna je notranja struktura pripravljenih vzorcev, in ali lahko samo s povečevanjem koncentracije viskozne disperzije tvorimo tridimenzionalne strukture. V nasprotnem primeru potrebujemo dodaten faktor, ki sproži povezovanje in urejanje v hidrogelsko strukturo.

4.2.2.1. *Amplitudni test*

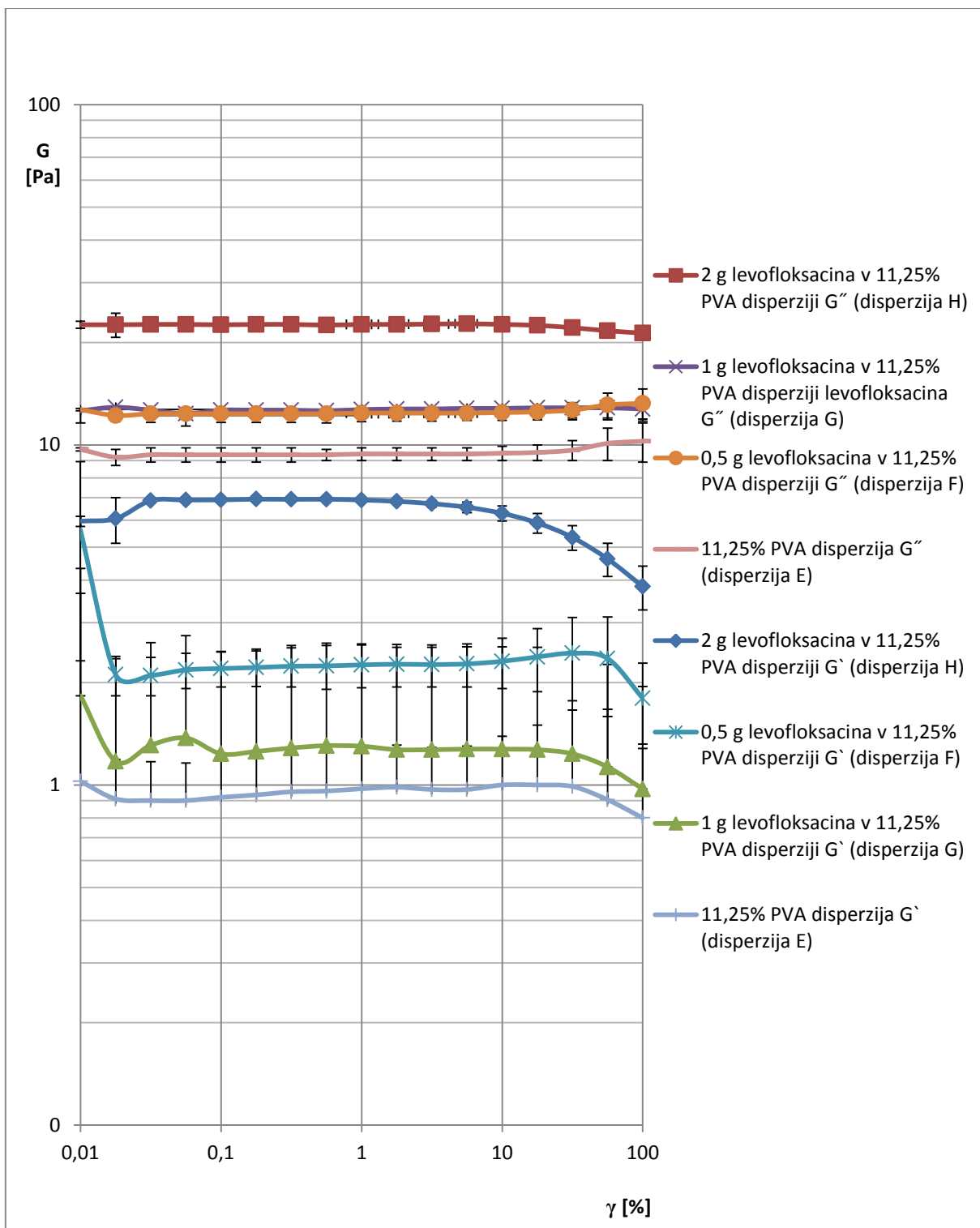
Z amplitudnim testom smo določili LVE. G' in G'' sta bila linearna skozi celotno amplitudno območje. Določili smo strižno deformacijo, znotraj LVE, pri kateri smo začeli meriti frekvenčne teste, to je 0,1%. Pri vseh pripravljenih disperzijah, ne glede na koncentracijo PVA ter koncentracijo levofloksacina je G'' nad G' . To pomeni, da je kljub visoki viskoznosti naš disperzni sistem še vedno koloidna raztopina. Samo povečevanje koncentracije PVA v raztopini polimernih verig ne približa toliko, da bi se le-te povezale in nastale urejene tridimenzionalne strukture. Na slikah (Slika 26, Slika 27) vidimo, da s povečevanjem koncentracije polimera ali učinkovine ne moremo povzročiti povezovanja polimernih verig.

G' in G'' se povečata ob dodatku levofloksacina v disperzijo (Slika 26). Pri 15 % PVA disperziji se po dodatku 0,5 g in 1 g levofloksacina G' poviša tudi za 30x (1g levofloksacina) glede na G' osnovne disperzije, G'' pa se spremeni za največ 5 Pa (Slika 26). G' pri disperziji z 2 g levofloksacina je presenetljivo nekoliko nižji kot G' pri disperziji z 1 g levofloksacina. G'' disperzije z 2 g levofloksacina je za 1,5x višji od G'' disperzije z 0,5 g levofloksacina (Slika 26). Iz tega lahko sklepamo, da na plastičnost disperzije vpliva večji dodatek levofloksacina, vendar pa so ti vplivi bisveno manjši kot je občutljivost G' , na katerega vpliva vsaka sprememba v sestavi disperzije.



Slika 26: Amplitudni test 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

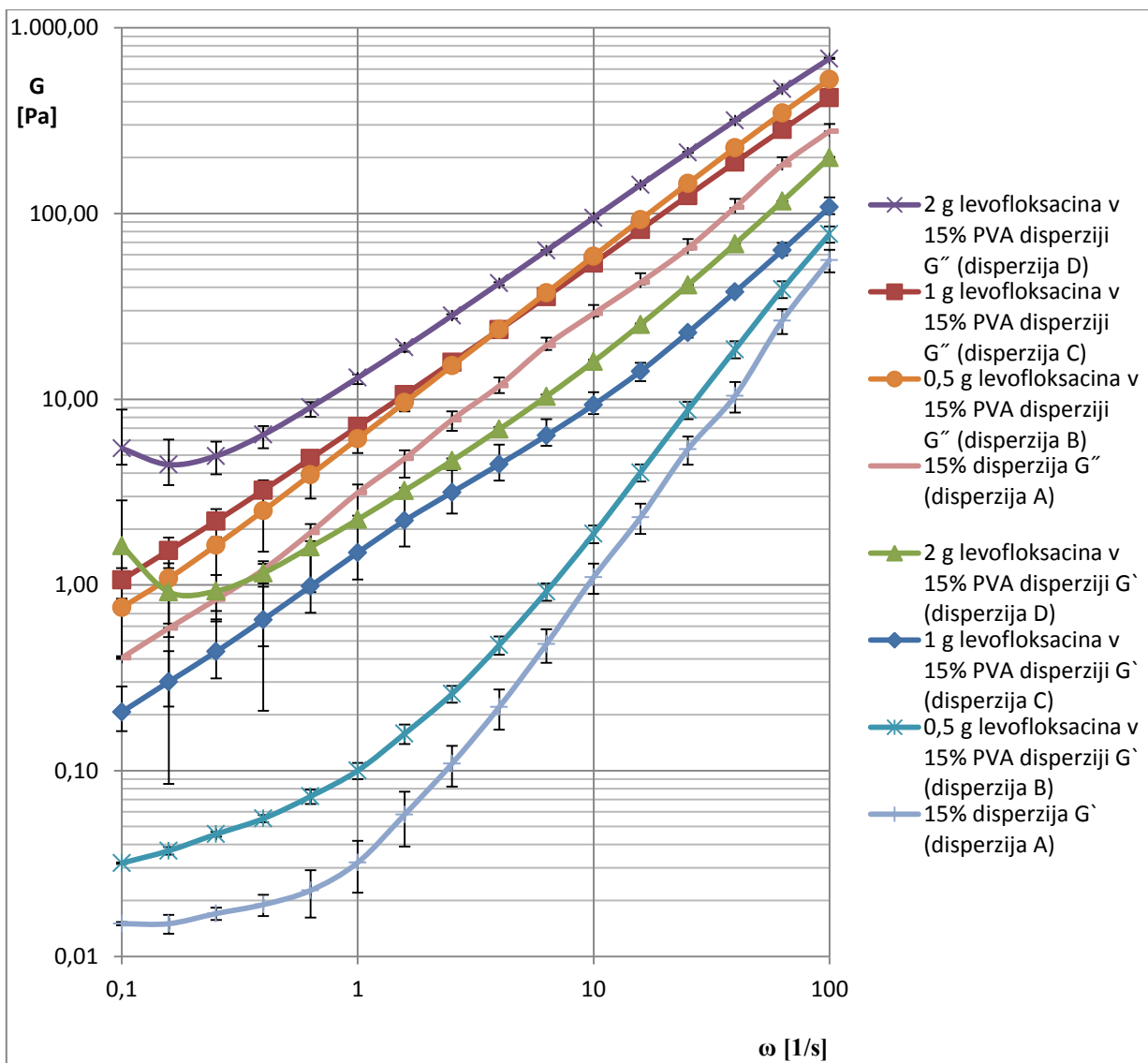
Pri 11,25 % PVA disperziji (Slika 27) se G' in G'' z dodajanjem levofloksacina disperziji povečujeta glede na osnovno disperzijo. G' z 0,5 g in 1 g levofloksacina so višji za 2x glede na vrednosti G' osnovne disperzije, disperzije z 2 g levofloksacina pa za 6x. G' disperzije z 1 g levofloksacina je nižji od G' disperzije z 0,5 g levofloksacina, kar je v nasprotju s pričakovanji. Iz tega lahko sklepamo, da dodatek levofloksacina v manjši količini ne vpliva toliko na elastičnost disperzije pri manj koncentrirani disperziji (11,25%) v primerjavi z 15% PVA disperzijo. G'' disperzij z levofloksacinom so višje glede na G'' osnovne 11,25% PVA disperzije. Razlike v G'' med osnovno disperzijo in disperzijama z 0,5 g in 1 g levofloksacina niso znatne, medtem ko so vrednosti G'' disperzije z 2 g levofloksacina približno 2x višje od disperzije brez učinkovine. Iz teh meritev lahko sklepamo, da dodatek levofloksacina v večji količini močno vpliva na plastičnost, na elastičnost pa tako kot v primeru 15% PVA vpliva vsak dodatek učinkovine.



Slika 27: Amplitudni test 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

4.2.2.2. Frekvenčni test

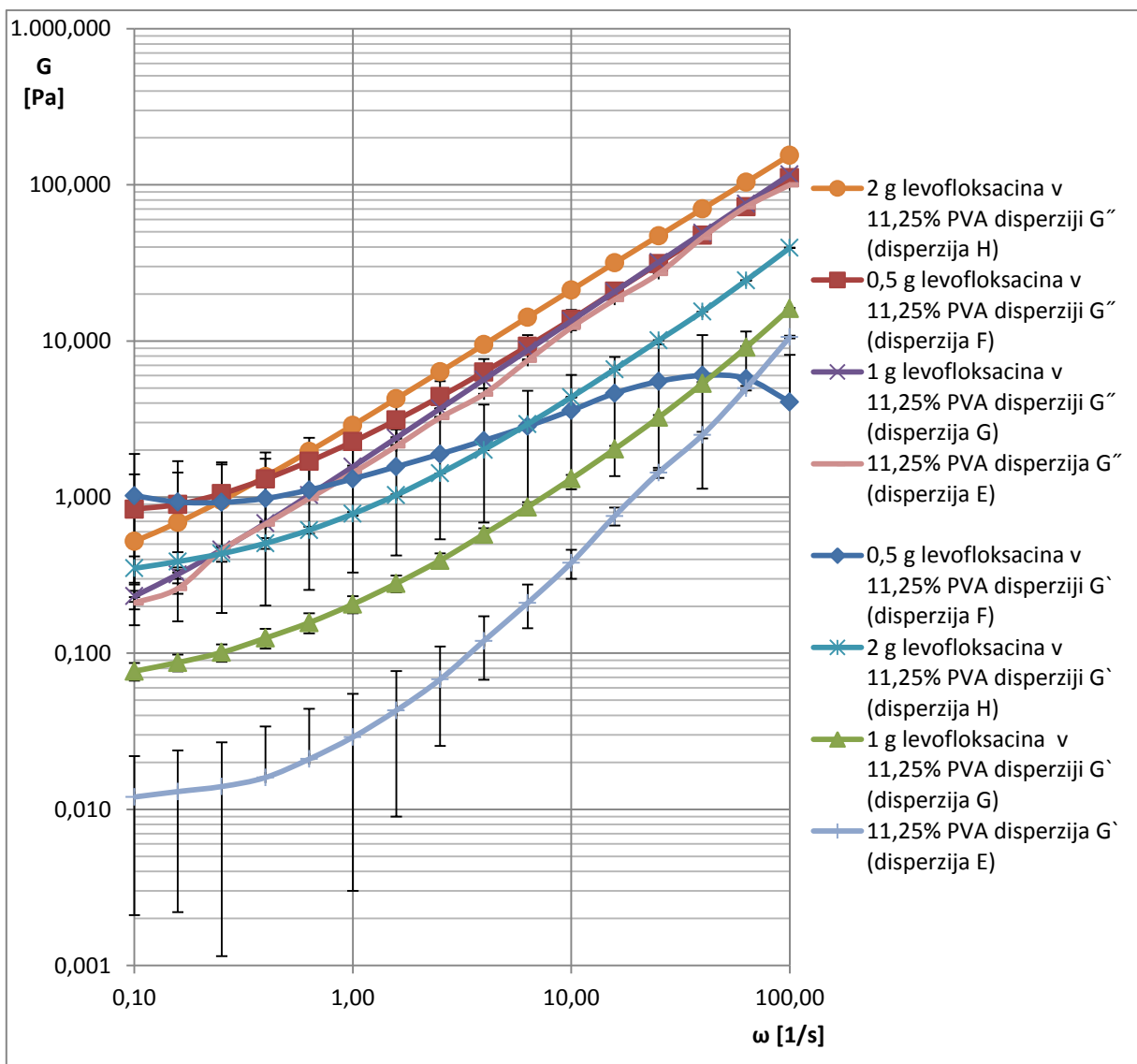
Iz grafa za frekvenčno odvisnost dinamičnih modulov 15% PVA disperzije (Slika 28) vidimo razlike v odzivu na delovanje strižne deformacije. Tako G' kot G'' 15% PVA disperzije (Slika 28) z naraščanjem ω naraščata približno vzporedno. G'' je nad G' , kar pomeni, da imamo zelo viskozno disperzijo. Nikjer v območju merjenja ni prišlo do prekrivanja teh dveh krivulj, zato ne moremo govoriti o disperziji s prepletenimi polimernimi verigami. Morda bi ob prekrivanju prišlo do višjih ω . Po dodatku levofloksacina v disperzijo se je tako G' kot G'' povišal glede na osnovno disperzijo. G' se je z več dodanega levofloksacina bolj povišal kot G'' . Po dodatku 0,5 g levofloksacina v disperzijo se vrednosti G' in G'' 2x povišajo v primerjavi z osnovno disperzijo. G' pri disperziji z 2 g levofloksacina se je povišal za 40x, G'' pa za 5x glede na osnovno disperzijo. G' disperzij z 0,5 g in 1 g levofloksacina se razlikuje za faktor 15, G'' disperzije z 0,5 g levofloksacina je zelo podoben G'' disperzije z 1 g levofloksacina. Ko še povečamo koncentracijo levofloksacina v disperziji, iz 15 mg/g na 30 mg/g, se je G' spremenil le za 1 Pa oziroma 1,5x, G'' pa se poviša za 2x. Sklepamo lahko, da dodatek levofloksacina osnovni disperziji zelo poveča elastičnost, manjši, skoraj zanemarljiv vpliv pa je na plastičnost disperzije. To velja do neke mejne koncentracije učinkovine v disperziji (1,5%), saj se tudi vrednost G' počasi ustali oziroma manj povečuje (Slika 28).



Slika 28: Frekvenčni test 15% PVA disperzije, 15% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

Pri 11,25% PVA disperziji (Slika 29) je frekvenčna odvisnost dinamičnih modulov podobna frekvenčni odvisnosti 15% PVA disperzij (Slika 28). G' in G'' osnovne 11,25% PVA disperzije je tudi tu dokaj vzporedna, vrednosti pa so sorazmerno nižje kot pri 15% PVA disperziji. G' se z dodajanjem levofloksacina povečuje, tudi za 45x. Vrednost G' disperzije z 0,5 g levofloksacina je višja od G' disperzij z 1 g in 2 g levofloksacina. Iz tega lahko sklepamo, da se pri manj koncentrirani disperziji elastičnost zelo poveča že ob majhnem dodatku

levofloksacina. G'' se zelo malo razlikujejo med disperzijami z različno vsebnostjo levofloksacina, največ za faktor 2. Pri tej koncentraciji PVA disperzije z dodajanjem levofloksacina zelo vplivamo na elastičnost, na plastičnost pa z dodajanjem učinkovine minimalnovplivamo. Ugotovili smo, da višanje koncentracija PVA, pa tudi dodatek levofloksacina ne pripomore k tvorbi čvrste gelske strukture. Zato smo za nadaljne poskuse uporabili disperzijo C.



Slika 29: Frekvenčni test 11,25% PVA disperzije, 11,25% PVA disperzije z 0,5 g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 1 g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 2 g levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

4.3. VREDNOTENJE HIDROGELOV NAREJENIH Z ZAMRZOVANJEM Z OSCILACIJSKO REOMETRIJO

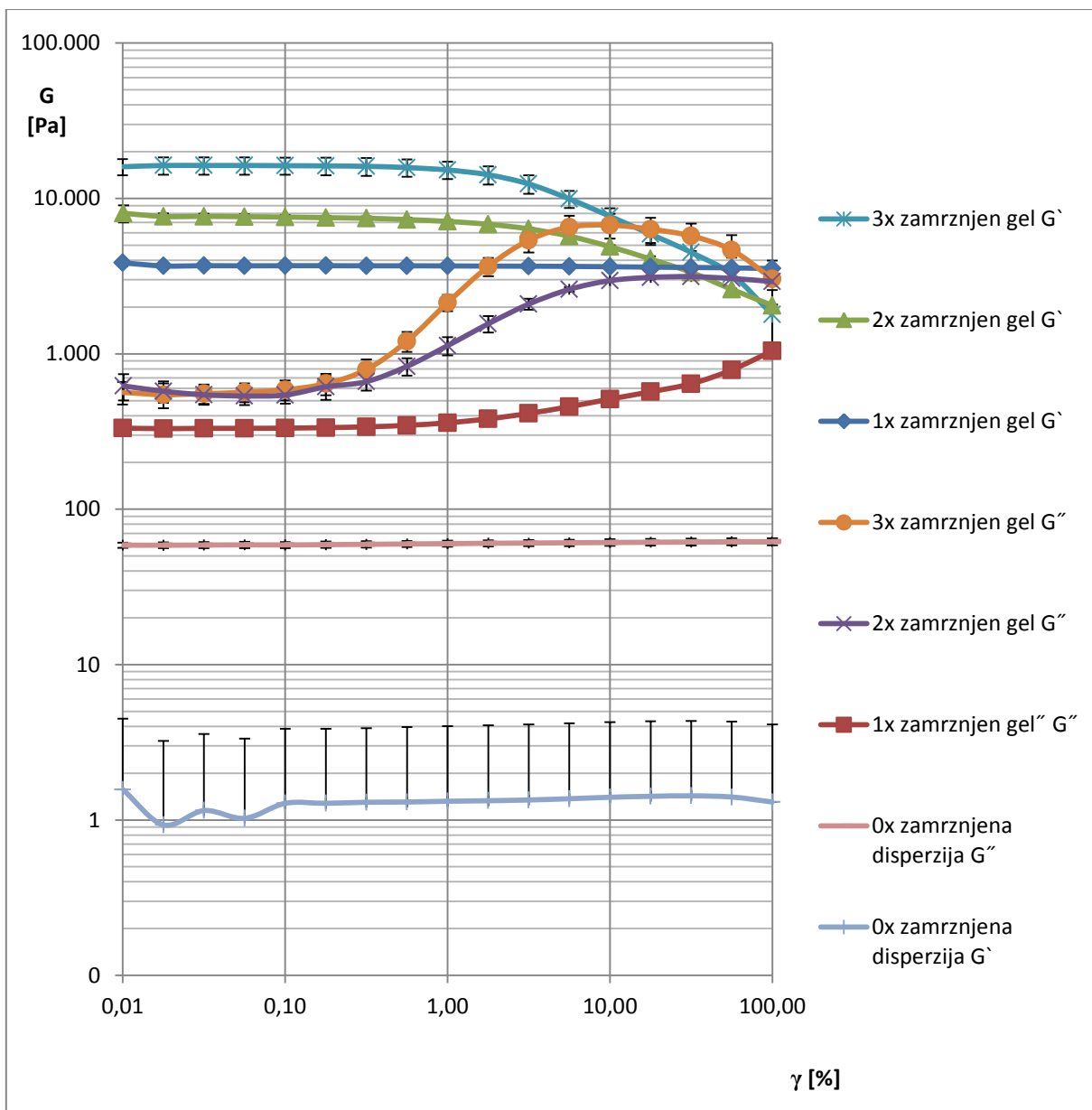
4.3.1. Reološko vrednotenje 15% PVA z 1,5% levofloksacina pripravljene z večkratnimi 24 h cikli zamrzovanja in odtajanja

Da zamrzovanje vpliva na strukturo samega gela smo videli že pri prvem vzorcu, ki smo ga zamrznili za 1 cikel (24 ur). Število ciklov smo še povečali ter videli, kako se sama struktura gela spreminja. Že s prostim očesom in na otip smo videli, da je gel vedno bolj čvrst. Vse to pa smo nato še potrdili z oscilacijskimi testi.

4.3.1.1. *Amplitudni test*

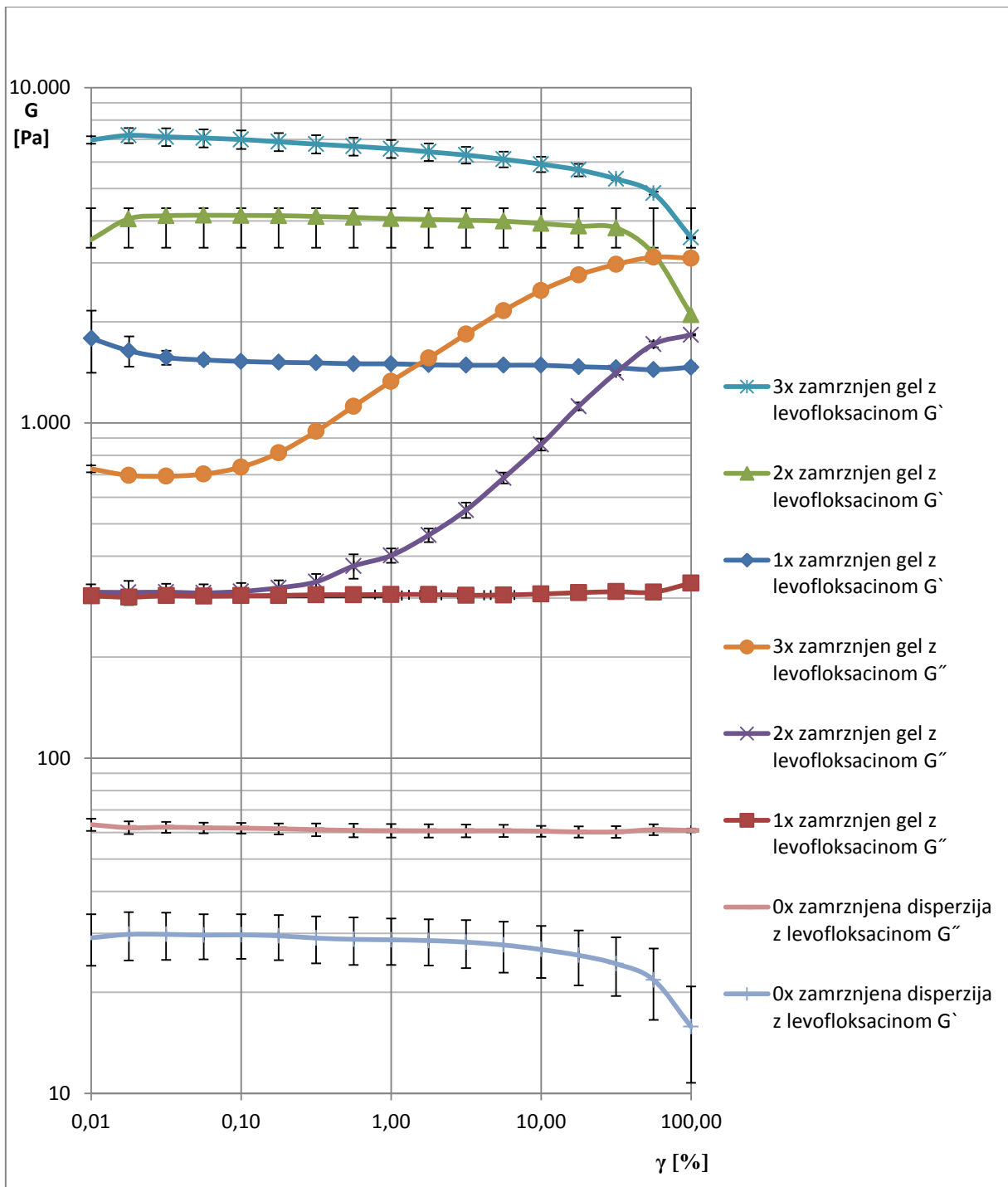
Na vzorcih smo najprej izvedli amplitudni test za določitev LVE. Pri 1x zamrznjenem vzorcu je bil tako G' kot G'' linearen. Ko pa smo pomerili še ostala dva vzorca, ki sta bila 2x oziroma 3x zamrznjena pa je LVE v ožjem območju deformacij in sicer med 0,01 – 1% (Slika 30).

V primerjavi z nezamrznjeno disperzijo so vrednosti G' in G'' pri zamrznjenih hidrogelih višje tudi za 10000x (Slika 30). Pri disperziji je LVE od 0,1 – 100%, pri hidrogelih pa je to le pri 1x zamrznjenem. Pri 2x in 3x zamrznjenem hidrogelu LVE velja le za območje 0,01 – 0,1 1/s, zato smo s frekvenčnim testom pogledali tudi, kaj se dogaja v tem območju. Najpomembnejša razlika med disperzijo in hidrogeli je v odnosu med G' in G'' . Pri netretirani disperziji je G'' nad G' , kar pomeni, da imamo polimerno raztopino. Pri hidrogelih je G' nad G'' kar pomeni, da se je med zamrzovanjem tvorila tridimenzionalna hidrogelska struktura. Iz Slika 30 razberemo, da se z vsakim ciklov vrednost G' in G'' povečuje, torej zamrzovanje vpliva tako na elastičnost kot plastičnost hidrogela. G' 1x zamrznjenega hidrogela je za 250x višji od G' nezamrznjene disperzije, G'' pa za 60x. Vrednosti G' in G'' med posameznimi zamrzovanji rastejo za faktor 2x.



Slika 30: Amplitudni test 15% PVA disperzije in 15% PVAhidrogela po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja. Sestava je podana v Tabeli I.

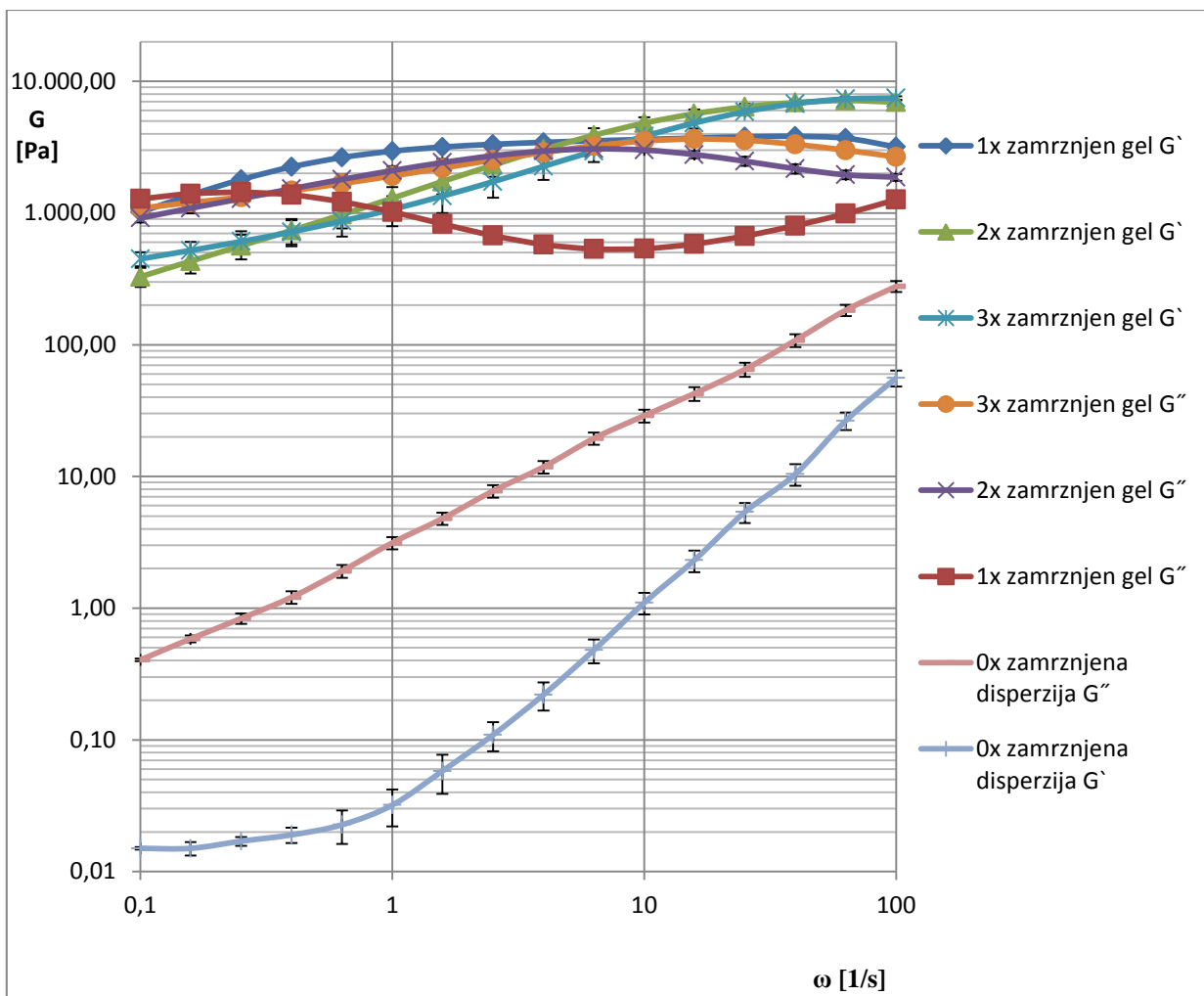
Pri amplitudnem testu 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina (disperzija C) so ugotovili podobno kot za hidrogel brez učinkovine(Slika 31). Tudi pri teh hidrogelih je G' nad G'' , medtem ko pri disperziji z levofloksacinom je G'' nad G' . Vrednost G' nezamrznjene disperzije in G' 3x zamrznjenega hidrogela je 250x višje, G'' pa 20x.



Slika 31: Amplitudni test 15% PVA disperzije in 15% PVA hidrogela z 15 mg/g levofloksacina po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja. Sestava je podana v Tabeli I.

4.3.1.2. Frekvenčni test

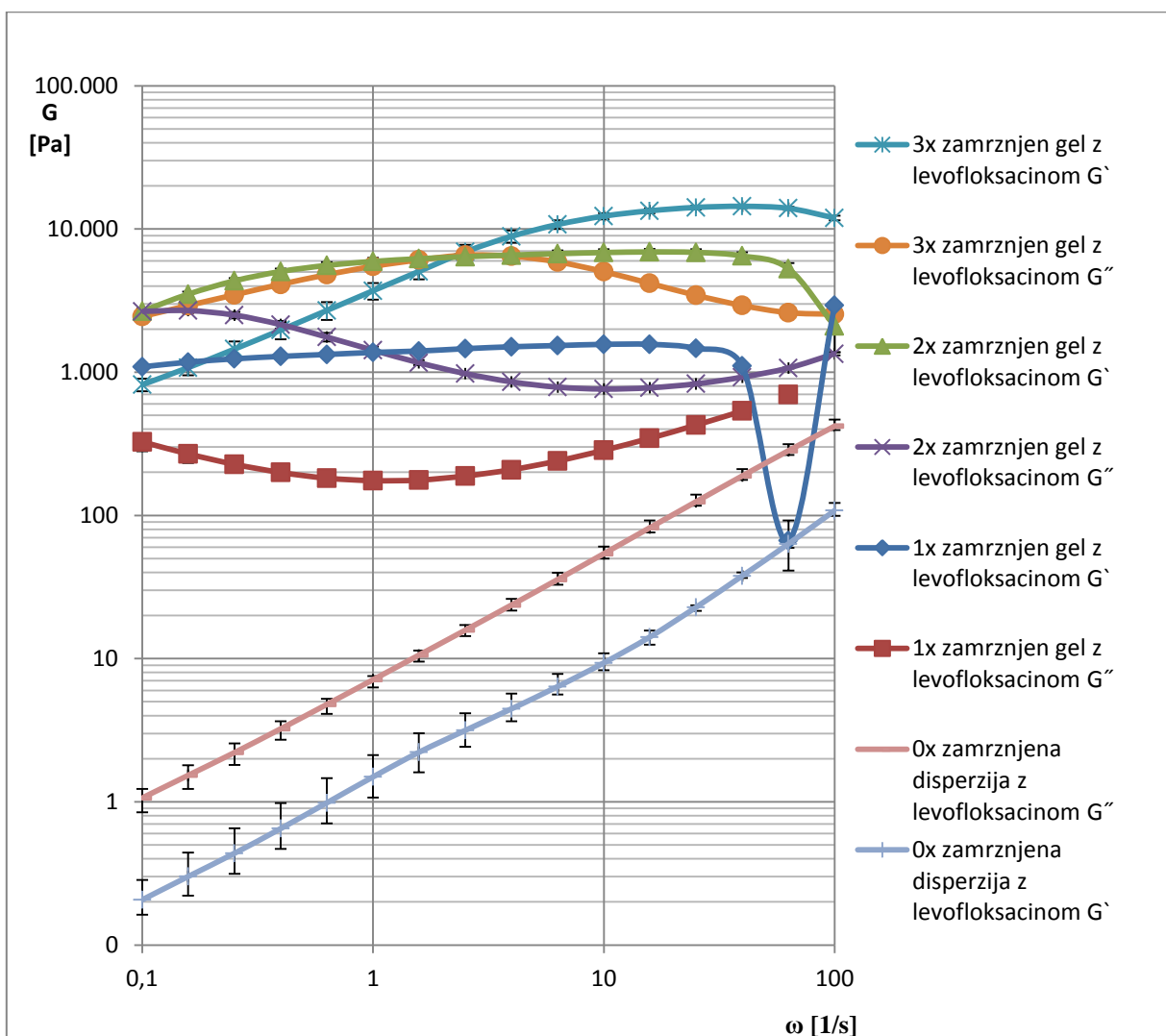
Na Slika 32 vidimo razlike dinamičnih modulov med disperzijo pred zamrzovanjem in hidrogeli po posameznih ciklih zamrzovanja. Pri disperziji je G'' nad G' , po zamrzovanju pa se G' obrne nad G'' . Takšna sprememba pomeni, da se je iz polimerne disperzije z zamrzovanjem tvorila tridimenzionalna struktura hidrogela. G' zamrznjenega hidrogela se v primerjavi z G' nezamrznjene disperzije poveča za največ 4000x, G'' pa za 100x. Pri 1x zamrznjenem hidrogelu se pri nižjih frekvencah krivulji G' in G'' približujeta, kar kaže šibko hidrogelsko strukturo oziroma na možno polimerno raztopino s prepletenimi verigami. G' in G'' 2x in 3x zamrznjenega hidrogela se sekata, kar pomeni, da se je tvorila tridimenzionalna struktura, vmes pa so deli, kjer imamo polimerno raztopino s premreženimi polimernimi verigami. Večkrat kot je hidrogel zamrznjen višje so ω , kjer se sekata krivulji G' in G'' (Slika 32). Pod presečiščem (nižje ω) se sistem obnaša kot tekočina, pri višjih ω , nad presečiščem, pa kot poltrdna snov (Slika 32).



Slika 32: Frekvenčni test 15% PVA disperzije in 15% PVA hidrogela po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja. Sestava je podana v Tabeli I.

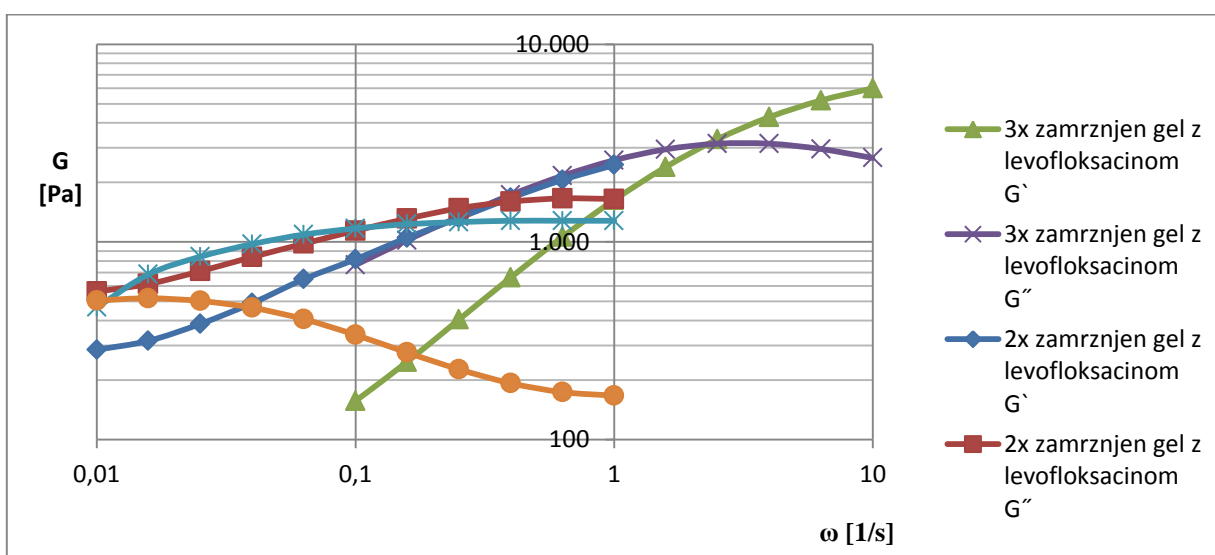
Frekvenčno odvisni dinamični moduli pri disperziji z levofloksacinom in hidrogelih z levofloksacinom, ki smo jih večkrat zaporedoma zamrznili so zelo podobni tistim pri disperziji in hidrogelih brez učinkovine (Slika 32, Slika 33), le da so tu vrednosti obeh modulov višje. Pri disperziji vidimo, da sta krivulji za G' in G'' vzporedni in da je G'' nad G' kar je značilno za koloidno raztopino. Pri hidrogelih je G' nad G'' , torej se je naša disperzija uredila v hidrogelsko strukturo. G' 3x zamrznjenega hidrogela je 1300x višji od G' disperzije, G'' pa 100x. V tem primeru niso vsi G'' zamrznjenih hidrogelov pod G' kot v prejšnjih primerih. Razlike med G' in G'' pri posameznem hidrogelu se z vsakim ciklom zamrzovanja manjšajo.

Iz oblike krivulj (Slika 33) lahko vidimo, da so naši hidrogeli pretežno elastični, saj prevladuje elastično obnašanje (10). Pri G' vidimo plato, najbolj izrazit je pri 1x zamrznjenem hidrogelu. G'' pa z naraščajočo ω pada do določenega minimuma, pri 1x zamrznjenem hidrogelu je to pri $\omega = 1$ 1/s, pri 2x zamrznjenem pri $\omega = 10$ 1/s ter pri 3x zamrznjenem pri $\omega = 100$ 1/s. Takšen odnos med G' in G'' pomeni da je to elastično (rubbery) področje, ki pa preide v prehodno žilavo področje (leathery), kjer G'' narašča hitreje kot G' (10). Pri 3x zamrznjenem hidrogelu lahko govorimo le o elastičnem obnašanju, saj v našem območju merjenja ne pride do prehoda v žilavo stanje.



Slika 33: Frekvenčni test 15% PVA disperzije in 15% PVA hidrogela z 15 mg/g levofloksacina po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja v območju $\omega = 0,1 - 100$ 1/s. Sestava je podana v Tabeli I.

Najprej smo vse gele merili pri frekvencah med 0,1 – 100 1/s. Ker se krivulji G' in G'' nista nikjer sekali, sta se pa približevali ena drugi, smo pogledali še kaj se dogaja pri nižjih frekvencah, med 0,01 – 10 1/s (Slika 34). Pri nižjih frekvencah se vidi točko prekrivanja oziroma na presečišču G' in G'' . Območje, kjer pride do presečišča, je prehodno območje, značilno za viskoelastične tekočine. Temu sledi elastično območje, kjer prevladuje elastično obnašanje, opazimo plato G' in minimum G'' , kar je značilno za viskoelastične poltrdne snovi. Pri 1x zamrznjenem hidrogelu je ta prehod pri $\omega=0,01$ 1/s, pri 2x zamrznjenem pri $\omega= 0,251$ 1/s in pri 3x zamrznjenem pri $\omega=2,51$ 1/s. Za naše hidrogelne lahko rečemo, da iz viskoelastičnih tekočin preidejo v viskoelastične poltrdne snovi.



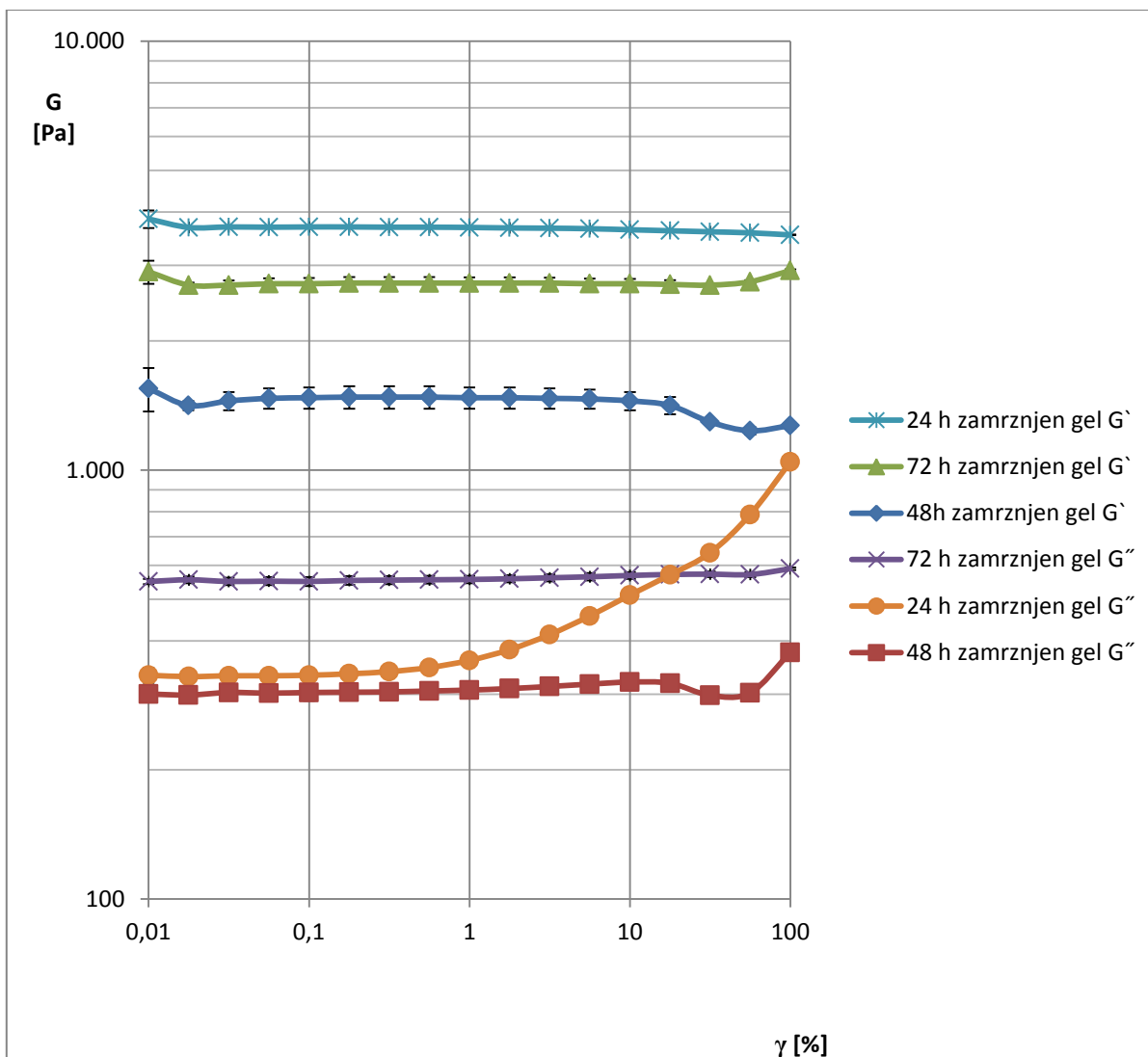
Slika 34: Frekvenčni test 15% PVA hidrogela z 15 mg/ml levoflokacina po 0, 1, 2 in 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja v območju $\omega = 0,01 - 10$ 1/s. Sestava je podana v Tabeli I.

4.3.2. Reološko vrednotenje 15% PVA z 1,5% levofloksacina pripravljenega s podaljšanim časom zamrzovanja (48h in 72h)

Ker nas je zanimal vpliv časa zamrzovanja na strukturo in lastnosti gela, smo izvedli še podaljšano zamrzovanje in to primerjali z večkratnim zamrzovanjem. Ti geli so vizuelno podobni 1x zamrznjenim. Na videz niso tako čvrsti kot geli pripravljene z večkratnim zamrzovanjem.

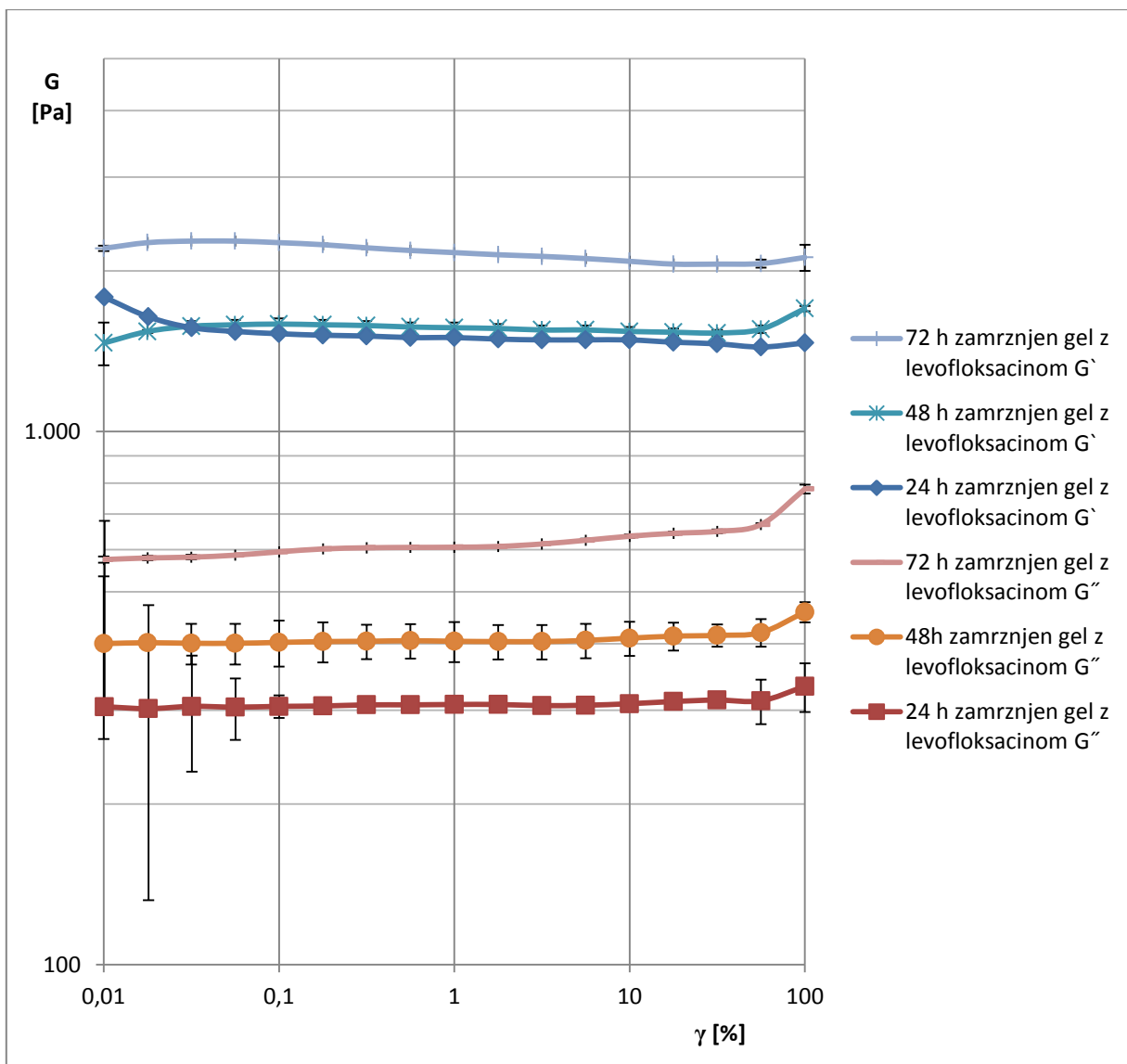
4.3.2.1. Amplitudni test

Pri podaljšanem času zamrzovanja je LVE skoraj skozi celotno območje tako kot pri gelih pripravljenih brez zamrzovanja. Pri teh nastanejo tridimenzionalne hidrogelske strukture, kar vidimo iz grafa (Slika 35), saj je G' nad G'' , za razliko od gelov brez zamrzovanja, kjer je G'' nad G' . Če primerjamo 48 h zamrznjen gel z 24 h zamrznjenim, je hidrogel zamrznjen 48 h manj plastičen in manj elastičen, 72 h zamrznjen gel pa je v primerjavi z 24 h zamrznjenim bolj plastičen, še vedno pa manj elastičen, torej manj strukturiran. 48 h zamrznjen hidrogel ima G' in G'' nižji od G' in G'' 72 h zamrznjenega hidrogela. Sklepamo lahko, da čas zamrzovanja ne vpliva toliko na notranjo strukturo hidrogela, saj razlike med posameznimi hidrogeli niso tako velike, G' se poveča za 2,5x in G'' za 2x.



Slika 35: Amplitudni test 15% PVA hidrogela pripravljenega s 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjem. Sestava je podana v Tabeli I.

LVE pri hidrogelih z dodanim levofloksacinom (Slika 36) prav tako obsega celotno območje merjenja. Pri teh hidrogelih s povečevanjem števila ciklov zamrzovanja vrednosti tako G' kot G'' rastejo. Plastičnost hidrogela se poveča za 2x po 72h zamrzovanja v primerjavi z 24 h zamrzovanja hidrogela. Elastičnost pa naraste le za 1,3x po 72 h v primerjavi s hidrogelom zamrznjenim 24 h.

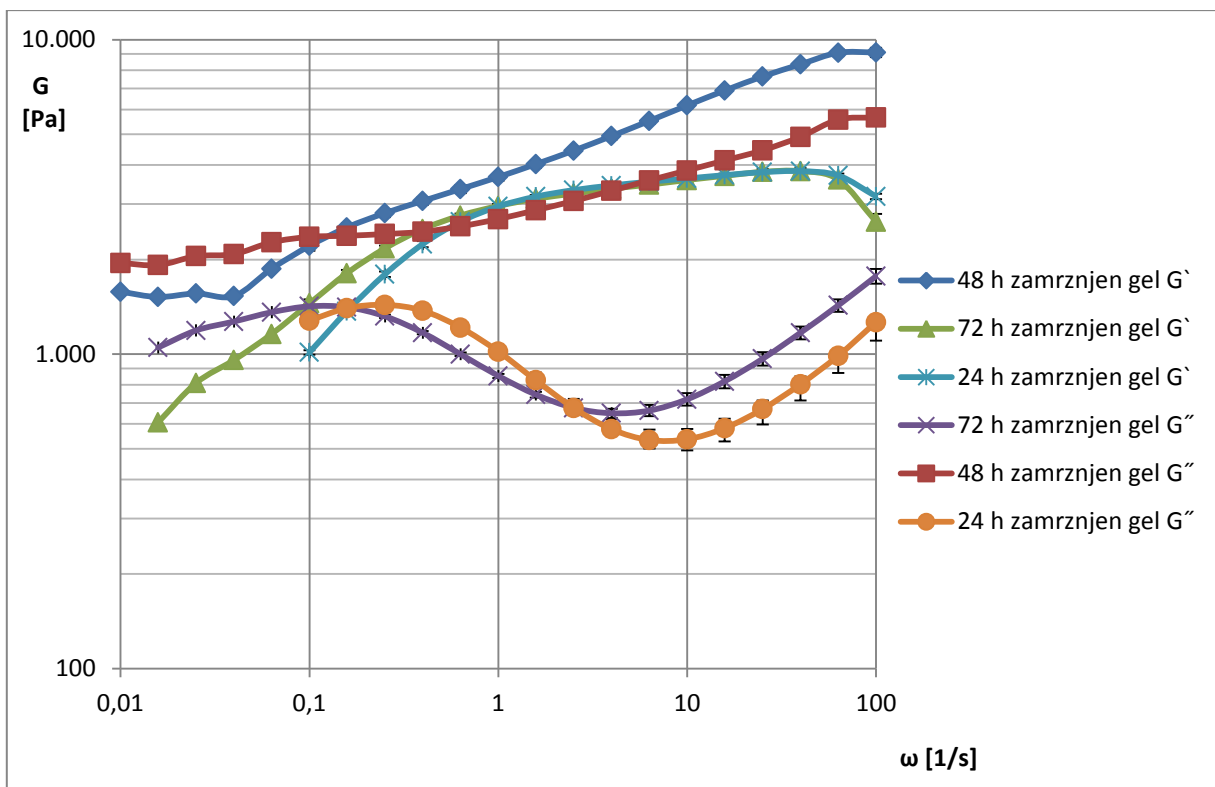


Slika 36: Amplitudni test 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina pripravljenega z 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjem. Sestava je podana v Tabeli I.

4.3.2.2. Frekvenčni test

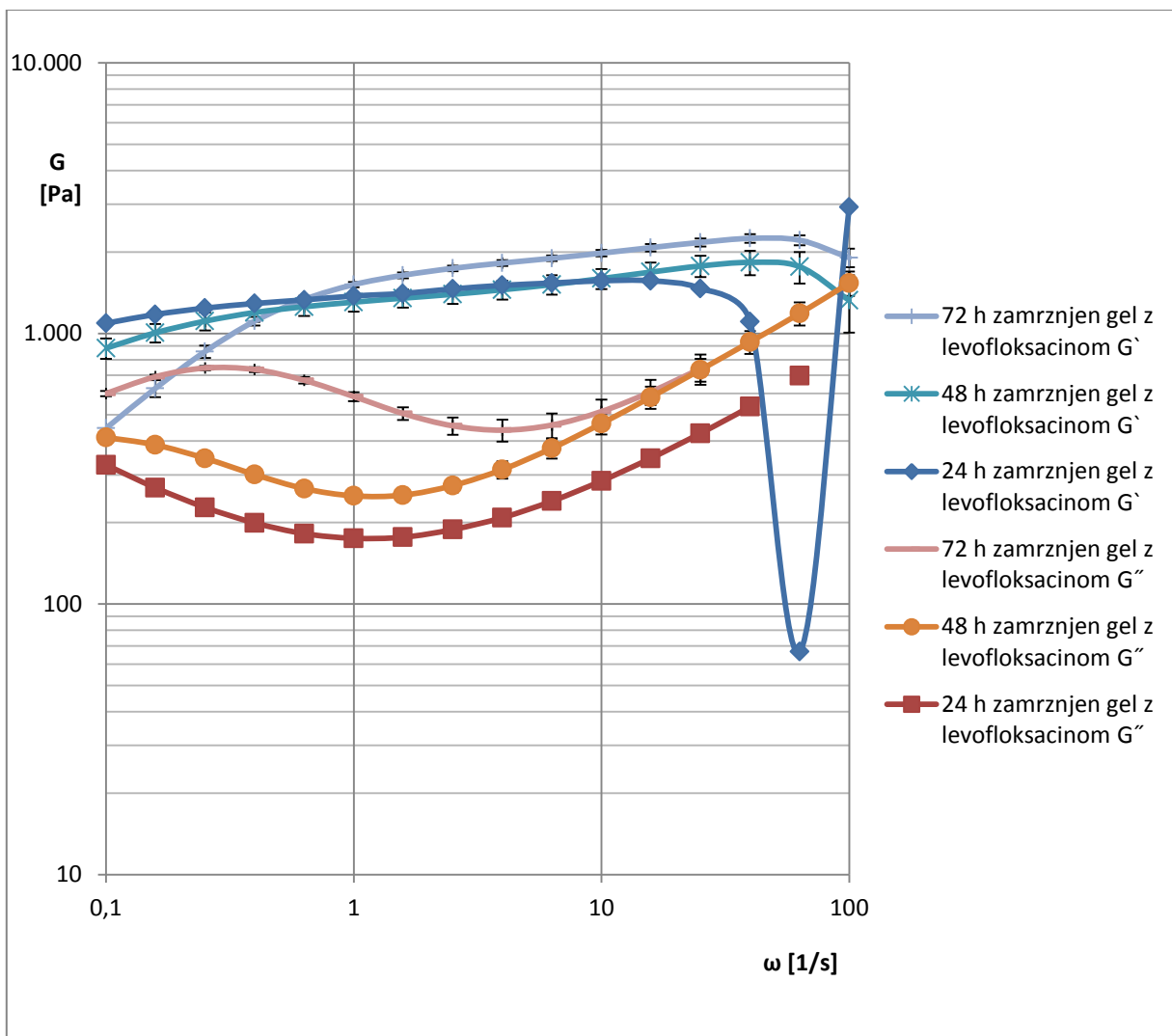
Pri 24 h zamrznjenem hidrogelu vidimo (Slika 37), da je graf značilen za viskoelastično snov, kjer se sistem pri nižjih ω obnaša kot viskoelastično tekočino, katere obnašnje pri višjih ω preide v viskoelastično trdno snov. Pri nižjih ω pod presečiščem je G'' nad G' kar je značilno za viskoelastične tekočine, nad presečiščem, pri višjih ω , pa je G' nad G'' , kar je značilno za

gelsko strukturo. Če ω še povečujemo preide naš hidrogel iz elastičnega obnašanja v žilavo področje, kjer G'' narašča hitreje kot G' (10).



Slika 37: Frekvenčni test 15% PVA hidrogela pripravljenega z 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjem. Sestava je podana v Tabeli I.

Na Slika 38 vidimo, da so krivulje hidrogelov z levofloksacinom, ki so bili različno dolgo zamrznjeni zelo podobne. Hidrogela zamrznjena 24 h in 72 h se obnašata enako kot hidrogel brez učinkovine (Slika 38) imata značilno obliko, ki ponazarja prehod iz viskoelastične tekočine v viskoelastično poltrdno snov. Pri obeh hidrogelih ima G'' minimum, ki pa se nato pri višjih ω povečuje nesorazmerno hitreje kot G' . G' je nad G'' kar pomeni, da prevladuje elastično območje. Pri 72 h zamrznjenem hidrogelu z levofloksacinom imamo prav tako presečišče krivulj, ki ponazarja prehod snovi iz viskoznega v elastično območje. Pri nižjih ω je G'' nad G' , nad presečiščem, pri višjih ω pa se to obrne, G' gre nad G'' (Slika 38).



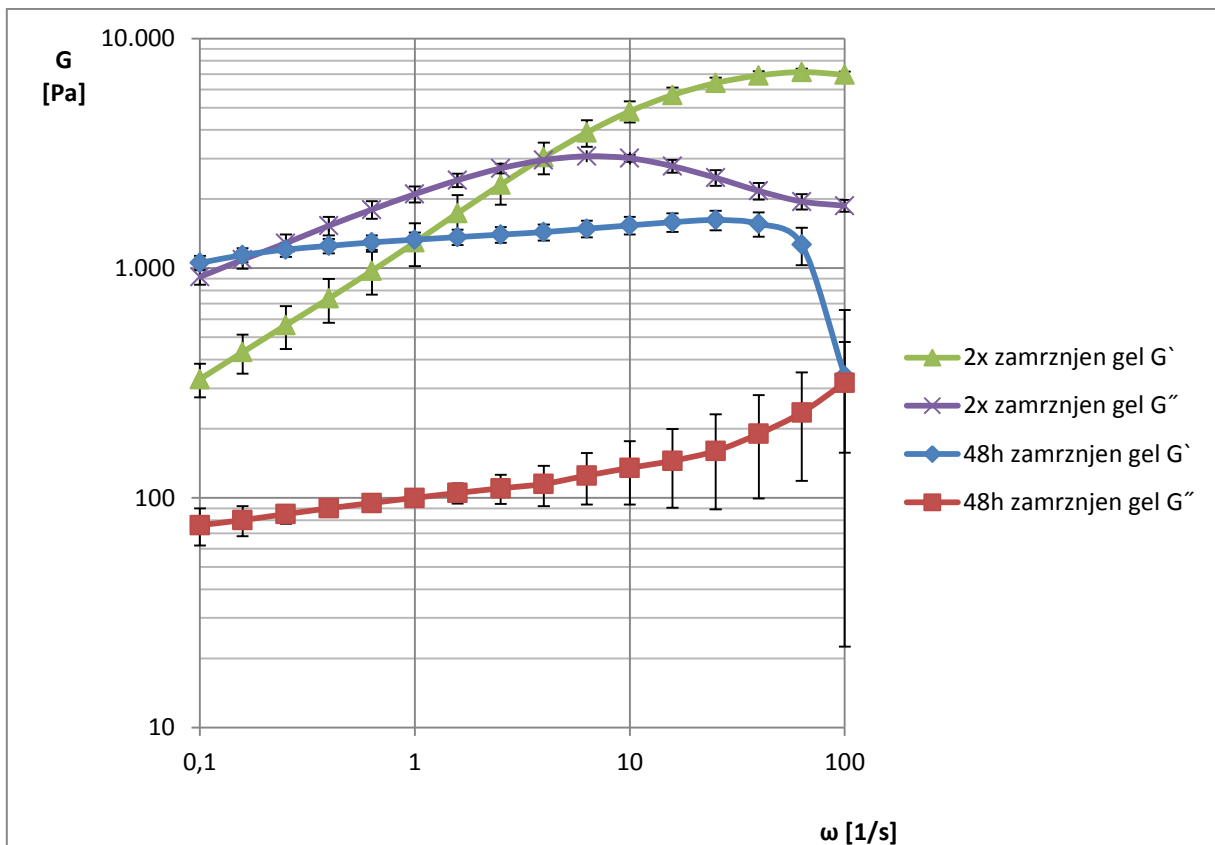
Slika 38: : Frekvenčni test 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina pripravljene z 24 h, 48 h in 72 h zamrzovanjem. Sestava je podana v Tabeli I.

4.3.3. Primerjava hidrogelov pripravljenih z večkratnim zamrzovanjem in odtajanjem ter gelov, pripravljenih s podaljšanim časom zamrzovanja

4.3.3.1. Frekvenčni test

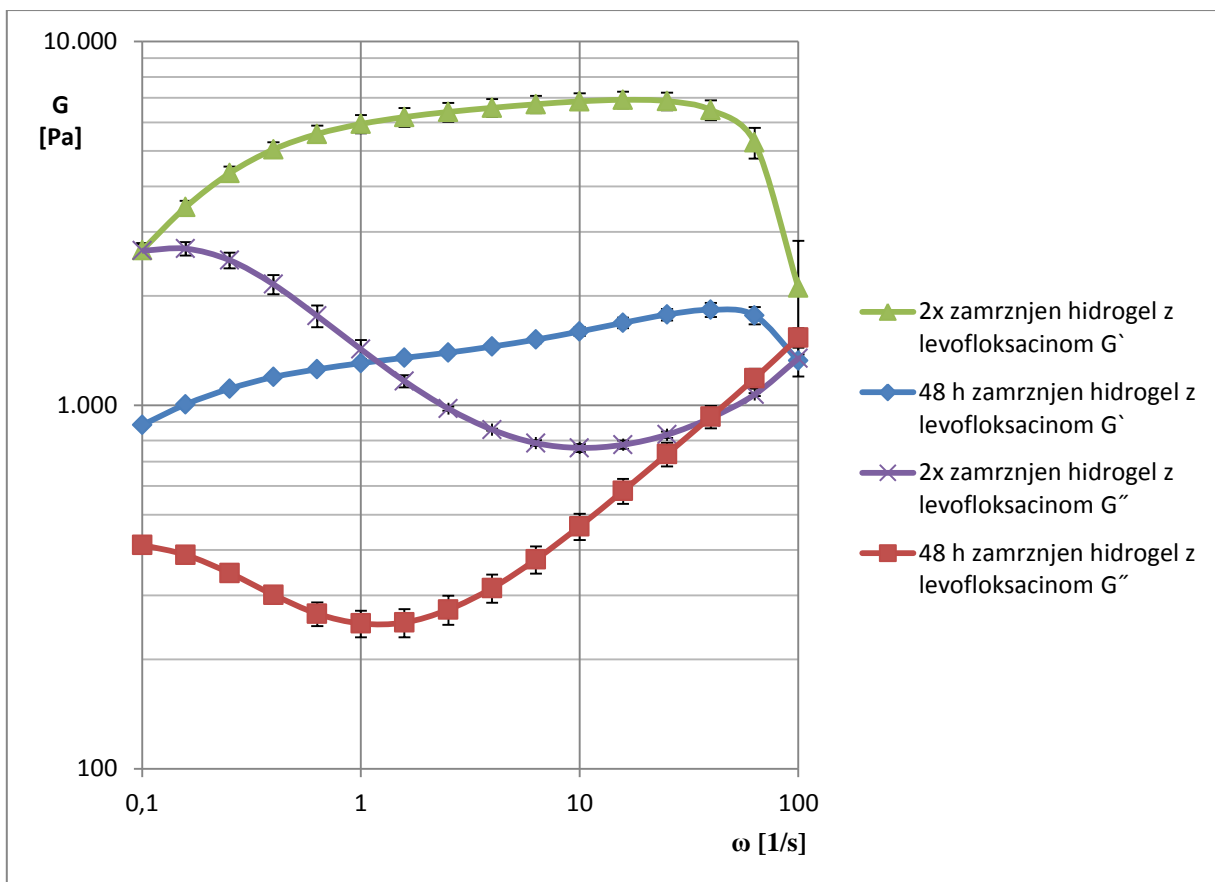
Na Sliki 39 vidimo direktno primerjavo med hidrogeloma z 2x zamrzovanjem po 24 h in 48 h zamrznjenim hidrogelom. Krivulje gelov, ki so bili 2x zamrznjeni imajo višje vrednosti, kot krivulje 48 h zamrznjenih hidrogelov. LVE je pri hidrogelih s podaljšanim časom

zamrzovanja (Slika 35, Slika 36) večje kot pri gelih z dvakratnim zamrzovanjem (Slika 30, Slika 31). Pri večkrat zamrznjenih gelih nastane med verigami več povezav, bolj čvrsta struktura. Pri 2x zamrznjenem hidrogelu vidimo prehod iz viskoelastične tekočine v viskoelastično poltrdno snov. Pri 48 h zamrznjenem hidrogelu tega prehoda ne vidimo, saj se je vzorec skozi celotno območje merjenja obnašal kot viskoelastična poltrdna snov. Podobno opazimo, če primerjamo 3x zamrznjene hidrokele in 72 h zamrznjene hidrokele (Slika 41).



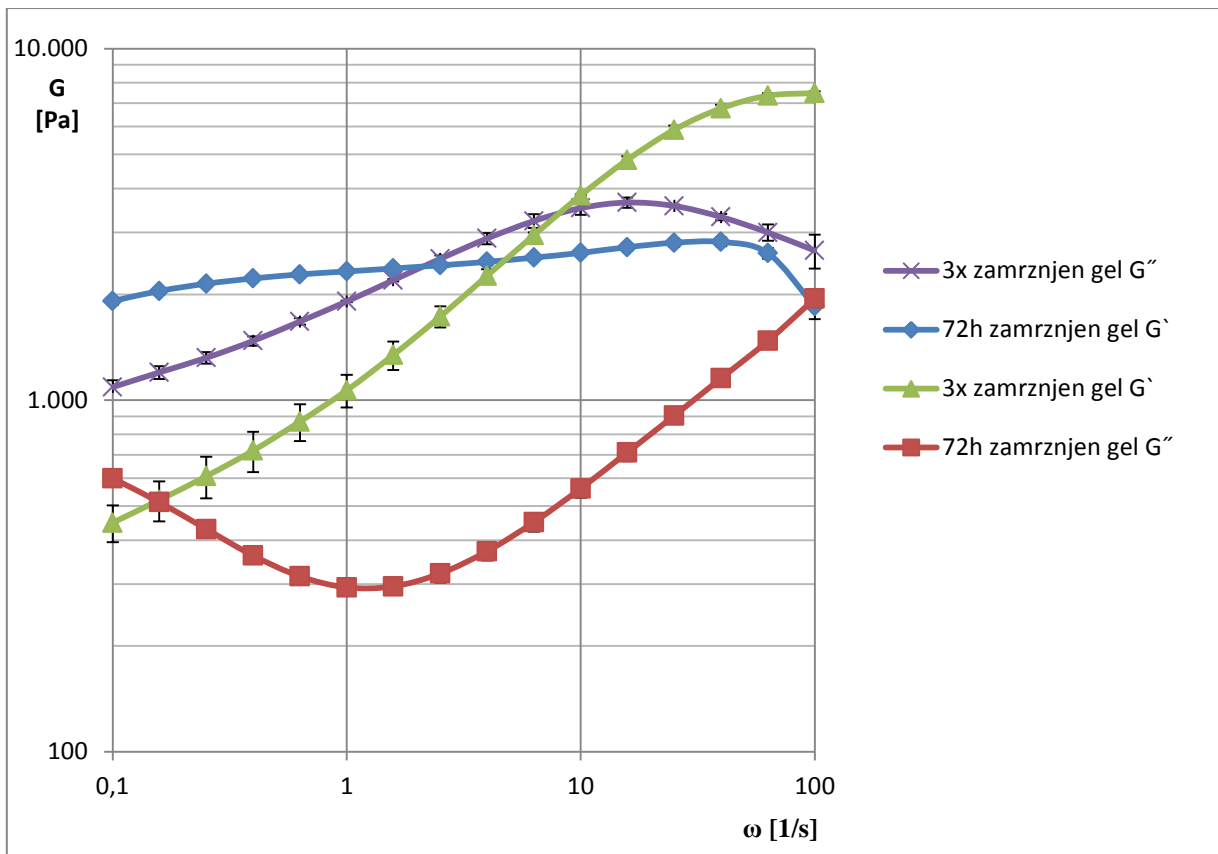
Slika 39: Frekvenčni test 2x zamrznjenega 15 % PVA hidrogela in 48 h zamrznjenega 15 % PVA hidrogela. Sestava je podana v Tabeli I.

Pri hidrogelih z dodanim levofloksacinom (Slika 40) so si krivulje pri 2x zamrznjenem in 48 h zamrznjenem hidrogelu bistveno bolj podobne kot v primeru brez učinkovine. Pri 2x zamrznjenem hidrogelu pride do prehoda iz viskoelastične tekočine v viskoelastično poltrdno snov pri $\omega = 0,1$ 1/s. Pri 48 h zamrznjenem hidrogelu imamo v tem območju le viskoelastično poltrdno snov, kjer G' doseže plato, G'' pa doseže nek minimum, nato pa preide v prehodno žilavo območje, kjer G'' narašča hitreje kot G' .



Slika 40: Frekvenčni test 2x zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina in 48 h zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

Pri 3x zamrznjenem hidrogelu je prehod obnašanja iz viskoelastične tekočine v viskoelastično poltrdno snov pri $\omega = 10$ 1/s, pri 72 h zamrznjenem hidrogelu pa je ta prehod že pri $\omega = 0,251$ 1/s (Slika 41).

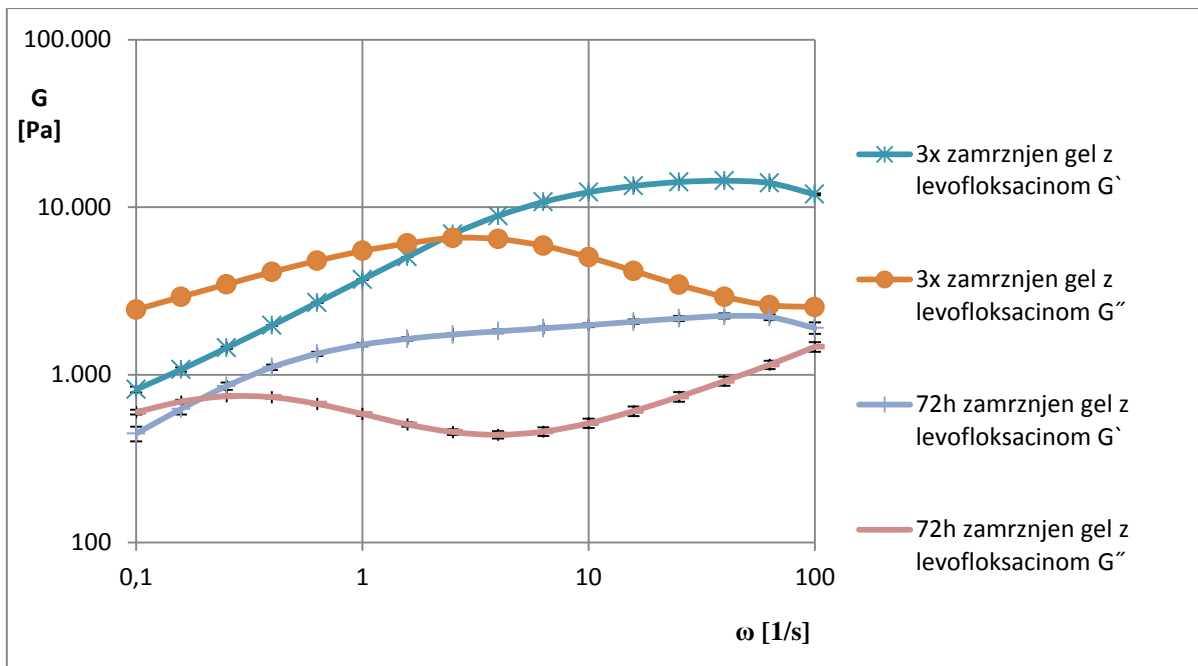


Slika 41: Frekvenčni test 3x zamrznjenega 15% PVA hidrogela in 72 h zamrznjenega 15% PVA hidrogela. Sestava je podana v Tabeli I.

Na Slika 42 vidimo, da se hidrogeli obnašajo podobno kot pri 2x zamrznjenih hidrogelih z učinkovino in 48 h zamrznjenih hidrogelih. Opazimo, da pride pri 72 h zamrznjenem hidrogelu z levofloksacinom do prehoda obnašanja iz viskoelastične tekočine v viskoelastično poltrdno snov pri $\omega = 0,158$ 1/s. Pri 3x zamrznjenem hidrogelu z levofloksacinom do tega prehoda pride pri višjih frekvencah in sicer pri $\omega = 2,51$ 1/s.

To je zelo podobno pri 3x zamrznjenem hidrogelu in 72 h zamrznjenem hidrogelu brez učinkovine (Slika 41).

Vsekakor pa lahko ugotovimo, da prisotnost levofloksacina vpliva na strukturo PVA hidrogelov tako, da se časovno odvisno zamrzovanje ne odraža na spremenjeni strukturi, razen na povečanje obeh modulov.

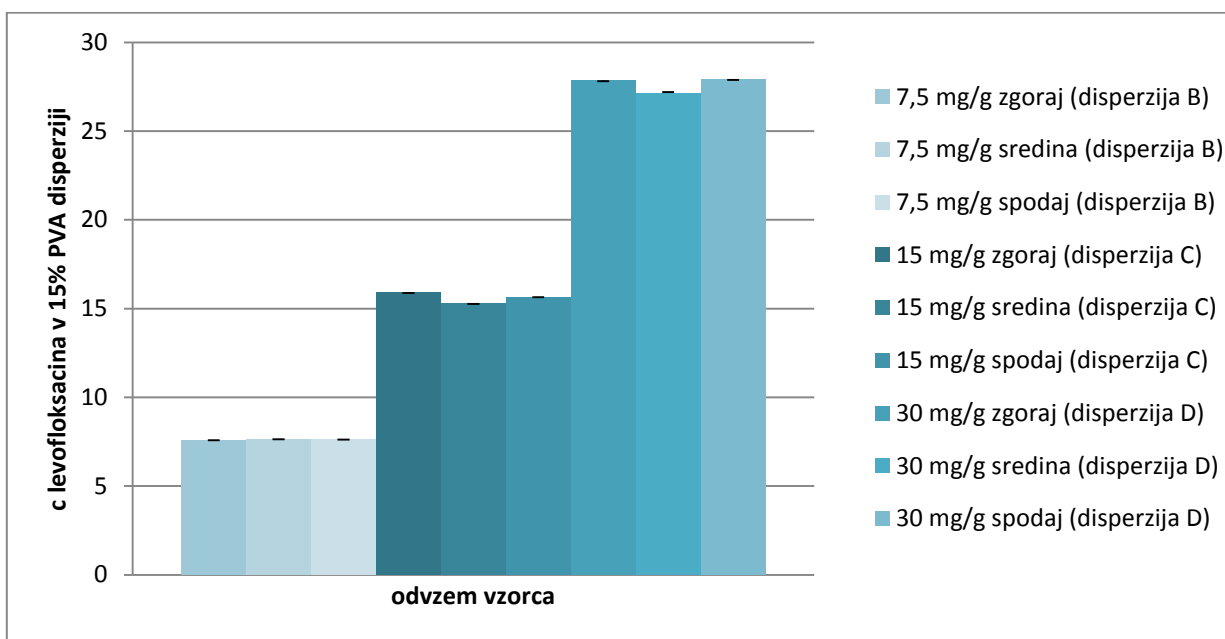


Slika 42: Frekvenčni test 3x zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina in 72 h zamrznjenega 15% PVA hidrogela z 1,5% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

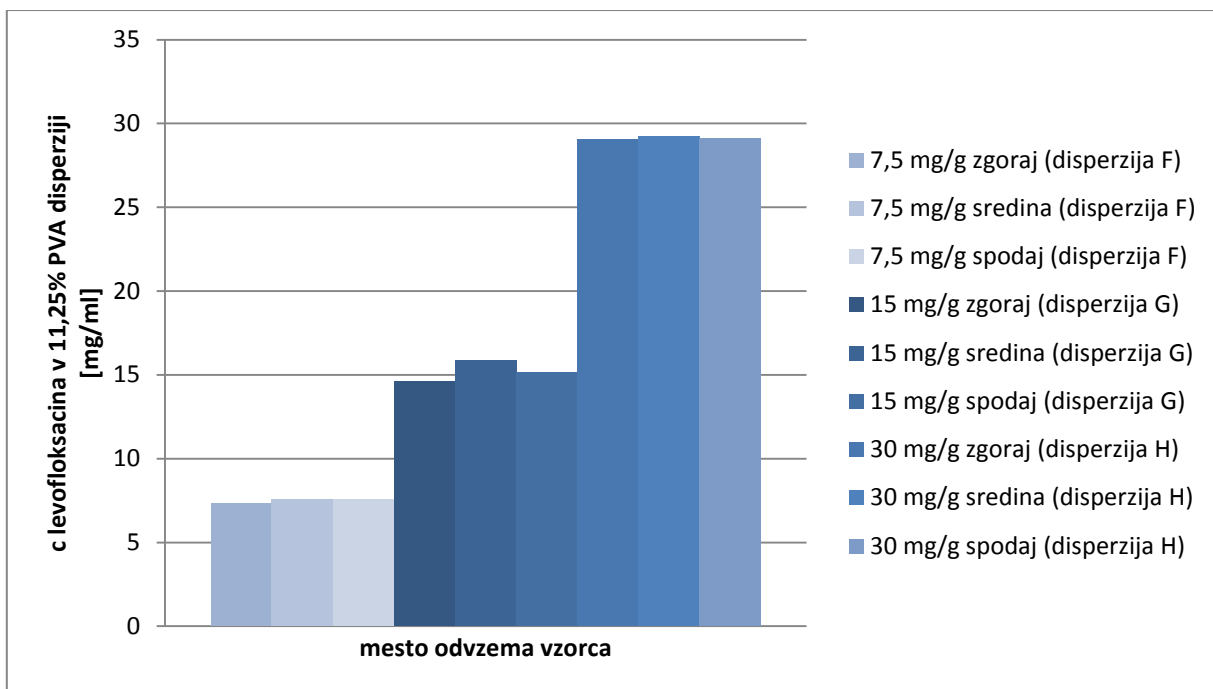
4.4. SPROŠČANJE LEVOFLOKSACINA IZ PVA DISPERZIJ

4.4.1. Homogenost levofloksacina v PVA disperziji

Z odvzemom vzorcev na treh različnih mestih v disperziji smo potrdili, da se je levofloksacin enakomerno porazdelil po celotnem vzorcu. S kapalko smo odvzeli vzorec gela na vrhu, sredini ter čisto na dnu čaše. Odvzete vzorce smo raztopili v pufru v bučki, ki smo jo dali v ultrazvočno kadičko, da se je celoten vzorec raztopil. Nato smo na UV spektrofotometru izmerili absorbance vzorca in določili koncentracijo levofloksacina. Rezultati so predstavljeni na slikah (Slika 43, Slika 44).



Slika 43: Homogenost levofloksacina v 15% PVA disperziji. Sestava je podana v Tabeli I.



Slika 44: Homogenost levofloksacina v 11,25% PVA disperziji. Sestava je podana v Tabeli I.

4.4.2. Sproščanje

Sproščanje iz različno koncentriranih gelov z različno koncentracijo levofloksacina smo vedno izvajali iz enako velikih čaš, s približno enako količino gela ter PBS. Naša primarna disperzija je bila 15% z vgrajenega 1,5% oziroma 15 mg/g levofloksacina. Željeno je bilo, da bi se učinkovina z mesta aplikacije sproščala nekaj dni (4-5 dni), zato smo prvotno sproščanje izvajali 4 dni oziroma 96 h. Ker se je po 96 h sprostil le 67% učinkovine, kar je premalo v takšnem časovnem obdobju (Slika 45), smo najprej poskusili povečati količino učinkovine v 15% PVA disperziji in tako povečati koncentracijski gradient. Sama učinkovina pa je povečala viskoznost disperzije (Slika 23) in tako sproščanje ni bilo nič hitrejše kot smo pričakovali (Slika 45). Zato smo naredili še disperzijo z manjšo količino levofloksacina, prvotno koncentracijo smo razpolovili (7,5 mg/g). Sproščanje levofloksacina se v takšni disperziji ni pospešilo, ampak je bilo zelo podobno sproščanju iz prvotne disperzije.

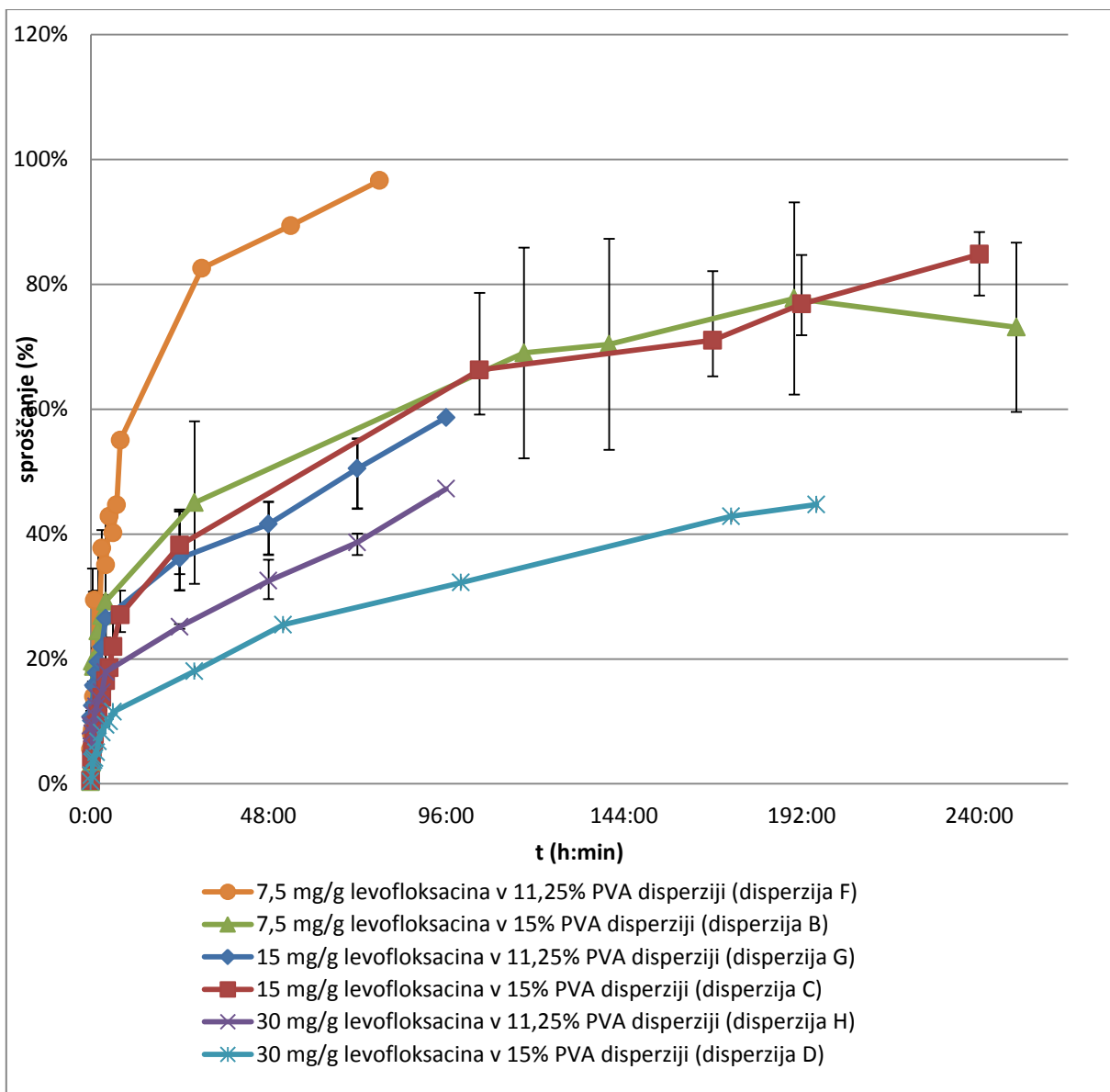
Ker spreminjanje koncentracije levofloksacina v disperziji ni pospešilo sproščanja, smo se odločili, da bomo poskusili z manj koncentrirano PVA disperzijo. Najprej smo izdelali 7,5% disperzijo z vgrajenim 1,5% oziroma 15 mg/g levofloksacina. Ta disperzija je bila preveč

tekoča in sproščanja iz nje nismo mogli izvajati, saj disperzija in PBS ne ostaneta ločena. Ko smo poskusili naliti PBS na disperzijo, se je le-ta pomešal in rezultati tega sproščanja ne bi bili relevantni.

Naredili smo še vmesno koncentracijo med 15% in 7,5% disperzijo, torej 11,25% in vanjo vgradili 1,5% in 3% levofloxacina. Sproščanje iz teh dveh disperzij je enako kot iz 15% PVA disperzije. V 96 h se je sprostilo približno 67% učinkovine. Nazadnje smo naredili še 11,25% disperzijo z 0,75% oziroma 7,5 mg/g učinkovine. Pri tem gelu, pa se je učinkovina presenetljivo hitro sprostila. V 72 h se je sprostila praktično celotna količina levofloksacina. Pri zadnji spremembi sestave PVA disperzije smo dosegli to, kar smo želeli na začetku.

Iz Slika 45 lahko torej zaključimo, da je sproščanje levofloksacina dovolj hitro za naše potrebe le iz manj koncentriranega gela z manj učinkovine. Več kot je učinkovine v sami disperziji, težje se le ta sprosti, saj težje pride celotna količina na površje disperzije oziroma na stik disperzija – pufer. Vzrok je verjetno višja η oziroma povečanje interakcij polimer-učinkovina.

Sproščanje pri vseh gelih poteka na začetku hitreje, nato pa se ustali in poteka sorazmerno s časom, približno po kinetiki ničtega reda. Učinkovina se na začetku sprošča z enostavno difuzijo, kateri se kasneje pridruži še razpletanje polimernih verig oziroma površinska erozija hidrogela na stiku s PBS.



Slika 45: Sproščanje levofloksacina iz 11,25% PVA disperzije z 7,5 mg/g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 15 mg/g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 30 mg/g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 7,5 mg/g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina in 15% PVA disperzije z 3% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

Pogledali smo tudi, ali se v začetnem delu prve 4 dni učinkovine iz različnih gelov sproščajo po Fickovi kinetiki. Za njo velja, da je hitrost sproščanja sorazmerna s korenem iz časa. Za gele 11,25% z 1,5% in 3% levofloksacina ter 15% z 0,75% in 1,5% levofloksacina lahko potrdimo sproščanje po Fickovem zakonu, R^2 večji od 0,95, razen za gel 15% z 1,5%

levofloksacina je ta nižji. Fickove kinetike pa ne moremo potrditi za gela 11,25% z 0,75% levofloksacina ter 15% gel z 3% levofloksacina. Skozi daljše časovno obdobje pa Fickov zakon ne velja, saj se sproščanje upočasni.

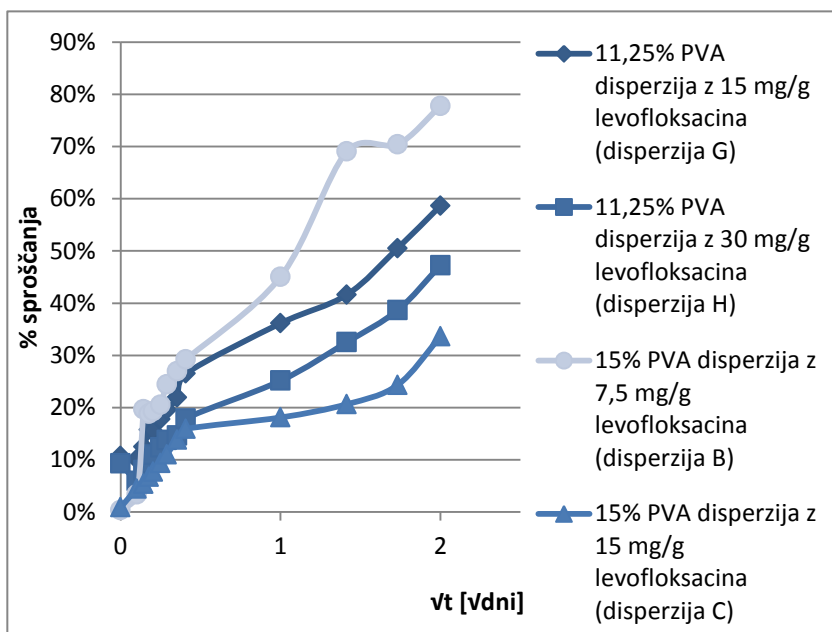


Tabela IV: R2 za sproščanje po Fickovi kinetiki

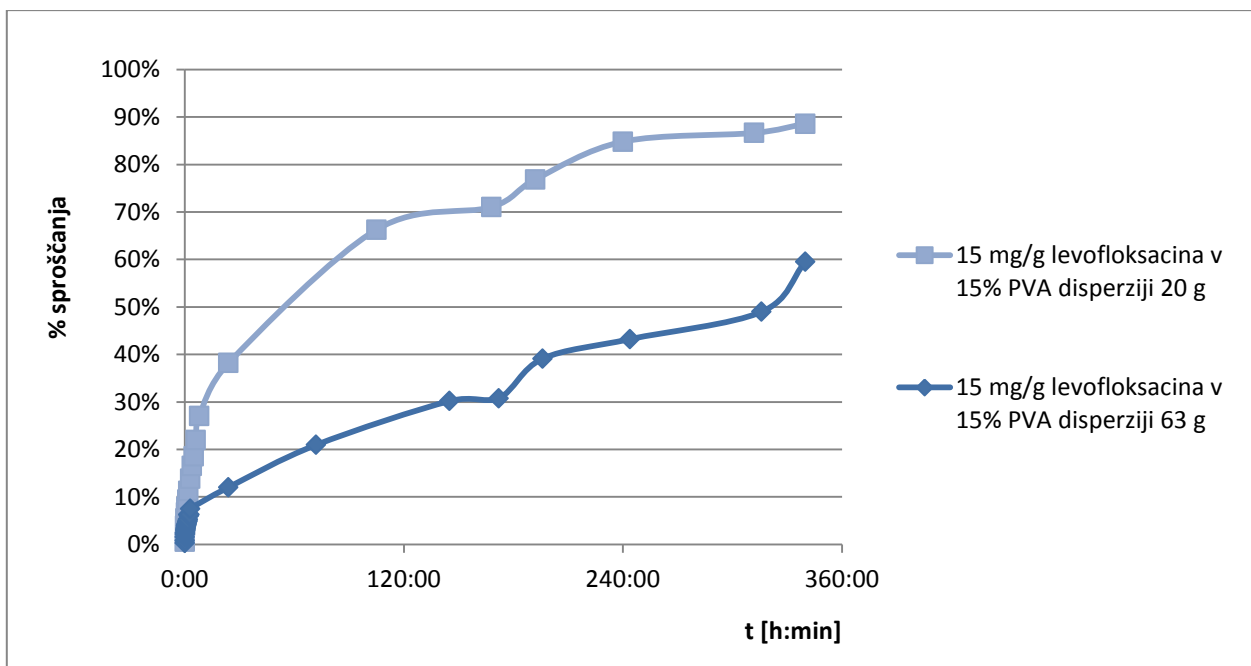
% disperzije	c levofloksacina [mg/g]	R2
11,25	15	0,9512
	30	0,9805
15	7,5	0,9512
	15	0,8985

Slika 46: Sproščanje levofloksacina iz 11,25% PVA disperzije z 15 mg/g levofloksacina, 11,25% PVA disperzije z 30 mg/g levofloksacina, 15% PVA disperzije z 7,5 mg/g levofloksacina in 15% PVA disperzije z 15 mg/g po Fickovi kinetiki. Sestava je podana v Tabeli I.

4.4.3. Primerjava sproščanja iz različno debelih disperzij

Sproščanje vseh disperzij smo izvajali tako, da smo primarno disperzijo, ki je imela skupno maso približno 66,6 g razdelili na 3 približno enake dele. Za primerjavo kakšno je sproščanje iz debelejšje disperzije, pa smo izvedli tudi sproščanje iz osnovne disperzije, kjer je bila masa 63,04 g in količina PBS nad disperzijo 126 ml. Iz spodnjega grafa vidimo, da kljub pogostejšemu odvzemanju vzorcev na začetku je sproščanje same učinkovine počasnejše. V 14 dneh se je namreč sprostilo 60% levofloksacina, v primerjavi s tanjšo disperzijo, kjer se je v 14 dneh sprostilo 85% levofloksacina. Iz česar lahko zaključimo, da tanjša kot je disperzija krajša je difuzijska razdalja, skozi katero se sprošča levofloksacin. To pomeni, da je

zelo pomembno kako debelo plast disperzije bomo dali na rano. Če bo plast predebela bo sproščanje prepočasno, saj erozije sistema zaradi okoljnega medija praktično ni (Slika 47).

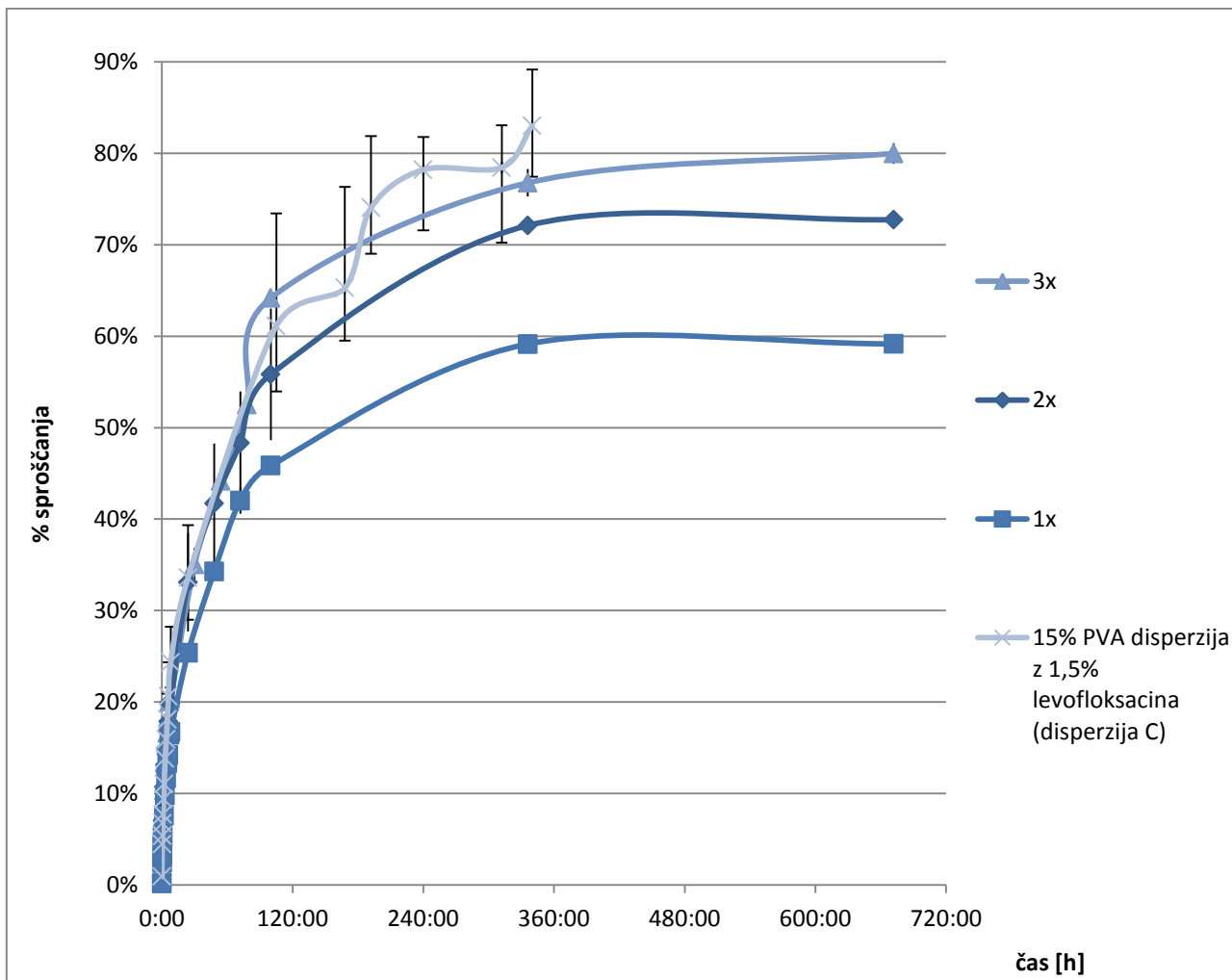


Slika 47: Sproščanje 15 mg/ml levofloksacina iz 15% PVA disperzij različnih debelin. Sestava je podana v Tabeli I.

4.5. SPROŠČANJE LEVOFLOKSACINA IZ HIDROGELOV NAREJENIH Z ZAMRZOVANJEM IN ODTAJANJEM

Zanimalo nas je tudi kako na sproščanje učinkovine iz hidrogela vpliva struktura po zamrzovanju. Rezultati so zelo zanimivi in nekoliko v nasprotju s pričakovanji. 1x zamrznjen hidrogel je najpočasnejši, sledi 2x zamrznjen, najhitreje pa se sprosti iz 3x zamrznjenega hidrogela. Pri 2x zamrznjenem hidrogelu smo pričakovali, da bo sproščanje še počasnejše, saj se z povečevanjem ciklov zamrzovanja polimerne verige vedno bolj prepletajo in levofloksacin naj bi vse težje prišel na površje. Sproščanje iz 2x in 3x zamrznjenega hidrogela je bilo hitrejše kot iz 1x zamrznjenega. Na podlagi primerjave teh dveh lahko sklepamo, da PVA s povezovanjem v urejene strukture izrine levofloksacin iz svoje strukture in tako pospeši njegovo sproščanje. Našo primarno razlago smo potrdili še s 3x zamrznjenim

hidrogelom. Torej s povečevanjem števila ciklov zamrzovanj pospešimo sproščanje učinkovine iz hidrogela in sicer v praviloma 5 dneh. V tem časovnem obdobju je sproščanje tako iz hidrogelov kot iz disperzije zelo podobno. Po tem času pa se sproščanje izredno upočasni, saj se je šele po 1 mesecu (Slika 48) sprostil toliko levofloksacina kot iz 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina po 14 dneh (Slika 45, Slika 48). To pomeni, da se določen delež levofloksacina pa le vgradi v strukturo ali pa je ujet v pore.



Slika 48: Sproščanje 1,5% levofloksacina iz 15% PVA hidrogela po 1x, 2x in 3x ciklu zamrzovanja in iz 15% PVA disperzije z 1,5% levofloksacina. Sestava je podana v Tabeli I.

Pogledali smo ali se levofloksacin sprošča po Fickovi kinetiki. Kot vidimo so pri vseh treh krivuljah R^2 večji od 0,98, vendar to velja le za prve 4 dni, nato se sproščanje upočasni. Ugotovimo pa lahko, da je večja strukturiranost sistema, ki je bila ugotovljena z moduloma G'

in G'' . Tako da se na začetku vgradi učinkovino, ki jo med zamrzovanjem polimer iztisne iz svoje strukture, kar pa zelo upočasni sproščanje v časovnem obdobju 1 meseca.

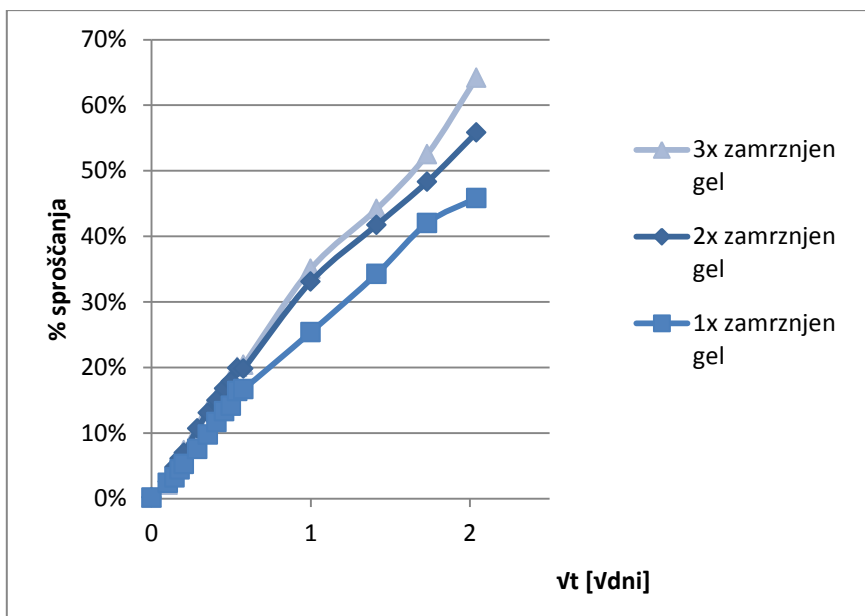


Tabela V: R^2 za sproščanje po Fickovi kinetiki iz

	R^2
1x	0,9898
2x	0,9868
3x	0,9862

zamrznjenih gelov

Slika 49: Sproščanje 1,5% levofloksacina iz 15 % hidrogela po 1x, 2x in 3x ciklu zamrzovanja po Fickovi kinetiki. Sestava je podana v Tabeli I.

5. SKLEPI

Z našim raziskovalnim delom smo prišli do naslednjih zaključkov:

- samo povečevanje koncentracije PVA v vodi neomogoči nastanka hidrogela
- levofloksacin je občutljiv na segrevanje v raztopini, zato ga moramo dodajati v ohlajeno polimerno disperzijo
- levofloksacin se homogeno razporedi po celotni disperziji
- s povečevanjem koncentracije PVA v disperziji se povečuje viskoznost polimerne raztopine in iz Newtonske tekočine dobimo psevdoplastičen sistem
- dodatek levofloksacina poveča viskoznost polimerne raztopine in pravtako vpliva na nastanek psevdoplastičnega sistema
- elastični (G') in plastični (G'') modul se povečujeta s povečevanjem koncentracije polimera in dodatka levofloksacina
- vse PVA disperzije z dodanim levofloksacinom imajo v celotnem amplitudnem območju je $G'' > G'$
- s povečevanjem frekvence pri frekvenčnih testih znotraj LVE vidimo prehod območja iz viskoelastične tekočine v viskoelastično potrdno snov
- z zamrzovanjem in odtajanjem povzročimo povezovanje hidroksilnih skupin polimera in nastanek hidrogela in iz razmerja $G'' > G'$ preide v $G' > G''$
- več kot je ponovitev zamrzovanj in odtajanj bolj čvrst hidrogel nastane
- daljši čas zamrzovanja ne vpliva toliko na čvrstost hidrogela kot več zaporednih ponovitev zamrzovanj in odtajanj, spremeni pa se strukturnost sistema
- levofloksacin se je v celoti sprostil iz najmanj koncentrirane PVA disperzije z najmanj levofloksacina (11,25% gel z 0,75% levofloksacina)
- sproščanje se upočasnjuje s povečevanjem koncentracije učinkovine in same koncentracije PVA v disperziji zaradi višje η
- počasnejše sproščanje je tudi iz debelejšega gela, ker učinkovina zaradi daljše difuzijske razdalje počasneje pride do površine oziroma stika s pufrom
- sproščanje iz zamrznjenih hidrogelov je v primerjavi z disperzijami v začetnem delu hitrejše, nato pa upočasnjuje

- sproščanje iz večkrat zapored zamrznjenega in odtajanega hidrogela je hitrejše kot manjkrat zamrznjenega hidrogela
- sproščanje levofloksacina iz PVA poteka po Fickovi kinetiki sproščanja tako iz disperzij kot zamrznjenih hidrogelov le prve 4 dni, v tem obdobju lahko govorimo o difuzijsko nadzorovanjem sproščanju

6. LITERATURA

1. **Hassan, CM in Peppas, NA.** Structure and application of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Advances in Polymer Science*. Berlin : Springer_Verlag, 2000, Zv. 153, str. 37-65.
2. **Aulton, ME.** *Aulton`s Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*. Edinburgh : Churchill Livingstone, 2007. str. 37-65.
3. **Cegnar, Mateja, Baumgartner, Saša in Kristl, Julijana.** Vlažna oskrba rane s sodobnimi oblogami. *Med. razgl.* 2007, Zv. 46, 3, str. 235-247.
4. **Bouwsta, JA in Junginger, HE.** Hydrogels. [avt. knjige] J Swarbrick in JC Boylan. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York : Marcel Dekker, 1993, str. 441-465.
5. **Blanco, Maria Dolores, Olmo, Rosa Maria in Teijon, Jose Maria.** Hydrogels. [avt. knjige] J Swarbrick in JC Boylan. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York : Marcel Dekker, 2007, str. 2021-2039.
6. **Swarbrick, J in Boylan, JC.** Film coating and film forming materials: Evaluation to generic drugs and generic equivalency. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York : Marcel Dekker, 1992, Zv. 6, str. 415-436.
7. **Brinker, CJ in Scherer, GW.** *Aging of gels; Sol-gel science: The physics and chemistry of sol-gel processing*. San Diego : Academic press inc., 1990. str. 357-402.
8. **Baumgartner, S.** Fakulteta za farmacijo-študentski informacijski sistem. [Elektronski] <https://vis.ffa.uni-lj.si/main.asp>.
9. **Planinšek, O in Srčič, S.** *Vaje iz fizikalne farmacije*. Ljubljana : Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
10. **Zupančič Valant, Andreja.** *Uvod v reologijo*. Ljubljana : Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2007.

11. **FFA**. Modularni reometer. *FFA*. [Elektronski] Anton Paar. [Navedeno: 4. maj 2012.] <http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Oprema/reometer.pdf>.
12. **Ikeda, S in Foegeding, EA**. *Current protocols in food analytical chemistry: Measurement of gel rheology: Dynamic tests, unit H3.2*. 2003.
13. Mowiol® 20-98, Mw~125.000/Sigma Aldrich. [Elektronski] Sigma Aldrich. [Navedeno: 9. maj 2012.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/11773?lang=en®ion=SI>.
14. Mowiol® Polyvinylalcohol. [Elektronski] KSE. [Navedeno: 9. maj 2012.] http://www.kuraray-am.com/pvoh-pvb/downloads/Mowiol_brochure_en_KSE.pdf.
15. **Davis, JR**. *Handbook of materias for medical devices: Overview of boimaterials and their use in medical devices*. ZDA : ASM International, 2003.
16. **Hernandez, R in Sarafin, A**. Viscoelastic properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels and ferrogels obtained through freezing-thawing cycles. *Polymer*. 2004, Zv. 46, str. 5543-5549.
17. *Gel-sol transition of poly(vinyl alcohol) hydrogels formed by freezing thawing*. **Hatakeyema, T, in drugi, in drugi**. Tokio : Thermochemica Acta, 2005, Zv. 431, str. 144-148.
18. *Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinily alcohol) hydrogels: Applications of protein controlled release multilaminate devices*. **Hassan, CM, Stewart, JE in Peppas, NA**. s.l. : European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2000, Zv. 49, str. 161-165.
19. **Million, LE, in drugi, in drugi**. SANS Characterisation of an anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogel with vascular applications. *Macromolecules*. 2007, Zv. 40, str. 3655-3662.
20. (FLUORO)KINOLONI. [Elektronski] [Navedeno: 8. maj 2012.] http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Predavanja/FK3/FK3Q28GB.pdf.
21. *Biowaiver Monographs for immediate release solid oral dosageforms: levofloxacin*. **Koeppe, MO, in drugi, in drugi**. s.l. : Wiley Online Library, 20011.

22. IQUIX (levofloxacin ophthalmic solution) 1.5%. [Elektronski] [Navedeno: 9. maj 2012.]
<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=835>.