

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



NIKA ŽERDONER

DIPLOMSKA NALOGA

**PROUČEVANJE VPLIVA ELEKTROLITOV NA
REOLOŠKE LASTNOSTI KARAGENANSKIH
HIDROGELOV IN NA SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ
KARAGENANSKIH OGRODNIH TABLET**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



NIKA ŽERDONER

DIPLOMSKA NALOGA

**PROUČEVANJE VPLIVA ELEKTROLITOV NA
REOLOŠKE LASTNOSTI KARAGENANSKIH
HIDROGELOV IN NA SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ
KARAGENANSKIH OGRODNIH TABLET**

**INFLUENCE OF ELECTROLITES ON RHEOLOGICAL
PROPERTIES OF CARRAGEENAN HYDROGELS AND
DISSOLUTION OF PENTOXIFYLLINE FROM
CARRAGEENAN HYDROPHILIC MATRIX TABLETS**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

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

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner, mag. farm. za vse strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Za vso pomoč v laboratoriju se zahvaljujem Romani Rošic ter Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan.

Zahvaljujem se tudi somentorju prof. dr. Francu Vrečerju, mag. farm. za pomoč pri izdelavi diplomske naloge in podjetju Krka, d.d. za donacijo vseh potrebnih materialov.

Še posebej pa se zahvaljujem svoji družini in Urošu za vso podporo tekom celotnega študija.

Izjava

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

Nika Žerdoner

Predsednik diplomske komisije:

prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član diplomske komisije:

doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

KAZALO

1	POVZETEK	2
2	SEZNAM OKRAJŠAV	4
3	UVOD.....	5
3.1	PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PRIREJENIM SPROŠČANJEM	5
3.2	HIDROFILNE OGRODNE TABLETE	6
3.2.1	MEHANIZMI SPROŠČANJA IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	6
3.2.2	FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA SPROŠČANJE ZU IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET	7
3.3	REOLOGIJA.....	8
3.3.1	VISKOELASTIČNE LASTNOSTI SNOVI	10
3.3.2	MERITVE REOLOŠKIH LASTNOSTI VISKOELASTIČNIH SNOVI.....	11
3.3.2.1	TESTI PRI KONSTANTNI FREKVENCI OSCILACIJE	12
3.3.2.2	MERITVE FREKVENČNE ODVISNOSTI DINAMIČNIH KOLIČIN	13
3.4	KARAGENANI.....	14
3.4.1	STRUKTURA KARAGENANOV	14
3.4.2	VPLIV KATIONOV NA LASTNOSTI KARAGENANOV	15
3.5	PENTOKSIFILIN	20
4	NAMEN DELA	21
5	MATERIALI IN NAPRAVE	22
5.1	MATERIALI ZA IZDELAVO HIDROGELOV, OGRODNIH TABLET TER ZA PRIPRAVO MEDIJEV ZA SPROŠČANJE.....	22
5.2	NAPRAVE.....	22
6	POSTOPKI IN METODE.....	23
6.1	PRIPRAVA FOSFATNEGA PUFRA.....	23
6.2	PRIPRAVA POLIMERNIH DISPERZIJ	23
6.3	VREDNOTENJE REOLOŠKIH LASTNOSTI.....	24
6.4	IZDELAVA TABLET	25
6.5	ENAKOMERNOST MASE ENOODMERNIH FARMACEVTSKIH OBLIK	25
6.6	TRDNOST TABLET	25
6.7	IZDELAVA UMERITVENIH PREMICE	26
6.8	IZVAJANJE POSKUSOV SPROŠČANJA	26
6.8.1	SPROŠČANJE NA NAPRAVI 2 PO USP	26
6.8.2	SPROŠČANJE NA NAPRAVI 3 PO USP	27
6.9	UGOTAVLJANJE PODOBNOSTI PROFILOV SPROŠČANJA	28
7	REZULTATI IN RAZPRAVA	29
7.1	REOLOŠKO VREDNOTENJE KARAGENANOV V VODI	29
7.2	REOLOŠKO VREDNOTENJE KARAGENANOV V FOSFATNEM PUFRU S pH=6,8	32
7.3	VPLIV RAZLIČNIH SOLI NA REOLOŠKE LASTNOSTI KARAGENANOV	36
7.4	VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET	49
7.4.1	ENAKOMERNOST MASE ENOODMERNIH FARMACEVTSKIH OBLIK.....	49
7.4.2	TRDNOST TABLET	49
7.5	IZDELAVA UMERITVENIH PREMICE	50
7.6	SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ OGRODNIH TABLET	52
7.6.1	SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ TABLET S CARR IOTA NA NAPRAVI Z VESLI	52
7.6.2	SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ TABLET NA NAPRAVI BIODIS.....	53
8	ZAKLJUČEK.....	61
9	LITERATURA.....	63

1 POVZETEK

Karagenani spadajo v skupino sulfatiranih polisaharidov. Tehnološko najbolj pomembne so tri vrste: kappa, iota in lambda, ki se med seboj razlikujejo v številu in poziciji sulfatnih skupin. Ker so karagenani polielektroliti, kationi bistveno vplivajo na njihove lastnosti in sposobnost geliranja. Znano je, da karagenana iota in kappa pri ohlajanju in dodatku kationov prehajata iz sol stanja v gel stanje, saj nastanejo dvojne vijačnice, ki agregirajo in tvorijo kohezivne mreže. Karagenan lambda pa v nasprotju z njima tvori le viskozne raztopine. V diplomski nalogi smo proučili, kakšen vpliv imajo ioni Na^+ , K^+ , Ca^{2+} in Mg^{2+} na reološke lastnosti teh treh tipov karagenanov. V ta namen smo pripravili disperzije karagenanov v raztopinah soli različnih ionskih moči in ovrednotili reološke lastnosti z oscilacijsko reometrijo. S pomočjo amplitudnih testov smo določili območje linearnega viskoelastičnega odziva, nato pa smo izvedli frekvenčne teste, kjer smo proučevali odvisnost elastičnega in viskoznega modula od frekvence oscilacije. Potrdili smo obstoj gelov, pri karagenanih kappa in iota, pri karagenanu lambda pa obstoj viskozne raztopine. Ugotovili smo, da na karagenan kappa najbolj vpliva K^+ , na karagenan iota pa najbolj vplivata dvovalentna iona Ca^{2+} in Mg^{2+} , kar je v skladu z literaturnimi podatki. Omejujoč faktor pri meritvah je bila heterogenost nekaterih vzorcev, saj so ioni vplivali na nastanek delnih gelov ali gelov s sinerezo.

Ker so elektroliti zelo vplivali na reološke lastnosti karagenanskih hidrogelov, smo preverili, ali vplivajo tudi na sproščanje modelne učinkovine iz karagenanskih hidrofilnih ogrodnih tablet. Kot modelno zdravilno učinkovino smo izbrali dobro topen neionogen pentoksifilin in z direktnim stiskanjem na tabletirki na udarec stisnili tablete iz posameznih karagenanov. Izvedli smo testa enakomernosti mase enodimenzionalnih farmacevtskih oblik in trdnost tablet. Nato smo izvedli teste sproščanja na napravi 2 po USP (naprava z vesli) in na napravi 3 po USP (BioDis). Kot medij smo uporabili prečiščeno vodo in raztopine soli z ionsko močjo 0,05. Rezultate meritev sproščanja smo interpretirali s pomočjo rezultatov, ki smo jih dobili pri reologiji. Ugotovili smo, da je sproščanje iz karagenanskih hidrofilnih ogrodnih tablet zelo odvisno od elektrolitov v mediju in da korelira z reološkimi lastnostmi, kjer je disperzija homogena. Tam nastanek bolj čvrstega gela pomeni počasnejše sproščanje, šibkejšega pa hitrejše sproščanje. Kjer izdelane disperzije za reološko vrednotenje niso bile homogene, reoloških lastnosti ne moremo direktno primerjati s hitrostjo sproščanja, lahko pa si vseeno pomagamo pri interpretaciji rezultatov. Glede na to, kako velik vpliv imajo kationi na reološke lastnosti karagenanskih hidrogelov in na sproščanje pentoksifilina iz karagenanskih ogrodnih tablet, bi bilo za nadaljnje raziskave smiselno uporabiti medij, ki dobro posnema pogoje v gastrointestinalnem traktu. Le tako bodo rezultati dobljeni *in vitro* relevantni rezultatom *in vivo*.

ABSTRACT

Carrageenan is the name of a family of sulphated galactanes. Depending on the number and position of sulphate groups, three main carrageenan types have been identified: kappa, iota and lambda. Carrageenans are polyelectrolytes and as expected, counter ions play a major role in the gelation process and their characteristics. Both kappa and iota carrageenan dispersions undergo sol-gel transition upon cooling and the addition of counter ions because of aggregation of double helices into three dimensional cohesive networks. In contrast, lambda carrageenan does not undergo gelation with mono- or divalent cations and displays only viscous behavior. Therefore, the influence of cations, such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} on rheological properties of carrageenan hydrogels was investigated. Carrageenan dispersions in salt solutions of different ionic strength were prepared and their viscoelastic behaviour was analyzed using rheometer in the oscillatory mode. In the first place, linear viscoelastic region was determined and all other measurements were performed within this region. Storage and loss modulus were measured as a function of frequency. The existence of true gels for iota and kappa carrageenans and viscous solutions for lambda carrageenan was confirmed. Kappa carrageenan was mostly effected by K^+ and iota carrageenan was effected by Ca^{2+} and Mg^{2+} , which is consistent with literature data. Syneresis (polymer helices aggregate tightly and extrude water from the system) has been a limiting factor in measuring the dynamic moduli, as the water leads to slip effect.

Further the influence of electrolytes on dissolution of pentoxifylline from carrageenan hydrophilic matrix tablets was investigated. Pentoxifylline was chosen because it is highly soluble, non-ionic drug. Tablets were prepared with direct powder compression method on single-punch press. Uniformity of mass of single-dose preparation test and resistance to crushing of tablets test were performed. After that, the dissolution of drug from tablets with apparatus 2 in USP (paddle apparatus) and with apparatus 3 in USP (BioDis) was tested. Five different dissolution medium were used: purified water and water with NaCl , KCl , CaCl_2 and MgCl_2 (ionic strength was 0,05). Results were interpreted and it was found out, that dissolution of drug is highly dependent on electrolytes in medium. It is in correlation with rheological properties, when samples are homogeneous: more compact gel means slower dissolution. When dispersions are not homogeneous, there is no direct correlation between dissolution of drug and rheological properties of gel. Our research showed great influence of cations on rheological properties of carrageenan hydrogels and on release of pentoxifylline from carrageenan hydrophilic matrix tablets. Therefore, in additional studies, it is reasonable to use medium, which imitate gastrointestinal conditions, so the rational *in vitro in vivo* evaluation of dosage form can be established.

2 SEZNAM OKRAJŠAV

Carr: karagenan

FO: farmacevtska oblika

G': elastični modul (storage modulus) [Pa]

G'': viskozni ali plastični modul (loss modulus) [Pa]

G*: kompleksni strižni modul [Pa]

OR: osnovna raztopina

PF: pentoksifilin

Ph. Eur. (7th Ed.): evropska farmakopeja (7. izdaja)

R²: kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije

SD: standardna deviacija

SEM: vrstični elektronski mikroskop (scanning electron microscope)

USP: ameriška farmakopeja

ZU: zdravilna učinkovina

γ : strižna deformacija [%]

$\dot{\gamma} = D$: strižna hitrost [s⁻¹]

γ_a : amplituda strižne deformacije

δ : fazni zamik med inducirano strižno deformacijo in nastalo strižno napetostjo

η : viskoznost [Pas]

η^* : kompleksna viskoznost [Pas]

ι, κ, λ : iota, kappa, lambda

μ : ionska moč

τ : strižna napetost [Pa]

ω : kotna hitrost [1/s]

3 UVOD

3.1 PERORALNE FARMACEVTSKE OBLIKE S PRIREJENIM SPROŠČANJEM

Formularium Slovenicum opredeljuje farmacevtske oblike (FO) z neprirejenim (takojšnjim) sproščanjem in FO s prirejenim (nadzorovanim) sproščanjem. Te so oblikovane tako, da priredijo hitrost, mesto ali čas sproščanja zdravilne učinkovine (ZU). Razdelimo jih na:

- FO s podaljšanim sproščanjem (sustained release), ki sproščajo ZU čez daljše časovno obdobje;
- FO z zakasnelim sproščanjem (delayed release), ki začnejo sproščati ZU po določenem času;
- FO s pulzirajočim sproščanjem (pulsatile release), ki sproščajo ZU v določenih časovnih intervalih (1).

Cilj razvoja FO s prirejenim sproščanjem je doseči želen profil ZU v plazmi in večjo sprejemljivost s strani bolnika (2). Te FO med drugimi omogočajo manj pogosto odmerjanje, manjše nihanje plazemskih koncentracij ZU, večjo komplianco bolnikov in imajo manj neželenih učinkov (3).

Izmed vseh možnih načinov aplikacije zdravila, je peroralna dostava najbolj običajna, najpogostejša FO pa so tablete. Prednost tablet je, da so bolniku prijazne. V primerjavi s tekočimi FO so fizikalno in kemijsko bolj stabilne, omogočeno je točno odmerjanje ZU, so priročne za uporabo in jih je relativno enostavno in poceni izdelati z dobro kontrolo kakovost (4).

Peroralne FO s prirejenim sproščanjem lahko razdelimo v več skupin:

- FO, kjer je sproščanje nadzorovano z raztapljanjem (raztapljanje je lahko nadzorovano z enkapsulacijo ali z ogrođjem);
- FO, kjer je sproščanje nadzorovano z difuzijo (poznamo sisteme z rezervoarjem ali ogrodne sisteme);
- FO, kjer je sproščanje nadzorovano z ionsko izmenjavo;
- FO, kjer je sproščanje nadzorovano z osmotskim tlakom;
- FO s podaljšanim časom zadrževanja v želodcu (2).

3.2 HIDROFILNE OGRODNE TABLETE

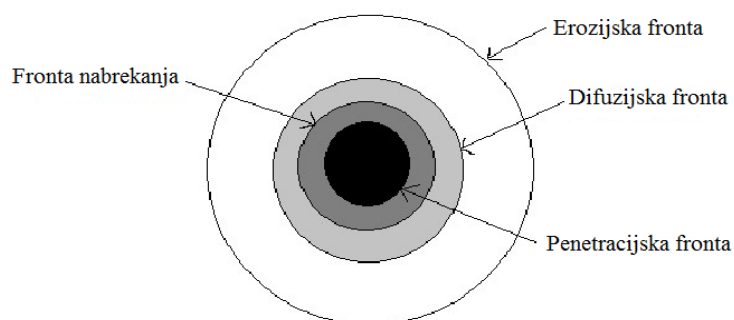
Najbolj pogosta vrsta tablet, ki omogočajo podaljšano sproščanje, so hidrofilne ogrodne tablete, saj je njihova izdelava enostavna in poceni, imajo dobro *in vitro* / *in vivo* korelacijo, možna je vgradnja učinkovin z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (3).

Pri hidrofilnih ogrodnih tabletah je ZU dispergirana v hidrofilnem polimeru, kot so npr. celulozni etri (hidroksipropilmetilceluloza – HPMC, hidroksipropilceluloza – HEC, etil hidroksietilceluloza – EHEC), natrijev alginat, karagenani, ksantan, polietilenoksidi, karbopol. Poleg hidrofilnega polimera in ZU, so lahko v tabletah prisotne tudi druge pomožne snovi, npr. polnila in drsila (3).

3.2.1 MEHANIZMI SPROŠČANJA IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET

Hidrofilno ogrodje se ob stiku z vodo omoči, polimer na površini tablete prehaja iz steklastega stanja v hidrogel. Gelski ovoj se sčasoma širi v notranjost tablete. Polimerne verige na zunanji strani tablete, ki so se hidrirale pred tistimi v notranjosti, se sproščajo in tako ogrodje erodira. Pri nabrekanju hidrofilnih ogrodnih tablet se tvorijo fronte in plasti, ki se med procesom nabrekanja in sproščanja premikajo v odvisnosti od časa (Slika 1).

- Penetracijska fronta predstavlja mejo med polimerom v hidratiranem stanju in polimerom v steklastem stanju.
- Nabrekajoča fronta predstavlja mejo, kjer polimer prehaja v elastično stanje, začne nabrekati. Vode je premalo, da bi se ZU raztopila.
- Difuzijska fronta predstavlja mejo med ZU v neraztopljenem in raztopljenem stanju.
- Erozijska fronta predstavlja mejo med gelsko plastjo in polimernimi verigami, ki se ločijo od gelske plasti (3, 5).



Slika 1. Ogrodna tableta med sproščanjem, vidimo štiri fronte: penetracijsko fronto, fronto nabrekanja, difuzijsko fronto in erozijsko fronto.

Mehanizmi, preko katerih se ZU sprošča, so kompleksni in vključujejo različne procese: vstop vodnega medija v ogrodje, nabrekanje, raztapljanje ZU v mediju, difuzijo raztopljenih molekul ZU skozi gelsko plast in erozijo ogrodja. Ločimo predvsem dva mehanizma sproščanja ZU:

- a) Sproščanje je nadzorovano z difuzijo: dobro topna ZU se znotraj hidratiranega ogrodja raztopi in difundira skozi gelsko plast nabreklih hidrogela.
- b) Sproščanje je nadzorovano z erozijo, kar je bolj pomembno za slabo topne ZU: voda, ki vstopa v sistem nabreka polimer in ga tudi raztaplja. Ko polimer erodira, je več vode na voljo za ZU in se le-ta sprosti in raztopi.

Pogosto se procesa difuzije in erozije prepletata in odvijata sočasno (3).

3.2.2 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA SPROŠČANJE ZU IZ HIDROFILNIH OGRODNIH TABLET

Faktorjev, ki vplivajo na sproščanje ZU iz hidrofilnih ogrodij, je veliko. Pri ZU je poleg topnosti pomembna sama molekulska masa, saj ZU z nižjo molekulsko maso difundirajo skozi gelsko plast lažje kot tiste z višjo. Topnost ZU vpliva na mehanizem sproščanja in s tem na kinetiko sproščanja. Vplivata tudi velikost delcev ZU in odmerik – pri visokih odmerkih ZU je zmanjšan delež polimera v tableti, zato bo tudi gelski sloj šibkejši, kar pomeni hitrejšo sproščanje.

Eden izmed faktorjev je polimer s svojimi strukturnimi in fizikalno kemijskimi lastnostmi, ki ga pri izdelavi tablet uporabimo. Vsi polimeri, na primer, ne tvorijo hidrogela (tak primer je etilceluloza). Molekulska masa polimera je direktno povezana z lastnostmi hidrogela – višja molekulska masa pomeni večjo stopnjo nabrekanja in manjšo sposobnost erozije. Za doseganje želenega profila sproščanja se pogosto uporabljajo kombinacije polimerov, npr. HPMC in etilceluloze. Narava substituentov in njihovo število na polimerni verigi igrajo bistveno vlogo pri stopnji hidratacije in difuzije ZU v medij. Na sproščanje ZU vpliva tudi velikost delcev polimera – manjši kot so delci, hitreje se tvori hidrogel. Zelo pomemben faktor je viskoznost gelske plasti – večja kot je, počasnejše je sproščanje. Viskoznost polimera je odvisna od kemijske strukture le-tega, njegove molekulske mase in interakcij s topilom.

Reološke lastnosti hidrogela in s tem sproščanje ZU so zelo odvisne od medija. Opazimo lahko vpliv pH in ionske moči medija na sproščanje ZU. Prisotnost ionov v mediju lahko prepreči hidratacijo polimera, kar vodi do šibkejših gelskih plasti. Omeniti je potrebno tudi,

da je hidratacija polimera in s tem tudi sproščanje odvisno od temperature. Pomemben faktor, ki vpliva na sproščanje ZU, je količina vode, ki prodira v ogrodje, saj le ta pomembno vpliva na lastnosti hidrogela. Poznamo tri vrste vode: prosto vodo, v kateri se ZU raztaplja, rahlo vezano vodo in vezano vodo, ki je vezana na polimer.

Na sproščanje seveda vplivajo tudi karakteristike same tablete: geometrija in debelina, prisotnost drugih ZU in pomožnih snovi, pH mikrookolja (to je pH nasičene raztopine, ki obdaja delce v formulaciji), poroznost tablete in njena trdnost (3).

3.3 REOLOGIJA

Reologija je interdisciplinarna veda o tokovnem obnašanju in deformaciji materiala. Omogoča vrednotenje mehanskih lastnosti predvsem tekočin in poltrdnih snovi ter viskoelastičnih trdnih snovi (6). Reologija ima pomembno mesto tudi v farmaciji, saj omogoča razjasnitev notranje strukture sistemov, spremljanje fizikalne stabilnosti vhodnih materialov, zdravilnih pripravkov in obnašanja snovi pod vplivom temperature, pomaga pri optimizaciji in kontroli končnih izdelkov, izbiri ustreznih vhodnih surovin, itd. (7).

Reološke parametre lahko predstavimo s preprostim modelom preiskovane tekočine med dvema ploščama s površino S [m²] in medsebojno razdaljo h [m] (Slika 2). Medtem ko spodnja plošča miruje, zgornjo premikamo s silo F [N] in hitrostjo v [m/s]. Nastane laminarni tok, posamezne tekočinske plasti pa se gibljejo z različnimi hitrostmi relativno druga na drugo. Sila, ki deluje v smeri ploskve, imenujemo strižna sila in je odgovorna za spremembo oblike telesa. Delovanje te strižne sile povzroči določen premik plasti, kar opišemo s strižno deformacijo γ . Po prenehanju delovanja sile se lahko molekule vrnejo v prvotni položaj (govorimo o elastični deformaciji). V tem primeru pride le do raztega vezi med atomi, a se te ne pretrgajo. Če pa se atomi preveč odmaknejo, povratek v prvotno lego ni več mogoč, pride do preurejanja, deformacija je trajna ali plastična. Vrsta deformacije je odvisna od zgradbe sistema ter od velikosti in trajanja deformacije (7).

Strižna napetost τ [Pa] je kvocient sile F , ki leži v ploskvi in površine S . Pri elastičnem obnašanju je mehanska strižna napetost v linearni zvezi z deformacijo (Hookov zakon za trdne snovi). To pomeni da se po razbremenitvi deformacija sorazmerno zmanjša (7).

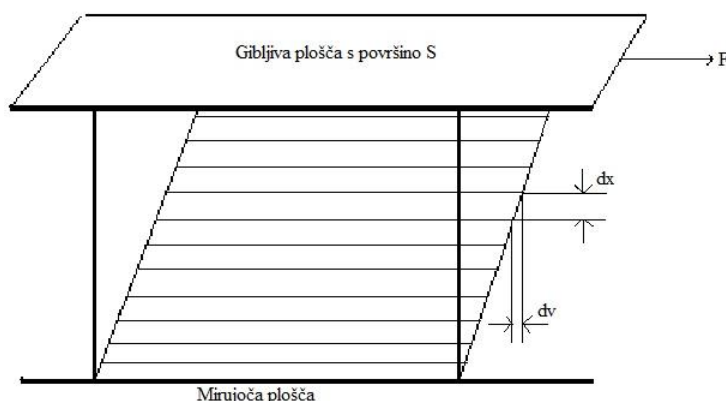
Strižna hitrost $\dot{\gamma} = D$ [s⁻¹] je mera tekočinske deformacije oz. je kvocient med diferencialom hitrosti dv in razmikom med sosednjima tekočinskima plastema dx . Strižna

hitrost v primeru poltrdnih in trdnih sistemov je obravnavana kot odvod deformacije dy po času dt .

Viskoznost (η) predstavlja odpor proti drsenju tekočine in je v enačbi določena kot sorazmernostni faktor med strižno napetostjo (τ) in strižno hitrostjo D (6).

$$\tau [\text{Pa}] = \eta [\text{Pas}] \cdot D [\text{s}^{-1}]$$

/enačba 1/



Slika 2. Model za razlago osnovnih reoloških parametrov.

Tokovno obnašanje sistemov najlažje prikažemo z reogrami, kjer na absciso nanašamo strižno hitrost D , na ordinato pa merjeno strižno napetost τ . Lahko pa prikažemo tudi odvisnost viskoznosti η od strižne hitrosti D (7).

Sisteme v grobem razdelimo na idealne ali Newtonske in realne ali ne-Newtonske. Newtonski sistemi so idealizirane tekočine, pri katerih viskoznost ni odvisna od delovanja sile na sistem in njenega trajanja. Je le funkcija temperature in atmosferskega tlaka. Z naraščujočo temperaturo viskoznost zaradi povečanega Brownovega gibanja molekul pada. Realne kapljevine, poltrdni in trdni sistemi pa se v glavnem obnašajo ne-Newtonsko, torej je njihova viskoznost odvisna od obremenitve. Ločimo psevdoplastične sisteme (to so tisti, pri katerih viskoznost z naraščujočo obremenitvijo pada), dilatantne sisteme (viskoznost z večanjem strižne obremenitve narašča) in plastične sisteme (pri njih je potrebna določena sila-mejna napetost, da snovi stečejo). Razlog za psevdoplastično obnašanje je ureditev strukturnih elementov v smeri toka kot posledica striga. Delovanje zunanje sile povzroči orientiranje npr. polimernih verig vzdolž osi, kar zmanjša notranje trenje med molekulami in dolge polimerne verige lažje zdrsejo ena ob drugi. Razlog za dilatantno obnašanje snovi je v tem, da se z večanjem obremenitve strukturni elementi premaknejo tako, da se med njimi pojavi večje število medsebojnih interakcij (7).

Časovno odvisni ne-Newtonski sistemi so tiksotropni ali reopeksni. Pri tiksotropnih sistemih viskoznost s časom in naraščujočo obremenitvijo pada, kar je posledica porušanja strukture sistema v obremenitveni fazi. V razbremenitveni fazi pa se struktura po določenem času ponovno zgradi – proces je reverzibilen. Reopeksija je nasproten pojav kot tiksotropija, kar pomeni, da se v obremenitveni fazi strukturiranost večja, v razbremenitveni fazi pa se vzpostavi prvotno stanje, torej se viskoznost zopet zmanjša. V okviru ne-Newtonskih snovi poznamo še viskoelastične sisteme, ki so reološko najbolj kompleksni. Kažejo viskozno in elastično obnašanje (7).

3.3.1 VISKOELASTIČNE LASTNOSTI SNOVI

Viskoelastičnih sistemov ni mogoče okarakterizirati z enostavnimi reološkimi enačbami, saj se obnašajo zelo kompleksno. Med obremenitvijo se namreč del energije izgublja in se pretvarja v toploto zaradi viskoznega trenja, del energije pa se shrani, ta shranjena energija omogoča vrnitev viskoelastičnih sistemov v prvotno obliko za tisti delež, ki priprada elastičnosti (7). Viskoznost in elastičnost sta torej dve osnovni lastnosti materialov kot odziv na delovanje strižnih sil (6).

Idealno trdno telo se pod vplivom strižnih sil deformira elastično, kar lahko ponazorimo z odzivom vzmeti. Energija se akumulira, kar omogoča popolno obnovo telesa po prenehanju delovanja strižnih sil. Strižna napetost τ je sorazmerna deformaciji γ (Hookov zakon). Sorazmernostni faktor je elastični strižni modul G .

$$\tau = G \cdot \gamma \quad \text{/enačba 2/}$$

Idealna tekočina se deformira ireverzibilno, kar lahko ponazorimo z odzivom dušilke. Energija, potrebna za deformacijo tekočine, se potroši v obliki toplote in je ni mogoče povrniti po prenehanju delovanja strižnih sil. Strižna napetost je premosorazmerna hitrosti deformacije D (Newtonov zakon). Sorazmernostni faktor je viskoznost.

$$\tau = \eta \cdot D \quad \text{/enačba 3/}$$

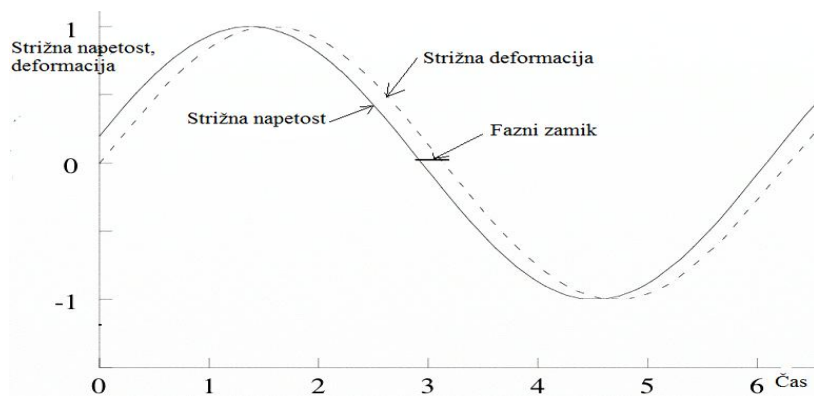
Ali se bo določena snov odzvala bolj elastično ali bolj viskozno, pa ni odvisno le od vrste snovi, temveč tudi od časa trajanja eksperimenta (6).

3.3.2 MERITVE REOLOŠKIH LASTNOSTI VISKOELASTIČNIH SNOVI

Za enolično določitev viskoelastičnih lastnosti je pomembno, da meritve izvajamo pri majhnih strižnih deformacijah. Na ta način namreč zagotovimo, da se bo snov na strižno silo odzvala v območju linearnega viskoelastičnega odziva, reološke količine pa bodo relativno enostavno merljive. Meritve torej izvajamo pri t. i. nedestruktivnih strižnih pogojih. Namen meritev je določiti delež viskoznega in elastičnega doprinosa k viskoelastičnemu odzivu snovi (6). Tudi pri destruktivnih pogojih se tekočina odziva viskozno in elastično, vendar je sama izvedba meritev in analiza eksperimentalnih podatkov pri teh pogojih zahtevna.

Meritve lahko izvajamo z uporabo dveh merilnih tehnik: z dinamičnimi testi (oscilatorni testi) in statičnimi testi (testi lezenja in obnove) (6). Večina modernejših reometrov omogoča meritve viskoelastičnih lastnosti v območju linearnega viskoelastičnega odziva. Meritve običajno izvajamo z oscilacijskim viskozimetrom z nastavljljivo strižno napetostjo ali z nastavljljivo strižno hitrostjo (6). Vzorec namestimo med spodnjo ploščo in merilni sistem in ga izpostavimo stalnim različno hitrim ali različno velikim strižnim obremenitvam, kar dosežemo z osciliranjem merilnega sistema. Vzorec se premikanju levo in desno upira z določenim navorom, ki ga merilni inštrument zazna. Ta signal se pretvori v električnega, računalniški program pa lahko izračuna reološke parametre (7).

Pri oscilatornih testih se strižna deformacija s časom spreminja sinusno z določeno frekvenco ω in amplitudo γ_a . Spremljamo časovno odvisnost strižne napetosti kot odziv na vsiljeno sinusno spreminjanje strižne deformacije (Slika 3). S pomočjo matematičnih modelov lahko določimo doprinos elastične in viskozne komponente, če poznamo fazni zamik δ med inducirano strižno deformacijo in nastalo strižno napetostjo (6).



Slika 3. Časovna odvisnost strižne napetosti kot odziv na spreminjanje strižne deformacije in prikaz faznega zamika.

Zapišemo lahko naslednje enačbe:

$$G' = (\tau_a/\gamma_a) \cdot \cos\delta \quad \text{/enačba 4/}$$

$$G'' = (\tau_a/\gamma_a) \cdot \sin\delta \quad \text{/enačba 5/}$$

G' [Pa] imenujemo elastični modul (storage modulus), ki je modul akumulacije energije in je v fazi z vsiljeno strižno deformacijo. G'' [Pa] pa imenujemo viskozni ali plastični modul (loss modulus), ki je modul energetskih izgub in je izven faze z vsiljeno strižno deformacijo. Ta dva modula sta komponenti kompleksnega strižnega modula G^* , ki ga vektorsko zapišemo:

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{/enačba 6/}$$

Za idealno trdno telo je torej $G''=0$ in $\delta=0^\circ$, za idealno tekočino pa je $G'=0$ in $\delta=90^\circ$. Fazni zamik ima torej vrednosti med 0° in 90° , tangens faznega zamika pa je razmerje med elastičnim in viskoznim modulom.

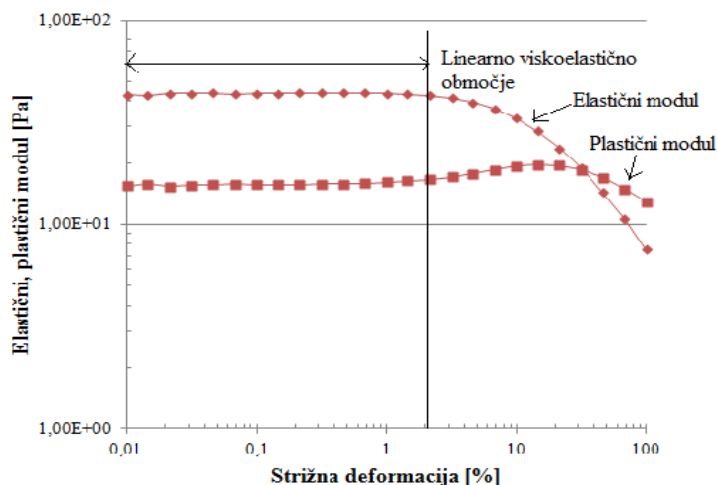
$$\tan\delta = G''/G' \quad \text{/enačba 7/}$$

Za opis viskoelastičnih količin se lahko uporablja tudi kompleksna viskoznost η^* , ki predstavlja celoten odpor snovi proti toku (6).

$$\eta^* = \tau_a/(\gamma_a \cdot \omega) = G^*/\omega \quad \text{/enačba 8/}$$

3.3.2.1 TESTI PRI KONSTANTNI FREKVENCI OSCILACIJE

Ta metoda je prvi korak za reološko opredelitev viskoelastičnih snovi, saj z njo določimo območje linearnosti. Reološke lastnosti viskoelastične snovi so do neke mejne vrednosti (γ ali τ) neodvisne od amplitude strižne deformacije, nad to vrednostjo pa začno vrednosti dinamičnih količin (G^* , G' , G'' , η^*) padati, fazni zamik pa naraščati (Slika 4). To pomeni, da je testiranje snovi prešlo v nelinearen viskoelastičen odziv. Test izvajamo tako, da zvezno povečujemo amplitudo strižne deformacije in merimo odziv. Ko notranja struktura vzorca popusti, se vrednosti reoloških količin spremenijo. Nadaljne teste torej izvajamo v območju nižjih amplitud kot je zgornja meja linearnega viskoelastičnega odziva (6).



Slika 4. Prikaz linearnega viskoelastičnega območja.

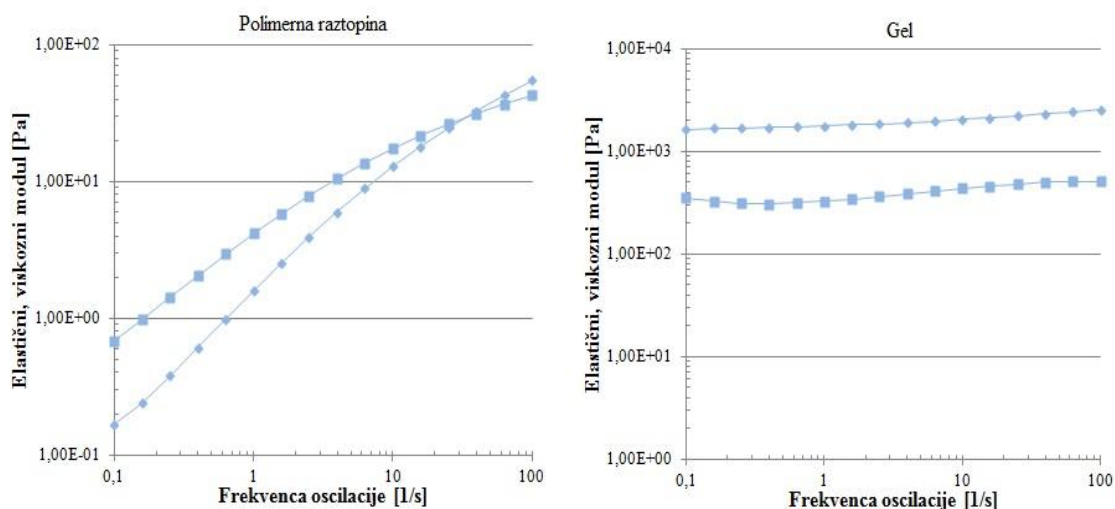
3.3.2.2 MERITVE FREKVENČNE ODVISNOSTI DINAMIČNIH KOLIČIN

Naslednji korak pri meritvah viskoelastičnih lastnosti snovi je stopenjsko povečevanje frekvenca oscilacije. Tako določimo frekvenčno odvisnost dinamičnih količin v pogojih, ko se notranja struktura snovi ne podira. S spreminjanjem frekvenca oscilacije med meritvijo spreminjamo hitrost vnesene deformacije. Kot rezultat dobimo spekter odzivov snovi na časovni potek eksperimenta, ki nam omogoča sklepanje na tip mikrostrukture proučevane snovi, na jakost vezi med strukturnimi elementi, stopnjo geliranja in podobno (6).

Kadar je $G'' > G'$, prevladuje viskozno obnašanje, oba dinamična modula sta izrazito frekvenčno odvisna, G' pa narašča hitreje kot G'' , zato pride do prekrivanja krivulj. Nad frekvenco, kjer je $G'' = G'$, prevladuje elastičen značaj tekočine. Taka krivulja je značilna za polimerne raztopine (Slika 5).

Kadar opazimo plato, lahko govorimo o viskoelastičnih poltrdnih snoveh. Tak tip diagrama je značilen za šibko-gelsko strukturo, kaže prevladujoč elastični doprinos in zelo majhen vpliv frekvenca oscilacije na dinamična modula (Slika 5).

Viskoelastične lastnosti so pogosto odvisne od temperature. V splošnem velja, da z naraščanjem temperature upada elastični doprinos k viskoelastičnemu odzivu (6).



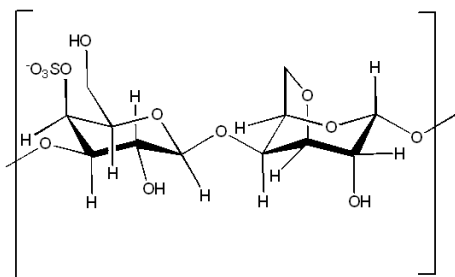
Slika 5. Frekvenčna odvisnost elastičnega (♦) in viskoznega (■) modula pri polimerni raztopini in gelu.

3.4 KARAGENANI

Karagenani (carr) so skupna sulfatiranih polisaharidov, ekstrahiranih iz rdečih morskih alg (*Rhodophyceae*) (8). Veliko se uporabljajo v prehrambeni industriji, farmaciji in kozmetiki kot zgoščevala, stabilizatorji in sredstva za geliranje, v raziskavah se uporabljajo kot možna sredstva za zaščito pred nekaterimi spolnopenosljivimi boleznimi (9). V odvisnosti od vira in stopnje sulfatiranosti so do sedaj odkrili 7 različnih vrst karagenanov, od teh so tehnološko najbolj pomembne tri vrste: kappa (κ), lambda (λ) in iota (ι) (8, 10).

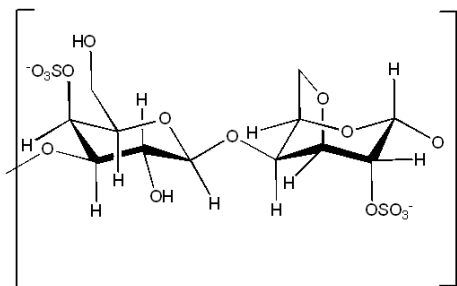
3.4.1 STRUKTURA KARAGENANOV

Karagenan kappa (carr κ) je sestavljen iz ponavljajočih se disaharidnih enot α -(1-3)-D-galaktoze-4-sulfata in β -(1-4)-3,6-anhidro-D-galaktoze, ki tvorijo linearno verigo (11). V strukturi ima eno sulfatno skupino na disaharidno enoto (Slika 6) (12).



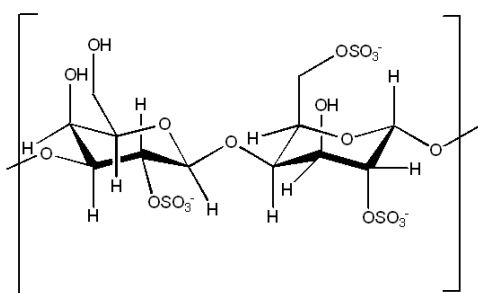
Slika 6. Teoretična struktura karagenana kappa.

Karagenan iota (carr ι) je sestavljen iz disaharidnih enot D-galaktoza-4-sulfata in 3,6-anhidro-D-galaktoze-2 sulfata. Enote so medsebojno povezane z 1-3- α in 1-4- β vezmi. Razlika od carr κ je v eni sulfatni skupini na 3,6-anhidro-D-galaktoznem ostanku (Slika 7) (8).



Slika 7. Teoretična struktura karagenana iota.

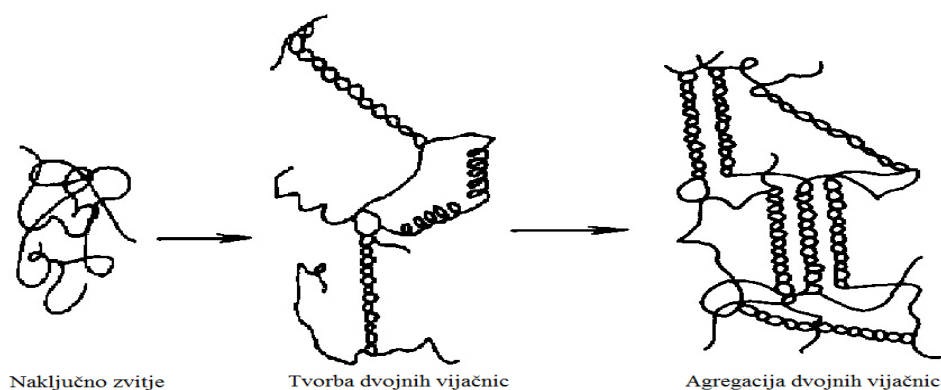
Karagenan lambda (carr λ) nima 3,6-anhidro mostu na galaktozni enoti, disaharidna enota vsebuje tri negativno nabite sulfatne skupine. Je kopolimer D-galaktoze-2-sulfata in D-galaktoze-2,6-disulfata (Slika 8) (9).



Slika 8. Teoretična struktura karagenana lambda.

3.4.2 VPLIV KATIONOV NA LASTNOSTI KARAGENANOV

Ker so carr polielektroliti, ioni bistveno vplivajo na njihove lastnosti in sposobnost geliranja (12, 14). Disperziji carr κ in ι pri ohlajanju in dodatku kationov kot so Na^+ , K^+ in Ca^{2+} prehajata iz sol stanja v gel stanje. Nasprotno pa carr λ ne gelira, najverjetneje zaradi visoke stopnje sulfatiranosti. Najbolj sprejeta teorija, ki opisuje proces geliranja, je model domen, ki pravi, da so pri visoki temperaturi, molekule carr v naključnih vijačnicah (Slika 9). Pri znižanju temperature pa pride do nastanka dvojnih vijačnic, kar vodi do nastanka majhnih domen, ki vsebujejo omejeno število intermolekularno povezanih verig. V prisotnosti kationov vijačnice različnih domen agregirajo in tvorijo kohezivne mreže. Nastanek gela je torej rezultat te kvarterne strukture (13).



Slika 9. Prikaz modela domen.

Znano je, da je carr κ zelo občutljiv na prisotnost monovalentnih ionov. NMR študije so pokazale, da se ti ioni (kalij- K^+ , cezij- Cs^+ in rubidij- Rb^+) vežejo na vijačnico (14). Inducirajo intermolekularne asociacije, saj tvorijo ionsko vez s sulfatno skupino, nato pa se tvori sekundarna elektrostatska vez med ionom in kisikom v anhidro-mostu galaktoznega ostanka. Manjši kationi, kot sta natrijev (Na^+) in litijev (Li^+), so sposobni samo ionske vezave na sulfatno skupino (13). Vpliv divalentnih ionov, kot je kalcijev (Ca^{2+}), na tvorbo gelov pri carr κ v literaturi ni dobro opisan, rezultati študij so si nasprotujoči, res pa je, da so se v različnih študijah razlikovali eksperimentalni pogoji. Pri tvorbi gelov je namreč pomembna koncentracija polimera, tip kationa, njegova koncentracija in hitrost hlajenja (14).

Dokazano je bilo, da imajo dvovalentni ioni, kot je na primer Ca^{2+} , velik vpliv na carr ι in na njegovo sposobnost tvorbe gela. Ca^{2+} je namreč sposoben tvorbe intramolekularnih mostov med sulfatnimi skupinami sosednjih anhidro-D-galaktoznih in D-galaktoznih ostankov. Pri ohlajanju pa prihaja do kvarterne strukture zaradi tvorbe intermolekularnih Ca^{2+} mostov (13).

V nasprotju s carr κ in ι , carr λ ne tvori gelov z mono- ali divalentnimi kationi in se obnaša kot viskozna raztopina. Razlog naj bi bil v poziciji sulfatne skupine na mestu 2, ki je obrnjena navznoter in preprečuje nastanek urejenih mrež (9).

Poudariti je potrebno, da so carr naravnega izvora, zato je njihova struktura na slikah 6–8 prikazana idealizirano. Prav tako so v obliki različnih soli, zato se v večini študij uporabljajo prečiščeni carr (npr. z ionsko izmenjevalno kromatografijo in s spiranjem z etanolom) (15).

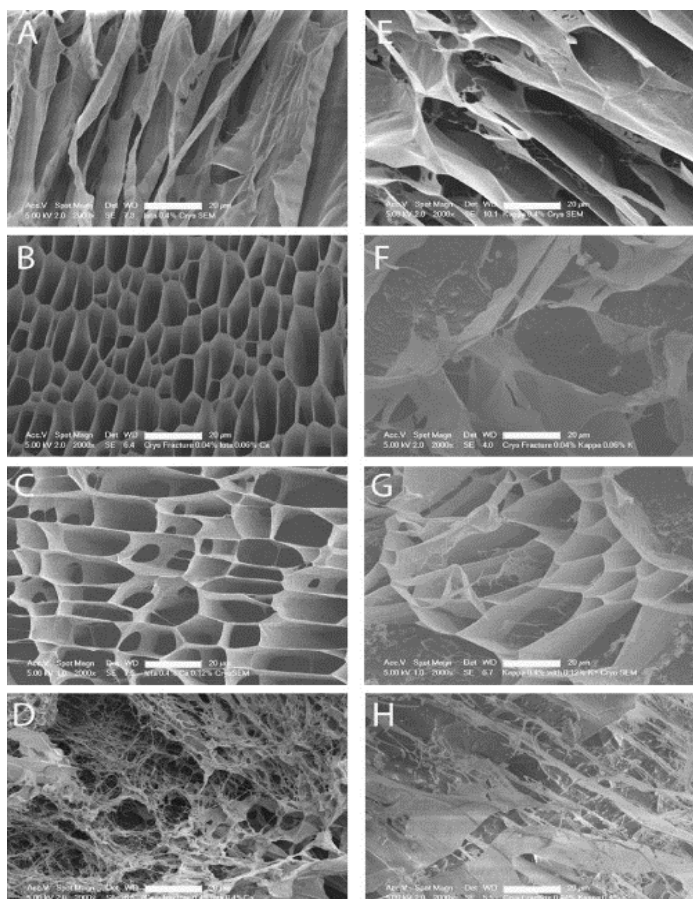
Rezultati študij nakazujejo, da lahko pri carr κ , ob dodatku soli, nastanejo geli, delni geli, geli s sinerezo ali raztopine. Nastanek delnega gela pomeni, da koncentracija polimera ni bila dovolj visoka, da bi se posamezni skupki gela povezali med seboj, zato delci gela plavajo v raztopini. Gel s sinerezo pa pomeni, da se verige polimera trdno povežejo med sabo in pri tem iztisnejo vodo iz sistema – na površini gela je plast vode. Kaj nastane, je odvisno od vrste kationa, koncentracije polimera in iona. Pri 1 % disperziji carr κ ob dodatku 0,4 % KCl in več, nastanejo geli s sinerezo, kar pri carr ι ni bilo opaženo. Za tvorbo gela s sinerezo pri dodatku CaCl₂ so raziskovalci ugotovili, da je pri carr κ potrebna večja koncentracija ionov kot če uporabijo KCl (približno 1 %). Če se koncentracija ionov še poveča (in sorazmerno zmanjša koncentracija polimera), nastanejo v primeru carr κ in ι le delni geli, kar nakazuje, da za tvorbo homogenega gela ni bila dovolj visoka koncentracija polimera (13).

Pri primerjavi vpliva KCl in NaCl na carr κ so avtorji opazili specifične interakcije med polimerom in K⁺ ioni. K⁺ ioni povzročijo hitrejšo agregacijo/geliranje kot Na⁺ ioni. Heterogenost je zaradi večje učinkovitosti agregacije večja pri KCl (bolj izražena je sinereza in nastanek delnega gela). Večje kot so interakcije med kationom in carr, bolj heterogen je celoten sistem (14).

Pri opazovanju vpliva NaCl in KCl na carr ι avtorji niso opazili ionske specifičnosti. Tisti, ki pa so jo opazili, ta pojav povezujejo z majhnimi količinami κ karagenana kot nečistote. Pri dvovalentnih ionih (Ca²⁺ in Cu²⁺) ionske specifičnosti niso opazili niti pri carr κ niti pri carr ι (14).

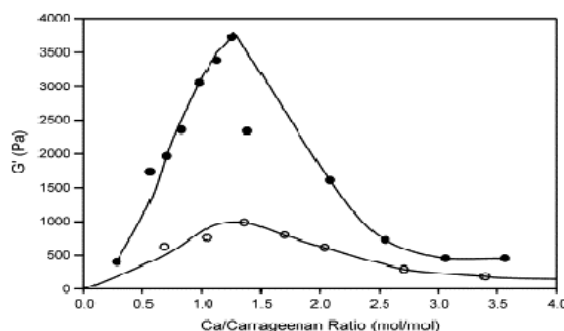
Pri primerjavi vpliva NaCl in KCl na carr κ in ι so opazili, da je za indukcijo geliranja potrebna pri ι karagenanu manjša količina soli in da pri carr κ prej nastane heterogena faza. Razlog za slednje je morda v manjši agregaciji vijačnic pri carr ι v primerjavi s κ (14).

Za analizo mikrostrukture so raziskovalci uporabili metodo z mikroskopom SEM (vrstični elektronski mikroskop). Carr ι v odsotnosti ionov ni izkazoval premreženja, v prisotnosti Ca²⁺ pa se le-to pojavi – tvorijo se pravokotne pore. Nadaljnje povišanje koncentracije Ca²⁺ je imelo negativni učinek na mikrostrukturo sistema – struktura se poruši. Carr κ je pri odsotnosti K⁺ ionov izkazoval nekaj premreženja, dodatek K⁺ ionov je premreženje povečal, nadaljnji dodatek pa bistveno zmanjšal urejenost strukture. Ta negativni učinek bi lahko bil posledica zasičenja vezavnih mest in agregacije polimera, kar lahko uniči kohezivno kvarterno strukturo sistema (Slika 10) (13).



Slika 10. SEM slika posušenih disperzij κ karagenana (0,4 % m/v) v odsotnosti kationov (A), in prisotnosti $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,06 % (B), 0,12 % (C) in 0,4 % (D). Disperzije κ karagenana (0,4 % m/V) v odsotnosti kationov (E) in prisotnosti KCl: 0,06 % (F), 0,12 % (G) in 0,4 % (H); označena velikost predstavlja 20 μm (13).

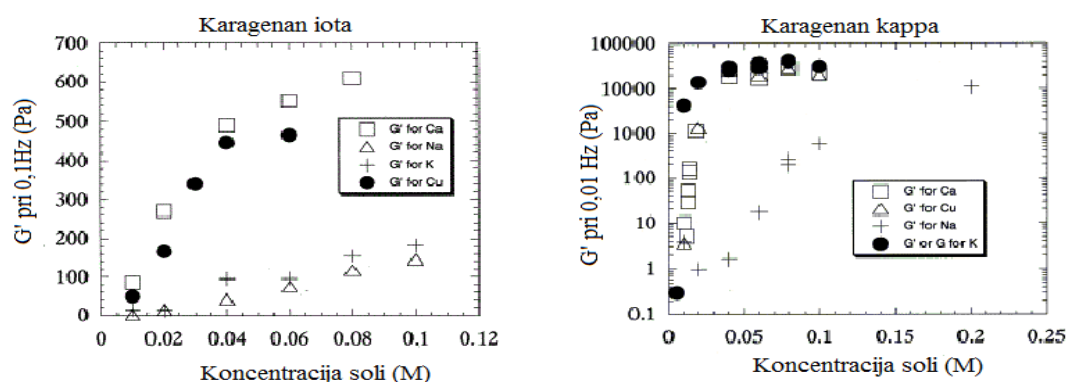
Študija, pri kateri so spremljali odvisnost elastičnega modula G' od razmerja med Ca^{2+} ioni in carr κ , je pokazala, da elastični modul do neke meje narašča, potem pa z nadaljnjim naraščanjem koncentracije Ca^{2+} signifikantno pade (SLIKA 11). Najvišja vrednost elastičnega modula je bila pri stehiometričnem razmerju en Ca^{2+} na sulfatno skupino carr. Razlog za tak padec je bila sinereza, ki se je pokazala kot omejujoč faktor pri meritvah. Enak pojav so isti raziskovalci opazili s slikanjem SEM. Pri molskem razmerju $\text{Ca}^{2+}/\text{karagenan} = 1/1$, so nastale majhne pore, pri poviševanju tega razmerja pa je prišlo do večanja por in podiranja mikrostrukture, kar je dalo šibkejše, motne gele (12).



Slika 11. G' v odvisnosti od razmerja med kalcijem in karagenanom κ pri koncentraciji polimera 5 g/l (○) in 10 g/l (●) (12).

Pri reoloških raziskavah disperzij karagenanov κ in ι v raztopinah monovalentnih in divalentnih soli različnih koncentracij je zanimivo, da dobljeni rezultati pokažejo karakteristike gela, torej, da je elastični modul G' konstanten v merjenem frekvenčnem območju in da je veliko višji od viskoznega modula G'' , čeprav so ti geli vizualno raztopine – tečejo. Rezultati torej potrjujejo obstoj zelo šibkih ampak pravih gelov (14).

Ugotovili so, da v območju nizkih koncentracij soli (do 0,1 M) kationi pri carr ι povečajo elastični modul G' . Razlog je v agregaciji vijačnic, ki se brez ionov ne zgodi zaradi odboja med sulfatnimi skupinami. Pri dodatku ionov se torej poveča območje kristaliničnosti in G' naraste. Pri karagenanu κ je elastični modul največji pri KCl, sledita CaCl_2 in CuCl_2 , najmanjši pa je pri NaCl (območje nizkih koncentracij soli – do 0,05 M). Ko pa dosežemo nek prag, tip in koncentracije soli ne vplivata več veliko na G' . Po tej točki namreč kationi vplivajo le na lokalno heterogenost sistema in pripomorejo k ločitvi faz (Slika 12) (14).



Slika 12. Vpliv soli na elastični modul G' na carr ι in κ pri koncentraciji carr 21,6 g/l in $T=20^\circ\text{C}$ (14).

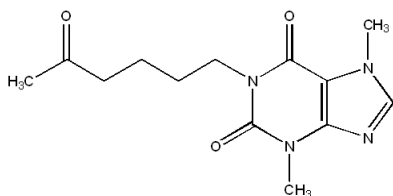
Pomembne so že same koncentracije soli v vzorcu carr in ali je le-ta prečiščen ali ne. Raziskave carr κ so pokazale, da je G' višji pri neprečiščenih vzorcih kot pri prečiščenih. Tudi če so v prečiščen vzorec dodali približno enako koncentracijo soli, kot je v

neprečiščenem vzorcu, so dobili bistveno šibkejšje gele, kar pomeni, da je bistvena kombinacija soli, ki se nahaja v neprečiščenem vzorcu (15).

Kot smo že omenili, karagenan λ po podatkih iz literature z mono- ali divalentnimi kationi tvori le viskozne raztopine, ne pa gelov. Zato so raziskovalci želeli preveriti, kako na tvorbo gela vplivajo trivalentni ioni, npr. FeCl_3 . Ko so v viskozno raztopino λ karagenana dodali vodno raztopino $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, je prišlo do obarjanja, precipitat so reološko ovrednotili. V celotnem frekvenčnem območju je bil $G' > G''$, kar potrjuje nastanek delnega gela in nastanek interakcij med verigami (9).

3.5 PENTOKSIFILIN

Pentoksifilin (PF) (3,7-dihidro-3,7-dimetil-1-(5-oksoheksil)-1H-purin-2,6-dion) je derivat ksantina (Slika 13). Njegov mehanizem delovanja temelji na inhibiciji fosfodiesteraz (predvsem v eritrocitih), kar vodi k zvišanim intracelularnim koncentracijam cikličnega adenozin monofosfata (cAMP). PF izboljša mikrocirkulacijo in oksigenacijo tkiv, saj poveča fleksibilnost rdečih krvnih celic, zmanjša viskoznost krvi, zmanjša agregacijo eritrocitov, potencialno agregacijo trombocitov in zniža nivo fibrinogena. Vpliva tudi na endotelijske celice, levkocite z jedri različnih oblik, makrofage in fibroblaste (16).



Slika 13. Struktura pentoksifilina (molekulska masa je 278,31 g/mol).

Zdravila z ZU pentoksifilin so pri odraslih indicirana za:

- motnje perifernega arterijskega obtoka (makro- in mikrocirkulacije) zaradi ateroskleroze, sladkorne bolezni ali vazospazmov;
- motnje v venskem krvnem obtoku;
- motnje možganskega krvnega obtoka (prehodni ishemični napadi, posledice možganske kapi in kronična možganskožilna insuficienca);
- prekrvavitvene motnje očesa (akutna in kronična stanja zaradi nezadostnega krvnega obtoka v mrežnici) (17).

PF je neionogena, dobro topna ZU (topnost v vodi pri 25 °C je 77 mg/ml) (18). V diplomski nalogi smo ga določali spektrofotometrično, pri valovni dolžini 274 nm.

4 NAMEN DELA

Cilj diplomske naloge bo proučiti vpliv kationov (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} in Ca^{2+}) na tvorbo hidrogelov iz karagenanov tipa kappa, iota in lambda. Zato bomo pripravili gele/raztopine polimerov v prečiščeni vodi in v raztopinah soli različnih koncentracij, določili njihove reološke lastnosti in jih primerjali z literaturnimi podatki. Prav tako bomo proučili, ali ti kationi vplivajo tudi na sproščanje modelne učinkovine pentoksifilina iz karagenanskih hidrofilnih ogrodnih tablet. V ta namen bomo z direktnim stiskanjem stisnili tablete iz polimera in učinkovine in izvedli poskuse sproščanja na napravi 3 po USP (naprava z recipročnimi celindri) in na napravi 2 po USP (naprava z vesli) v različnih medijih. Rezultate pridobljene pri sproščanju bomo primerjali s podatki, ki jih bomo pridobili pri reoloških meritvah, da bi videli, ali lastnosti reološko ovrednotenih izdelanih gelov korelirajo s sproščanjem pentoksifilina iz tablet.

5 MATERIALI IN NAPRAVE

5.1 MATERIALI ZA IZDELAVO HIDROGELOV, OGRODNIH TABLET TER ZA PRIPRAVO MEDIJEV ZA SPROŠČANJE

- karagenan kappa Gelcarin GP-812NF (karagenan κ 1), FMC BioPolymer, Rockland, Maine, ZDA; viskoznost 1,5 % raztopine: 13 mPas; videz: rumen prah
- karagenan kappa Gelcarin GP-911NF (karagenan κ 2); FMC BioPolymer, Rockland, Maine, ZDA; viskoznost 1,5 % raztopine: 24 mPas; videz: rumen prah
- karagenan iota Gelcarin GP-379NF (karagenan ι); FMC BioPolymer, Rockland, Maine, ZDA; viskoznost 1,5 % raztopine: 41 mPas; videz: rumen prah
- karagenan lambda Viscarin GP-209NF (karagenan λ); FMC BioPolymer, Rockland, Maine, ZDA; viskoznost 1,5 % raztopine: 560 mPas; videz: rumen prah
- pentoksifilin, Krka, d.d., Novo mesto, Slovenija; videz: bel prah
- kalijev klorid (KCl) (> 99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev klorid (NaCl) (> 99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalcijev klorid (CaCl_2) (> 90,0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (99,0 % – 101,0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (99,5 % – 100,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid (NaOH) (> 99,0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- s postopkom reverzne osmoze prečiščena voda

5.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Scherzenbach, Švica
- analitska tehtnica, Mettler Toledo XS205, Scherzenbach, Švica
- magnetno mešalo, IKA WERKE, Nemčija
- pH meter MA234, Mettler Toledo, pH/Ion Analyzer, Schwarzenbach, Švica
- modularni reometer Physica MCR 301, Anton Paar; nastavek: CP50-2, D = 50 mm, angle 2°
- avtomatska pipeta BIOHIT e1000 (100-1000 μl), Kemomed, Finska
- tabletirka na udarec, Kilian SP 300 01-SP3, Nemčija
- merilec trdnosti tablet Vanderkamp®, VK 2000, ZDA

- naprava za spremljanje sproščanja vesli, VanKel, VK 7000, ZDA
- avtomatski vzorčevalnik VanKel, VK 8000, ZDA
- naprava za spremljanje sproščanja BIO-DIS Varian, ZDA
- avtomatski vzorčevalnik Varian, VK 8000, ZDA
- UV/VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453, Nemčija

6 POSTOPKI IN METODE

6.1 PRIPRAVA FOSFATNEGA PUFRA

Pripravili smo fosfatni pufer s $\text{pH}=6,8$ po ameriški farmakopeji (USP). Najprej smo pripravili 0,2 M raztopino kalijevega dihidrogenfosfata- KH_2PO_4 in 0,2 M raztopino natrijevega hidroksida- NaOH . 0,2 M raztopino KH_2PO_4 smo pripravili tako, da smo v 2 l merilno bučko natehtali 54,4 g KH_2PO_4 , ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Mešali smo na magnetnem mešalu, dokler se ni KH_2PO_4 popolnoma raztopil. 0,2 M NaOH smo pripravili tako, da smo v 1 l merilno bučko natehtali 8,0 g NaOH in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Premešali smo, da se je NaOH raztopil. V 5 l merilno bučko smo odmerili 1250 ml 0,2 M KH_2PO_4 in 560 ml 0,2 M NaOH . Merilno bučko smo skoraj do oznake dopolnili s prečiščeno vodo. Nastali raztopini smo izmerili pH in ga na $6,8 \pm 0,05$ natančno uravnali z 0,2 M klorovodikovo kislino- HCl in 0,2 M NaOH .

6.2 PRIPRAVA POLIMERNIH DISPERZIJ

Disperzije karagenanov smo pripravili tako, da smo v čašo natehtali prečiščeno vodo (fosfatni pufer s $\text{pH}=6,8$), v njej raztopili soli, da smo dobili raztopine soli z želeno ionsko močjo (μ) in med mešanjem na magnetnem mešalu dodali natehtan karagenan. Čaše smo pokrili s parafilmom in pustili do naslednjega dne (približno 20 ur), da so se disperzije mešale. V kolikor smo vmes videli, da je karagenan še v skupkih, smo s spatulo pomagali razbiti te kepe. Pripravljali smo po 50 g vzorca.

Sestave disperzij so podane v tabeli 1.

Tabela 1. Sestava pripravljenih polimernih disperzij.

	VODA	PUFER	$\kappa_1/\kappa_2/t/\lambda$	KCl	NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂ · 6H ₂ O
0,5% vodna disperzija	49,8 g	-	0,25 g	-	-	-	-
2% vodna disperzija	49,0 g	-	1,00 g	-	-	-	-
0,5% disperzija v pufru	-	49,8 g	0,25 g	-	-	-	-
1% disperzija v pufru	-	49,5 g	0,50 g	-	-	-	-
2% disperzija v pufru	-	49,0 g	1,00 g	-	-	-	-
2% disperzija, KCl, $\mu=0,1$	48,6 g	-	1,00 g	0,365 g	-	-	-
2% disperzija, NaCl, $\mu=0,1$	48,7 g	-	1,00 g	-	0,286 g	-	-
2% disperzija, CaCl ₂ , $\mu=0,1$	48,8 g	-	1,00 g	-	-	0,181 g	-
2% disperzija, MgCl ₂ , $\mu=0,1$	48,7 g	-	1,00 g	-	-	-	0,332 g
2% disperzija, KCl, $\mu=0,05$	48,8 g	-	1,00 g	0,183 g	-	-	-
2% disperzija, NaCl, $\mu=0,05$	48,9 g	-	1,00 g	-	0,143 g	-	-
2% disperzija, CaCl ₂ , $\mu=0,05$	48,9 g	-	1,00 g	-	-	0,091 g	-
2% disperzija, MgCl ₂ , $\mu=0,05$	48,8 g	-	1,00 g	-	-	-	0,166 g

6.3 VREDNOTENJE REOLOŠKIH LASTNOSTI

Polimerne disperzije, ki smo jih pripravili po zgoraj opisanem postopku, smo reološko ovrednotili z reometrom Physica MCR 301. Uporabili smo sistem stožec – ploščica, stožec je imel premer 50 mm in kot 2°. Na spodnjo ploščo smo nanegli vzorec, morebitne zračne mehurčke smo odstranili s spatulo. Ko se je stožec približal spodnji ploščici, je izrinil odvečni vzorec, ki smo ga pred začetkom meritve odstranili.

Nato smo na nekaterih vzorcih izvedli amplitudni test, s katerim smo ugotovili območje linearnega viskoelastičnega odziva. Graf, ki smo ga dobili, je prikazoval odvisnost elastičnega (G') in viskoznega (G'') modula od strižne deformacije, ki smo jo zvezno povečevali od 0,01 do 100 % pri konstantni frekvenci oscilacije (10 1/s). Vse meritve smo izvajali pri temperaturi 25 °C, nekatere pa tudi pri 37 °C.

Frekvenčno odvisnost dinamičnih modulov G' in G'' smo merili pri konstantni deformaciji, v območju nedestruktivnih pogojev (1 % oziroma 0,1 % deformacija). Frekvenca se je spreminjala od 100 do 0,1 1/s. Meritve smo izvajali pri 25 °C, nekatere pa tudi pri 37 °C,

da bi videli temperaturno odvisnost dinamičnih modulov. Med seboj lahko primerjamo le vzorce, ki smo jih merili pri enaki deformaciji. Nekatere vzorce smo merili dvakrat, da bi videli, kakšna je ponovljivost rezultatov.

6.4 IZDELAVA TABLET

Iz vseh vrst karagenanov smo stisnili 400 mg tablete, ki so vsebovale 100 mg pentoksifilina in 300 mg polimera. To smo storili tako, da smo v pateno natehtali 3000 mg pentoksifilina in 9000 mg polimera in maso mešali vsaj 20 minut, da je bila homogena. Nato smo vso maso ročno raztehtali na papirčke po 400 mg mešanice. Z direktnim stiskanjem smo stisnili vsako tableto posebej na tabletirki na udarec, Kilian SP 300. Uporabljali smo okrogle pečate s premerom 12 mm in ravno površino. Med tabletiranjem smo preverjali trdnost tablet in s spreminjanjem položaja pečatov le-to ustrezno prilagodili (Tabela 2).

Tabela 2. Nastavitve pečatov pri tabletiranju.

	Zgornji pečat (mm)	Spodnji pečat (mm)
Tablete s karagenanom κ1	101	120
Tablete s karagenanom κ2	105	120
Tablete s karagenanom ι	105	120
Tablete s karagenanom λ	106	120

6.5 ENAKOMERNOST MASE ENOODMERNIH FARMACEVTSKIH OBLIK

Preizkus enakomernosti mase smo izvajali po predpisu, navedenem v Ph. Eur. 7th Ed, v poglavju 2.9.5 (Uniformity of mass of single-dose preparations). Stehtali smo 20 tablet iz vsake serije in določili povprečno maso. Pri tabletah, težjih od 250 mg lahko največ 2 tableti odstopata od povprečne mase za več kot 5 %, nobena tableta pa ne sme odstopati za več kot 10 % (19). Kot rezultat smo podali povprečno maso, največjo in najmanjšo maso tablet ter standardno deviacijo (SD).

6.6 TRDNOST TABLET

Preizkus smo izvedli po predpisu v Ph. Eur. 7th Ed, v poglavju 2.9.8 (Resistance to crushing of tablets) (19). Poskus smo izvajali na napravi Vanderkamp®, kamor smo položili tableto z večjo, ravno površino navzdol med premični in statični del naprave. Merili smo najmanjšo silo izraženo v Newton-ih (N), ko tableta počí, oziroma se

poškoduje. Kot rezultat smo podali povprečno, maksimalno in minimalno trdnost ter standardno deviacijo. Zaradi omejenega števila tablet smo preskus izvedli le na 5 tabletah.

6.7 IZDELAVA UMERITVENIH PREMICE

Sproščanje pentoksifilina (PF) iz tablet smo izvajali v petih medijih: prečiščena voda, vodne raztopine KCl, NaCl, CaCl₂ in MgCl₂ (vse raztopine soli so imele ionsko močjo 0,05). Za vsak medij smo izdelali umeritveno premico. V 100 ml merilno bučko smo natančno natehtali približno 10 mg PF in z medijem dopolnili do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino (OR) (koncentracija 0,1 mg/ml), ki smo jo dalje redčili.

Tabela 3. Redčenja pri pripravi umeritvene premice.

ml (OR)/ml (bučka)	Faktor redčenja	Dobljena koncentracija (mg/ml)
5/100	20	0,005
7/100	14,3	0,007
10/100	10	0,01
7/50	7,1	0,014
10/50	5	0,02
3/10	3,3	0,03
4/10	2,5	0,04

Vse smo delali v dveh paralelkah. Tako pripravljenim raztopinam smo na spektrofotometru izmerili absorbanco pri 274 nm, rezultate predstavili grafično in izračunali kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije (R^2).

6.8 IZVAJANJE POSKUSOV SPROŠČANJA

6.8.1 SPROŠČANJE NA NAPRAVI 2 PO USP

Na napravi 2 po USP smo izvedli poskuse sproščanja PF iz tablet s carr 1 v prečiščeni vodi in v KCl z $\mu=0,05$. Gre za napravo z veslom. Delali smo v treh paralelkah, v vsaki posodi je bilo na začetku 900 ml medija. Poskus je trajal 24 ur pri konstantni hitrosti vrtenja mešal (rpm=100) in konstantni temperaturi $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Avtomatski vzorčevalnik je odvezal po 10 ml vzorca skozi filter v epruvete v naslednjih časovnih točkah: 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h in 24 h. Odvzetega volumna medija nismo nadomeščali, kar smo upoštevali pri izračunih. Izhlepevanje medija smo omejili s tem, da smo posode pokrili. Vzorce smo

primerno razredčili in jim izmerili absorbanco pri 274 nm. S pomočjo umeritvenih premic smo določili koncentracijo merjenega vzorca in izračunali delež sproščenega PF z naslednjimi enačbami:

$$- V_n = V_0 - (n \cdot V_{vz}) \quad \text{/enačba 9/}$$

$$- m_n = c_n \cdot V_n + \sum c_n \cdot V_{vz} \quad \text{/enačba 10/}$$

$$- X_n = (m_n / m_0) \cdot 100\% \quad \text{/enačba 11/}$$

V_n – dejanski volumen po vzorčenju (ml)

V_0 – začetni volumen medija (ml)

V_{vz} – volumen vzorca (ml)

n – število vzorcev

m_n – masa raztopljenega PF v mediju ob n -tem vzorcu (mg)

c_n – koncentracija vzetega vzorca (mg/ml)

X_n – delež sproščenega PF ob n -tem jemanju vzorca (%)

m_0 – teoretična masa PF v tableti (mg)

6.8.2 SPROŠČANJE NA NAPRAVI 3 PO USP

Sproščanje PF iz vseh tablet smo izvedli na napravi 3 po USP (BioDis). Čeprav ta naprava omogoča uporabo do šestih različnih medijev med sproščanjem (s tem se lažje približamo pogojem v prebavnem traktu), smo mi v vseh posodah uporabili enak medij. S tem smo dosegli večjo in bolj enakomerno hidrodinamsko obremenitev tablet. Na ta način smo dosegli, da se tablete niso lepile na dno posod. V vsaki posodi smo imeli po 250 ml medija, temperatura je bila 37 °C, recipročni cilinder se je potapljal s hitrostjo 10 potopov na minuto. Vzorce po 10 ml je odzema avtomatski vzorčevalnik v naslednjih časovnih točkah: 0,5 h in 1 h (1. posoda), 1,5 h in 2 h (2. posoda), 3 h in 4 h (3. posoda), 6 h (4. posoda), 8 h (5. posoda), 12 h (6. posoda). Vzorce smo filtrirali (kjer je bila filtracija potrebna), jih primerno razredčili in jim izmerili absorbanco pri 274 nm. S pomočjo umeritvenih premic smo določili koncentracije PF v odvzetih vzorcih (z upoštevanjem faktorja redčenja), iz le-teh pa smo izračunali delež sproščenega PF na podoben način kot pri sproščanju na napravi z vesli.

6.9 UGOTAVLJANJE PODOBNOSTI PROFILOV SPROŠČANJA

S pomočjo faktorja podobnosti f_2 in faktorja različnosti f_1 (enačbi 12 in 13) smo ugotavljali podobnost profilov sproščanja. Faktorja f_2 in f_1 v svojih smernicah uporabljata tudi agenciji Food and Drug Administration (FDA) in v European Medicines Agency (EMA).

V obe enačbi smo vstavljali povprečne vrednosti sproščene ZU v devetih časovnih točkah.

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad \text{/enačba 12/}$$

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \cdot 100 \quad \text{/enačba 13/}$$

R_t – količina sproščene ZU v referenčni raztopini ob času t

T_t – količina sproščene ZU v testni raztopini ob času t

n – število točk vzorčenja

Večja kot je vrednost faktorja f_2 , manjša je razlika med povprečji testne in referenčne krivulje (pri vrednosti 100 bi bila profila sproščanja enaka). Večja kot je vrednost faktorja f_1 , večja je razlika med povprečji testne in referenčne krivulje (pri vrednosti 0 bi bila profila sproščanja enaka). Food and Drug Administration (FDA) je objavila javne standarde za f_1 in f_2 . Dva profila sproščanja sta si statistično podobna, ko je vrednost faktorja f_2 med 50 in 100 in vrednost faktorja f_1 med 0 in 15. Najnižja sprejemljiva vrednost faktorja podobnosti $f_2 = 50$ ustreza 10 % absolutni razliki med testno in referenčno krivuljo v vsaki časovni točki (20).

7 REZULTATI IN RAZPRAVA

7.1 REOLOŠKO VREDNOTENJE KARAGENANOV V VODI

Pripravili smo 0,5 in 2 % disperzije karagenanov v prečiščeni vodi po postopku, opisanem v poglavju 6.2 ter jih reološko ovrednotili. Najprej smo izvedli amplitudni test pri 25 °C in 37 °C. Na diagramu 1 so prikazani le rezultati pri 25 °C. Pri 37 °C so rezultati zelo podobni, le da so vrednosti dinamičnih modulov nižje (rezultati grafično niso prikazani). Za amplitudni test smo izbrali disperzije, ki so bile bodisi najbolj tekoče, bodisi najbolj čvrste. Za ostale disperzije smo predvidevali, da bodo vrednosti modulov med vrednostmi za najbolj čvrste oziroma najbolj tekoče disperzije.

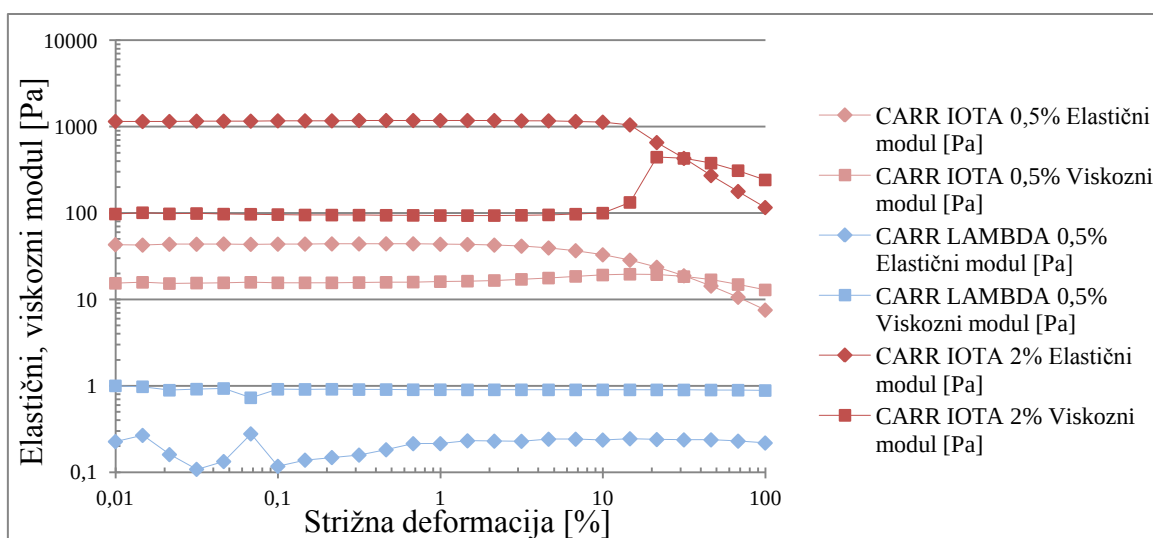


Diagram 1. Amplitudni test: disperzije karagenanov v vodi pri 25 °C.

Z diagrama 1 lahko vidimo široko območje linearnega viskoelastičnega odziva. Prav tako lahko vidimo, da je pri carr ι elastični modul nad viskoznim tako pri 0,5 % koncentraciji kot tudi pri 2 % koncentraciji, kar kaže na gelsko strukturo. Pri carr λ je situacija ravno obratna, carr λ ni tvoril gela. Za frekvenčne teste smo izbrali 1 % strižno deformacijo, ki je znotraj linearnega viskoelastičnega odziva. Rezultate frekvenčnih testov prikazujeta diagrama 2 in 3.

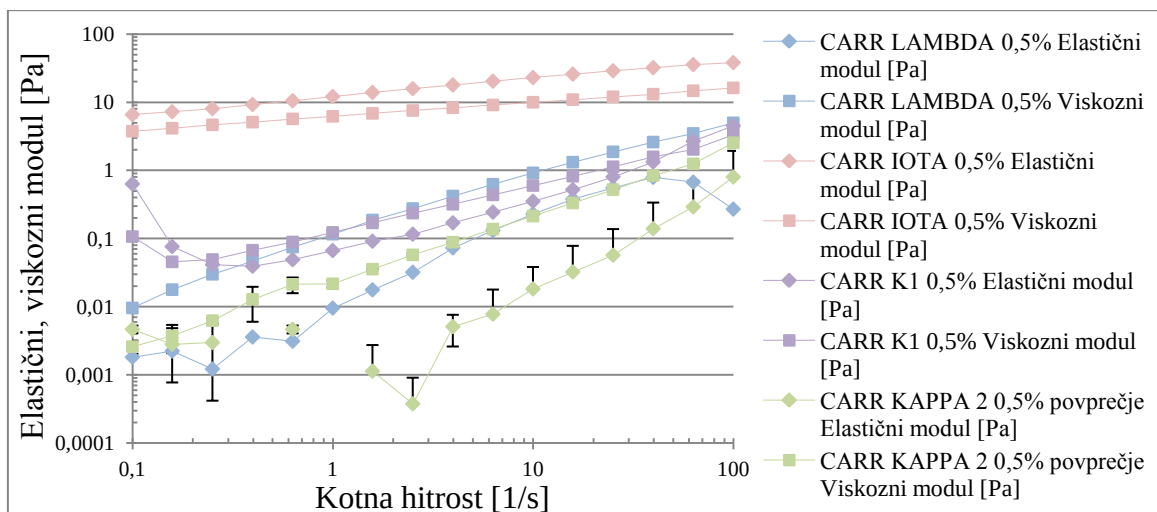


Diagram 2. Frekvenčni testi: 0,5 % disperzije carr v prečiščeni vodi pri 25 °C in strižni deformaciji 1 %.

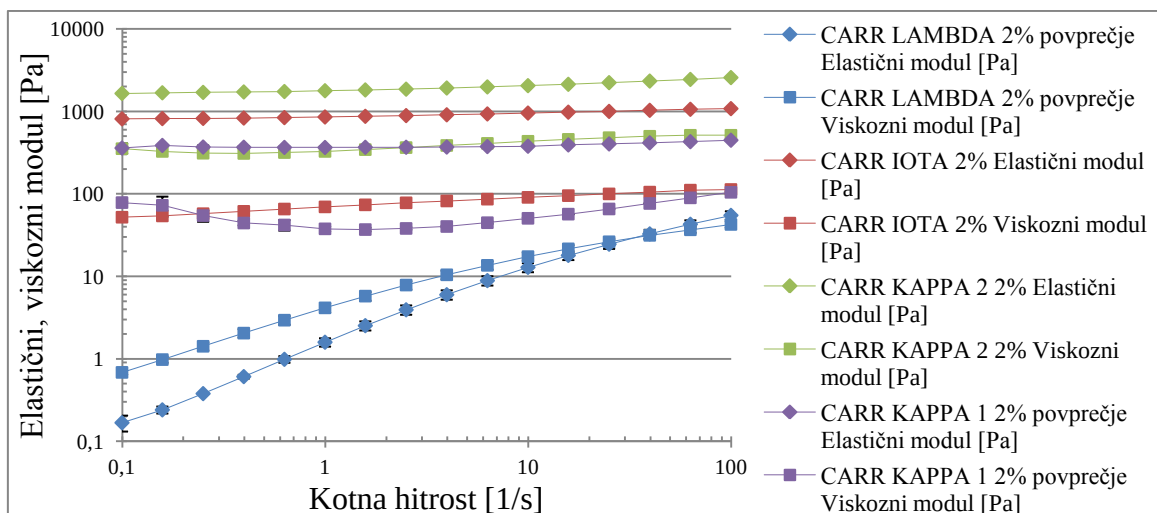


Diagram 3. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr v prečiščeni vodi pri 25 °C in strižni deformaciji 1 %.

Vidimo, da pri koncentraciji 0,5 % gelsko strukturo izkazuje le carr ι , saj je le tu elastični modul nad viskoznim hkrati pa sta oba modula le malo odvisna od frekvence oscilacije (Diagram 2). Vrednost modulov je nizka, gel je zelo šibak. Pri obeh carr κ opazimo, da je 0,5 % koncentracija polimera prenizka, da bi se tvoril gel, tudi carr λ tvori le viskozno raztopino. Pri 2 % koncentraciji je situacija drugačna: gel tvori oba carr κ in carr ι (Diagram 3). Po čvrstosti si sledijo: carr κ_2 , sledi ι , κ_1 tvori najmanj čvrst gel. Carr λ po pričakovanjih tvori le viskozne raztopine, kar je v skladu z literaturo (9). Vrednosti dinamičnih modulov so pri 2 % koncentracijah višje kot pri 0,5 %.

Zanimiva je razlika v vrednosti modulov pri carr κ_1 in κ_2 – κ_1 daje nižje vrednosti modulov. Glede na to, da gre za isti tip polimera, je najverjetneje razlika med njima v molekulski masi (Diagram 3).

Pri 37 °C je situacija podobna, le da so vrednosti dinamičnih modulov pomaknjene k nižjim vrednostim, kar prikazujejo diagrami 4–7. Predvsem opazimo premik elastičnega modula, manj pa viskoznega, kar je skladno z literaturnimi podatki (6). Zaradi te ugotovitve smo vse nadaljne meritve izvajali le pri 25 °C. To je bolj primerno tudi zaradi samih meritev, saj je pri nižji temperaturi manjše izhlapevanje vode in so zato napake merjenja manjše.

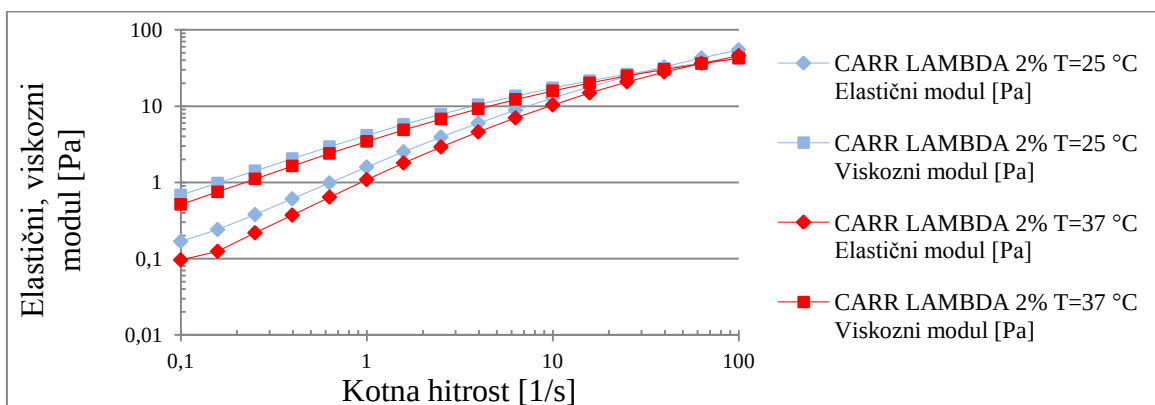


Diagram 4. Primerjava rezultatov frekvenčnih testov 2 % raztopine carr λ pri 25 °C in pri 37 °C.

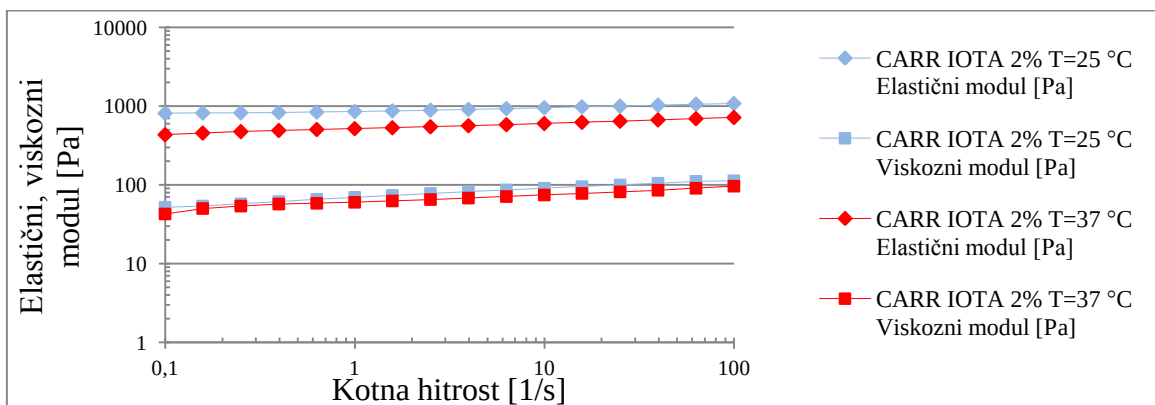


Diagram 5. Primerjava rezultatov frekvenčnih testov 2 % gela carr ι pri 25 °C in pri 37 °C.

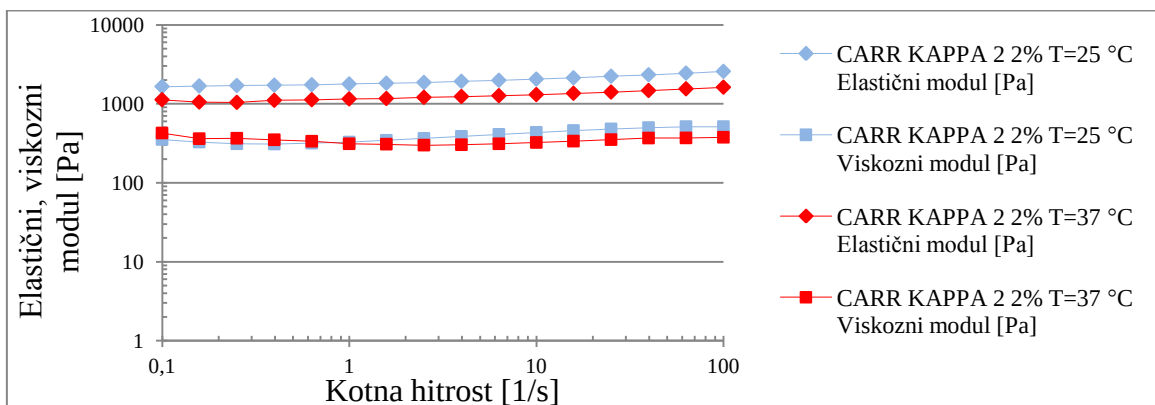


Diagram 6. Primerjava rezultatov frekvenčnih testov 2 % gela carr κ_2 pri 25 °C in pri 37 °C.

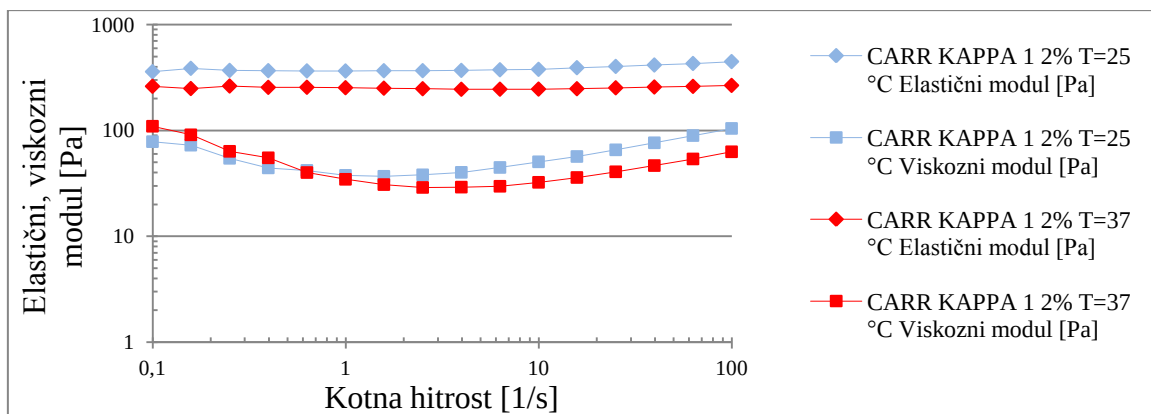


Diagram 7. Primerjava rezultatov frekvenčnih testov 2 % gela carr κ 1 pri 25 °C in pri 37 °C.

7.2 REOLOŠKO VREDNOTENJE KARAGENANOV V FOSFATNEM PUFRU S pH=6,8

Želeli smo preveriti, kako se karagenani obnašajo v fosfatnem pufru s pH=6,8, ki je eden najpogostejših medijev za sproščanje. Zato smo pripravili 0,5 %, 1 % in 2 % disperzije carr v pufru. Meritve smo izvajali pri 1 % strižni deformaciji. Rezultate prikazujejo diagrami 8–10.

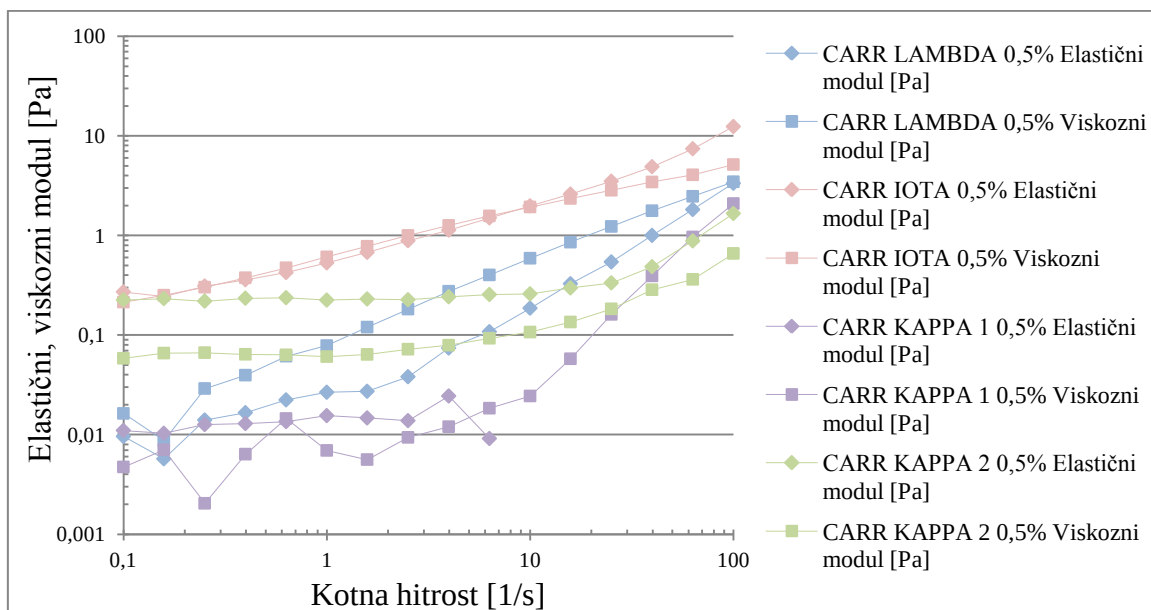


Diagram 8. Frekvenčni testi: 0,5 % disperzije carr v fosfatnem pufru s pH=6,8.

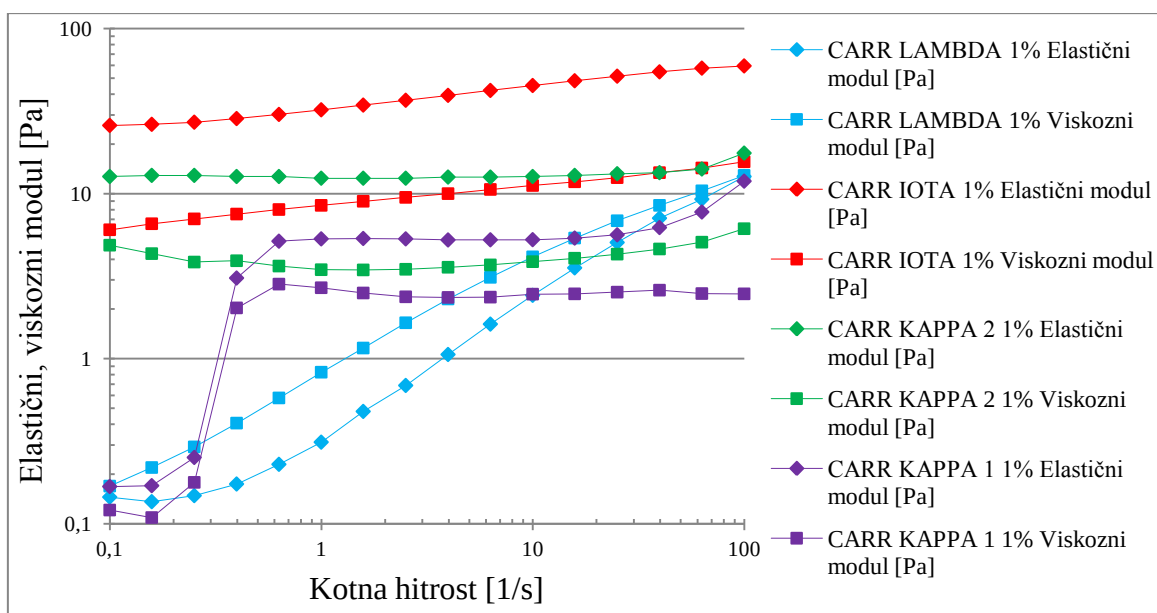


Diagram 9. Frekvenčni testi: 1 % disperzije carr v fosfatnem pufru s pH=6,8.

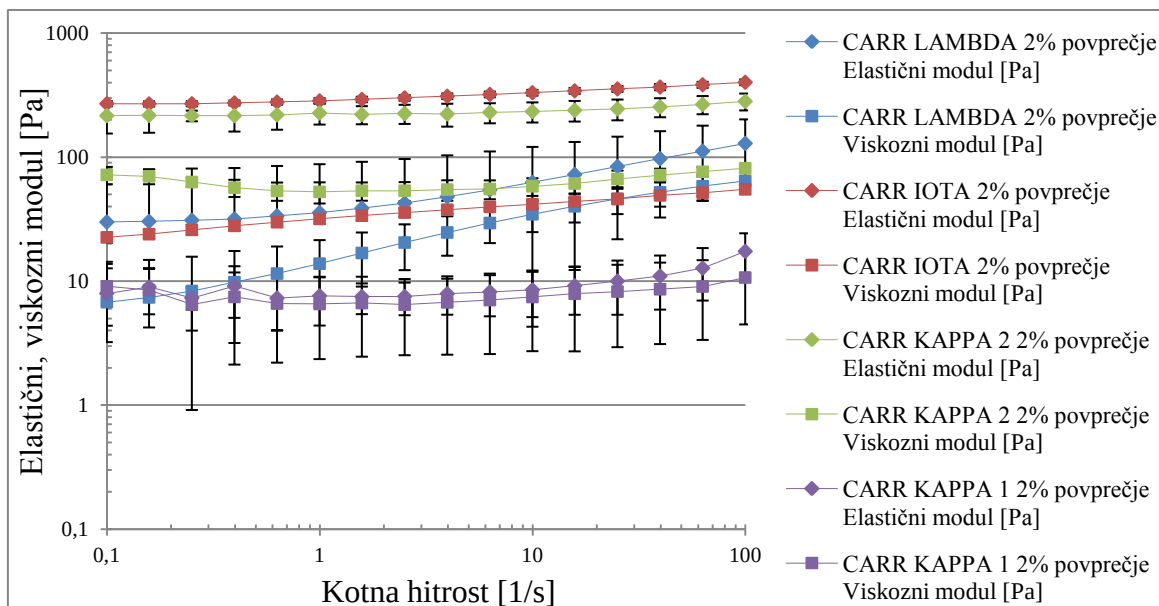


Diagram 10. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr v fosfatnem pufru s pH=6,8.

Ugotovili smo, da se z višanjem koncentracije carr, vrednosti dinamičnih modulov višajo – tako kot pri vodnih disperzijah. Opazimo tudi razliko v obliki krivulj, saj se z višanjem koncentracije polimera zmanjša frekvenčna odvisnost modulov – tvorijo se čvrstejši geli (Diagram 8, Diagram 9, Diagram 10).

Pri meritvah 0,5 % disperzij so se pri carr κ_1 in κ_2 pojavile težave – prišlo je do nehomogenosti vzorca – vzorec se je razplasil – spodaj je bila plast s polimerom, zgoraj pa voda. Tvoril se je le delni gel, koncentracija polimera ni bila dovolj visoka za tvorbo homogenega gela. Zato ni bil omogočen dober stik med vzorcem in merilnim

instrumentom, meritve so bile praktično nemogoče. Pri 0,5 % disperziji carr ι lahko opazimo, da koncentracija polimera ni bila dovolj visoka, da bi prišlo do tvorbe gela – tudi vizualno je bil vzorec le viskozna raztopina (Diagram 8).

Pri 1 % raztopinah vidimo, da tako carr ι , kot tudi carr κ_1 in κ_2 , tvorijo gele, ki pa so zelo šibki. Carr λ tvori le viskozno raztopino, kar je v skladu z literaturnimi podatki (Diagram 9) (13).

Zanimivo je, da je pri 2 % disperziji carr λ elastični modul nad plastičnim, kar nakazuje na gelsko strukturo carr λ . Res pa je, da so v tem primeru standardne deviacije precej velike – imeli smo zelo slabo ponovljivost (Diagram 10). Razlog za to je verjetno v nehomogenosti zelo viskozne raztopine. Pri pripravi se je carr λ namreč precej skepil, skupke smo poskušali razbiti s spatulo, pri tem pa smo vnesli zračne mehurčke, ki bi tudi lahko vplivali na rezultat. Možno je tudi, da sta v vzorcu kot nečistota prisotna carr ι ali carr κ . Gre namreč za naravne, neprečiščene vzorce. Karagenani so pridobljeni iz različnih vrst rdeče morske trave in so pravzaprav zmes polimerov. To pomeni, da če imamo carr λ , sta lahko v majhnem deležu prisotna tudi carr κ in ι . Kolikšen je ta delež, ne vemo, saj proizvajalec polimerov tega podatka nima.

Pri primerjavi diagramov 3 in 10, vidimo, da je pufer v primerjavi s prečiščeno vodo zelo vplival na carr κ_1 in κ_2 , saj se je čvrstost gelov zmanjšala v primerjavi z vodo. Faktorjev, ki bi lahko vplivali na vrednosti modulov je več (npr. vrsta iona, ionska moč, pH), ker je pufer kompleksen sistem.

Če primerjamo 2 % disperzije carr v prečiščeni vodi in v pufru, vidimo, da se vrednosti elastičnega in viskoznega modula povsod znižajo, le pri carr λ se zvišajo. To pomeni, da v fosfatnem pufru v glavnem nastanejo šibkejši geli, raztopina carr λ pa je bolj strukturirana. To je prikazano na diagramih 11–14.

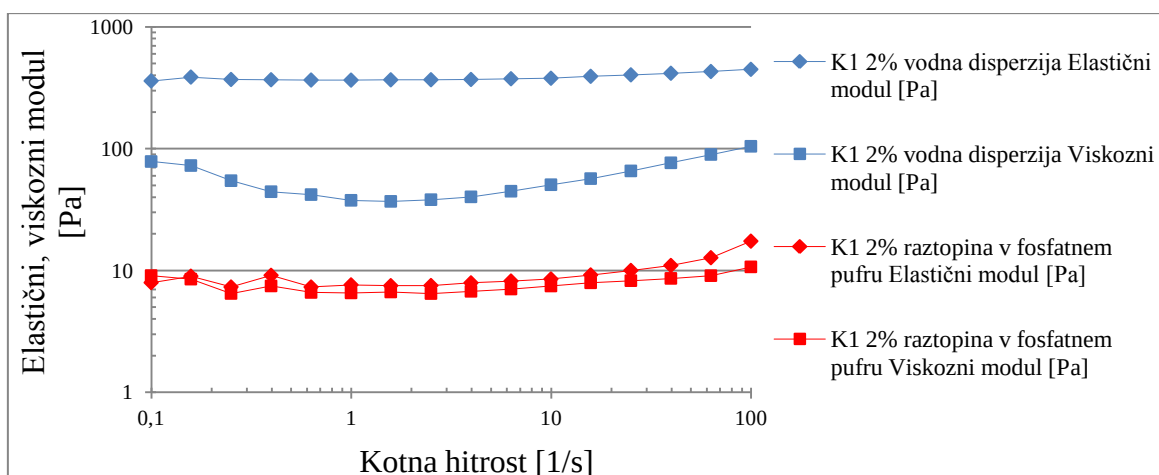


Diagram 11. Frekvenčni testi: primerjava 2 % disperzij carr $\kappa 1$ v prečiščeni vodi in v fosfatnem pufru s pH=6,8.

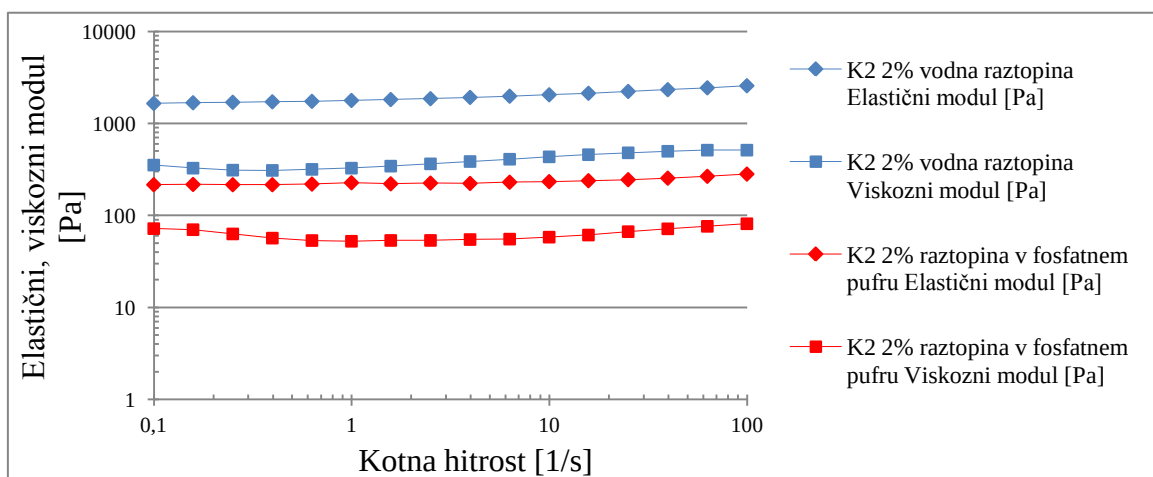


Diagram 12. Frekvenčni testi: primerjava 2 % disperzij carr $\kappa 2$ v prečiščeni vodi in v fosfatnem pufru s pH=6,8.

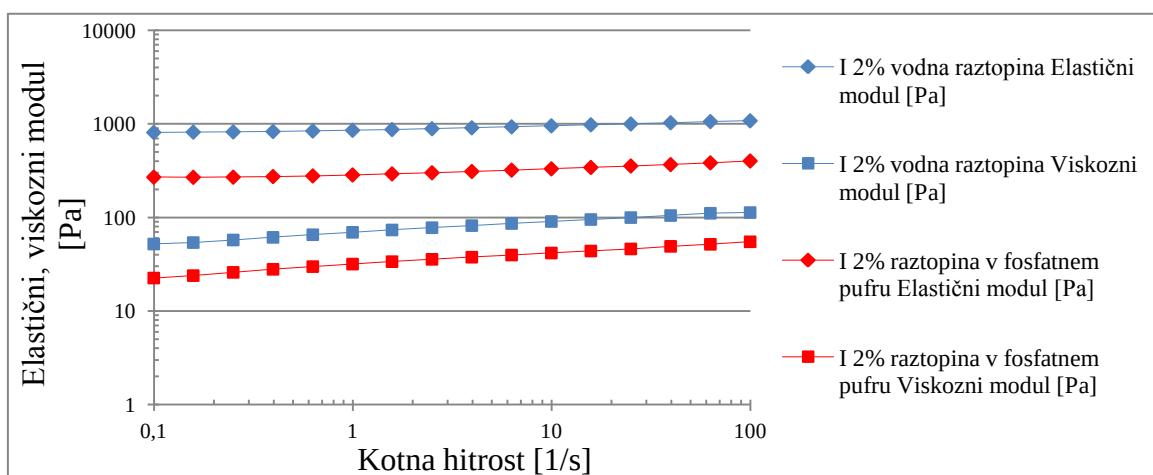


Diagram 13. Frekvenčni testi: primerjava 2 % disperzij carr ι v prečiščeni vodi in v fosfatnem pufru s pH=6,8.

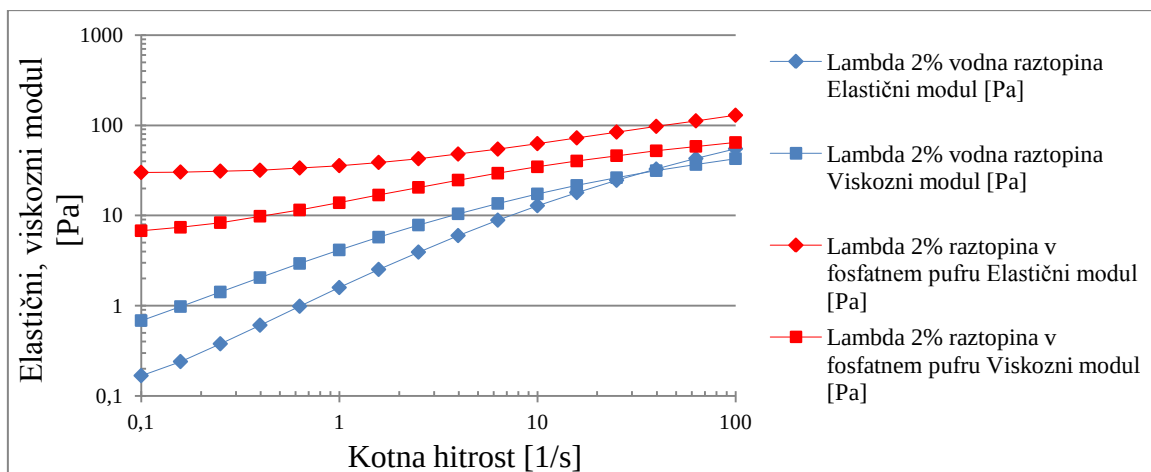


Diagram 14. Frekvenčni testi: primerjava 2 % disperzij carr λ v prečiščeni vodi in v fosfatnem pufru s pH=6,8.

7.3 VPLIV RAZLIČNIH SOLI NA REOLOŠKE LASTNOSTI KARAGENANOV

Ker smo pri pufrnih disperzijah opazili, da se reološke lastnosti zelo spremenijo v primerjavi z vodo, smo se odločili, da bomo preverili, kako posamezne soli vplivajo na tvorbo gelov/viskoznih raztopin pri posameznih vrstah carr. V ta namen smo pripravili 2 % disperzije carr v naslednjih medijih: prečiščena voda, vodne raztopine KCl ($\mu=0,05$), NaCl ($\mu=0,05$), CaCl₂ ($\mu=0,05$), MgCl₂ ($\mu=0,05$), KCl ($\mu=0,1$), NaCl ($\mu=0,1$), CaCl₂ ($\mu=0,1$) in MgCl₂ ($\mu=0,1$). Za 2 % disperzije smo se odločili, ker je koncentracija polimera pri 0,5 % disperzijah dostikrat prenizka, da bi se sploh tovril gel. Glede na to, da smo ugotovili, da se vrednosti dinamičnih modulov pri T=37 °C znižajo, smo poskuse izvajali le pri 25 °C.

Najprej smo izvedli amplitudne teste, da bi ugotovili, pri kateri strižni deformaciji smo v območju linearnega viskoelastičnega odziva. Rezultate teh testov prikazujejo diagrami 15–19.

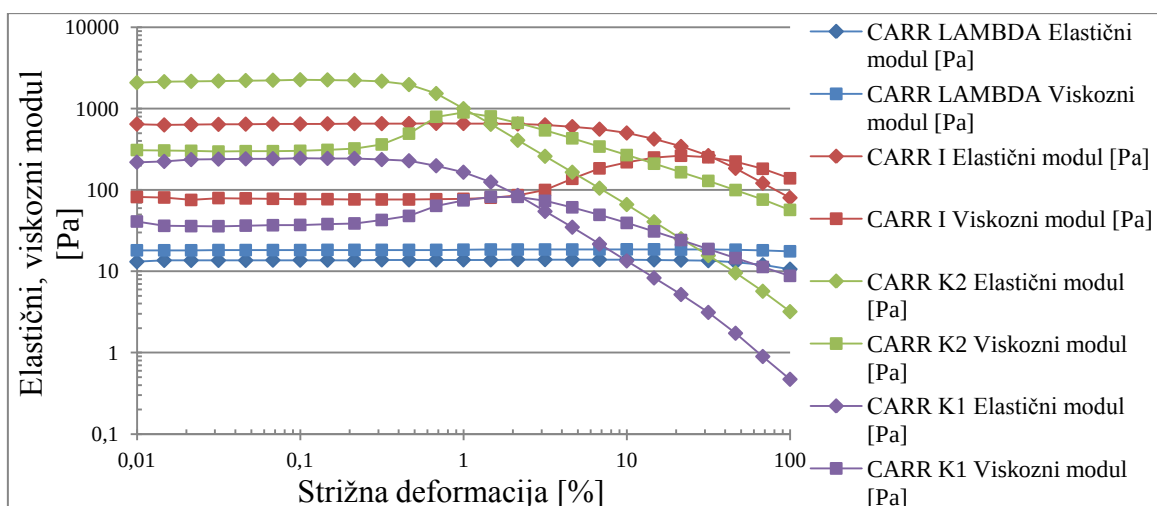


Diagram 15. Amplitudni test: 2 % carr v prečiščeni vodi.

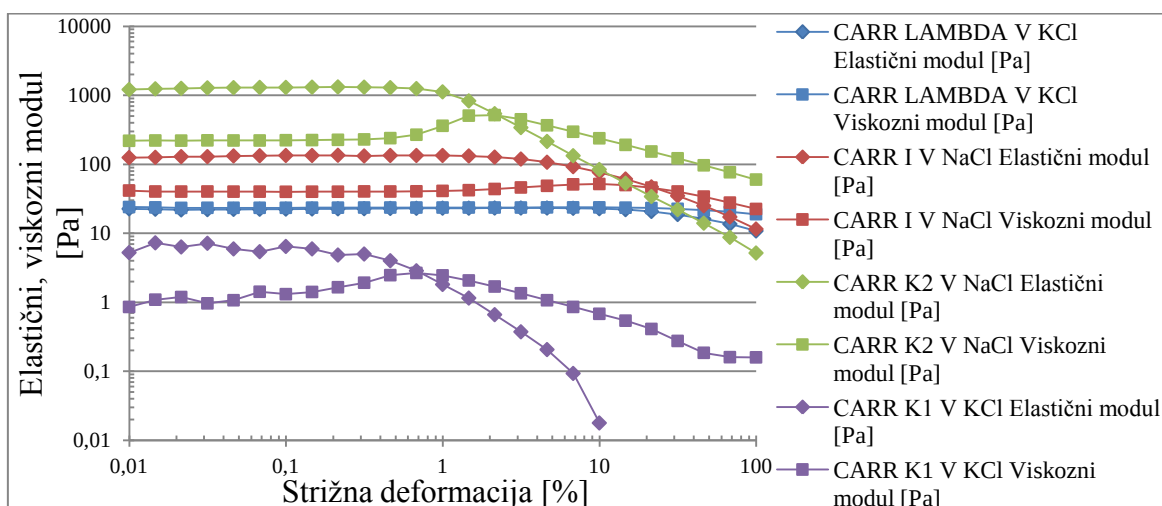


Diagram 16. Amplitudni testi: 2 % carr v NaCl/KCl z ionsko močjo 0,05.

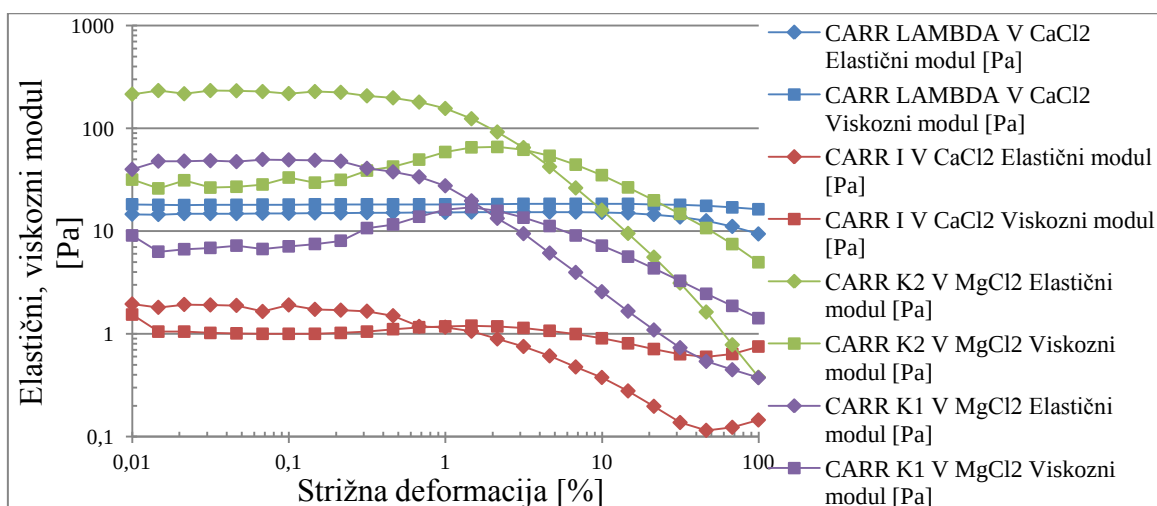


Diagram 17. Amplitudni testi: 2 % carr v CaCl₂/MgCl₂ z ionsko močjo 0,05.

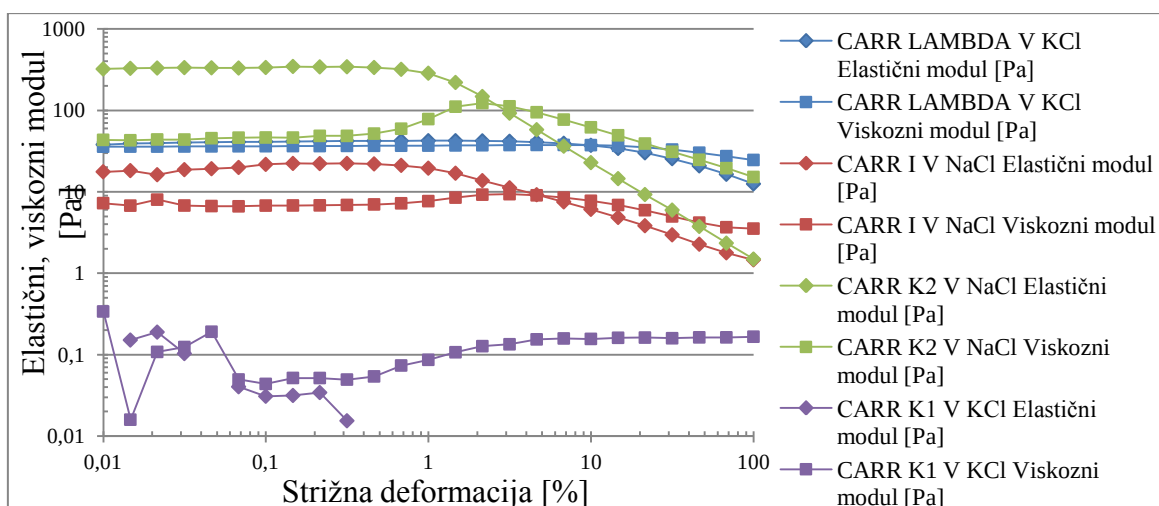


Diagram 18. Amplitudni testi: 2 % carr v NaCl/KCl z ionsko močjo 0,1.

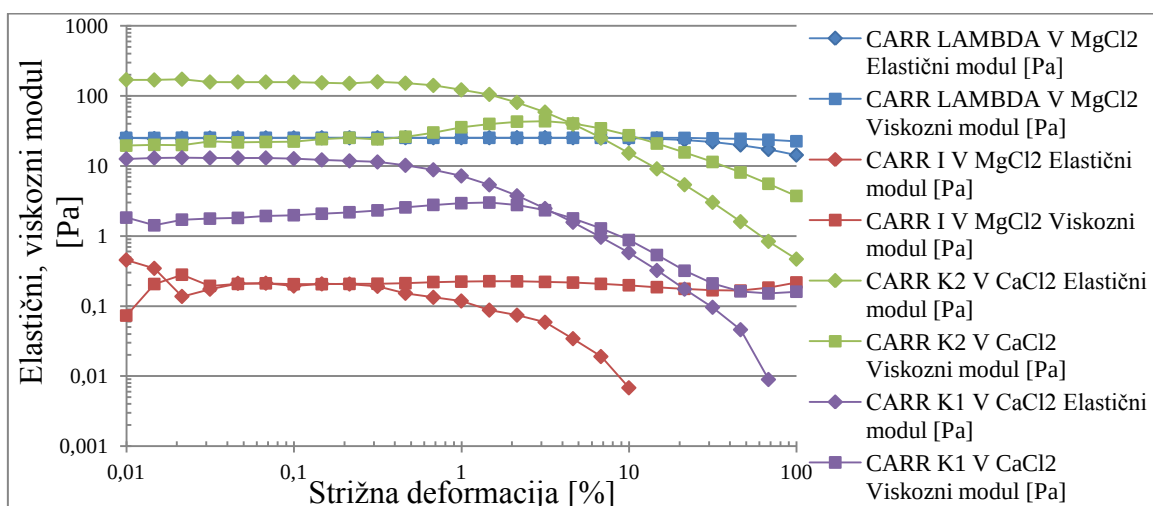


Diagram 19. Amplitudni testi: 2 % carr v CaCl₂/MgCl₂ z ionsko močjo 0,1.

Iz diagramov 15–19 lahko vidimo, da je za nadaljne meritve najboljše, če izberemo strižno deformacijo 0,1 %, saj so takrat vsi vzorci v območju linearnega viskoelastičnega odziva. Najbolj problematičen je carr κ 1 v KCl z ionsko močjo 0,1, kjer že pri amplitudnih testih opazimo zdrsavanje merilnega sistema in težave pri merjenju G' in G'' .

Preden smo izvajali frekvenčne meritve, smo vzorce vizualno ocenili. Subjektivna opažanja, so zapisana v tabeli 4.

Tabela 4. Vizualne ocene 2 % vzorcev, ki smo jih reološko ovrednotili.

Karagenan	Medij	Opazanja
$\kappa 1$	prečiščena voda	Tekoče, homogeno.
$\kappa 2$	prečiščena voda	Čvrst gel, homogenega videza.
ι	prečiščena voda	Čvrst gel, nekaj zračnih mehurčkov.
λ	prečiščena voda	Viskozna, homogena raztopina.
$\kappa 1$	NaCl/KCl ($\mu=0,05$)	Nehomogeno (kašast videz), ločitev plasti, polimer izloči vodo. Pri NaCl je manj opazna ločitev plasti kot pri KCl.
$\kappa 2$	NaCl/KCl ($\mu=0,05$)	Nehomogen, kašast, tekoč videz pri KCl, vendar manj kot pri $\kappa 1$. Pri NaCl čvrst gel.
ι	NaCl/KCl ($\mu=0,05$)	Homogeno, kot gel, še vedno počasi teče. Je motne barve.
λ	NaCl/KCl ($\mu=0,05$)	Homogena, viskozna raztopina, nekaj zračnih mehurčkov.
$\kappa 1$	NaCl/KCl ($\mu=0,1$)	Zelo opazna je ločitev plasti, polimer izloči vodo, nehomogeno.
$\kappa 2$	NaCl/KCl ($\mu=0,1$)	Nehomogeno, kašast videz.
ι	NaCl/KCl ($\mu=0,1$)	Homogeno, kot gel. Je motne barve.
λ	NaCl/KCl ($\mu=0,1$)	Viskozna, homogena raztopina.
$\kappa 1$	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,05$)	Kašasta, redka, nehomogena tekočina. Pri CaCl ₂ opazimo razplastitev.
$\kappa 2$	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,05$)	Kašasto, nehomogeno, ni pa vidne ločitve faz.
ι	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,05$)	Redka, ne čisto homogena tekočina (bolj kot $\kappa 1$ in $\kappa 2$), ni razplastitev.
λ	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,05$)	Homogena, viskozna raztopina.
$\kappa 1$	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,1$)	Nehomogen videz, fazi se ločita, polimer iztisne vodo.
$\kappa 2$	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,1$)	Nehomogen, kašast videz, opazimo ločitev faz.
ι	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,1$)	Nehomogeno, tekoče, opazimo ločitev faz.
λ	CaCl ₂ /MgCl ₂ ($\mu=0,1$)	Homogena, viskozna raztopina, nekaj zračnih mehurčkov.

Nato smo izvedli frekvenčne teste pri strižni deformaciji 0,1 % in $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vse meritve, razen carr $\kappa 1/\text{KCl}$ z $\mu=0,1$, smo izvajali v dveh paralelkah, da bi videli, kakšna je ponovljivost rezultatov. Vse vzorce smo imeli na magnetnem mešalu do trenutka, ko smo jih dali na ploščico reometra. Na ta način smo poskušali zagotoviti čim večjo homogenost vzorcev. Kot vidimo v tabeli 4, prisotnost soli namreč zelo spremeni lastnosti vzorcev, ki v večini primerov postanejo nehomogeni in manj strukturirani. Rezultate frekvenčnih testov vidimo na diagramih 20–28.

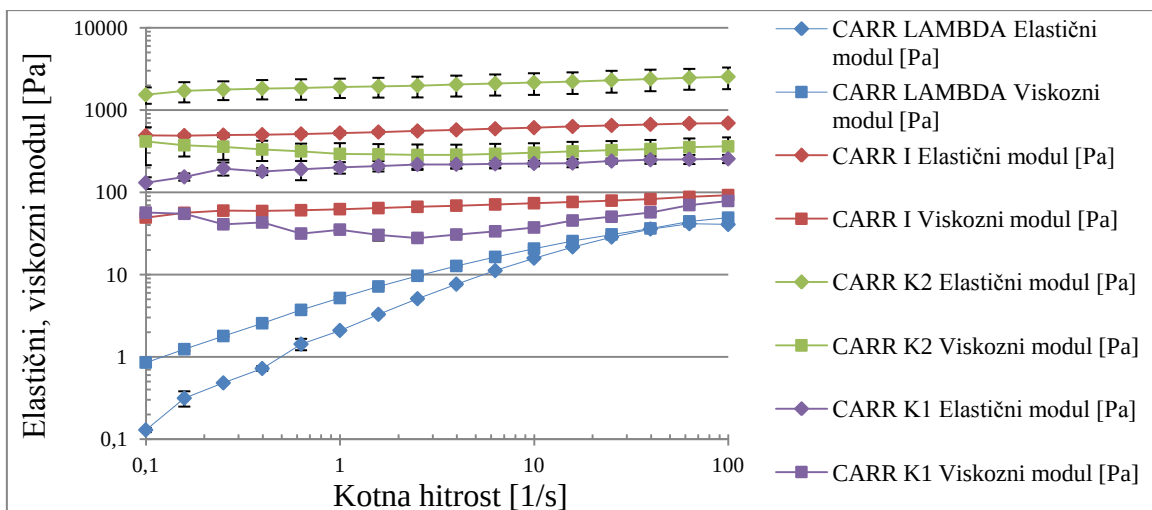


Diagram 20. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v prečiščeni vodi.

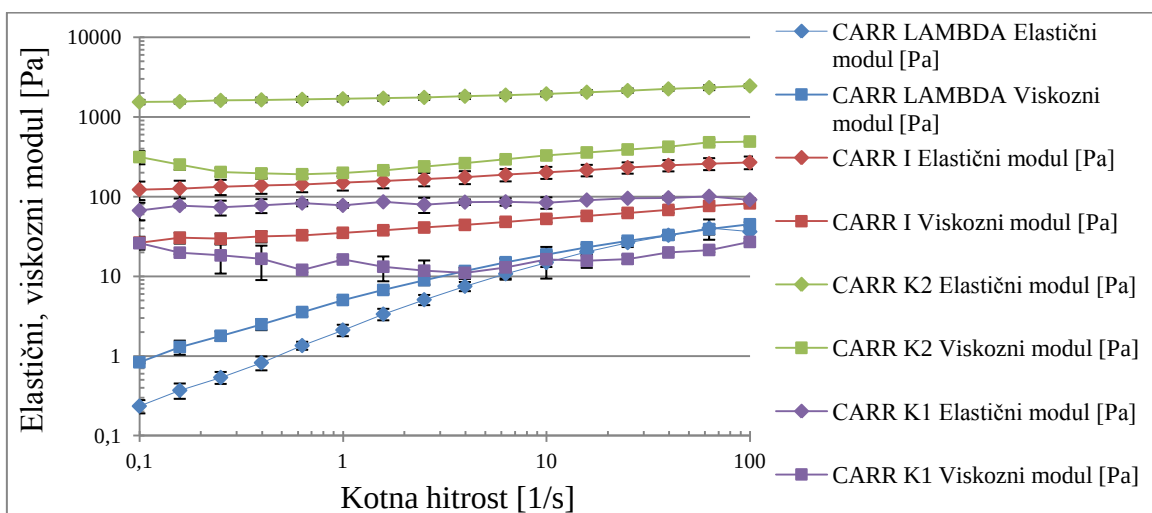


Diagram 21. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v NaCl z ionsko močjo 0,05.

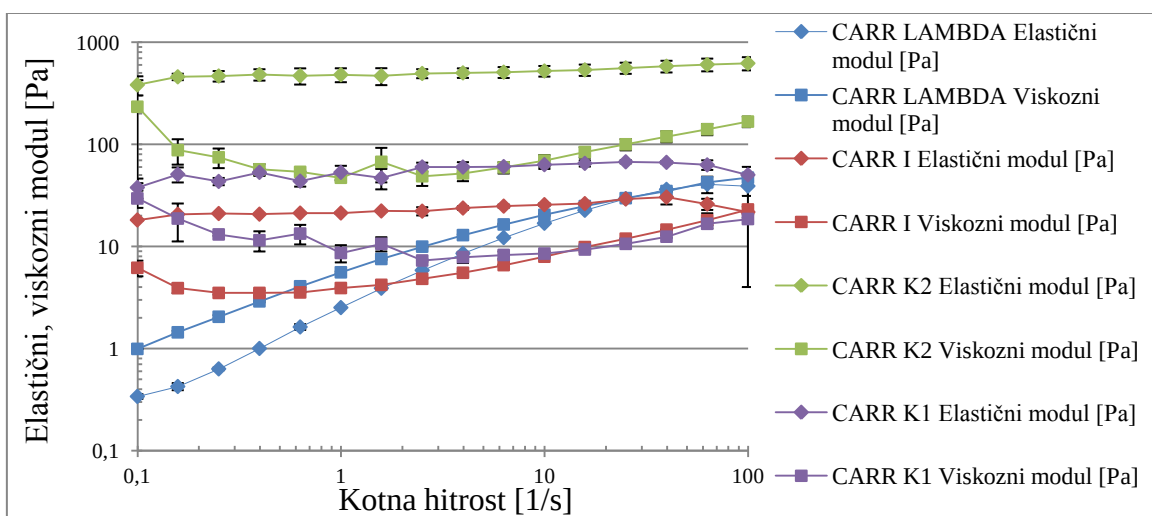


Diagram 22. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v NaCl z ionsko močjo 0,1.

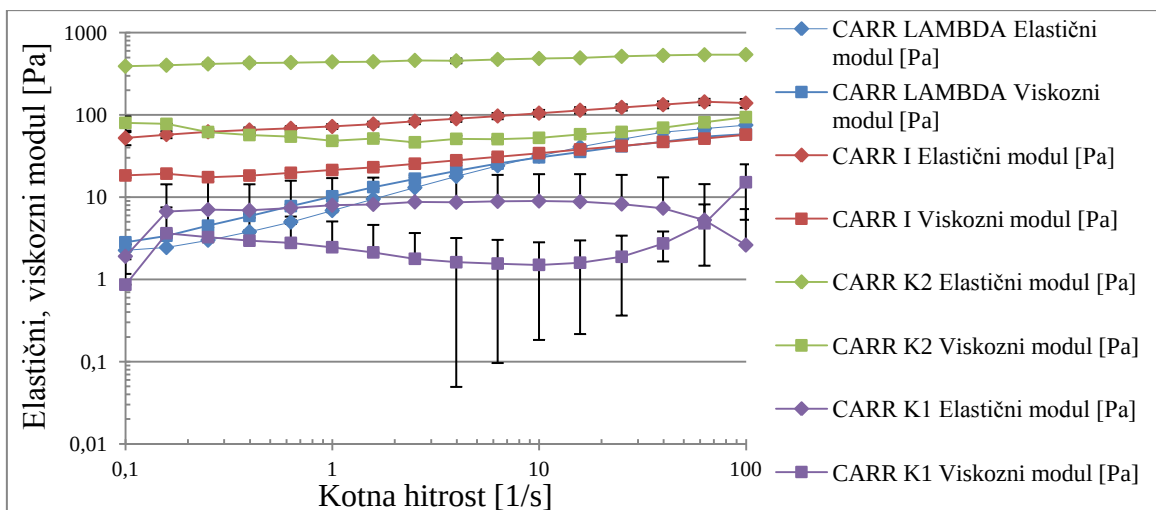


Diagram 23. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v KCl z ionsko močjo 0,05.

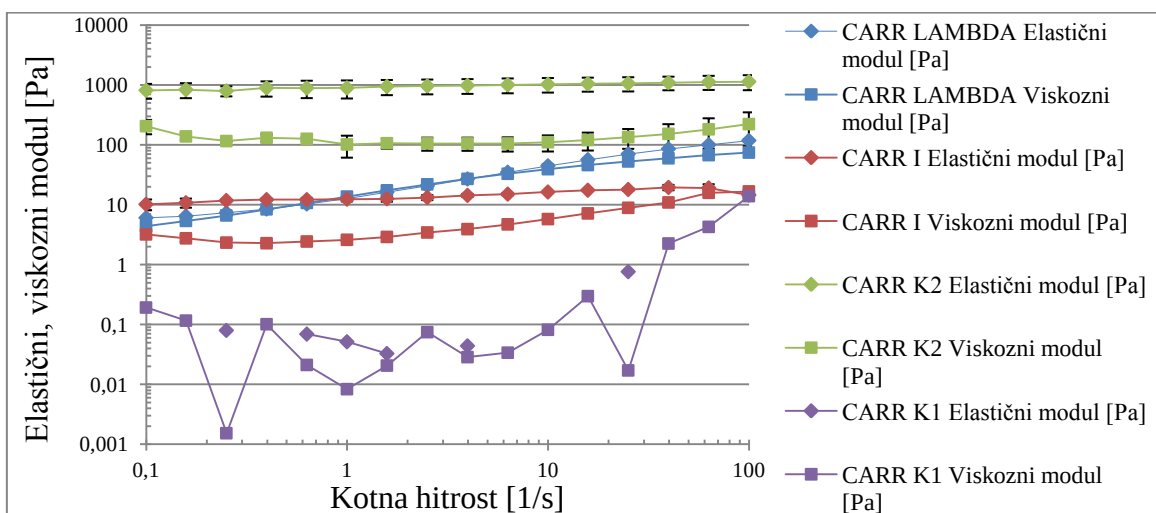


Diagram 24. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v KCl z ionsko močjo 0,1.

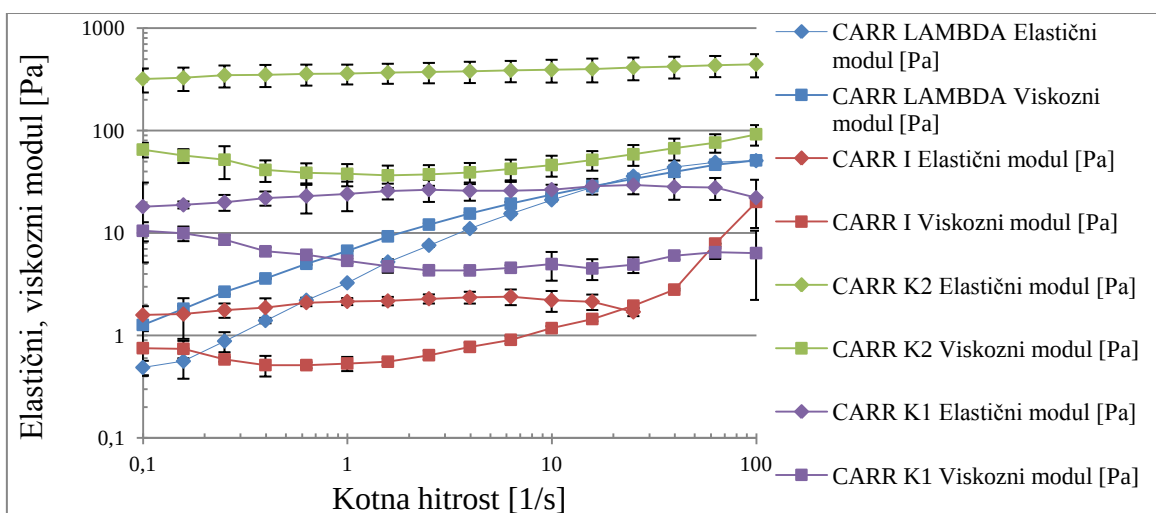


Diagram 25. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v CaCl_2 z ionsko močjo 0,05.

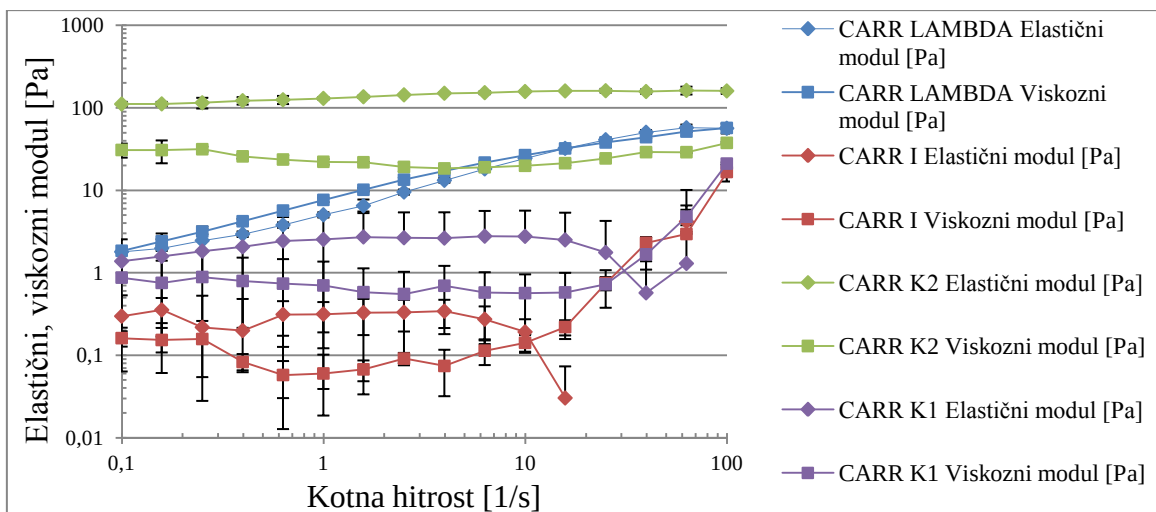


Diagram 26. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v CaCl_2 z ionsko močjo 0,1.

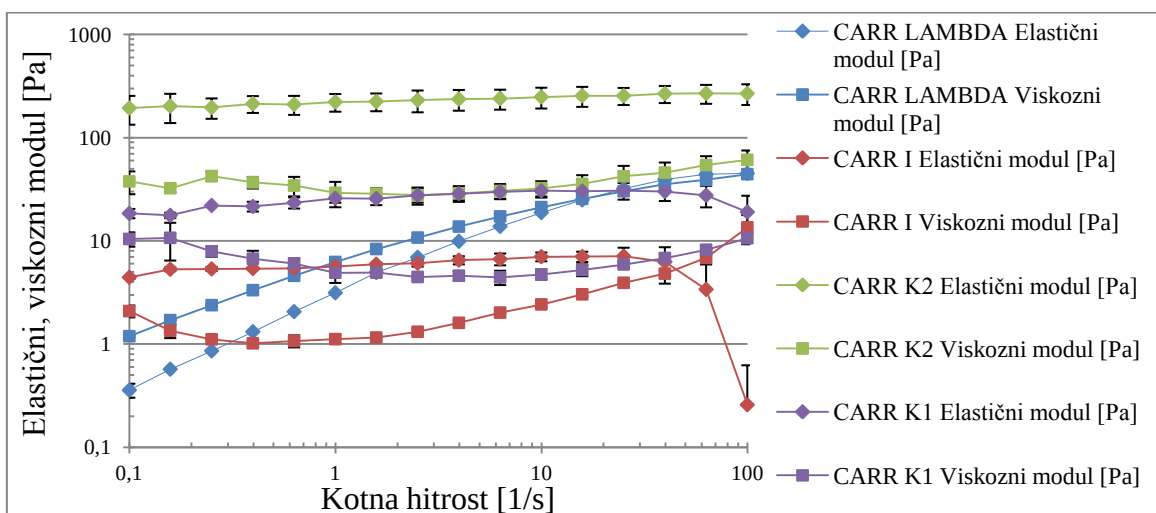


Diagram 27. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v MgCl_2 z ionsko močjo 0,05.

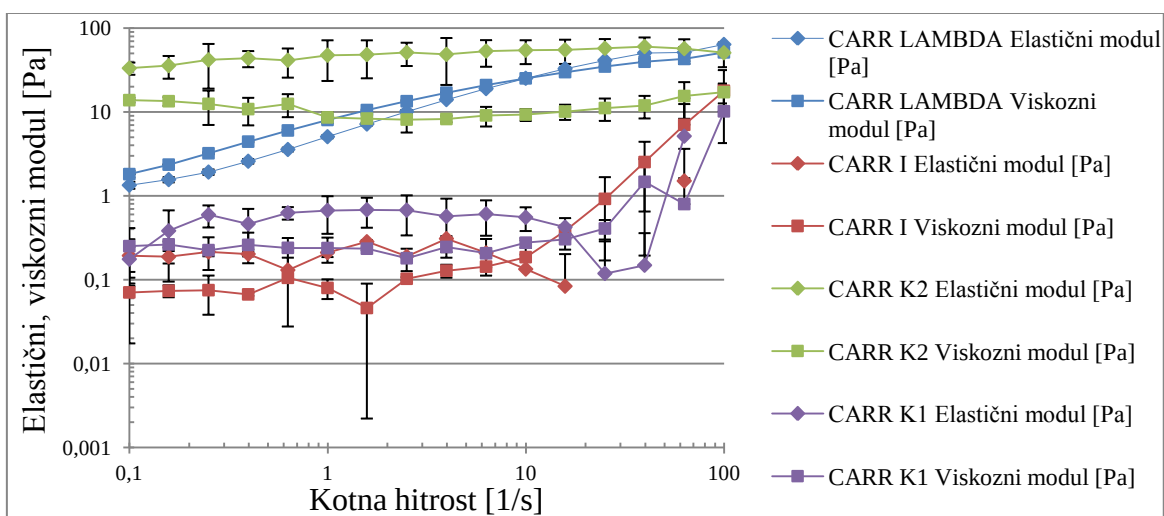


Diagram 28. Rezultati frekvenčnih testov za 2 % disperzije carr v MgCl_2 z ionsko močjo 0,1.

Iz diagramov 20–28 je razvidno, da na reološke lastnosti carr vplivajo tako vrsta kationa kot tudi ionska moč. Pri 2 % disperzijah v prečiščeni vodi vidimo, da carr ι , κ_1 in κ_2 tvorijo gele, najbolj čvrstega κ_2 , sledi ι , najmanj čvrstega pa κ_1 . Carr λ tvori le viskozne raztopine. Standardne deviacije (SD) so majhne in s homogenostjo ni bilo težav.

Tudi pri disperzijah v NaCl z ionsko močjo 0,05 ni bilo težav z meritvami, kljub manjši nehomogenosti vzorcev κ_1 in κ_2 . Večja nehomogenost vzorcev je opazna pri NaCl z ionsko močjo 0,1 (Diagram 22). Le-ta se na grafu odraža v večjih SD. Elastični in viskozni modul sta pri carr ι , κ_1 in κ_2 občutno nižja kot pri prečiščeni vodi.

Večji vpliv kot NaCl ima na reološke lastnosti polimernih disperzij KCl (Diagram 24). Opazi se večja nehomogenost vzorcev (predvsem carr κ_1), ki se na grafih vidi v večjih SD. Vrednosti modulov so bistveno nižje v primerjavi s prečiščeno vodo, vzorci postanejo zelo tekoči, nehomogeni, vrednosti modulov pa praktično nemerljive, zaradi sinereze ali tvorbe delnih gelov in posledičnega zdrsanja sistema. Sinereza je omejujoč faktor pri reoloških meritvah. Rezultati takšnih meritev dajejo nižje vrednosti elastičnega modula, kot so resnične. V literaturi lahko zasledimo različne načine reševanja te težave, kot je npr. pritrditev gela med plošče, popeskane ali nazobčane plošče, perforirani kcentrični celindri idr. (12, 13). Kljub temu, da gre za zelo tekoče sisteme, pa rezultati potrjujejo obstoj gela – elastični modul je nad viskoznim, modula sta malo odvisna od frekvence oscilacije. Enak podatek smo našli tudi v literaturi (12). To pomeni, da z našim načinom priprave vzorcev pripravimo t. i. delne gele in če bi vrednotili le posamezne skupke, bi verjetno izmerili zelo visoke vrednosti dinamičnih modulov. Ker pa merimo povprečen vzorec, meritve niso povsem odraz dejanskega stanja.

Iz diagramov 25–28 je razvidno, da dvovalentni ioni, kot sta Ca^{2+} in Mg^{2+} , najbolj vplivajo na carr ι – pri obeh ionih in obeh ionskih močeh se je vrednost elastičnega in viskoznega modula zelo znižala, pri ionski moči 0,1 je opazna nehomogenost vzorcev (pojav delnih gelov) – SD so velike, očitno je, da sistem zdrsava. To je v skladu z literaturnimi podatki, kjer so avtorji opazili velik vpliv dvovalentnih ionov na carr ι (13). Vpliv dvovalentnih soli je opazen tudi na carr κ_1 in κ_2 , ki sta tudi nehomogena, zato so tudi te meritve manj zanesljive.

Zaradi preglednosti vpliva ionov na posamezne vrste karagenanov, je prikazanih še nekaj diagramov.

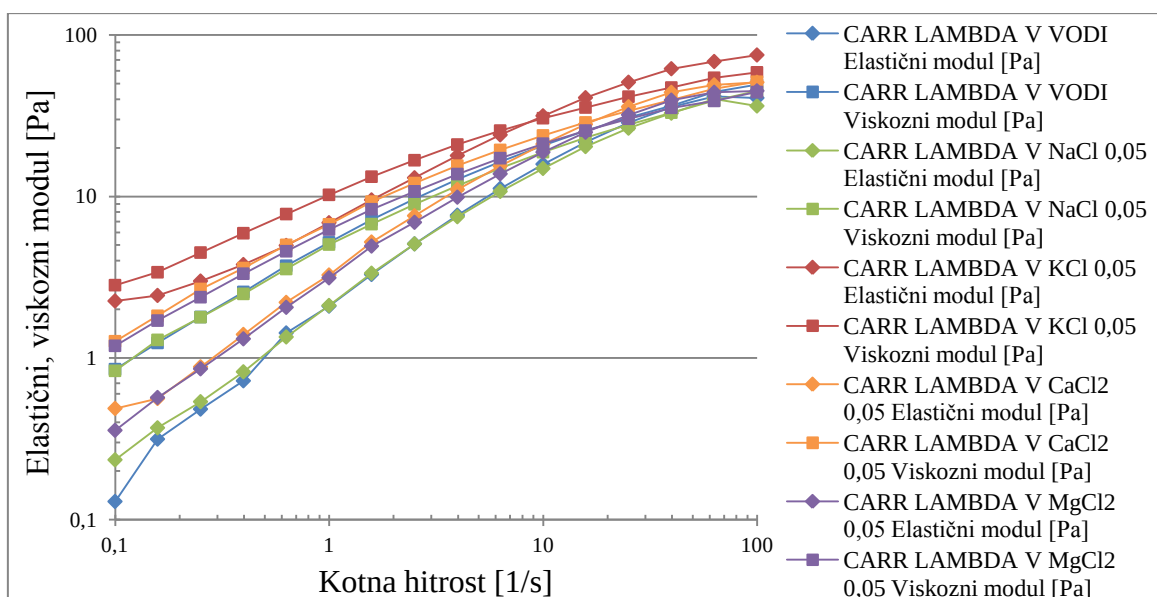


Diagram 29. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr λ v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,05.

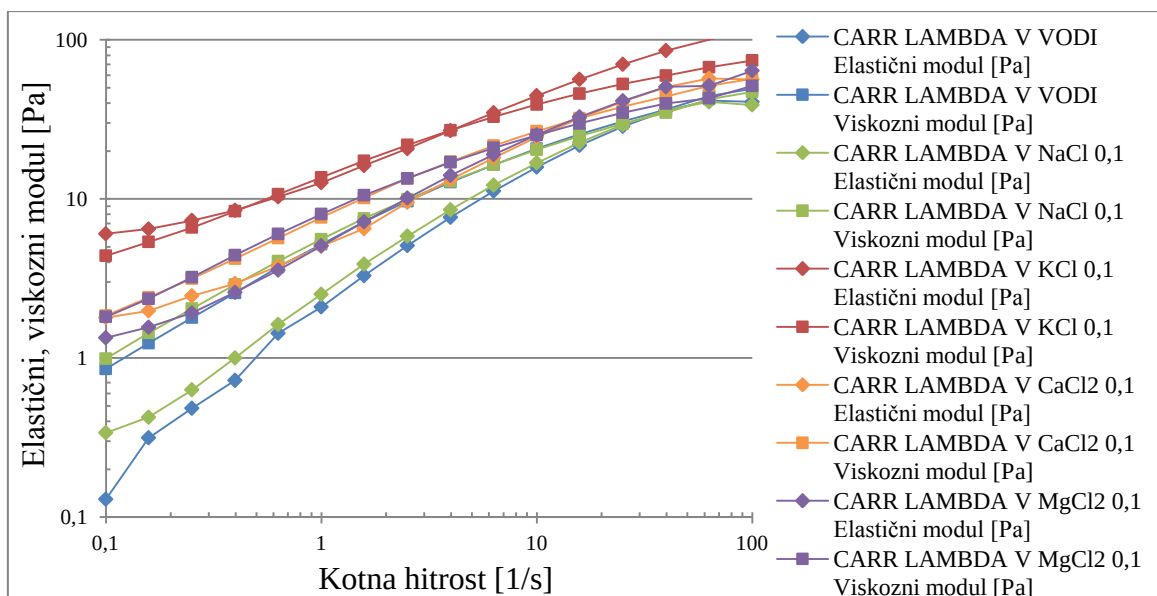


Diagram 30. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr λ v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,1.

Podatki, ki smo jih našli v literaturi, so v skladu z našimi ugotovitvami: carr λ v vseh preizkušanih medijih tvori le viskozne raztopine (9). Zanimivo je, da dodatek soli zviša vrednosti G' in G'' , torej, da se število interakcij med verigami polimera v raztopini poveča (Diagram 29, Diagram 30). Najmanjši vpliv na carr λ ima NaCl, sledita CaCl_2 in MgCl_2 , ki imata zelo podoben vpliv (ne opazimo ionske specifičnosti), največji vpliv pa ima KCl. Opazimo lahko tudi, da višja ionska moč prispeva k višjim dinamičnim modulom: torej, da se moduli zvišujejo v smeri: prečiščena voda $\rightarrow$ sol ($\mu=0,05$) $\rightarrow$ sol ($\mu=0,1$). Točka

prekrižanja krivulj G' in G'' se pri KCl pojavi pri najnižji frekvenci, sledita CaCl_2 in MgCl_2 , pri najvišji frekvenci pa se pojavi pri NaCl in prečiščeni vodi.

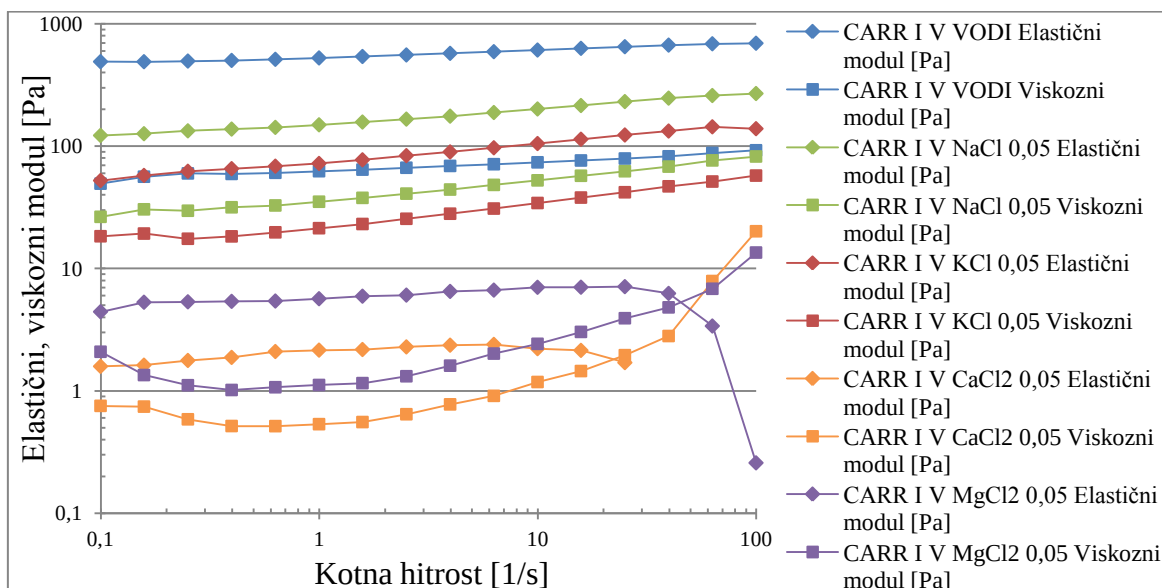


Diagram 31. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr t v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,05.

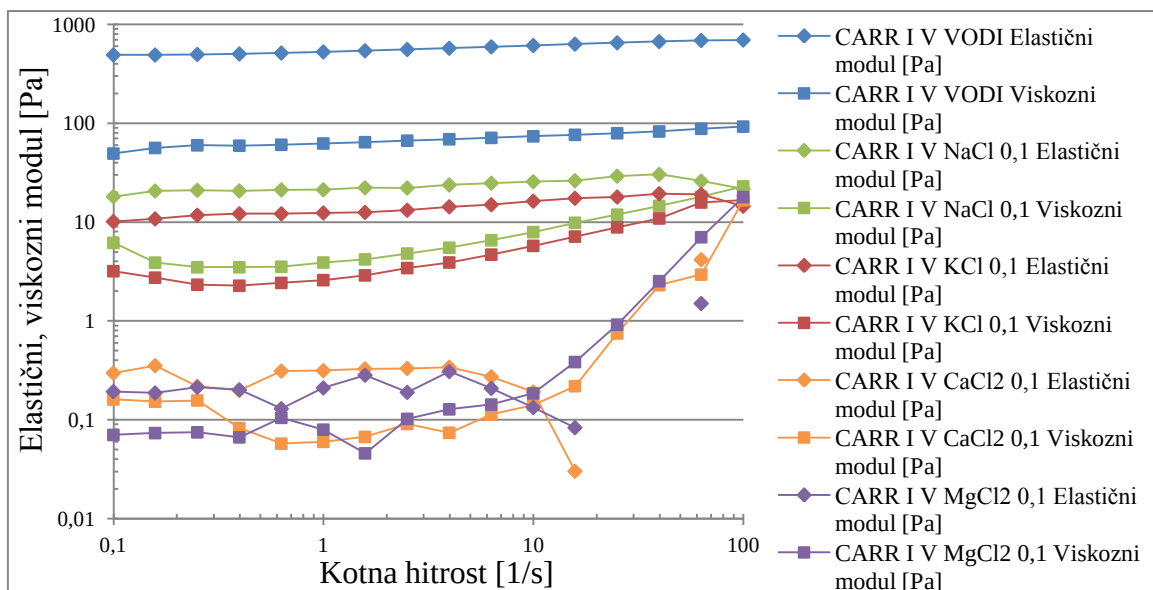


Diagram 32. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr t v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,1.

V nasprotju s carr λ , pri carr ι , dodatek soli povzroči znižanje vrednosti modulov G' in G'' , torej nastanejo šibkejši geli oz. delni geli. Večja koncentracija soli je prispevala k večjemu znižanju dinamičnih modulov. Iz diagramov 31 in 32 je razvidno, da na carr ι najmanj vpliva NaCl, sledi mu KCl, najbolj pa vplivajo dvovalentne soli – CaCl_2 in MgCl_2 . Pri slednjih opazimo nastanek delnega gela in nehomogenost vzorca. Velik vpliv dvovalentnih ionov na carr ι je v skladu z literturnimi podatki (13). Če bi reološke lastnosti merili le

delu vzorca s skupki polimera, bi morda opazili tvorbo čvrstih gelov, ker pa merimo povprečen, nehomogen vzorec, stik med merilnim inštrumentom in vzorcem ni dober, zato je točnost meritev je vprašljiva.

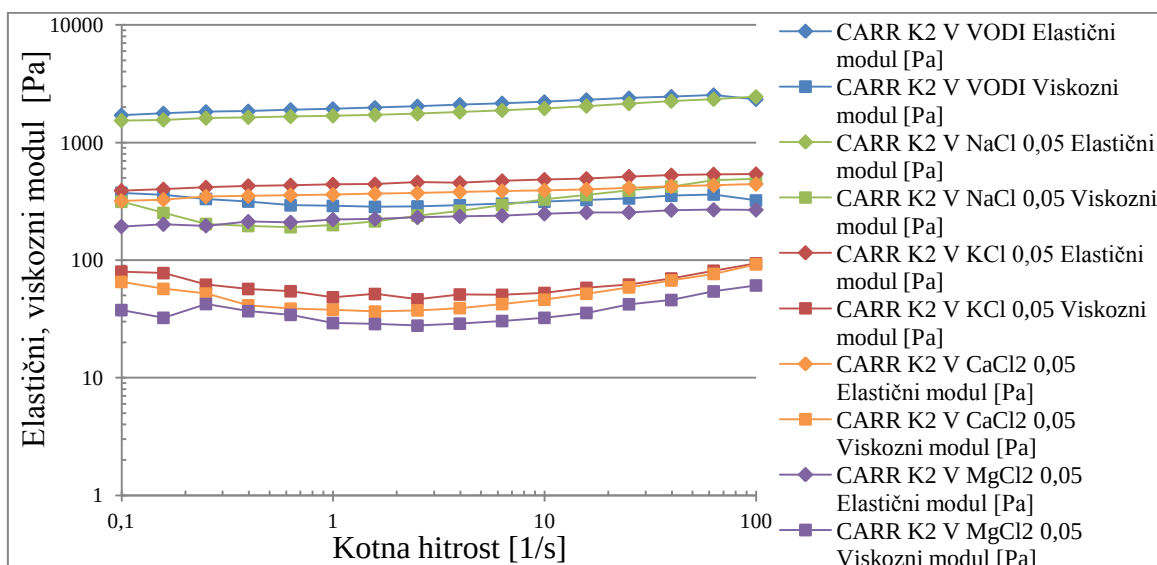


Diagram 33. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr κ2 v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,05.

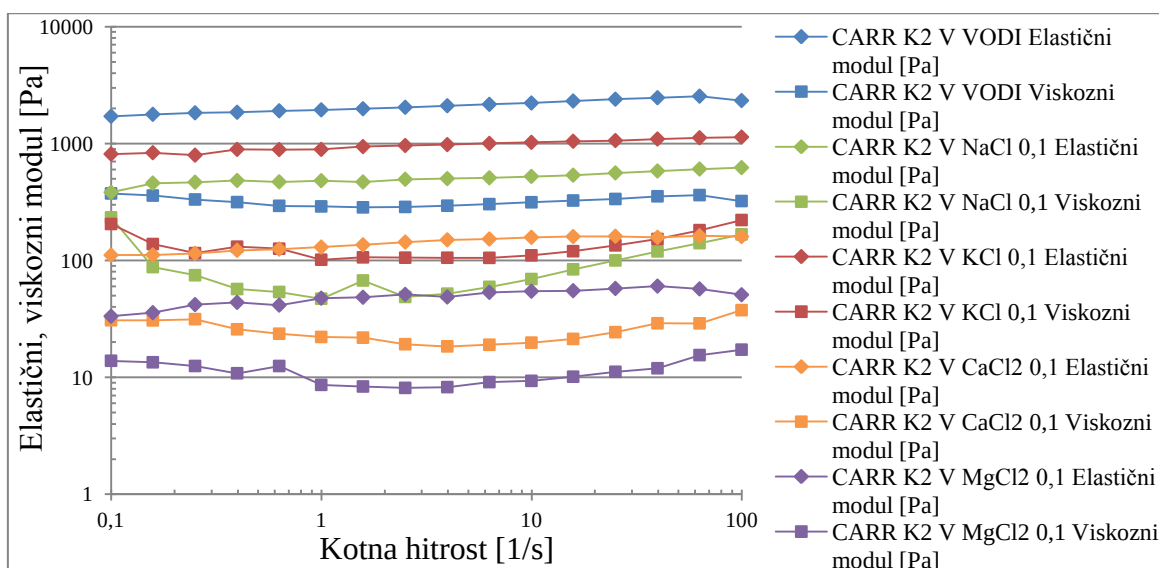


Diagram 34. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr κ2 v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,1.

Pri carr κ2 smo opazili, da so vse soli vplivale na homogenost vzorcev – vsi vzorci so bili kašastega videza, ločite faz pa je bila bolj opazna pri enovalentnih solih. Iz diagramov 33 in 34 vidimo, da na reološke lastnosti najmanj vpliva NaCl. Sledi mu KCl, nato pa CaCl₂ in MgCl₂. Izjema je KCl z ionsko močjo 0,1, ki po grafu sodeč na reološke lastnosti carr κ2 vpliva manj kot NaCl, kar je v nasprotju z literaturnimi podatki (14). Razlog za to je nehomogenost vzorca, ki ima za posledico zdrsavanje sistema in napačno meritev. Glede

na to, da še bolj kot KCl na notranjo strukturo sistema vplivata CaCl_2 in MgCl_2 , bi lahko sklepali, da je morda bil v vzorcu prisoten carr 1 kot nečistota. Le-ta bi lahko tja prišel pri pripravi disperzij, ali pa je prisoten kot nečistota v izhodni snovi, saj so karagenani naravni polimeri. Po pričakovanjih pa lahko potrdimo, da soli z višjo ionsko močjo bolj znižajo dinamična modula G' in G'' kot soli z nižjo ionsko močjo. To je posledica zasičenja mest, na katerih pride do vezave ionov. Višek ionov veže nase vodo, le-ta zato ni na voljo za vezavo na polimer, ki agregira.

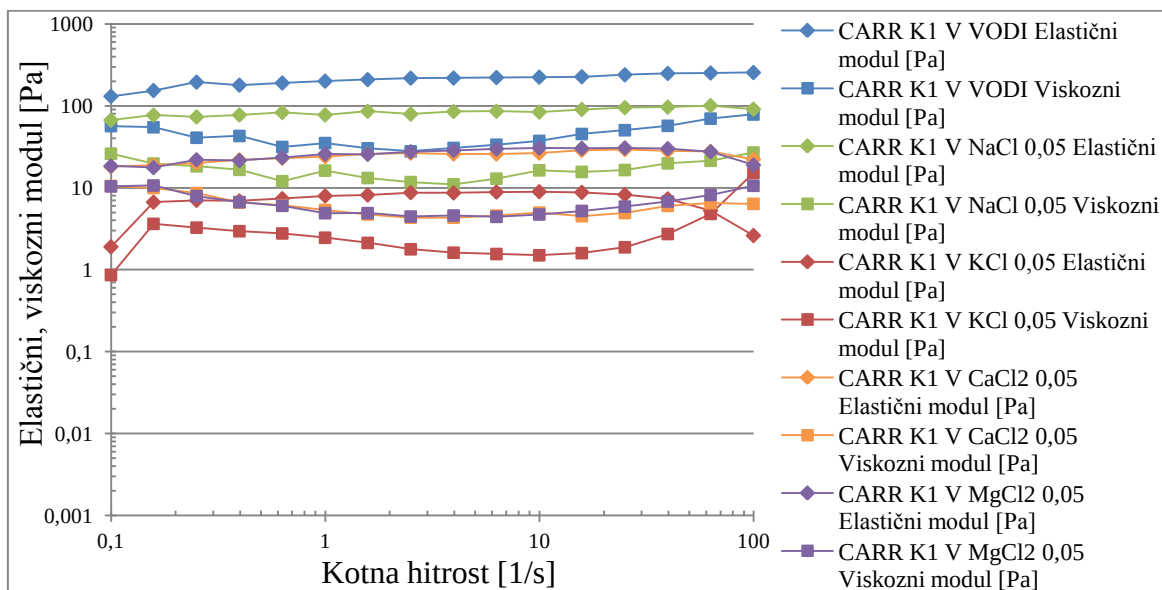


Diagram 35. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr k1 v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,05.

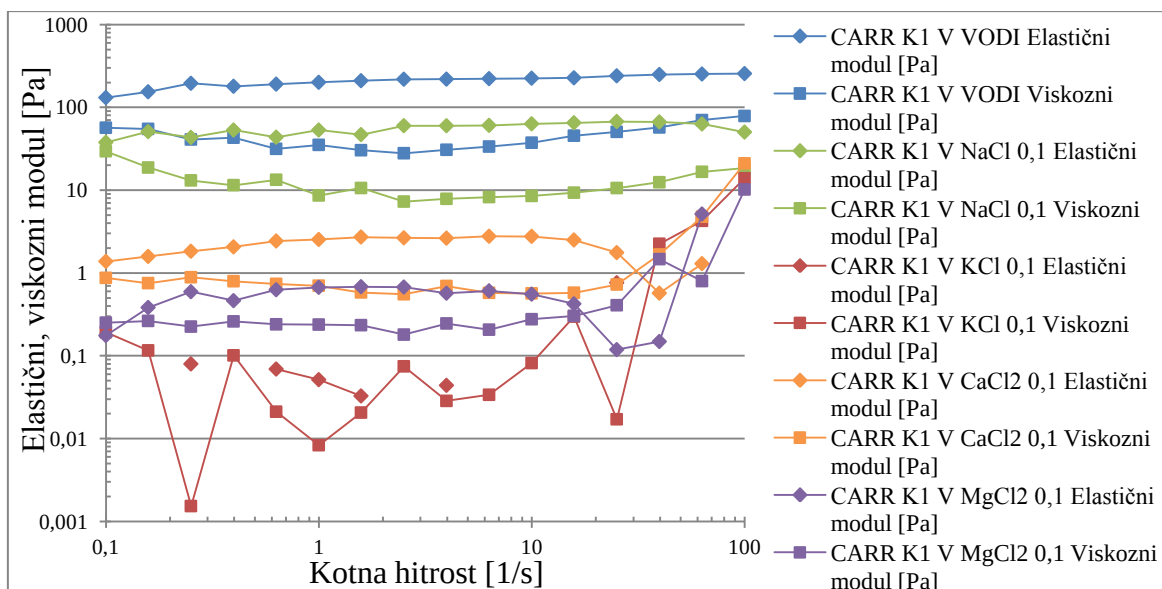


Diagram 36. Frekvenčni testi: 2 % disperzije carr k1 v vodi in raztopinah soli z ionsko močjo 0,1.

Pri carr $\kappa 1$ so dobljeni rezultati bolj v skladu s pričakovanji. Na strukturo najmanj vpliva Na^+ , saj je kot majhen ion sposoben le ionske vezave na sulfatno skupino. Sledita mu Ca^{2+} in Mg^{2+} , najbolj pa na strukturo in s tem reološke lastnosti vpliva K^+ . Le-ta inducira intermolekularne povezave polimernih verig, saj tvori ionsko vez s sulfatno skupino D-galaktoznega ostanka in sekundarno elektrostatsko vez s kisikom anhidro mostu sosednjega galaktoznega ostanka (13). Ker med sulfatnimi skupinami ni več elektrostatskega odboja, verige polimera agregirajo (10). Rezultati nam povedo, da smo z dodano količino K^+ ionov že presegli prag, kjer je notranja struktura sistema urejena v premreženja. Prišlo je do zasičenja vezavnih mest za ione in agregacije polimera, kar je uničilo kohezivno kvarterno strukturo do te mere, da so reološke lastnosti zaradi nehomogenosti in s tem ločitve faz praktično nemerljive. Višek ionov je vezal nase vodo, le-ta zato ni bila na voljo za vezavo na polimer, ki je zato agregiral.

Teorija ionske specifičnosti med K^+ in Na^+ torej temelji na razliki ionskih radijev: Na^+ ima ionski radij 0,95Å, K^+ pa 1,33Å (21). Razlika v ionskih radijih ni velika, zato je na tem mestu potreben razmislek, ali je morda za ionsko specifičnost odgovorna hidratizacija ionov. V vodnih raztopinah so ioni namreč hidratizirani. Pri elementih I. skupine periodnega sistema hidratizacija pada po skupini navzdol: v največji meri je hidratiziran litijev ion (med 12 in 17 molekul vode okrog enega Li^+), najmanj pa cезijev ion (0 molekul vode) (21). Torej je Na^+ bolj hidratiziran kot K^+ , kar pomeni, da bi za ionsko specifičnost lahko bila odgovorna sterična oviranost med polimernimi verigami, zaradi molekul vode, ki obdajajo ion. Na^+ s svojim večjim hidratacijskim plaščkom vode bolj učinkovito preprečuje agregacijo polimernih verig kot K^+ .

Zanimiva je razlika med carr $\kappa 1$ in $\kappa 2$ – $\kappa 1$ tvori šibkejše gele kot $\kappa 2$. Iz specifikacij teh dveh polimerov žal ne vidimo, kako se po strukturi med sabo razlikujeta. Za proizvajalce polimerov je namreč bistveno, da polimer dosega želeno viskoznost raztopine oziroma tvori primerno čvrste gele. Zato točna molekulska masa obeh polimerov ni znana, predvidevamo pa, da je različna in sicer višja za carr $\kappa 2$.

7.4 VREDNOTENJE OGRODNIH TABLET

7.4.1 ENAKOMERNOST MASE ENOODMERNIH FARMACEVTSKIH OBLIK

Preskus enakomernosti mase smo izvajali po predpisu, navedenem v Ph. Eur. 7th Ed. Izdelali smo 400 mg tablete, ki so vsebovale 300 mg polimera in 100 mg PF. Stehtali smo 20 tablet iz vsake serije in določili povprečno maso. Pri tabletah, težjih od 250 mg, lahko največ 2 tableti odstopata od povprečne mase za več kot 5 %, nobena tableta pa ne sme odstopati za več kot 10 %. Rezultate prikazuje tabela 5.

Tabela 5. Rezultati poskusa enakomernosti mase enoodmernih farmacevtskih oblik (n=20 tablet).

	Povprečna masa (mg)	Najmanjša masa (mg)	Največja masa (mg)	SD (mg)	RSD (%)
Carr κ1	403,30	397,21	408,85	4,01	0,99
Carr κ2	401,37	397,52	403,98	1,75	0,44
Carr ι	399,77	396,82	404,35	2,25	0,56
Carr λ	402,12	397,96	406,42	2,85	0,71

Iz preglednice 5 je razvidno, da tablete ustrezajo poskusu enakomernost mase, saj nobena tableta ne odstopa od povprečne mase več, kot dovoljuje evropska farmakopeja.

7.4.2 TRDNOST TABLET

Preskus smo izvedli po predpisu v Ph. Eur. 7th Ed, v poglavju 2.9.8. Poskus smo izvajali na napravi Vanderkamp®, kamor smo položili tableto z večjo, ravno površino navzdol med premični in statični del naprave. Merili smo najmanjšo silo izraženo v Newton-ih (N), ko tableta počí oziroma se poškoduje. Zaradi omejenega števila tablet smo preskus izvedli le na 5 tabletah. Rezultati so podani v tabeli 6.

Tabela 6. Prikaz trdnosti izdelanih tablet (n=5 tablet).

	Povprečna trdnost (N)	Najmanjša trdnost (N)	Največja trdnost (N)	SD (N)	RSD (%)
Carr κ1	84,76	81,1	88,4	3,05	3,60
Carr κ2	75,56	71,9	80,1	3,47	4,59
Carr ι	80,58	70,0	92,9	8,26	10,25
Carr λ	57,34	53,5	59,5	2,38	4,15

Iz rezultatov trdnosti lahko vidimo, da je bil carr $\kappa 1$ najbolj stisljiv – zgornji pečat je bil nastavljen najvišje, pa ima kljub temu najvišjo trdnost med carr (Tabela 1). Sledi mu carr ι , nato $\kappa 2$. Najmanj stisljiv je bil carr λ , ki ima kljub temu, da je bil zgornji pečat nastavljen na najnižjo lego, najmanjšo trdnost med vsemi karagenani. Pri carr ι znotraj serije opazimo največja odstopanja v trdnosti (RSD je najvišji), kar je verjetno posledica zračne vlažnosti – na dan, ko smo stiskali tablete iz carr ι , je bila višja zračna vlažnost kot na dan, ko smo stiskali tablete drugih serij.

7.5 IZDELAVA UMERITVENIH PREMICO

Sproščanje PF iz tablet smo izvajali v petih medijih: prečiščena voda, KCl, NaCl, CaCl_2 in MgCl_2 (vse raztopine soli z ionsko močjo 0,05). Zato smo za vsak medij izdelali umeritveno premico. Osnovno raztopino in razredčene raztopine smo naredili po postopku, opisanem v poglavju 6.7. Nato smo pripravljenim raztopinam pri 274 nm, kjer ima PF absorpcijski maksimum, izmerili absorbanco. Točke smo nanesli na graf, narisali premico in izračunali kvadrat Pearsonovega koeficienta korelacije R^2 .

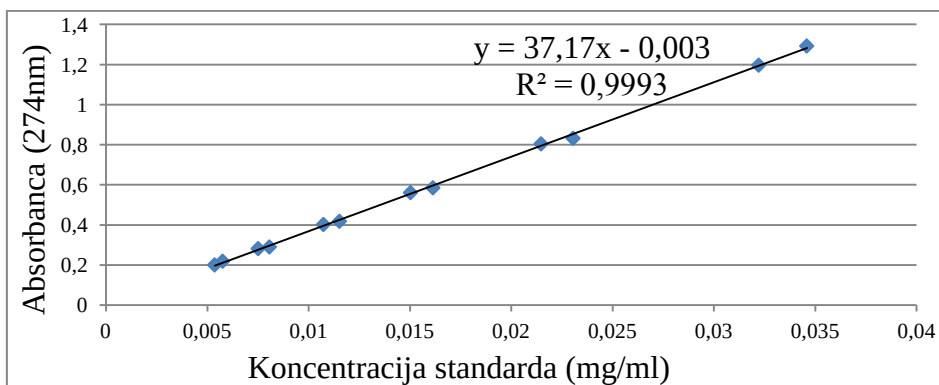


Diagram 37. Umeritvena krivulja za PF v prečiščeni vodi.

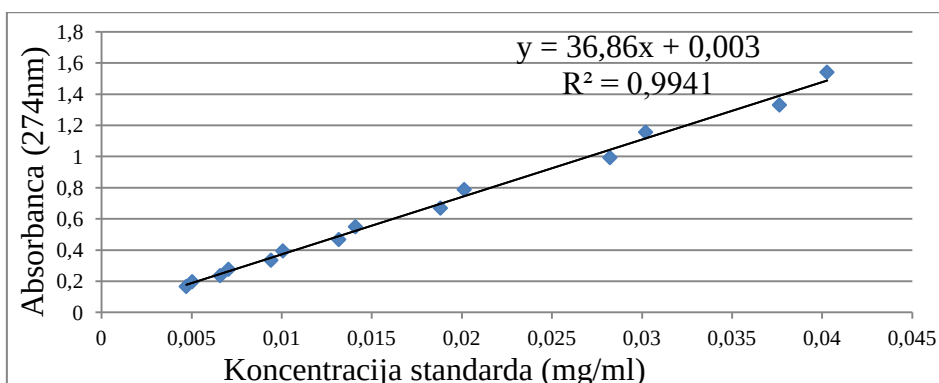


Diagram 38. Umeritvena krivulja za PF v NaCl z ionsko močjo 0,05.

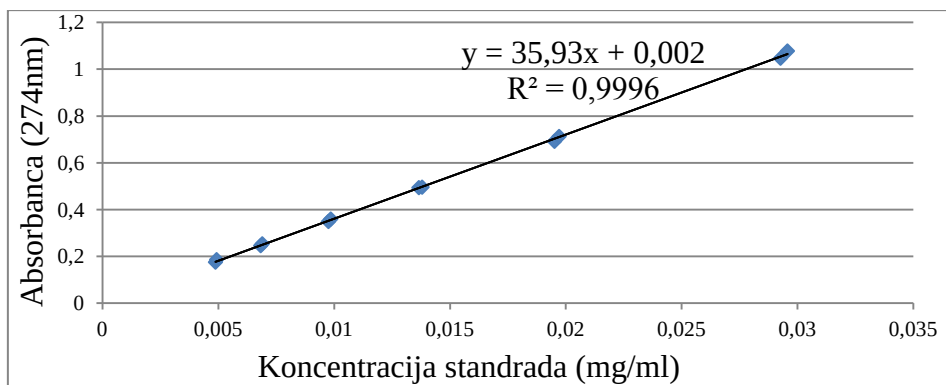


Diagram 39. Umeritvena krivulja za PF v KCl z ionsko močjo 0,05.

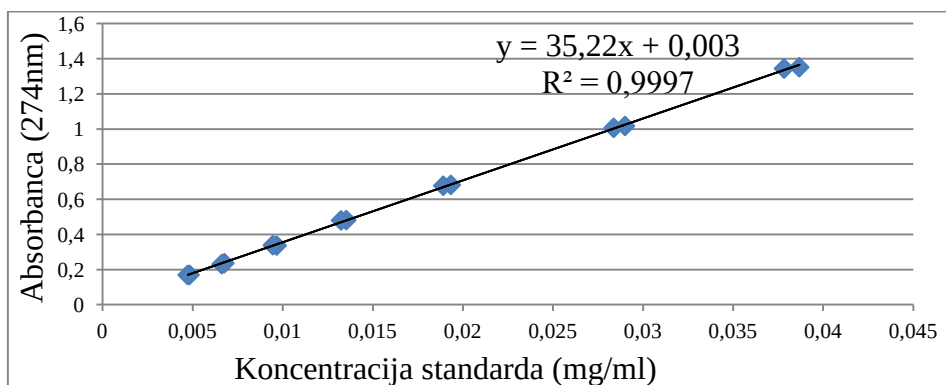


Diagram 40. Umeritvena krivulja za PF v CaCl_2 z ionsko močjo 0,05.

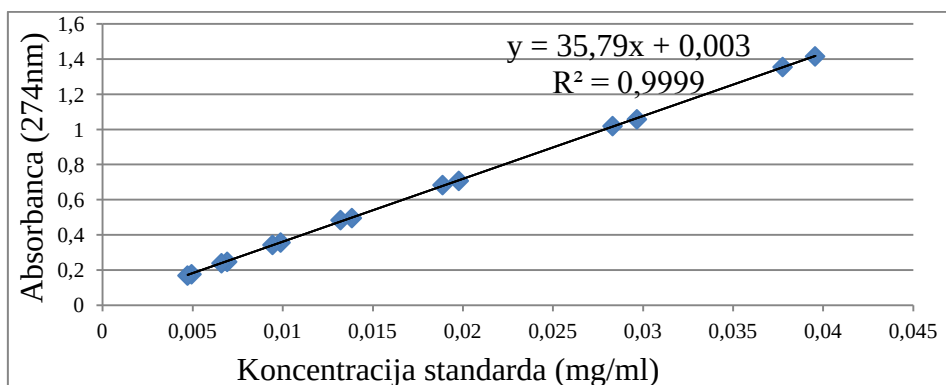


Diagram 41. Umeritvena krivulja za PF v MgCl_2 z ionsko močjo 0,05.

Vidimo, da se enačbe umeritvenih premic med seboj ne razlikujejo veliko, kar pomeni, da raztopljene soli v mediju ne vplivajo bistveno na absorpcijski spekter pentoksifilina.

7.6 SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ OGRODNIH TABLET

7.6.1 SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ TABLET S CARR IOTA NA NAPRAVI Z VESLI

Zanimalo nas je, ali lahko morebiti povežemo reološke lastnosti karagenanov v različnih medijih s sproščanjem modelne ZU – pentoksifilina v teh medijih. PF smo izbrali, ker je dobro topna, neionogena ZU, ki ne tvori interakcij z ogrodjem in lahko zato lažje opazujemo vpliv ionogenega ogrodja na sproščanje.

Sproščanje na napravi 2 po USP smo izvajali le na tabletah iz carr ι , v prečiščeni vodi in v KCl z $\mu=0,05$. Pri carr ι smo namreč z reološkimi meritvami pokazali velik vpliv ionov na strukturo gela.

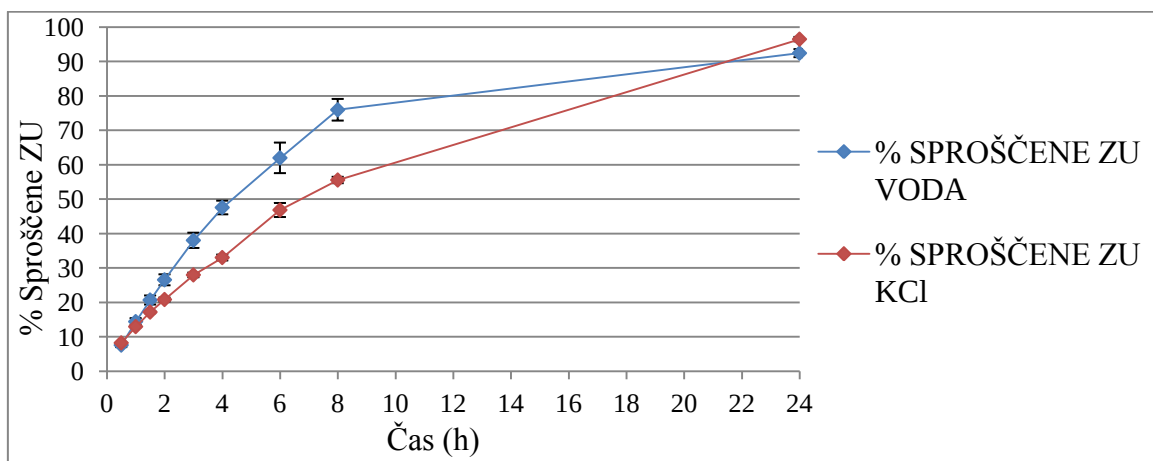


Diagram 42. Rezultati sproščanja PF iz tablet s carr ι v prečiščeni vodi in v mediju s KCl ($\mu=0,05$) na napravi z vesli.

Rezultati so zanimivi, saj lahko vidimo, da se PF hitreje sprosti v prečiščeni vodi kot v KCl. Po štirih urah je v prečiščeni vodi sproščene že skoraj 50 % ZU, medtem ko v mediju s KCl šele 33 %. Prav tako smo opazili, da se tablete v obeh medijih prilepijo na dno posode in da zato tableta na tisti strani ne nabreka. Po 24 urah poskusa smo ugotovili, da je v posodah s KCl še vedno prisoten hidrogel na dnu posode, kljub temu da se je sprostila že vsa ZU. Pri vodi tega hidrogela ni bilo več. Glede na reološke meritve bi pričakovali prav nasprotno rezultate, saj je carr ι v KCl tvoril šibkejši gel kot v vodi. Hkrati pa smo že prej opozorili, da je pri vzorcih za reološke meritve (razen pri prečiščeni vodi) opazna tvorba delnega gela in zato te meritve niso odraz realnega stanja sistema. Merili smo namreč povprečen vzorec, ne pa posameznih skupkov gela, ki so zelo čvrsti. K^+ po literaturnih podatkih zmanjša elektrostatski odboj med sulfatnimi skupinami carr ι , zato je možna

agregacija vijačnic polimera, kar se odraža v nastanku bolj čvrstega gela (14). Točno to pa opazimo tudi pri testu sproščanja.

7.6.2 SPROŠČANJE PENTOKSIFILINA IZ TABLET NA NAPRAVI BIODIS

Ker so se na napravi z vesli tablete lepile na dno in se niso enakomerno omočile, smo se odločili, da bomo poskuse sproščanja izvedli na napravi 3 po USP (BioDis). Menili smo, da bomo tako lažje simulirali pogoje prebavnega trakta in bodo zato rezultati bolj relevantni in tudi lažje primerljivi z reološkimi rezultati.

Poizkuse smo izvedli, kot je opisano v poglavju 6.8.2. Izvajali smo jih 12 ur.

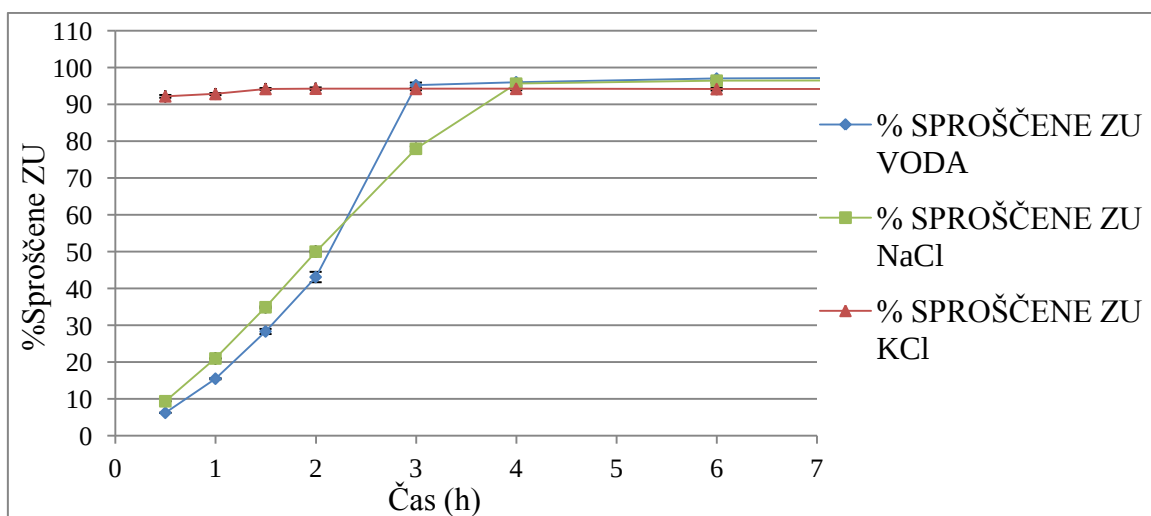


Diagram 43. Rezultati sproščanja PF iz tablet s carr κ 1.

Iz diagrama 43 vidimo, da sproščanje iz tablet s carr κ 1 v vodi do dveh ur poteka zadržano – sprostí se 43 % PF, nato pa pride do razpada tablete in se sprostí vsa učinkovina. V primerjavi s prečiščeno vodo prisotnost NaCl na začetku nekoliko pospeši sproščanje, do razpada pa ni prišlo – sproščanje je enakomerno do 4 ur, ko se je že sprostil ves PF. Zanimivo je, kako zelo na sproščanje vpliva KCl – tableta je namreč takoj razpadla (prej kot v petih minutah), vsa ZU se je sprostila takoj. Zato smo morali vzorce pred meritvijo na spektrofotometru tudi filtrirati. Sproščanja v mediju z dvovalentnimi ioni nismo izvajali, saj smo ga pri tabletah na osnovi carr κ 2, ki je enak tip polimera kot carr κ 1.

Če rezultate primerjamo z rezultati, dobljenimi pri reoloških meritvah, opazimo, da jih lahko povežemo. κ 1 je namreč tvoril najmanj čvrst gel v raztopini KCl, prišlo je do nehomogenosti vzorca, celo do težav pri meritvah zaradi ločitve faz (polimer se je oboril). Sproščanje v KCl je bilo tako najhitrejše, prišlo je do takojšnjega razpada tablete. Prisotnost NaCl je znižala vrednosti dinamičnih modulov v primerjavi z vodo (Diagram

35, Diagram 36), tvoril naj bi se manj čvrst gel (prišlo je do sinereze ali tvorbe delnega gela) in tudi pri sproščanju je NaCl na začetku pospešil sproščanje.

Ponovo lahko potrdimo velik vpliv K^+ ionov na carr κ in uničenje kohezivne kvarterne strukture sistema pri preveliki koncentraciji K^+ ionov (13). Zanimiva je razlika v sproščanju PF v mediju z NaCl in v mediju s KCl. Potrdimo lahko ionsko specifičnost, ki je bodisi posledica ionskega radija, bodisi hidratizacije ionov. Na^+ je namreč manjši od K^+ . K^+ zato poleg ionske vezi s sulfatno skupino D-galaktoze tvori še sekundarno elektrostatsko vez s kisikom anhidro mostu sosednjega galaktoznega ostanka (13). Po drugi strani pa je okrog Na^+ ionov več molekul vode kot okrog K^+ ionov (21). Zato je možno, da na agregacijo polimernih verig vpliva tudi sterična oviranost, le-ta je pri Na^+ večja, zato verige polimera težje agregirajo.

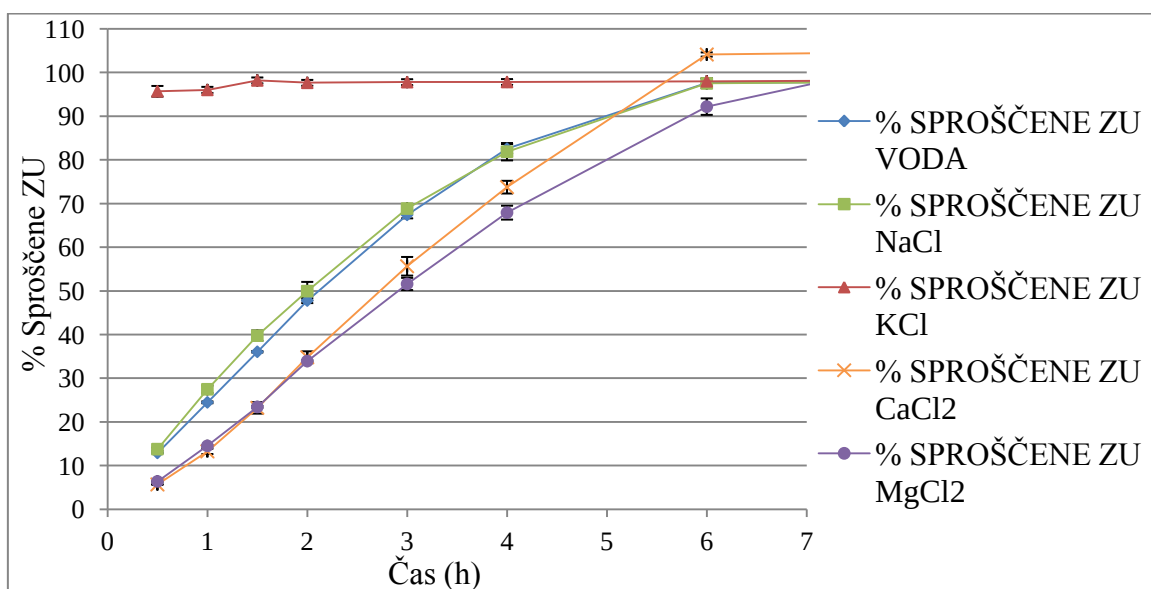


Diagram 44. Rezultati sproščanja PF iz tablet s carr $\kappa 2$.

Pri sproščanju PF iz tablet iz carr $\kappa 2$ opazimo pri KCl enak efekt kot pri $\kappa 1$ – takojšen razpad tablete in sprostitve celotnega odmerka (Diagram 44). Spet lahko potrdimo literaturne podatke, ki govorijo o velikem vplivu K^+ ionov na mikrostrukturo carr κ (13). Potrdimo lahko tudi ionsko specifičnost enovalentnih ionov K^+ in Na^+ – razlika v sproščanju v teh dveh medijih je ogromna.

Rezultati sproščanja iz tablet s carr $\kappa 2$ v mediju s KCl in NaCl se tudi ujemajo z reološkimi meritvami – manj kot je nastali gel čvrst, hitreje je sproščanje. Do razpada tablet v vodi v primeru $\kappa 2$ ni prišlo, verjetno zato, ker $\kappa 2$ tvori bolj čvrste gele kot $\kappa 1$ (Diagram 20). Zanimiv pa je podatek, da dvovalentne soli upočasnijo sproščanje PF iz polimera v

primerjavi z vodo, kljub temu da smo pri reoloških meritvah ugotovili, da v raztopinah CaCl_2 in MgCl_2 nastanejo manj čvrsti geli kot v vodi. Razlog za to je v koncentraciji polimera in količini medija, ki je na razpolago za polimer. Pri vzorcih za reološke meritve je namreč nastal le delni gel, kar se je odražalo v nehomogenosti vzorca. Koncentracija polimera ni bila dovolj visoka, da bi se vijačnice, ki so nastale, povezale v homogeno kvarterno strukturo. Pri tabletah pa so vijačnice trdno skupaj, kar je omogočilo njihovo premreženje, nastanek gela in počasnejše sproščanje kot v vodi. Če bi pri reoloških meritvah merili le skupke polimera in ne povprečnega vzorca, bi se rezultati reoloških meritev najverjetneje ujemali z rezultati sproščanja.

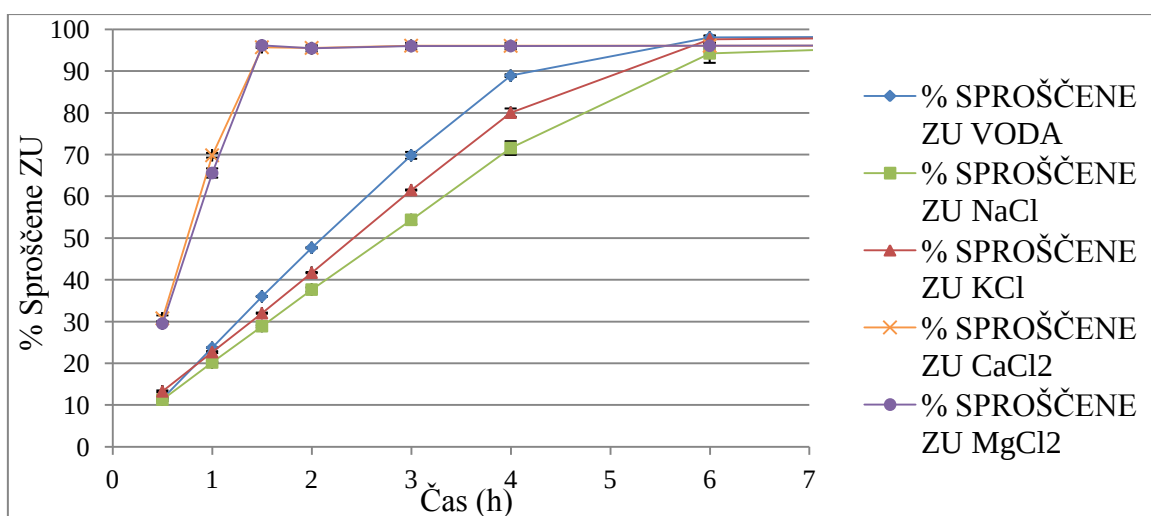
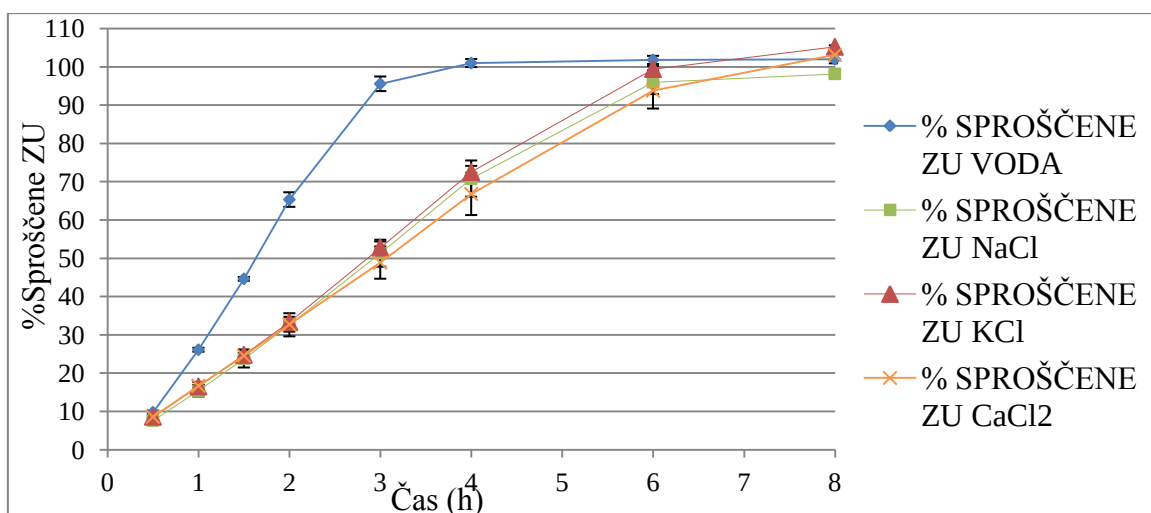


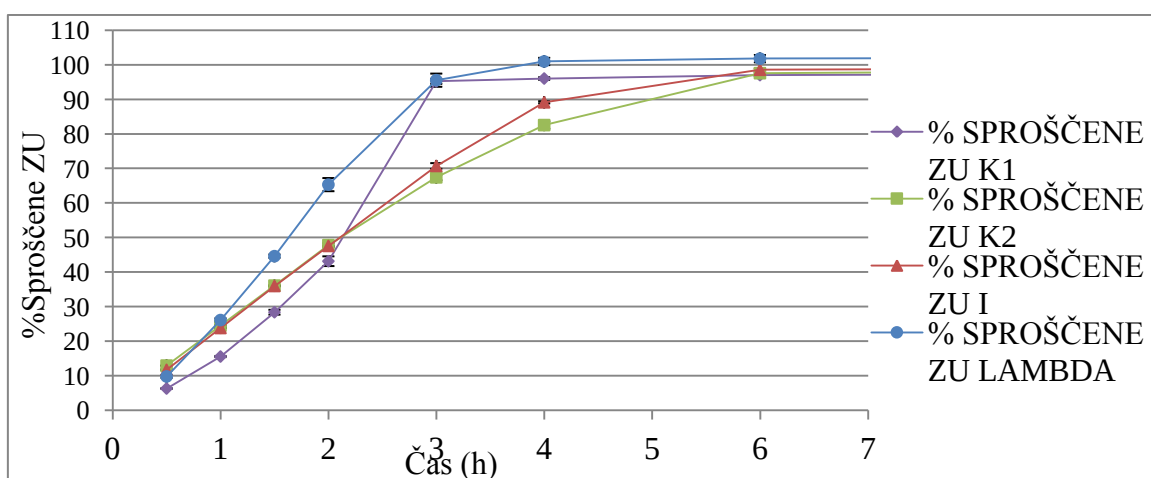
Diagram 45. Rezultati sproščanja PF iz tablet s carr 1.

Pri sproščanju PF iz tablet s carr 1 (Diagram 45) opazimo, da imajo dvovalentni ioni velik vpliv na sproščanje, pride do razpada tablet in ves PF se sprosti že v 1,5 h. Ta podatek se ujema z literaturnimi podatki (13), prav tako s podatki, pridobljenimi pri reoloških meritvah. Tam sta imela gela carr 1 v CaCl_2 in MgCl_2 najnižje vrednosti dinamičnih modulov in sta bila torej najšibkejša. Potrdimo lahko velik vpliv dvovalentnih ionov na mikrostrukturo disperzij s carr 1, ki se ob presežku optimalne koncentracije poruši. Ionske specifičnosti za Ca^{2+} ali Mg^{2+} nismo opazili, kar je v skladu z literaturo (14). Sproščanje v KCl je potekalo počasneje kot v vodi, še počasneje je potekalo sproščanje v NaCl, kar pa je v nasprotju s podatki pridobljenimi z reološkimi meritvami, kjer se v NaCl in KCl tvorijo šibkejši geli kot v vodi. Morda v tem primeru elektroliti preprečijo hidratacijo polimera, medij prodira v tableto počasi in se zato ZU sprošča bolj počasi.

Diagram 46. Sproščanje PF iz tablet s carr λ .

Pri sproščanju PF iz tablet iz carr λ voda bistveno odstopa od ostalih medijev, kar je presenetljivo, saj pri reoloških meritvah nismo opazili tako velikega vpliva ionov na dinamična modula G' in G'' (Diagram 29, Diagram 30). So pa podatki skladni z dobljenimi pri reoloških meritvah: najhitrejšo sproščanje je v prečiščeni vodi, kjer nastane najmanj strukturirana raztopina polimera. V ostalih medijih se PF sprošča zelo podobno, kljub temu da se pri reoloških meritvah opazijo razlike v viskoznosti: najbolj viskozna raztopina nastane v KCl, sledi CaCl_2 , nato NaCl. Statistično gledano razlike v profilih sproščanja PF v medijih s KCl in CaCl_2 ni. Vrednost faktorja f_1 je namreč 5,46, vrednost faktorja f_2 pa 74,41. Faktor f_1 je torej manjši od 15, faktor f_2 pa večji od 50, profila sta si statistično podobna.

Na diagramih 47–51 so prikazane primerjave sproščanja različnih carr v istem mediju.

Diagram 47. Sproščanje PF iz tablet s carr $\kappa 1$, $\kappa 2$, ι in λ v prečiščeni vodi.

V prečiščeni vodi se PF najhitreje sprosti iz tablet s carr λ (Diagram 47), ki ima tudi pri reoloških meritvah najnižje vrednosti dinamičnih modulov G' in G'' v celotnem frekvenčnem območju in tvori le viskozno raztopino (Diagram 20). Najbolj počasi se PF sprošča iz carr $\kappa 2$, kar se tudi ujema z rezultati reoloških meritev, saj je carr $\kappa 2$ v prečiščeni vodi tvoril najbolj čvrst gel. Sproščanje iz tablet s carr ι je nekje vmes, prav tako tudi vrednosti G' in G'' . Carr $\kappa 1$ je na začetku zadržal sproščanje, potem pa je tableta razpadla, kar lahko povežemo z reologijo – carr $\kappa 1$ v vodi tvori zelo šibak gel in ko se je tableta dovolj hidratirala (nastal je zelo šibak sloj hidrogela), je le-ta razpadla.

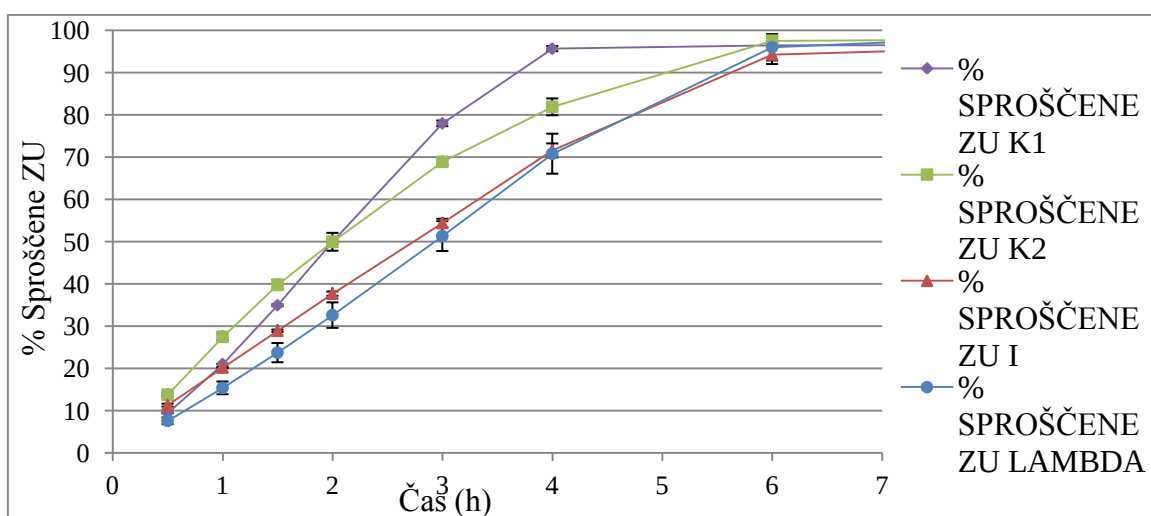


Diagram 48. Sproščanje PF iz tablet s carr $\kappa 1$, $\kappa 2$, ι in λ v PF v mediju z NaCl ($\mu=0,05$).

Na^+ najbolj vpliva na sproščanje carr $\kappa 1$ in $\kappa 2$ – PF se iz teh tablet sprosti najhitreje (Diagram 48). To je razumljivo, kljub temu da reološki rezultati kažejo, da carr $\kappa 2$ in $\kappa 1$ tvorita v NaCl najbolj čvrst gel. Razlog je namreč nehomogenost, izražena pri reoloških meritvah in agregacija polimernih verig, ki je pri NaCl sicer manj izrazita kot pri KCl. Ko polimerne verige agregirajo, skupke teh verig pri premikanju recipročnega cilindra odnaša v medij, PF pa se sprosti. Na začetku se bolj počasi sprošča PF iz tablet s carr $\kappa 1$, a se to kmalu spremeni, saj carr $\kappa 1$ tvori bolj šibke gele kot carr $\kappa 2$ (Diagram 21, Diagram 22) – pri $\kappa 1$ je zato vsa ZU sproščena že po 4 urah, medtem ko se pri $\kappa 2$ PF sprošča 6 ur. Sproščanje iz tablet s carr ι in λ je podobno, iz tablet s carr ι se pentoksifilin sprošča malo hitreje.

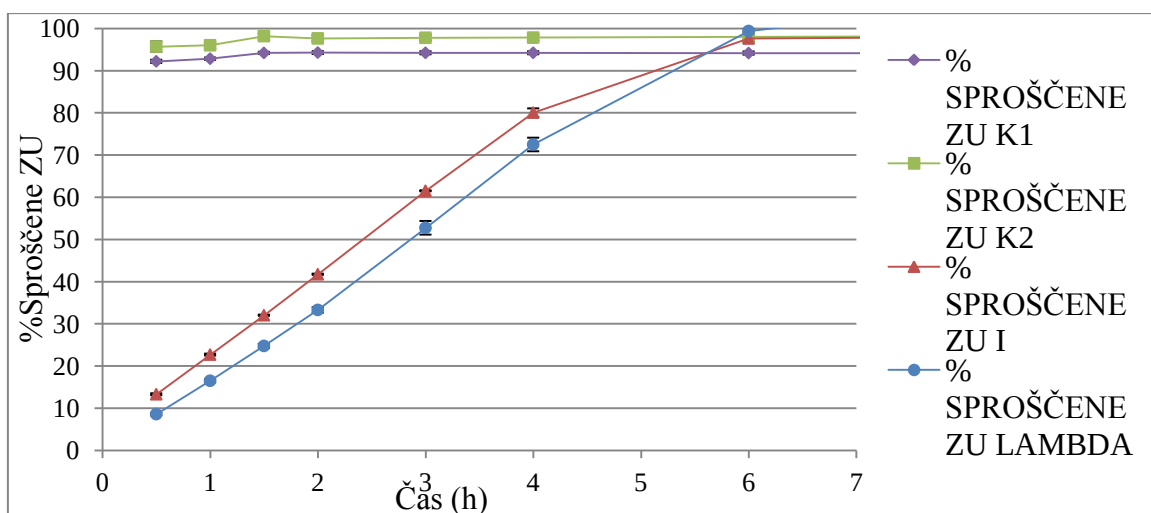


Diagram 49. Sproščanje PF iz tablet s carr $\kappa 1$, $\kappa 2$, ι in λ v mediju s KCl ($\mu=0,05$).

Iz diagrama 49 je razvidno, da ima K^+ največji vpliv na carr κ , pride do takojšnjega razpada tablete in sprostitve celotnega odmerka. Čeprav nam reološki podatki povedo, da tvori $\kappa 2$ čvrst gel v KCl (Diagram 23, Diagram 24), pa vemo, da je šlo za zelo heterogen sistem, ki je izločil vodo (prišlo je do ločitve plasti). Nastal je delni gel ali gel s sinerezo. Predvidevamo, da so tudi pri hidriranju tablete verige carr $\kappa 1$ oziroma $\kappa 2$ agregirale, te skupke verig pa je odplovilo v medij pri premikanju recipročnega cilindra in so zato tablete razpadle. PF se je iz tablet s carr ι sproščal 6 ur, prav tako iz carr λ , sproščanje je potekalo malo hitreje iz tablet s carr ι .

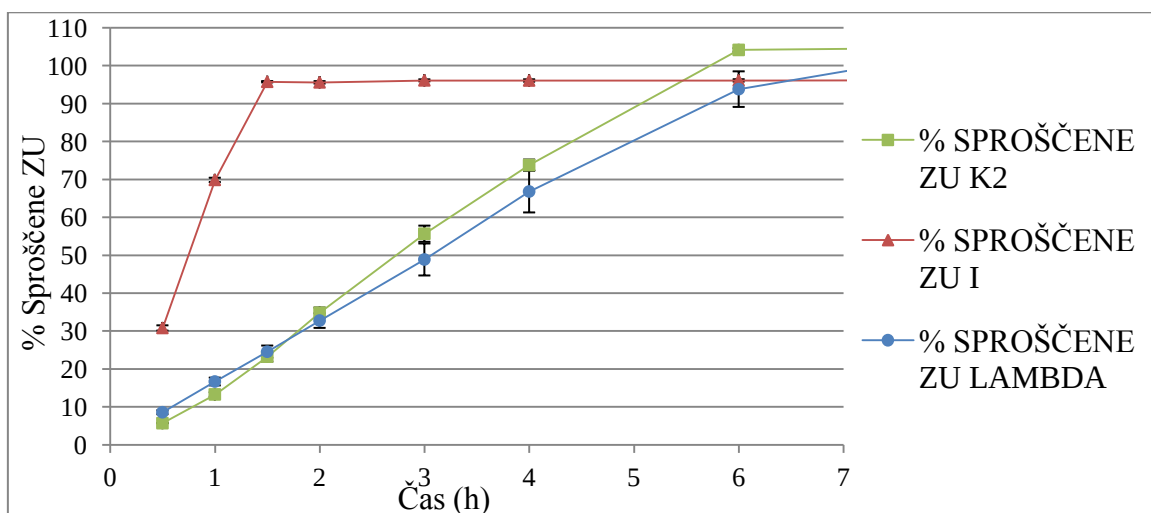


Diagram 50. Sproščanje PF iz tablet s carr $\kappa 2$, ι in λ v mediju s $CaCl_2$ ($\mu=0,05$).

$CaCl_2$ najbolj vpliva na sproščanje PF iz tablet s carr ι – tableta razpade, sprosti se vsa ZU (Diagram 50). Dobljeni podatek se ujema z literaturnimi podatki (13) in s podatki pridobljenimi pri reoloških meritvah – tvoril se je le šibak gel, vrednosti modulov G' in G''

so bile zelo nizke, sistem je bil heterogen in je povzročal zdrsavanje instrumenta (Diagram 25, Diagram 26). Ca^{2+} ioni so povzročili razpad kohezivne mikrostrukture, rezultat pa je bila sprostitvev celotnega odmerka v 1,5 h. Sproščanje iz tablet s carr $\kappa 2$ na začetku poteka malo počasneje kot pri tabletah s carr λ , nato pa se krivulji prekrížata in se PF hitreje sprošča iz tablet s carr $\kappa 2$ kot pa iz tablet s carr λ .

Želeli smo preveriti, ali med profiloma sproščanja PF iz tablet na osnovi carr $\kappa 2$ in λ obstaja statistična razlika (v mediju s CaCl_2) (Diagram 20). Zato smo izračunali faktor podobnosti f_2 in faktor različnosti f_1 . Vrednost faktorja f_1 je bila 6,91, vrednost faktorja f_2 pa 64,38, kar pomeni, da statistična razlika med tema dvema profiloma sproščanja ne obstaja.

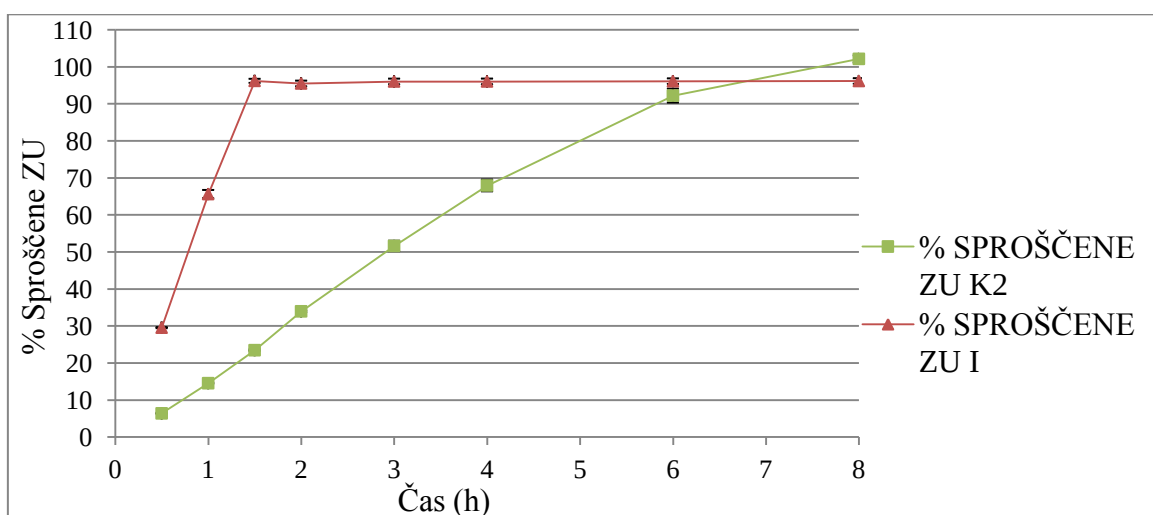


Diagram 51. Sproščanje PF iz tablet s carr $\kappa 2$ in λ v mediju z MgCl_2 ($\mu=0,05$).

Tako kot Ca^{2+} , tudi Mg^{2+} najbolj vpliva na sproščanje ZU iz tablet na osnovi carr λ (Diagram 51). Mehanizem delovanja je enak – porušenje por v mikrostrukturi polimera. Glede na reološke rezultate je ta rezultat v skladu s pričakovanji (Diagram 27, Diagram 28). Mg^{2+} je manj vplival na sproščanje iz tablet s carr $\kappa 2$ – sproščanje je bilo precej konstantno 8 ur, v tem času se je sprostila vsa ZU.

Kot zanimivost naj še omenimo primerjavo rezultatov dobljenih na napravi BioDis in na napravi z vesli (Diagram 52). PF se tako v primeru prečiščene vode kot medija, kot tudi v KCl, sprošča mnogo hitreje na napravi BioDis. Razlog za to je v enakomernem omočenju tablete iz vseh strani na napravi BioDis in večji hidrodinamski vpliv medija na tablete. Za pridobitev rezultatov, ki bi najbolj posnemali fiziološke pogoje in bili zato najbolj kakovostni, je torej potrebno izbrati tudi primerno aparaturo.

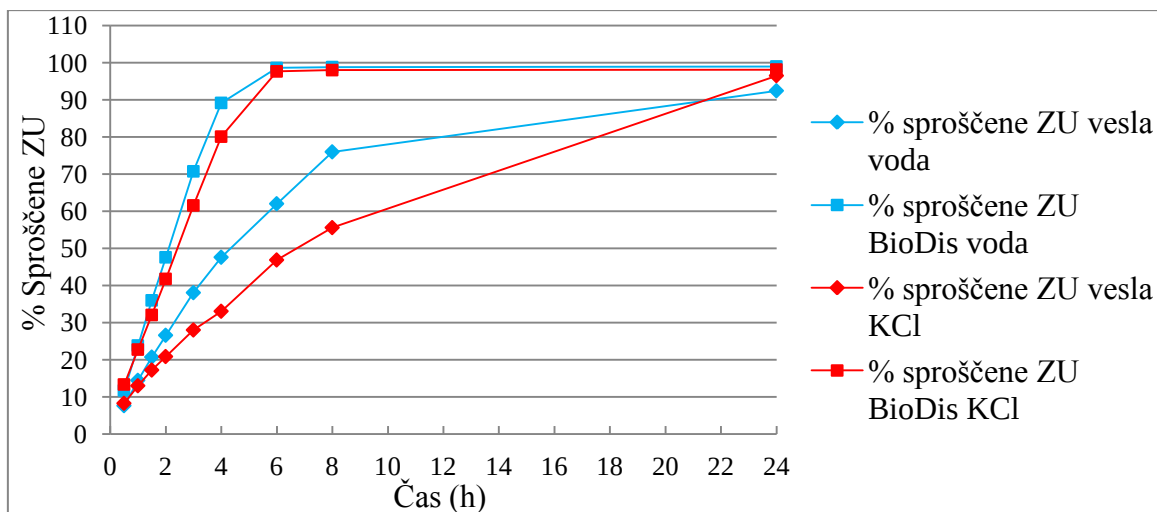


Diagram 52. Primerjava rezultatov pridobljenih na napravi BioDis (■) in rezultatov pridobljenih na napravi z vesli (◆).

8 ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo sistematično proučili vpliv kationov (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} in Ca^{2+}) na reološke lastnosti karagenanskih hidrogelov pri sobni temperaturi in pri 37 °C. Prav tako smo proučili vpliv teh ionov na sproščanje pentoksifilina iz karagenanskih ogrodnih tablet. Proučili smo vse tri tehnološko najbolj pomembne vrste karagenanov. Rezultate pridobljene pri reologiji smo primerjali z literaturnimi podatki in z rezultati pridobljenimi pri sproščanju. Z našim raziskovalnim delom smo prišli do naslednjih sklepov:

- Na reološke lastnosti karagenanov vplivajo tako vrsta kationa kot tudi ionska moč.
- Karagenani $\kappa 1$, $\kappa 2$ in ι v prečiščeni vodi v preiskovanem koncentracijskem območju (1 – 2 %) tvorijo gele, medtem ko karagenan λ tvori viskozne raztopine.
- Za tvorbo homogenega gela mora biti prisotna dovolj visoka koncentracija polimera (npr. 2 %).
- Najvišje vrednosti elastičnega in viskoznega modula pri karagenanih $\kappa 1$, $\kappa 2$ in ι so pri vodnih disperzijah, dodatek elektrolitov pa te vrednosti zniža. Nastanejo namreč delni geli ali geli s sinerezo, merimo pa povprečne vzorce. Pri karagenanu λ je ravno obratno – vrednosti dinamičnih modulov so najnižje pri vodnih disperzijah, dodatek elektrolitov pa jih zviša.
- K^+ ioni imajo največji vpliv na reološke lastnosti karagenanov κ (agregacija polimernih verig je največja), na reološke lastnosti karagenana ι pa imata največji vpliv divalentna iona Ca^{2+} in Mg^{2+} . Na karagenan λ najbolj vpliva K^+ , najmanjši vpliv na vse karagenane ima Na^+ .
- Višja ionska moč prispeva k večjemu znižanju obeh dinamičnih modulov pri karagenanih $\kappa 1$, $\kappa 2$ in ι .
- Višja ionska moč prispeva k večjemu zvišanju modulov pri karagenanu λ .
- $\kappa 1$ tvori šibkejše gele kot $\kappa 2$.
- Omejujoč faktor pri reoloških meritvah je nehomogenost določenih vzorcev, na katere so ioni vplivali tako, da so se verige polimera trdno povezale med sabo in izločile vodo. Posledično je prišlo do zdrsanja merilnega sistema.
- Na sproščanje pentoksifilina iz ogrodnih tablet na osnovi carr opazimo velik vpliv uporabljenega medija za sproščanje.
- Na karagenana $\kappa 1$ in $\kappa 2$ najbolj vpliva KCl, ki povzroči takojšen razpad tablete in sprostitev celotnega odmerka.

- Potrdimo lahko selektiven vpliv K^+ na karagenan κ , Na^+ namreč nima takšnega vpliva.
- Divalentni ioni imajo velik vpliv na sproščanje pentoksifilina iz tablet s karagenanom ι . Tableta razpade in celoten odmerek se sprost v 1,5 h tako pri Ca^{2+} kot tudi pri Mg^{2+} .
- Pri sproščanju PF iz tablet s karagenanom λ je sproščanje v prečiščeni vodi najhitrejše.
- Sproščanje PF iz tablet korelira z reološkimi lastnostmi, kjer je disperzija homogena, na primer v prečiščeni vodi. Tam nastanek bolj čvrtega gela pomeni počasnejše sproščanje, šibkejšega pa hitrejše sproščanje.
- Kjer disperzija ni homogena (prihaja do nastanka delnih gelov ali gelov s sinerezo), reoloških lastnosti ne moremo direktno primerjati s hitrostjo sproščanja, lahko pa si vseeno pomagamo pri interpretaciji rezultatov.
- Poleg izbire medija je za sproščanje ZU pomembna tudi izbira vrste aparature za sproščanje, saj se rezultati dobljeni na napravi 2 po USP bistveno razlikujejo od rezultatov pridobljenih na napravi 3 po USP. Pomembna razlika med aparaturama je ne le možnost izbire različnih medijev pri napravi 3 po USP, ampak tudi hidrodinamska obremenitev tablet, ki je veliko večja pri napravi 3. Tablete se zato ne lepijo na dno in se enakomerno omočijo z vseh strani. V našem primeru je zato primernejša uporaba naprave 3 po USP.

Glede na to, kako velik vpliv imajo ioni na reološke lastnosti karagenanskih hidrogelov in na sproščanje pentoksifilina iz karagenanskih ogrodnih tablet, bi bilo smiselno za nadaljne raziskave sproščanja uporabiti medij, ki zelo dobro posnema pogoje v gastrointestinalnem traktu. Smiselno bi bilo preučiti na primer vpliv žolčnih soli na sproščanje in uporabiti takšno kombinacijo soli, ionsko moč, pH, pufersko kapaciteto in površinsko napetost, ki je fiziološko prisotna. Prav tako bi bilo potrebno proučiti vpliv hrane na sproščanje in absorpcijo zdravilne učinkovine, saj so ioni sestavni del hrane (npr. Ca^{2+} v mleku). Le tako bodo dobljeni *in vitro* rezultati korelirali z *in vivo* rezultati.

9 LITERATURA

1. Formularium Slovenicum, Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 3.0. Ministrstvo za zdravje, Javna Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, 2011.
2. Wise LD. Handbook of pharmaceutical controlled release technology. Marcel Dekker, New York, 2000: 431– 445.
3. Maderuelo C, Zarzuelo A, Lanao JM. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. Journal of Controlled release 2011; 154: 2–19.
4. Aulton ME. Aulton`s Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 442– 466.
5. Mikac U, Sepe A, Kristl J, Baumgartner S. A new approach combining different MRI methods to provide detailed view on swelling dynamics of xanthan tablets influencing drug release at different pH and ionic strength. Journal of Controlled release 2010; 145: 247– 256.
6. Zupančič Valant A: Uvod v reologijo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 7– 65.
7. Planinšek O, Srčič S: Vaje iz fizikalne farmacije. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 48 –58.
8. Janaswamy S, Chandrasekaran. Three-dimensional structure of the sodium salt of iota-carrageenan. Carbohydrate research 2001; 335: 181–194.
9. Running CA, Falshaw R, Janaswamy S. Trivalent iron induced gelation in lambda-carrageenan. Carbohydrate polymers 2012; 87: 2735–2739.
10. Şen M, Erboz EN. Determination of critical gelation conditions of κ -carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses. Food research international 2010; 43: 1361–1364.
11. Nickerson MT, Paulson AT, Hallett FR. Dilute solution properties of κ -carrageenan polysaccharides: effect of potassium and calcium ions on chain conformation. Carbohydrate polymers 2004; 58: 25–33.
12. MacArtain P, Jacquier JC, Dawson KA. Physical characteristics of calcium induced κ - carrageenan networks. Carbohydrate polymers 2003; 53: 395– 400.

13. Thrimawithana TR, Young S, Dunstan DE, Alany, RG. Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. Carbohydrate polymers 2010; 82: 69 –77.
14. Michel AS, Mestdagh MM, Axelos MAV. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. International journal of biological macromolecules 1997; 21: 195–200.
15. Chen Y, Liao ML, Dunstan DE. The rheology of K^+ -κ-carrageenan as a weak gel. Carbohydrate polymers 2002; 50: 109 –116.
16. Windmeier C, Gressner AM. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. General pharmacology 1997; 29: 181–196.
17. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-009256.pdf&dir=smpc>, dostopano avgust 2012
18. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00806>, dostopano avgust 2012
19. European Pharmacopoeia, 7th edition, Volume 1. EDQM, Strasbourg, 2011: 256–266.
20. Anderson NH, Bauer M, Boussac N, Khan-Malek R, Munden P, Sardaro M. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1998; 17: 811– 822.
21. Brenčič J, Lazarini F. Splošna in anorganska kemija. Visokošolski učbenik, Ljubljana, 2004: 420– 422.