

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA DROBNIČ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA DROBNIČ

**REOLOŠKO OVREDNOTENJE TERMOREVERZIBILNIH HIDROGELOV ZA
PODKOŽNO APLIKACIJO**

**RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THERMOREVERSIBLE
HYDROGELS FOR SUBCUTANEOUS APPLICATION**

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar za pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi tehnični sodelavki Tatjani Hrovatič za pomoč pri delu z reometrom.

Nenazadnje se želim zahvaliti tudi svojim staršem za vso potrpežljivost in podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft

Član diplomske komisije: asist.dr. Stane Pajk

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	V
1. UVOD	1
1.1. HIDROGELI	1
1.1.1. STRUKTURA HIDROGELSKE MREŽE	1
1.1.2. NAČINI PREMREŽEVANJA HIDROGELOV	1
1.2. POLOKSAMERI	3
1.2.1. POLOKSAMER P407 (F127).....	4
1.2.2. POLOKSAMER P188 (F68).....	5
1.2.3. GLAVNE POMANJKLJIVOSTI POLOKSAMERNIH HIDROGELOV	5
1.3. HIDROKSIPROPIL METILCELULOZA (HPMC)	5
1.4. MOŽNOSTI APLIKACIJE HIDROGELOV	7
1.5. VREDNOTENJE HIDROGELOV	8
1.5.1. OSNOVE REOLOGIJE	8
1.5.2. REOLOŠKI SISTEMI	10
1.5.3. DOLOČANJE VISKOELASTIČNIH LASTNOSTI SNOVI	12
2. NAMEN DELA	20
3. MATERIALI IN METODE	21
3.1. MATERIALI IN NAPRAVE	21
3.2. POSTOPKI IN METODE	21
3.2.1. IZDELAVA HIDROGELOV	21

3.2.2. VREDNOTENJE HIDROGELOV	23
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1. I. SKLOP MERITEV: OSCILACIJSKA VISKOMETRIJA	30
4.1.1. DOLOČITEV OBMOČJA LINEARNOSTI ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA ..	30
4.1.2. FREKVENČNA ODVISNOST ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA	32
4.1.3. TEMPERATURNNA ODVISNOST ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA V INTERVALU 10-40°C.....	36
4.1.4. PRILAGAJANJE POGOJEV MERITEV TEMPERATURNE ODVISNOSTI.....	37
4.1.5. TEMPERATURNNA ODVISNOST MODULOV V INTERVALU 40-10°C.....	46
4.2. II. SKLOP MERITEV: OCENA ČASA GELIRANJA	51
4.2.1. VIZUALNA OCENA ČASA GELIRANJA.....	51
4.2.2. OCENA ČASA GELIRANJA – ROTACIJSKA VISKOMETRIJA.....	51
4.3. III. SKLOP MERITEV: PREIZKUŠANJE SPOSOBNOSTI SUBKUTANE APLIKACIJE HIDROGELOV	54
4.3.1. PREIZKUS IZTISLJIVOSTI SKOZI IGLO	54
4.3.2. VPLIV STRIŽNE HITROSTI NA VISKOZNOST HIDROGELOV	56
5. SKLEP	58
6. LITERATURA	60

POVZETEK

Termoreverzibilni hidrogeli so nadvse privlačni sistemi za dostavo zdravilnih učinkovin v podkožje. Zaradi svoje mehke konsistence in visoke vsebnosti vode so visoko biološko kompatibilni. Z ustreznim kombiniranjem polimerov in uravnavanjem njihove vsebnosti lahko izdelamo hidrogel, ki so tekoči pri sobni temperaturi, po aplikaciji pa gelirajo pri telesni temperaturi.

V okviru diplomske naloge smo izdelali 8 formulacij hidrogelov, ki so vsebovale različne kombinacije in deleže poloksamerov P407 in P188 ter HPMC. Z reometrom Physica MCR301 smo nato določali lastnosti teh formulacij, prav tako pa smo preverjali tudi njihovo sposobnost iztisa skozi hipodermalno iglo.

Za vse formulacije smo posneli mehanske spektre (frekvenčna odvisnost elastičnega in viskoznega modula). Ugotovili smo, da imajo vsi hidrogeli lastnosti viskozne tekočine pri temperaturi hladilnika, pri telesni temperaturi pa imajo gelski značaj. Izvedli smo tudi meritve temperaturne odvisnosti (proces geliranja) obeh modulov v temperaturnem območju od 10 do 40°C in od 40 do 10°C. Dobljene rezultate smo nato primerjali s predhodno določenimi temperaturami geliranja (T_{gel}). Za večino formulacij smo potrdili predhodno določene T_{gel} , nekaterim formulacijam pa z našimi meritvami nismo uspeli določiti vrednosti T_{gel} . V nadaljevanju nas je zanimalo tudi, kako hitro naše formulacije hidrogelov preidejo iz tekočega v poltrdno stanje ter kakšen vpliv imata dodatek P188 in HPMC na trajanje procesa geliranja (čas geliranja). Za ta namen smo izvedli meritve časovne odvisnosti viskoznosti ob naraščajoči temperaturi. Ugotovili smo, da višanje vsebnosti P407 nima vpliva na čas geliranja. Dodatek HPMC je skrajšal čas geliranja hidrogela, dodatek P188 in višanje vsebnosti le-tega pa sta čas geliranja podaljšala.

Na koncu smo preverjali še iztisljivost hidrogelov skozi 25G in 21G hipodermalni igli (»syringeability and injectability test«) ter rezultate iztisa obrazložiti tudi z meritvijo viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti. Ugotovili smo, da se je z višanjem deleža polimerov iztisljivost skozi 25G poslabšala. Prav tako je iztisljivost poslabšal tudi dodatek HPMC. Z reološkimi meritvami nismo uspeli obrazložiti odstopanja v iztisljivosti formulacije, ki je vsebovala kombinacijo P407 in P188 v višjih deležih.

Ključne besede: termoreverzibilni hidrogeli, viskoelastičnost, iztisljivost skozi iglo

ABSTRACT

Thermoreversible hydrogels are very attractive for drug delivery into subcutaneous tissue. Due to their soft consistency and high content of water are hydrogels highly biocompatible. With suitable polymer combination and their content modulation hydrogels that are liquid at room temperature but gel at body temperature can be prepared.

Within the graduation thesis 8 hydrogel formulations were prepared. The formulations contained different combinations and contents of poloxamers P407, P188 and HPMC. We performed tests with rheometer Physica MCR301 to characterize the properties of hydrogel formulations. The syringeability of formulations through a hypodermic needle was also evaluated.

The mechanical spectra (the frequency dependence of storage and loss moduli) were recorded and it was found that all the formulations were viscous liquids at refrigerator temperature but possessed gel-like properties at body temperature. The temperature dependence of the moduli (gelation process) was investigated in the temperature range from 10 to 40°C and from 40 to 10°C. The results of the tests were then compared to previously determined gelation temperatures (T_{gel}). For most formulations predefined T_{gel} were confirmed, however in some formulations T_{gel} could not be determined. Furthermore the sol to gel transition time and the influence of additives P188 and HPMC on the gelation time were investigated. Thus time dependence of viscosity at increasing temperature was performed. It was found that increasing the content of P407 had no effect on the gelation time. Adding HPMC decreased the gelation time of the hydrogel, whereas adding and increasing the content of P188 increased the time of gelation.

In the end syringeability of hydrogels through 25G and 21G needles was assessed (syringeability and injectability test). In order to explain the results of the latter test, shear rate dependence of viscosity was performed. It was found that increasing the content of polymers deteriorated the syringeability through 25G needle. The addition of HPMC deteriorated the syringeability as well. The rheological assessment could not explain the syringeability deviation in the formulation containing a combination of P407 and P188 in higher proportions.

Keywords: thermoreversible hydrogels, viscoelasticity, syringeability

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

- CMC: Critical micelle concentration; kritična micelska koncentracija
- CMT: Critical micelle temperature; kritična micelska temperatura
- γ : Strižna deformacija, shear strain
- $\dot{\gamma}$: Strižna hitrost, shear rate
- δ : Fazni zamik
- G^* : Kompleksni modul
- G' : Elastični modul, storage modulus
- G'' : Viskozni modul, loss modulus
- η : Viskoznost
- η^* : Kompleksna viskoznost
- η' : Dinamična viskoznost
- LCST: Lower critical solution temperature; spodnja kritična temperatura raztopine
- LVO: Linearni viskoelastični odziv
- ν : Frekvenca
- ω : Kotna hitrost (tudi kot frekvenca oscilacije)
- PEO: polietilen oksid
- PPO: polipropilen oksid
- T_{gel} : Temperatura geliranja; temperatura prehoda vodne raztopine polimera iz tekočega v poltrdno stanje.
- τ : Strižna napetost, shear stress
- UCST: Upper critical solution temperature; zgornja kritična temperatura raztopine
- UPPT: Upper phase-transition temperature; temperatura zgornjega faznega prehoda

1. UVOD

1.1. HIDROGELI

Hidrofilni geli ali hidrogeli ponujajo možnost ciljne dostave in prirejenega sproščanja raznovrstnih učinkovin, med drugim tudi peptidnih učinkovin in velikih proteinskih molekul in so tako predmet številnih raziskav. Uvrščamo jih med poltrdne farmacevtske oblike, katerih hidrofilna podlaga je gelirana z ustreznimi tvorilci gelov, ki jih izberemo glede na želene lastnosti hidrogela (nabrekanje, biološka razgradljivost, sproščanje učinkovine, itd.) (1, 2).

Po strukturi so hidrogeli tridimenzionalne polimerne mreže, ki so sposobne sprejeti večje količine vode ali bioloških tekočin. Visoka vsebnost vode in mehka konsistenca sta lastnosti, zaradi katerih so hidrogeli podobni mehkim tkivom v telesu, kar močno prispeva k njihovi biokompatibilnosti in razširi področje uporabe hidrogelov (2).

1.1.1. STRUKTURA HIDROGELSKE MREŽE

Polimerne mreže hidrogelov vsebujejo hidrofilne skupine (domene), ki so v vodnem okolju hidratirane in oblikujejo strukturo hidrogela. Te hidrofilne domene so povezane s premreževalci, ki preprečujejo raztapljanje polimernih verig v vodnem okolju (3). S stopnjo premreženosti lahko vplivamo na mehanske lastnosti hidrogelov. Če stopnjo premreženosti povišamo, dobimo čvrstejše gele. Visoka stopnja premreženosti pomeni tudi večjo krhkost strukture. Tako je pomembno, da imamo neko optimalno stopnjo premreženosti, s katero dobimo relativno čvrste in obenem elastične hidrokele. Hidrogeli z visoko stopnjo premreženosti imajo tudi manjši obseg nabrekanja, saj premrežitve ovirajo gibanje polimernih verig, zato je stopnja nabrekanja nižja, struktura pa bolj zbita (2).

1.1.2. NAČINI PREMREŽEVANJA HIDROGELOV

Premreževalci v hidrogelski strukturi so lahko kemijski, ko govorimo o kemijsko premreženih hidrogelih ali fizikalni pri fizikalno premreženih hidrogelih (3).

Kemijsko premreženi hidrogeli

Pri kemijsko premreženih hidrogelih so med polimernimi verigami prisotne kovalentne vezi, kar lahko dosežemo na različne načine:

- Premreževanje z radikalsko polimerizacijo

- Premreževanje s kemijskimi reakcijami med funkcionalnimi skupinami s komplementarno reaktivnostjo
- Premreževanje z uporabo encimov (3)

Radikalna polimerizacija pa tudi mnoge kemijske reakcije med funkcionalnimi skupinami zahtevajo pripravo hidrogelov pred samo aplikacijo. Te metode pogosto vključujejo uporabo toksičnih reagentov, ki jih je potrebno odstraniti pred vnosom hidrogela v telo, ali pa že samo izvajanje metode predstavlja tveganje za organizem, kot je to pri metodah, kjer premreževanje dosežemo s pomočjo sevanja. Tako pred-pripravljene hidrogele največkrat apliciramo v obliki vsadkov, saj imajo ti hidrogeli definirane dimenzije in pogosto tudi visoko elastičnost. To izključuje možnost iztisa skozi iglo (4). Raziskave so tako usmerjene v pripravo hidrogelov, ki bi nastajali spontano pod fiziološkimi pogoji (5).

In situ nastajajoči kemijsko premreženi hidrogeli

In situ nastajajoče kovalentne povezave lahko tvorimo preko encimsko kataliziranih reakcij ali z reakcijami med predhodno derivatiziranimi polimernimi verigami (5).

Premreževanje s temi metodami poteka v fizioloških pogojih in v veliki meri se izognemo uporabi toksičnih reagentov. Kljub temu pa so funkcionalizirani polimeri v manjši meri še vedno citotoksični. Problem *in situ* nastajajočih kemijsko premreženih hidrogelov je tudi njihova aplikacija, ki zahteva uporabo predeljenih ali dvojnih brizg. Te brizge ločujejo posamezne komponente reakcijske zmesi pred aplikacijo. Ker premreževanje poteka med aplikacijo (ko komponente pridejo v stik), je potrebno apliciranje izvesti dovolj hitro, da nastajajoči hidrogel ne zamaši igle (4).

Fizikalno premreženi hidrogeli

S pripravo fizikalno premreženih hidrogelov se popolnoma izognemo uporabi toksičnih reagentov. Tu so fizikalne interakcije tiste, ki preprečujejo raztapljanje polimernih verig v okoliški tekočini in s tem razpad hidrogelske mreže (3). Kljub prisotnim fizikalnim interakcijam pa je raztapljanje polimernih verig vseeno prisotno, tako da pogosto pride do porušjenja strukture v relativno kratkem času (včasih že v nekaj urah) v primerjavi s kovalentno premreženimi hidrogeli (4).

Fizikalne interakcije lahko nastopijo kot odziv na dejavnike iz okolja. Za pripravo hidrogelov se pogosto uporablja naslednji tip interakcij:

- Hidrofobne interakcije

Polimere, ki poleg hidrofilnih vsebujejo tudi hidrofobne domene, v vodnem okolju lahko reverzibilno premrežujemo v odvisnosti od temperature (termoreverzibilni hidrogeli). Sprememba temperature pri teh polimernih raztopinah pomeni zmanjšanje topnosti polimerov zaradi zmanjšanja hidrofilnosti verig. Pri spremembi temperature raztopine hidrogela pride namreč do termodinamskih sprememb v sistemu, zaradi katerih postanejo interakcije vodnih molekul med seboj prevladujoče, medtem ko so interakcije voda-polimer neugodne. Pride do tako imenovanega hidrofobnega efekta, ko se začnejo hidrofobne domene polimera združevati in na ta način zmanjševati hidrofobno površino, ki je v stiku z vodo. Ta agregacija hidrofobnih domen povzroči oblikovanje hidrogelske mreže. Polimerne raztopine preidejo v poltrdno stanje, kar pogosto imenujemo tudi sol-gel prehod.

Do prehoda lahko pride zaradi zvišanja ali padca temperature okolja. Tako imajo hidrogeli lahko spodnjo kritično temperaturo raztopine (LCST) ali zgornjo kritično temperaturo raztopine (UCST). Za aplikacijo in geliranje *in situ* so zelo primerni hidrogeli z LCST, saj so pod to mejno temperaturo topni v vodi. Ko temperatura naraste nad vrednost LCST, postanejo močno hidrofobni, kar vodi do tvorbe gela. Z uravnavanjem deleža polimerov v raztopini in kombiniranjem le-teh lahko dobimo hidrogele, ki so pri sobni temperaturi v obliki raztopin, po aplikaciji pa gelirajo pri telesni temperaturi (6).

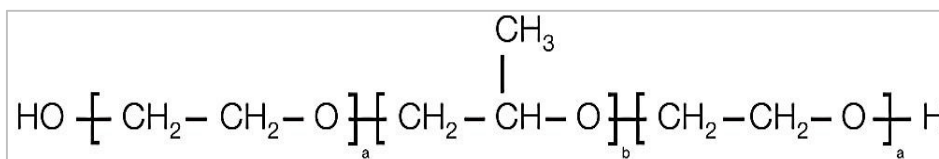
Poleg hidrofobnih interakcij lahko izkoriščamo tudi druge fizikalne interakcije:

- ionske interakcije pri polimerih, ki vsebujejo kisle ali bazične stranske skupine (2),
- vodikove vezi med različnimi naravnimi polimeri (4)
- stereoselektivne interakcije (stereokompleksiranje) med komplementarnimi enantiomeri, vezanimi na polimerne verige (5).

1.2. POLOKSAMERI

Poloksameri so sintezni triblokkopolimeri tipa A-B-A. Verigo polimera sestavljajo polietilenoksidne enote (A) ali na kratko PEO ter polipropilenoksidne enote (B) ali PPO (slika 1) (7). Sinteza poloksamernih verig poteka preko polimerizacije etilenoksidnih in propilenoksidnih monomerov v prisotnosti natrijevega ali kalijevega hidroksida (8). S spreminjanjem števila PEO in PPO enot, dobimo poloksamere različnih molekulskih mas z

različnimi lastnostmi (7). Na tržišču so tako dostopni v obliki tekočin (razred L – liquid), past (razred P – paste) in kosmičev (razred F – flakes) (6).



Slika 1: Kemijska struktura poloksamerov, (a) predstavlja število PEO enot, (b) pa število PPO enot (9).

Poloksameri imajo amfifilno strukturo, ki je posledica hidrofilnosti PEO enot in hidrofobnosti PPO enot. V vodi se dobro raztapljajo. Predpostavlja se, da je njihova vodotopnost posledica vodikovih vezi med etrskim kisikom PEO bloka in vodnimi molekulami. Vodne raztopine poloksamerov lahko tvorijo micelle, pri čemer je proces micelizacije močno odvisen od koncentracije polimera in temperature. Ravno združevanje v micelle je možna obrazložitev mehanizma geliranja vodnih raztopin poloksamerov (6, 9).

Pod določeno temperaturo, imenovano kritična micelska temperatura (CMT), so tako PEO kot tudi PPO bloki hidratirani in PPO je relativno topen v vodi. Z naraščanjem temperature pa postanejo PPO verige čedalje slabše topne v vodi (6). Molekule začnejo agregirati in ko temperatura doseže CMT, agregati tvorijo micelle, zato da zmanjšajo izpostavljeno površino hidrofobnih blokov proti vodi. Nastali miceli imajo hidrofobno jedro, sestavljeno iz PPO verig (7). Micelizacija poteče tudi pri koncentriranju vodnih raztopin poloksamerov. Nad neko mejno koncentracijo, imenovano kritična micelska koncentracija (CMC), začnejo polimerne molekule v raztopini agregirati in oblikovati micelle (9).

Na CMC in CMT vplivajo fizikalno-kemijske lastnosti kopolimerov, kot so sestava blokov (razmerje PEO/PPO), molekulska masa in dolžina posameznih blokov. Poloksameri z višjo molekulsko maso gelirajo pri nižjih koncentracijah in so zato prva izbira za pripravo poloksamernih hidrogelov. Ugotovljeno je bilo, da se CMC in CMT znižata s povečanjem deleža PPO, medtem ko ima spreminjanje deleža PEO (ob konstantnem številu PPO enot) le manjši vpliv na ti dve količini (7, 9).

1.2.1. POLOKSAMER P407 (F127) PEO₁₀₁ – PPO₅₆ – PEO₁₀₁

P407 se v prvi vrsti uporablja kot zgoščevalec in tvorilo gelov, a so možnosti uporabe tega poloksamera velike. Tako je P407 v uporabi tudi kot koemulgator in kot snov za izboljševanje konsistence krem ter tekočih emulzij. Prav tako ga lahko uporabljamo tudi za

izboljšanje topnosti nekaterih učinkovin in eteričnih olj ali pa za stabilizacijo suspenzij za lokalno aplikacijo (9).

Vodne raztopine P407 izkazujejo termoreverzibilno geliranje v koncentracijskem območju med 16 in 30% m/m. Raztopine so v tekočem stanju, kadar so ohlajene (4-5°C) ali kadar jih segrejemo nad temperaturo 70°C (9). Prehod vodnih raztopin iz gel v sol pri segrevanju je lastnost nekaterih koncentriranih raztopin poloksamerov (tudi P407) in se zgodi pri tako imenovani temperaturi zgornjega faznega prehoda (UPPT). Možen razlog za ta prehod so zmanjšane intermicelarne interakcije, kar je posledica sprememb v strukturi micelov zaradi delne dehidracije PEO blokov (10).

1.2.2. POLOKSAMER P188 (F68) $\text{PEO}_{80} - \text{PPO}_{27} - \text{PEO}_{80}$

V farmacevtskih pripravkih ima P188 vlogo močljivca, emulgatorja ali sredstva za izboljšanje topnosti učinkovin, ki so slabo topne v vodi. Vodne raztopine pri koncentracijah nad 20% m/m izkazujejo termoreverzibilne lastnosti geliranja (9).

Dodatek P188 k vodnim raztopinam P407 zviša temperaturo geliranja (T_{gel}) hidrogelov. T_{gel} se viša s povečevanjem deleža P188 do največ 10% m/m. Z nadaljnjim povečevanjem deleža P188 T_{gel} ponovno pada (11).

1.2.3. GLAVNE POMANJKLJIVOSTI POLOKSAMERNIH HIDROGELOV

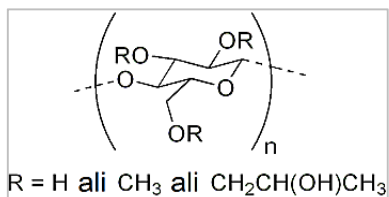
Ena izmed glavnih slabosti je slaba mehanska trdnost poloksamernih hidrogelov, zaradi česar imajo ti hidrogeli omejeno obstojnost in hiter čas razpadanja (6).

Poloksamerni hidrogeli v splošnem veljajo za netoksične, a so bili opaženi sistemski stranski učinki, kot sta pojav hiperholesterolemije in hipertrigliceridemije (12). Problematična je tudi biološka nerazgradljivost poloksamerov. Z namenom izboljšanja teh omejujočih lastnosti potekajo raziskave, pri katerih so poloksamere modificirali do te mere, da imajo hidrogeli višjo viskoznost, daljši čas obstojnosti in so biorazgradljivi (10).

1.3. HIDROKSIPROPIL METILCELULOZA (HPMC)

HPMC je derivat celuloze, naravnega polisaharida, netopnega v vodi. S substituiranjem hidroksilnih skupin v celulozi z bolj hidrofobnimi, kot sta metilna in hidroksipropilna skupina, postane ta naravni polimer vodotopen (slika 2) (6). Glukozne enote v celulozi so lahko zaetrene na največ treh hidroksi skupinah in glede na delež prisotnih metilnih in

hidroksipropilnih zaetritev poznamo več različnih tipov HPMC. V vseh tipih je metiloksi substituenta prevladujoča (13).



Slika 2: Struktura hidroksipropil metilceluloze (povzeto po 14).

HPMC se uporablja kot vezivo v farmacevtskih pripravkih ter kot zgoščevalo vodnih in nevodnih sistemov. HPMC ima tudi emulgatorske lastnosti, saj stabilizira emulzije z znižanjem površinske in medfazne napetosti ter z zgostitvijo vodne faze. V suspenzijah se uporablja za nadzor posedanja delcev. V koloidnih sistemih pa preprečuje koalesciranje kapljic in aglomeriranje delcev (13).

Topnost HPMC v vodi je omejena le z viskoznostjo nastalih raztopin. V primeru raztapljanja v hladni vodi je potrebno temeljito dispergiranje, da preprečimo nastanek grudic (13). Na viskoznost vodnih raztopin vpliva molekulska masa posameznega tipa HPMC. Viskoznost je posledica hidratacije polimernih verig. Hidratacija v prvi vrsti poteka preko vodikovih vezi med kisikovimi atomi v etrskih vezeh in molekulami vode. Posledično se verige polimera raztegnejo in pri tem nastanejo razmeroma odprte naključno zavite vijačnice. Taka hidratirana vijačnica se nadalje povezuje z vodnimi molekulami preko vodikovih vezi. Pri tem se vodne molekule ujamejo v vijačnice. Poleg interakcij z vodo je prisotno tudi prepletanje naključno zavitih vijačnic med seboj. Vsi ti dejavniki prispevajo k večji efektivni velikosti in povečani strižni odpornosti na pretakanje (15).

Vodne raztopine HPMC izkazujejo termoreverzibilno sol-gel prehajanje. Temperatura faznega prehoda je odvisna od tipa HPMC in je nižja pri polimerih z manj hidroksipropilnimi substituenti. Geliranje je v osnovi posledica hidrofobnih interakcij med molekulami, ki vsebujejo metoksi substituenti. Pri nizkih temperaturah so makromolekule hidratirane in razen preprostega prepletanja skorajda ni prisotnih drugih polimer-polimer interakcij. Ko začne temperatura naraščati, polimerne molekule postopoma izgubijo hidratacijsko vodo. To se pokaže kot padec relativne viskoznosti pri sobni temperaturi. Sčasoma, ko pride do zadostne, vendar ne popolne dehidracije polimernih verig, se začnejo

vzpostavljati polimer-polimer asociacije. Premreževanje polimernih verig se izrazi kot oster dvig viskoznosti raztopine (16).

1.4. MOŽNOSTI APLIKACIJE HIDROGELOV

Hidrogeli so primerni za izdelavo sistemov s kontroliranim sproščanjem, bioadhezivnih sistemov ali sistemov za ciljano dostavo zdravilnih učinkovin. Poleg klasične lokalne uporabe se hidrogeli čedalje pogosteje uporabljajo tudi za naslednje načine dostave učinkovin (2):

- Peroralna dostava zdravilnih učinkovin:

Na ta način dosežemo štiri glavna mesta prebavne poti, to so ustna votlina, želodec, tanko črevo, kolon. S hidrogeli lahko dostavimo učinkovine za zdravljenje lokalnih obolenj ali učinkovine s sistemskim delovanjem (2).

- Rektalna dostava zdravilnih učinkovin:

Poleg zdravljenja lokalnih obolenj lahko na ta način dosežemo tudi sistemsko delovanje, zlasti tistih učinkovin, ki so podvržene obsežnemu metabolizmu prvega prehoda (2).

- Dostava zdravilnih učinkovin v oko:

V primerjavi s klasičnimi kapljicami imajo hidrogeli večjo odpornost proti očesnim zaščitnim mehanizmom in se tako dlje časa zadržijo na površini očesa. Na ta način povečajo biološko uporabnost učinkovine ter zmanjšajo pogostnost odmerjanja (2).

- Transdermalna dostava zdravilnih učinkovin:

Na ta način lahko dosežemo sistemsko dostavo učinkovin. V primerjavi s klasičnimi mazili in obliži so hidrogeli zaradi visoke vsebnosti vode bolj ugodni za nanos na kožo (2).

- Subkutana dostava zdravilnih učinkovin:

Podkožje (subcutis) je plast kože, ki se nahaja pod vrhnjico (epidermis) in usnjico (dermis). Sestavljeno je iz večjih in manjših skupkov maščevja (lobuli), ki so sestavljeni iz maščobnih celic, žil in živcev. V tem predelu kože se nahajajo tudi sekretorni deli znojnic in lasni mešički. Glavni nalogi podkožja sta mehanska zaščita globlje ležečih tkiv ter toplotna izolacija (17).

Podkožna aplikacija je primeren način dostave zdravil, kadar želimo doseči podaljšano delovanje učinkovin z razmeroma hitrim nastopom učinka (po 15 do 30 minutah). Prav tako je ta način aplikacije primeren, kadar želimo v telo vnesti občutljive učinkovine, katerih peroralna dostava ne bi prinesla želenega učinka. Ker je apliciranje zdravil v podkožje razmeroma neboleče, je subkutana aplikacija primerna za pogosto uporabo (na primer vbrizgavanje insulina pri sladkornih bolnikih). Vendar pa je pri pogostem apliciranju v podkožje pomembno stalno sistematično menjavanje mest vbrizgavanja, saj lahko v nasprotnem primeru pride do atrofije maščobnega tkiva. Količina apliciranega zdravila v podkožje je omejena na 1 do 2 mL, saj je to področje zaradi oživčenosti bolj občutljivo v primerjavi z žilami ali mišicami (18).

Hidrogeli so primerni za dostavo učinkovin v podkožje zaradi svoje biokompatibilnosti in minimalnega mehanskega draženja, kar je posledica njihove visoke vsebnosti vode ter mehke, elastične strukture (2).

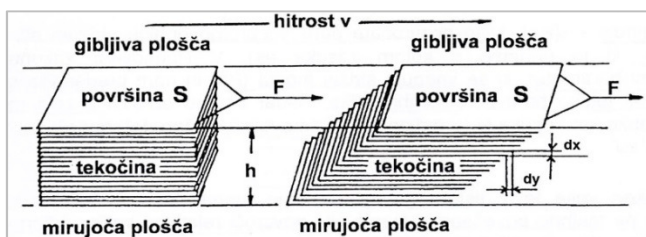
1.5. VREDNOTENJE HIDROGELOV

Kot poltrdne farmacevtske oblike hidrogeli izkazujejo viskoelastično obnašanje, zato se reološke metode pogosto uporabljajo za preučevanje lastnosti hidrogelov (1).

1.5.1. OSNOVE REOLOGIJE

Reologija je veda, ki preučuje pretočne lastnosti snovi in obnašanje materialov pod vplivom strižnih sil. Preiskujemo lahko poltrdne sisteme (geli, paste, mazila, kreme) pa tudi prave kapljevine (voda, olje) in različne trdne materiale (19).

Preprost model, ki opisuje osnovne reološke spremenljivke je model dveh enakih vzporednih plošč, med katerima se nahaja preiskovana tekočina (slika 3). Na zgornjo ploščo delujemo s strižno silo F , ki deluje v smeri ploskve. Zaradi delovanja sile se začne zgornja plošča premikati s hitrostjo v , spodnja pa ves čas miruje. Pri tem nastane plastni laminarni tok. Posamezne tekočinske plasti se premikajo z različnimi hitrostmi. Dve sosednji plasti tekočine sta razmaknjeni za dx prečno glede na smer gibanja in se gibljeta relativno druga na drugo. Razlika v hitrosti njunega gibanja je enaka dy (19).



Slika 3: Reološki model za opis osnovnih spremenljivk (povzeto po 19).

Opredelimo naslednje spremenljivke:

- Strižna deformacija: γ [%], shear strain

Strižna deformacija opisuje premik plasti (dy) zaradi delovanja strižne sile, definiramo pa jo lahko tudi kot tangens kota deformacije telesa (enačba 1) (19, 20).

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

Enačba 1

O prožni, oziroma elastični deformaciji govorimo, kadar se gradniki snovi po prenehanju delovanja sile vrnejo v prvotni položaj. To pomeni, da je med obremenitvijo prišlo do raztega kemijskih vezi, a le v tolikšni meri, da se vezi niso pretrgale. V nasprotnem primeru, ko med obremenitvijo pride do prekinitvev kemijskih vezi in preurejanja gradnikov, je bila deformacija trajna, oziroma plastična (19).

- Strižna napetost: τ [N/m^2 , Pa], shear stress

Strižna napetost je opredeljena kot kvocient med strižno silo F , ki je vzporedna s ploskvijo in površino S (19).

- Strižna hitrost: $\dot{\gamma}$ [s^{-1}], shear rate

Strižna hitrost je sprememba hitrosti v smeri y , pravokotno na smer dx . Opredeljena je kot kvocient med dv in razmikom med sosednjima tekočinskima plastema. Pri poltrdnih in trdnih sistemih predstavlja tudi spremembo deformacije s časom (enačba 2) (19, 20).

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dx} = \frac{dy}{dt}$$

Enačba 2

- Dinamična viskoznost: η [Pas]

Dinamična viskoznost je lastnost snovi, da se upira pretakanju. Predstavlja sorazmernostni faktor med strižno napetostjo in strižno hitrostjo (enačba 3) (19).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Enačba 3

1.5.2. REOLOŠKI SISTEMI

Glede na to, kako se snov odzove na obremenitev poznamo več različnih reoloških sistemov. Grafično jih prikažemo z reogrami (strižna napetost v odvisnosti od strižne hitrosti) ali viskoznostnimi diagrami (viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti) (19).

Newtonski ali idealni sistemi

Viskoznost v teh sistemih ni odvisna od smeri, jakosti in časa delovanja strižnih sil. Spreminja se zgolj s tlakom in temperaturo (slika 4). V to skupino uvrščamo idealizirane tekočine, kot so voda, plini, raztopine topljencev z nizko molekulsko maso, olje in druge.

Nenewtonski ali realni sistemi

Pri teh sistemih je viskoznost odvisna od smeri in jakosti delovanja strižne sile, pri nekaterih pa tudi od časa delovanja. To so realne kapljevine, poltrdne ter trdne snovi. Ti sistemi lahko izkazujejo newtonsko obnašanje v določenem območju strižnih hitrosti ali temperaturnem območju, kar opazimo kot konstantno viskoznost sistema pri teh pogojih (19, 20). Glede na odziv med obremenitvijo nenewtonske sisteme delimo na:

- Psevdoplastični sistemi

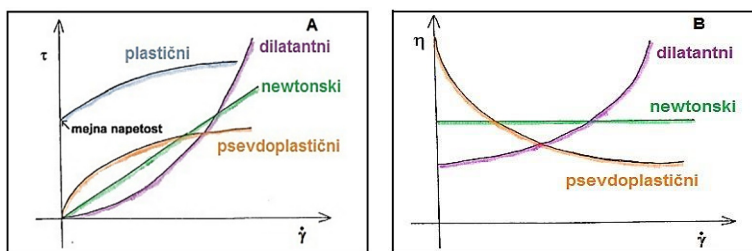
Viskoznost teh sistemov z naraščanjem strižne obremenitve upada (slika 4). Možna razlaga za tak odziv je urejanje strukturnih elementov v smeri toka med obremenitvijo (19).

- Dilatantni sistemi

Pri teh sistemih viskoznost med obremenitvijo narašča (slika 4). Tako obnašanje lahko opazimo v visoko koncentriranih suspenzijah, kjer ni dovolj tekoče faze, da bi se delci lahko orientirali v smeri toka (20).

- Plastični sistemi

Ti sistemi imajo dovolj čvrsto notranjo strukturo, da se do neke mere lahko upirajo strižnemu toku. Ko zunanja strižna sila preseže notranjo silo strukture, snov steče (slika 4). Značilnost teh sistemov je mejna strižna napetost ali plastična napetost, ki je opredeljena kot strižna napetost pri strižni hitrosti: $\dot{\gamma} = 0$ (20).



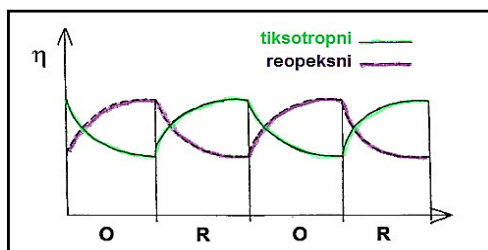
Slika 4: Reogrami (A) in viskoznostne krivulje (B) reoloških sistemov (povzeto po 19).

- Tiksotropni sistemi

To so časovno odvisni sistemi. Podobno kot pri psevdoplastičnih sistemih viskoznost snovi med obremenitvijo upada (slika 5). Tudi tu se notranja struktura ureja v smeri strižnega toka, vendar pa ta proces urejanja poteka dovolj dolgo, da ga med meritvijo lahko časovno zaznamo. Po končani obremenitvi ali po določenem času mirovanja se lahko sistem povrne v prvotno stanje, v tem primeru govorimo o reverzibilnem tiksotropnem obnašanju. Kadar pa viskoznost ne doseže vrednosti pred obremenitvijo tudi po daljšem času mirovanja, govorimo o ireverzibilnem tiksotropnem obnašanju (20).

- Reopeksni sistemi

Strukturiranost teh sistemov se med obremenitvijo večja in viskoznost narašča z jakostjo in časom delovanja strižnih sil (slika 5) (19, 20).



Slika 5: Časovna odvisnost viskoznosti v fazi obremenitve (O) in fazi razbremenitve (R) za tiksotropne in reopeksne sisteme (povzeto po 19).

- Viskoelastični sistemi

Večina realnih kapljev in izkazuje glede na strižne pogoje tako viskozne kot tudi elastične lastnosti. Elastičnost in viskoznost lahko opredelimo s pomočjo dveh modelov:

Elastičnost

Ponazorimo jo z odzivom vzmeti, ki predstavlja idealno trdno telo. Ko vzmet obremenimo s strižno silo, se le-ta deformira elastično. Energija, ki je potrebna za deformacijo vzmeti, se akumulira. Po končani obremenitvi se telo povrne v prvotno stanje. Povezavo med

strižno napetostjo in deformacijo opisuje Hookov zakon. Premosorazmernostni faktor predstavlja strižni modul G [Pa] (enačba 4) (20).

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

Enačba 4

Viskoznost

Odziv dušilke predstavlja idealno newtonsko tekočino. Pri obremenitvi se ireverzibilno deformira. Energija, potrebna za deformacijo, se namreč po prenehanju delovanja strižnih sil izgubi v obliki toplote. Odziv dušilke opisuje Newtonov zakon (enačba 5) (20).

$$\tau = \eta \cdot \frac{dy}{dt} = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Enačba 5

Pri realnih tekočinah opazimo lastnosti obeh modelov. Med obremenitvijo se del energije izgublja v obliki toplote, del energije pa se shrani in omogoči delno povrnitev v prvotno stanje po prenehanju delovanja strižnih sil (19, 20).

1.5.3. DOLOČANJE VISKOELASTIČNIH LASTNOSTI SNOVI

Glede na lastnosti, ki jih želimo določiti in kompleksnost preiskovanega sistema lahko izbiramo med različnimi viskozimetri in reometri. Viskoznost tekočin lahko določamo relativno glede na tekočino z znano viskoznostjo ali pa merimo absolutno dinamično viskoznost preiskovane tekočine. Za zahtevnejše meritve imamo na voljo različne tipe rotacijskih viskozimetrov in reometrov (19).

Rotacijski reometri

Glede na način meritve poznamo dva tipa rotacijskih reometrov. Skupna lastnost vseh pa je, da je merilni sistem sestavljen iz dveh delov. En del merilnega sistema rotira, drugi pa miruje. Geometrije merilnih sistemov so pri obeh tipih reometrov enake. Glede na to, kateri del merilnega sistema miruje in kateri rotira, delimo reometre na Searle sisteme in Couette sisteme. Pri Searle tipu zgornja plošča (stožec, notranji valj) rotira, spodnja plošča (zunanji valj) pa miruje. Ravno nasprotno je pri Couette tipu reometrov, kjer zgornji del (notranji valj) miruje, spodnji del (zunanji valj) pa rotira (20).

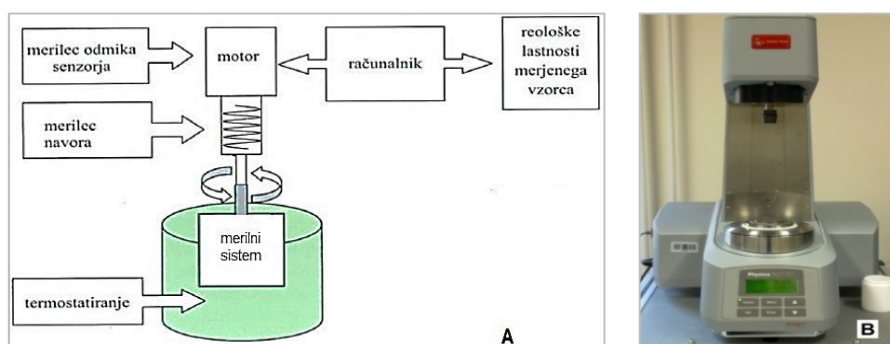
Rotacijski reometri z nastavljivo strižno hitrostjo

Pri tem tipu reometrov je strižna hitrost neodvisna spremenljivka, merimo pa strižno napetost. Strižna napetost je sorazmerna izmerjenemu navoru, ki je posledica upora tekočine proti strigu.

Ti reometri se večinoma uporabljajo za meritve pri srednjih in visokih strižnih hitrostih. Izvajamo lahko teste pod stacionarnimi (kontinuiranimi) strižnimi pogoji ali pri dinamičnih (oscilatornih) strižnih pogojih (20).

Rotacijski reometri z nastavljivo strižno napetostjo

Ti reometri so novejši od reometrov z nastavljivo strižno hitrostjo in omogočajo natančnejše meritve. Nastavljiva količina je strižna napetost, merimo pa deformacijo ali strižno hitrost. Glede na zgradbo in delovanje so ti reometri drugačni. Rotirajoči del merilnega sistema poganja motor s predhodno nastavljenim navorom. Ko na vzorec med senzorskim sistemom delujemo s strižno napetostjo, odpor vzorca povzroči, da se rotor odmakne od začetne lege ali pa se vrti z določeno kotno hitrostjo. Odmik ali hitrost rotorja beležimo z digitalnim optičnim kodirnikom in na osnovi poznanih geometrijskih lastnosti merilnega sistema lahko izračunamo strižno deformacijo ali hitrost (slika 6) (20).



Slika 6: Shema rotacijskega reometra z nastavljivo strižno napetostjo (A) (povzeto po 20), reometer Physica MCR301 kot primer reometra z nastavljivo strižno napetostjo (B).

Reometri z nastavljivo strižno napetostjo so Searle tip reometrov, saj so vneseni navor in posledični deformacija ali hitrost rotiranja senzorja na isti pogonski osi. Izvajamo lahko meritve pod stacionarnimi ali dinamičnimi strižnimi pogoji. Ti reometri omogočajo tudi tako imenovane teste lezenja in obnove (creep and recovery test). Prednost tega tipa reometrov je, da lahko meritve opravljamo tudi pri zelo nizkih deformacijah v zelo širokem območju strižnih napetosti. To pomeni, da lahko določamo lastnosti snovi pri nedestruktivnih strižnih pogojih (20).

Merilni (senzorski) sistemi

Merilni sistem izberemo glede na lastnosti preiskovanega vzorca (viskoznost, strukturiranost, prisotnost in velikost delcev, itd.) ter glede na pogoje merjenja (destruktivni ali nedestruktivni strižni pogoji, temperaturno območje meritev, itd.). vsi

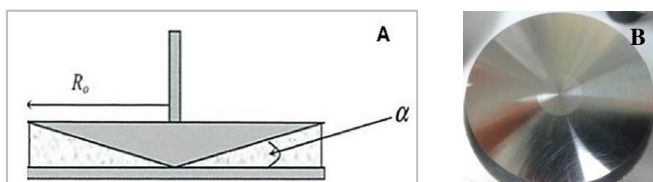
merilni sistemi morajo zagotavljati pogoje enostavnega strižnega toka (laminarni tok), da lahko definiramo reološko obnašanje preiskovanega vzorca (20).

Merilni sistem koaksialnih valjev

Merilni sistem sestavljata zunanji in notranji valj z znanimi geometrijskimi lastnostmi. Med meritvijo se vzorec nahaja v reži med valjema in eden od obeh valjev rotira, drugi pa miruje. Če je reža med valjema dovolj majhna, se lahko dobro približamo enostavnemu strižnemu toku. Zaradi notranjega trenja tekočine (viskoznost) pride do navora na notranji valj. Iz navora lahko izračunamo strižno napetost. Navor lahko merimo ali pa nastavimo pred meritvijo (20).

Merilni sistem stožec-plošča

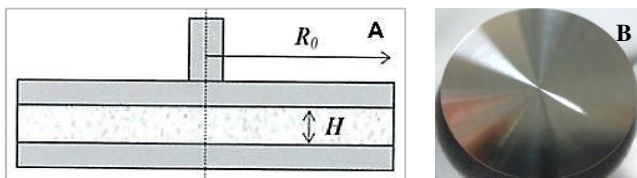
Glavne prednosti tega merilnega sistema so enostavno nanašanje vzorca, enostavno čiščenje po meritvi in izvajanje meritev z majhnimi količinami vzorca. Med meritvijo se vzorec nahaja v reži med stožcem in ploščo. Pri majhnih kotih stožca sta tako strižna hitrost kot strižna napetost po celotni reži enaka in neodvisna od polmera stožca. Strižno napetost na stožec lahko izračunamo s pomočjo merjenega ali predhodno nastavljenega navora in geometrijskih lastnosti stožca (slika 7) (20).



Slika 7: Geometrija merilnega sistema stožec-plošča (A) (20), stožec za reometer Physica MCR301(B).

Merilni sistem vzporednih plošč

Merilni sistem je sestavljen iz dveh vzporednih plošč, katerih medsebojno oddaljenost lahko poljubno nastavimo (slika 8). Strižna hitrost se spreminja po polmeru plošče, s tem pa tudi po celotnem vzorcu. Zato pri meritvah s tem merilnim sistemom iz navora na ploščo in geometrijskih lastnosti izračunamo strižno napetost ter strižno hitrost na obodu plošče. Z nastavljanjem razdalje med ploščama lahko določamo različna območja strižnih hitrosti ali deformacij. Ta merilni sistem se pogosto uporablja za visoko viskozne tekočine in poltrdne snovi pa tudi za koncentrirane suspenzije z večjimi delci, ki jih z drugima dvema merilnima sistemoma ne bi mogli ovrednotiti (20).



Slika 8: Geometrija merilnega sistema vzporednih plošč (A) (20), zgornja plošča za reometer Physica MCR301 (B).

Osnove merjenja pri oscilatornih strižnih pogojih

Pri oscilatornih pogojih se strižna deformacija sinusno spreminja z določeno frekvenco in amplitudo. Nastavljena strižna deformacija med meritvijo predstavlja vsiljeno nihanje, na katerega se preiskovana snov odzove s periodičnim nihanjem strižne napetosti z določeno frekvenco (kotno hitrostjo) ω in amplitudo γ_a . Če odziv snovi ponazorimo z odzivom vzmeti in dušilke, potem velja, da je časovno spreminjanje strižne napetosti vzmeti v fazi z vsiljeno deformacijo (γ_a) (enačba 6). Časovno spreminjanje strižne napetosti dušilke pa je za vsiljeno deformacijo zamaknjeno za 90° (enačba 7) (20).

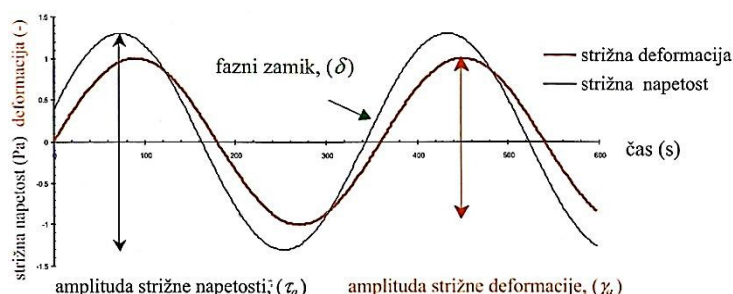
Elastični odziv vzmeti: $\tau(t) = G \cdot \gamma_a \cdot \sin(\omega \cdot t)$ Enačba 6

Viskozni odziv dušilke: $\tau(t) = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_a \cdot \cos(\omega \cdot t)$ Enačba 7

Odziv realne viskoelastične snovi je sestavljen tako iz elastične kot tudi viskozne komponente. To pomeni, da se snov na vsiljeno sinusno nihanje strižne deformacije odzove z nihanjem strižne napetosti, ki ima enako frekvenco ω , različno amplitudo τ_a in je zamaknjena za določen fazni zamik φ (enačbi 8 in 9) (20). Zaradi izgub energije (viskozni odziv) je amplituda strižne napetosti (τ_a) nižja od vsiljene deformacije (γ_a) (slika 9) (21).

Odziv realne viskoelastične snovi: $\gamma(t) = \gamma_a \cdot \sin(\omega \cdot t)$ Enačba 8

$\tau(t) = \tau_a \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta)$ Enačba 9



Slika 9: Spreminjanje strižne napetosti realne viskoelastične snovi pri oscilatornih pogojih (20).

Celoten odpor snovi na vsiljeno nihanje strižne deformacije je opredeljen s kompleksnim modulom G^* (enačba 10) (20).

$$|G^*| = \frac{\tau_a}{\gamma_a} \quad \text{Enačba 10}$$

Kompleksni modul sestavljata dinamični komponenti, ki predstavljata elastični in viskozni doprinos k viskoelastičnemu odzivu:

- Elastični modul: G' [Pa], storage modulus

Je modul akumulacije energije, ki je v fazi z vsiljeno strižno deformacijo (enačba 11) (20).

$$G' = \left(\frac{\tau_a}{\gamma_a} \right) \cdot \cos \delta \quad \text{Enačba 11}$$

Viskozni modul: G'' [Pa], loss modulus

To je modul energetskih izgub in ni v fazi z vsiljeno strižno deformacijo (enačba 12) (20).

$$G'' = \left(\frac{\tau_a}{\gamma_a} \right) \cdot \sin \delta \quad \text{Enačba 12}$$

Fazni zamik δ pri viskoelastičnih snoveh zavzema vrednosti med 0° in 90° ter ga lahko zapišemo kot razmerje obeh modulov (enačba 13) (20).

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Enačba 13}$$

Celoten odpor snovi proti toku predstavlja kompleksna viskoznost (η^*). Tudi kompleksna viskoznost je sestavljena iz dveh komponent, pri čemer pa običajno z meritvami določamo le dinamično viskoznost (η') (enačba 14) (20).

$$\eta' = \left(\frac{\tau_a}{\gamma_a \cdot \omega} \right) \cdot \sin \delta = \frac{G''}{\omega} \quad \text{Enačba 14}$$

Metode določanja viskoelastičnih lastnosti snovi

- Območje linearnega viskoelastičnega odziva (LVO)

Te meritve običajno izvajamo na začetku, pred ostalimi meritvami. V tej fazi določimo do katere kritične vrednosti so dinamične količine (moduli, viskoznost) neodvisne od amplitude strižne deformacije ali napetosti. Nad kritično vrednostjo strižne deformacije ali napetosti notranja struktura vzorca popusti, kar se odraža kot padanje vrednosti dinamičnih količin in naraščanje faznega zamika z nadaljnjim povečevanjem vrednosti amplitud strižne deformacije ali napetosti. Kritični amplitudi strižne deformacije in napetosti sta

odvisni od frekvence oscilacije. Zato nadaljnje meritve izvajamo pri nižjih amplitudah, kot je meja linearnega viskoelastičnega odziva pri dani frekvenci (20).

- Frekvenčna odvisnost (mehanski spekter)

Pri teh meritvah spreminjamo frekvenco oscilacije (kotno hitrost) ω znotraj območja linearnosti. S spreminjanjem frekvence spreminjamo hitrost vnesene strižne deformacije. Na ta način dobimo frekvenčno odvisnost dinamičnih količin, ki predstavljajo odziv snovi na časovni potek eksperimenta. Z mehanskimi spektri si lahko pomagamo pri ugotavljanju tipa mikrostrukture, stopnje geliranja, premreženosti polimerov, ipd (20). V primeru polimernih vodnih raztopin, ki tvorijo hidrogelne so značilna tri področja mehanskega spektra glede na frekvenčno odvisnost elastičnega in viskoznega modula:

Viskozno področje: v tem področju prevladuje viskozno obnašanje snovi ($G'' > G'$), pri čemer viskozni modul narašča linearno z naraščanjem frekvence, elastični modul pa narašča s kvadratom frekvence.

Prehodno področje: frekvenčna odvisnost ni več enaka kot v viskoznem področju. Elastični modul narašča hitreje kot viskozni in z nadaljnjim naraščanjem frekvence pride do prehoda iz $G'' > G'$ v $G' > G''$.

Elastično področje: v tem področju prevladuje elastično obnašanje ($G' > G''$). Frekvenčna odvisnost modulov je majhna. Opazimo plato pri elastičnem modulu, medtem ko vrednosti viskoznega modula rahlo upadajo (20).

- Proces geliranja termoreverzibilnih hidrogelov

Temperaturna odvisnost – temperatura geliranja

Zelo pogoste so meritve, pri katerih spremljamo reološke spremenljivke (dinamična modula, viskoznost, fazni zamik) v odvisnosti od temperature.

L. Mayol in sodelavci so izvedli meritve temperaturne odvisnosti na vodnih raztopinah poloksamerov (kombinacije P407 in P188). Meritve so izvedli z rotacijskim reometrom Bohlin GEMINI pri konstantni frekvenci oscilacije $\omega = 0,01 \text{ Hz}$ in amplitudi strižne deformacije znotraj območja linearnosti. Med meritvijo je temperatura naraščala iz začetnih 10°C na končnih 40°C . V tem temperaturnem intervalu so spremljali spremembe v vrednostih elastičnega in viskoznega modula. Temperaturo geliranja (T_{gel}) so določili kot

tisto temperaturo, pri kateri sta bili vrednosti obeh modulov enaki ($G'=G''$), oziroma na diagramu temperaturne odvisnosti kot presečišče krivulj obeh modulov (22).

Veyries in sodelavci so vrednotili proces geliranja različnih raztopin P407. Meritve so izvedli z reometrom z nastavljivo strižno napetostjo Carri-Med CSL 100 in merilnim sistemom stožec-plošča. Najprej so pri konstantni strižni napetosti $\tau=40\text{Pa}$ temperaturo dvigali iz 10°C na 20°C s konstantno hitrostjo $0,67^\circ\text{C}/\text{min}$. Pri tem so spremljali vrednosti strižne hitrosti. Temperaturo prehoda sol-gel ($T_{\text{sol-gel}}$) so opredelili kot tisto temperaturo, kjer je strižna hitrost $\dot{\gamma}<10^{-2}\text{s}^{-1}$. Nato so izvedli meritve, kjer so pri konstantni strižni napetosti $\tau=59,68\text{Pa}$ in frekvenci oscilacije $\omega=1\text{Hz}$ v območju linearnosti temperaturo spuščali iz 30°C na 10°C s konstantno hitrostjo $1,18^\circ\text{C}/\text{min}$. V tem primeru so spremljali vrednosti viskoznega in elastičnega modula ter določili temperaturo prehoda gel-sol ($T_{\text{gel-sol}}$) kot tisto temperaturo, pri kateri pride do nenadne spremembe krivulje elastičnega modula. Dobljene $T_{\text{sol-gel}}$ in $T_{\text{gel-sol}}$ so nato primerjali med seboj in ugotovili, da sta temperaturi obeh prehodov zelo podobni (23).

Čas geliranja

Pri termoreverzibilnih hidrogelih za parenteralno aplikacijo je tudi čas geliranja pomemben dejavnik. Hidrogeli z relativno kratkim časom geliranja, bi namreč izkazovali boljši nadzor nad sproščanjem učinkovine iz pripravka (24).

Xuan in sodelavci so določali čas geliranja različnim formulacijam vodnih raztopin poloksamerov P407 in P188. Meritve so izvajali z reometrom Physica in senzorskim sistemom vzporednih plošč pri konstantni temperaturi $36,5^\circ\text{C}$. Spremljali so viskoznost vzorcev v odvisnosti od časa. Čas geliranja so opredelili kot čas, potreben da hidrogel doseže prazno viskoznost $\eta=4000\text{mPas}$ pri temperaturi $36,5^\circ\text{C}$. To je predstavljalo tisti čas, ki ga hidrogel potrebuje za prehod iz tekočega v poltrdno stanje (sol→gel). Prazno vrednost viskoznosti so predhodno določili z meritvijo, pri kateri so vzorce nagibali pri $T=36,5^\circ\text{C}$ in opazovali, kdaj vzorci prenehajo teči (24).

S temi metodami v glavnem vrednotimo obnašanje hidrogelov pred in po aplikaciji, ne izvemo pa dosti o tem, kaj se dogaja med samo aplikacijo, kar je zlasti pomembno pri hidrogelih za parenteralno apliciranje. Tako se za vrednotenje lastnosti hidrogelov med apliciranjem z injekcijsko iglo pogosto uporabljajo tako imenovani »syringeability« in »injectability« testi (pogosto tudi samo kot »syringeability« test) (25).

- Lastnosti hidrogelov med aplikacijo

Sposobnost iztisa skozi iglo («Syringeability in injectability» testi)

»Syringeability« je opredeljena kot sposobnost povleka preiskovane tekočine skozi hipodermalno iglo v brizgo. Po drugi strani je »injectability« opredeljena kot iztis (ali aplikacija) preiskovane tekočine skozi iglo, pritrjeno na brizgo (25).

Ur-Rehman in sodelavci so sposobnost povleka in iztisa skozi iglo preverjali poloksamernim P407 hidrogelom. V ta namen so različne formulacije hidrogelov povlekli in iztiskali skozi igle različnih velikosti, in sicer 27G (0,4x19mm) in 23G (0,6x25mm). V brizgo so vsakokrat povlekli 1mL ohlajene formulacije. Glede na sposobnost iztisa iz brizge so hidrokele razdelili v različne skupine. Med iztisom so opazovali, ali hidrogel skozi 27G iglo pride kot prosto tekoča disperzija, kot curek koaguliranega gela, v obliki gelskih kapljic ali pa iztis skozi to velikost igle ni možen, je pa formulacija lahko iztisljiva skozi 23G iglo (skupine 1-4) (25).

Reološko vrednotenje aplikacije hidrogelov skozi injekcijsko iglo (tokovni cikel)

Simões in sodelavci so z reološkimi meritvami želeli posnemati pogoje *in vivo* aplikacije skozi iglo. Formulacije poloksamernih P407-ciklodekstrinskih hidrogelov so podvrgli tokovnemu ciklu z reometrom Rheolyst AR-1000N, tako da so najprej 10 minut pri temperaturi 20°C (temperatura med apliciranjem) zviševali strižno hitrost od 0,05s⁻¹ do 10s⁻¹. Nato so temperaturo dvignili na 37°C (telesna temperatura, po aplikaciji) in vzorec temperirali 10 s. V zadnjem koraku so pri temperaturi 37°C v 40 minutah strižno hitrost zniževali iz 10s⁻¹ na 0,05s⁻¹. Opazovana količina tekom meritve je bila viskoznost v odvisnosti od strižne hitrosti. Ugotovili so, da se viskoznost formulacij z naraščajočo strižno hitrostjo močno zniža. Obnovitev viskoznosti vzorcev med tretjim korakom pa je bila zelo različna. Opazili so boljšo regeneracijo tistih hidrogelov, ki so imeli višje koncentracije P407 (26).

2. NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo reološko ovrednotili različne formulacije hidrogelov in preverili njihovo sposobnost apliciranja s hipodermalno iglo.

V prvem delu bomo na ledeni kopeli pripravili hidrokele z različnimi vsebnostmi in kombinacijami poloksamerov P407 in P188 ter HPMC. Medij za vse formulacije bo prečiščena voda, v katero bomo postopoma dodajali različne količine in kombinacije polimerov. Tako pripravljenim hidrogelom bomo nato z reometrom Physica MCR 301 s pomočjo oscilacijske viskometrije določili linearno območje spreminjanja elastičnega in viskoznega modula pri različnih temperaturah, frekvenčno odvisnost obeh modulov pri različnih temperaturah in temperaturo geliranja. Temperaturo bomo najprej zviševali iz 10°C na 40°C in opredelili T_{gel} kot temperaturni interval, pri katerem pride do presečišča krivulj obeh modulov. Nato bomo temperaturo zniževali iz 40°C na 10°C in opredelili $T_{gel-sol}$ kot tisto temperaturo, pri kateri začnejo vrednosti elastičnega modula močno upadati.

V drugem delu bomo za vsak posamezni hidrogel najprej vizualno ocenili trajanje procesa geliranja (čas geliranja), tako da bomo ohlajen hidrogel prenesli v plastične epruvete s pokrovčkom in jih postavili v termostatisirano vodno kopel s temperaturo 37°C. Epruvete bomo periodično vzeli iz kopeli in preverjali, ali je formulacija še tekoča ali je že gelirala. Z reometrom Physica MCR 301 in uporabo rotacijske viskometrije bomo nato merili čas geliranja hidrogelov, tako da bomo na odrejenem časovnem intervalu merili viskoznost v odvisnosti od naraščajoče temperature. Čas geliranja bo tako opredeljen kot razlika tistih dveh časov, kjer viskoznost še ne narašča in kjer doseže določeno prazno vrednost.

V tretjem delu bomo preizkušali sposobnost iztisa hidrogelov skozi iglo (»syringeability and injectability test«). Za ta namen bomo hidrokele, ohlajene na temperaturo hladilnika, iztiskali skozi dve velikosti injekcijskih igel in vizualno ocenili, kako iztisljivo so formulacije. Vsako formulacijo bomo na ta način opredelili kot lahko iztisljivo, iztisljivo, težko iztisljivo ali zelo težko iztisljivo. Rezultate preizkusa iztisljivosti hidrogelov bomo na koncu skušali obrazložiti tudi reološko, tako da bomo z reometrom Physica MCR 301 spremljali, kako se spreminja viskoznost z naraščajočo strižno hitrostjo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI IN NAPRAVE

Materiali za izdelavo hidrogelov

- Lutrol® F127 (Poloxamer 407), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
- Lutrol® F68 (Poloxamer 188), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
- Methocel K4M Premium (HPMC), Colorcon, Velika Britanija
- Prečiščena voda

Materiali za preverjanje iztisljivosti hidrogelov

- Brizga BD discardit II LS 2mL/0,1mL, Medias international d.o.o., Ljubljana, Slovenija
- Injekcijska igla Luer-lock tip 21G (0,8x38mm), TIK d.o.o., Kobarid, Slovenija
- Injekcijska igla Luer-lock tip 25G (0,5x16mm), TIK d.o.o., Kobarid, Slovenija

Naprave

- Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- Magnetno mešalo, IKA-WERKE RO 15 power, Staufen, Nemčija
- Reometer, Physica MCR 301, Anton Paar, GmbH, Gradec, Avstrija
- Vodna kopel, WB13, Kambič laboratorijska oprema d.o.o., Semič, Slovenija

3.2. POSTOPKI IN METODE

3.2.1. IZDELAVA HIDROGELOV

Pripravili smo 8 formulacij hidrogelov, ki so vsebovale različne deleže P407, kombinacijo P407 in P188, oziroma P407 in HPMC ali kombinacijo vseh treh polimerov. Vodilo pri oblikovanju formulacij je bilo dobiti hidrogele s čim višjo viskoznostjo zaradi subkutane aplikacije. Osnovni polimer za formulacije je bil tako P407 (dve formulaciji z različnima deležema P407). Ostale formulacije so vsebovale še dodatke, ki vplivajo na viskoznost

in/ali temperaturo geliranja hidrogelov (P188 in HPMC), v različnih kombinacijah in deležih (preglednica I). Medij za izdelavo vseh hidrogelov je bila prečiščena voda.

Na začetku smo natehtali ustrezne količine P407, P188 in HPMC (preglednica I). Na magnetno mešalo smo postavili čaše z ledom, vanje pa smo nato postavili manjše, 50mL čaše, ki so vsebovale 20mL prečiščene vode in magnet. Led smo tekom izdelave hidrogelov stalno preverjali in po potrebi zamenjali, saj smo tako zagotavljali, da so bile raztopine polimerov celoten čas priprave ohlajene na temperaturo nižjo od sobne in niso gelirale. Polimere smo ob konstantnem mešanju postopoma dodajali v prečiščeno vodo. Pred ponovnim dodajanjem smo počakali, da se je predhodno dodana količina popolnoma raztopila. Vrstni red dodajanja polimerov je bil, z ozirom na sestavo, vedno najprej P407, nato P188 in na koncu HPMC. Ko smo dodali vse potrebne količine polimerov, smo raztopine pustili mešati, dokler ni bilo več prisotnih vidnih delcev. Čaše smo nato prekrili s parafilmom in postavili v hladilnik, kjer smo jih pustili čez noč, da so se pene polegale.

Po enakem postopku smo pripravili tudi dve testni formulaciji, od katerih je bila prva (Pol-1) vzeta po članku, po katerem smo delali meritve in je služila kot kontrola za meritve in prilagajanje parametrov meritev (22). Drugo formulacijo pa smo kasneje izdelali z namenom dodatnega preverjanja in prilagajanja parametrov meritev temperaturne odvisnosti. Izbor polimerov in njihova vsebnost za slednjo formulacijo je temeljil na osnovi poznanih podatkov za temperaturo geliranja iz člankov (preglednica I) (27, 28).

Preglednica I: Formulacije hidrogelov in potrebne količine polimerov za izdelavo.

Formulacija (vsebnost v % m/m)	Potrebna količina polimera		
	P407	P188	HPMC
1. P407 18%	4,39g	/	/
2. P407 18% + HPMC 1%	4,44g	/	0,25g
3. P407 18% + P188 1%	4,44g	0,25g	/
4. P407 18% + P188 1% + HPMC 1%	4,50g	0,25g	0,25g
5. P407 21%	5,32g	/	/
6. P407 21% + HPMC 1%	5,38g	/	0,26g
7. P407 21% + P188 5%	5,68g	1,36g	/
8. P407 21% + P188 5% + HPMC 1%	5,75g	1,37g	0,27g
Testni formulaciji	P407	P188	HPMC
9. P407 15% + P188 10% (Pol-1)	4,00g	2,67g	/
10. P407 20%	5,00g	/	/

3.2.2. VREDNOTENJE HIDROGELOV

I. sklop meritev: Oscilacijska viskometrija

Večji del vrednotenja hidrogelov je temeljil na opazovanju elastičnega in viskoznega modula z uporabo metod oscilacijske viskometrije. Na ta način smo določili območje linearnosti pri različnih temperaturah, odvisnost od frekvence pri različnih temperaturah in temperaturno odvisnost obeh modulov. Pri meritvah frekvenčne in temperaturne odvisnosti smo se opirali na delo L. Mayol in sodelavcev. Izdelali smo tudi eno od formulacij, na katerih so izvajali meritve (Pol-1), z namenom kontrole meritev naših formulacij (22). Meritve smo izvajali z reometrom Physica MCR 301 in merilnim sistemom stožec-plošča: CP50-2 (premer: 50mm, kot: 2°). Za upravljanje aparature in beleženje podatkov smo uporabljali programsko opremo Rheoplus v.3.40.

Vsi vzorci so bili ohlajeni na temperaturo hladilnika, pred meritvami pa smo hidrokele tudi premešali na mešalu. Vzorec smo nanegli na ploščo, ohlajeno ali segreto na želeno temperaturo, spustili stožec na položaj za merjenje, obrisali odvečno količino vzorca in počakali 5 minut pred samim začetkom merjenja, da se je celoten vzorec ohladil ali segrel na delovno (ali začetno) temperaturo.

Določitev območja linearnosti elastičnega in viskoznega modula

Za določitev linearnega območja smo spreminjali strižno deformacijo (γ) pri konstantni frekvenci (ν) in temperaturi (T) ter spremljali vrednosti elastičnega in viskoznega modula. Meritve smo izvajali pri štirih različnih temperaturah (T_1 - T_4). Temperature smo izbrali z ozirom na kasnejše meritve (predvsem meritve frekvenčne odvisnosti). Tako smo opravili meritve pri temperaturi hladilnika (T_1), sobni temperaturi (T_2 in T_3) ter telesni temperaturi (T_4).

Iz dobljenih podatkov smo nato za vsako temperaturo narisali graf elastičnega in viskoznega modula v odvisnosti od strižne deformacije, tako da smo imeli za vsako temperaturo vseh 8 formulacij in testno formulacijo Pol-1 združene na enem grafu. Iz grafov smo odčitali najprimernejšo deformacijo, pri kateri sta se elastični in viskozni modul spreminjala linearno (se pravi, da nista naraščala, upadala ali se prekrizala), gledano pri vseh formulacijah in temperaturah hkrati. To deformacijo smo nato uporabili pri nadaljnjih meritvah iz tega sklopa.

Pogoji meritev:

- Strižna deformacija: $\gamma=0,01-100\%$
- Frekvenca: $\nu=1\text{Hz}$
- Temperatura: $T_1=8^\circ\text{C}$, $T_2=20^\circ\text{C}$, $T_3=25^\circ\text{C}$, $T_4=35^\circ\text{C}$

Za nadaljnje meritve smo se odločili za vrednost strižne deformacije: $\gamma=0,2\%$.

Frekvenčna odvisnost elastičnega in viskoznega modula (mehanski spekter)

V tem delu meritev smo merili vrednosti elastičnega in viskoznega modula pri spreminjajoči se frekvenci in konstantni temperaturi ter strižni deformaciji. Vsako formulacijo smo pomerili pri treh različnih temperaturah (T_1-T_3). Meritve smo izvedli tudi za testno formulacijo Pol-1.

Z dobljenimi podatki smo za vsako formulacijo narisali graf elastičnega in viskoznega modula v odvisnosti od frekvence za vse tri temperature skupaj. Grafi so nam nato služili za ugotavljanje viskoelastičnih lastnosti formulacij pri različnih temperaturah.

Pogoji meritev:

- Frekvenca: $\nu=0,1-10\text{Hz}$
- Strižna deformacija: $\gamma=0,2\%$
- Temperatura: $T_1=8^\circ\text{C}$, $T_2=20^\circ\text{C}$, $T_3=37^\circ\text{C}$

Temperaturna odvisnost elastičnega in viskoznega modula v intervalu $10-40^\circ\text{C}$ (proces geliranja)

V okviru teh meritev smo merili vrednosti elastičnega in viskoznega modula pri konstantni frekvenci in strižni deformaciji ter naraščajoči temperaturi. S tem smo spremljali celoten proces geliranja. Vzorce smo nanašali na ploščo, ohlajeno na 10°C , nato pa smo s konstantno hitrostjo temperaturo dvigali, tako da je hidrogel tekom meritve geliral. Hitrost segrevanja plošče smo določili z ozirom na to, da pri prehitrem segrevanju ne bi dobili prave temperature geliranja in, po drugi strani, da nižja kot je hitrost segrevanja, daljši je čas trajanja meritve. Meritve smo najprej izvedli na naših 8 hidrogelih.

Pogoji meritev:

- Temperatura: $T=10-40^\circ\text{C}$
- Hitrost segrevanja: $0,015^\circ\text{C/s}$ ($0,90^\circ\text{C/min}$)
- Strižna deformacija: $\gamma=0,2\%$

- Frekvenca: $\nu=0,1\text{Hz}$

Iz dobljenih podatkov smo nato želeli določiti temperaturo geliranja, opredeljeno kot tista temperatura, pri kateri se krivulji elastičnega in viskoznega modula sekata (22). V našem primeru smo temperaturo geliranja podali kot temperaturni interval, ki ga omejujeta zadnja temperatura, pri kateri je vrednost viskoznega modula večja od vrednosti elastičnega modula ($G' < G''$) in temperatura, od katere dalje je elastični modul višji kot viskozni modul ($G' > G''$). Temperaturne intervale za presečišče krivulj obeh modulov pri naših formulacijah smo primerjali s temperaturami geliranja, ki jih je v svojem diplomskem delu določila diplomantka Sonja Balažek po metodi, ki so jo uporabili tudi Choi in sodelavci (29). Temperature geliranja so podane kot povprečje treh meritev (30). Po primerjavi podatkov smo pod enakimi pogoji izvedli meritev še za testno formulacijo Pol-1.

Podatke o intervalu za temperaturo geliranja testne formulacije Pol-1 smo primerjali s podatki o temperaturi geliranja, ki so jo določili L. Mayol in sodelavci (22). Iz primerjave smo ugotovili, da je pogoje meritev potrebno prilagoditi.

Prilagajanje pogojev meritev temperature odvisnosti

Prvi parameter, ki smo ga spreminjali je bila frekvenca. Zaradi neujemanja temperaturnega intervala za temperaturo geliranja, dobljenega pri frekvenci $0,1\text{Hz}$ in podatkov o temperaturi geliranja za testno formulacijo Pol-1 smo opravili meritev še enkrat, tokrat pri frekvenci $0,01\text{Hz}$ ($T=10-40^{\circ}\text{C}$, $0,015^{\circ}\text{C/s}$, $\gamma=0,2\%$).

Po ponovni primerjavi temperaturnega intervala, dobljenega pri frekvenci $0,01\text{Hz}$ s poznano temperaturo geliranja testne formulacije Pol-1 smo frekvenco za nadaljnje meritve znižali z $0,1\text{Hz}$ na $0,01\text{Hz}$.

Poleg vpliva frekvence na meritve nas je zanimalo tudi kakšen je vpliv strižne deformacije na vrednosti elastičnega in viskoznega modula. Tako smo na drugi testni formulaciji P407 20% (m/m) izvedli meritve temperature odvisnosti pri treh različnih vrednostih strižne deformacije. Vse tri vrednosti so bile izbrane znotraj linearnega območja. Za vse tri primere smo nato določili interval za temperaturo geliranja in ga primerjali s podatki o temperaturi geliranja iz literature (27, 28).

Pogoji meritev:

- Temperatura: $T=10-40^{\circ}\text{C}$

- Hitrost segrevanja: $0,015^{\circ}\text{C/s}$
- Frekvenca: $\nu=0,01\text{Hz}$
- Strižna deformacija: $\gamma_1=0,1\%$, $\gamma_2=0,2\%$, $\gamma_3=0,5\%$

Iz dobljenih podatkov smo se odločili, da za nadaljnje meritve lahko pustimo strižno deformacijo enako kot na začetku.

Končni pogoji meritev temperaturne odvisnosti:

- Temperatura: $T=10\text{-}40^{\circ}\text{C}$
- Hitrost segrevanja: $0,015^{\circ}\text{C/s}$
- Frekvenca: $\nu=0,01\text{Hz}$
- Strižna deformacija: $\gamma=0,2\%$

Pri teh pogojih smo opravili meritve na naših 8 formulacijah in za vse določili temperaturni interval, na katerem pride do presečišča krivulj elastičnega in viskoznega modula. Te podatke smo nato primerjali s temperaturami geliranja teh hidrogelov, ki jih je v svojem diplomskem delu določila diplomantka Sonja Balažek. Temperature geliranja so podane kot povprečne vrednosti treh meritev (30).

Temperaturna odvisnost v intervalu $40\text{-}10^{\circ}\text{C}$

Podobno kot Veyries in sodelavci smo hoteli določiti temperaturo prehoda iz poltrdnega v tekoče stanje ($T_{\text{gel-sol}}$) (23). Za ta namen smo temperaturo zniževali iz 40°C na 10°C , ostale pogoje meritev pa smo pustili enake kot pri predhodnih meritvah temperaturne odvisnosti. Spremljali smo vrednosti elastičnega in viskoznega modula ter opredelili $T_{\text{gel-sol}}$ kot temperaturo, od katere dalje začnejo vrednosti elastičnega modula močneje upadati. Dobljene temperaturne prehode smo primerjali z dobljenimi presečišči krivulj ali predhodno določenimi temperaturami geliranja, ki jih je določila diplomantka Sonja Balažek (30).

Pogoji meritev:

- Temperatura: $T=40\text{-}10^{\circ}\text{C}$
- Hitrost ohlajanja: $0,015^{\circ}\text{C/s}$
- Frekvenca: $\nu=0,01\text{Hz}$
- Strižna deformacija: $\gamma=0,2\%$

II. Sklop meritev: Ocena časa geliranja

Poleg same temperature geliranja nas je zanimalo tudi v kolikšnem času hidrogeli preidejo iz tekočega stanja v trdno. V ta namen smo zato izvedli dva preizkusa. Pri prvem preizkusu smo čas geliranja ocenjevali vizualno in s tem dobili osnovne informacije o tem, kako dolgo posamezna formulacija gelira. Te informacije so nam služile pri zbiru pogojev v drugem preizkusu, kjer smo čas geliranja ocenjevali preko meritev z reometrom.

Vizualna ocena časa geliranja

Preizkus smo izvedli z 1mL ohlajenega in predhodno na mešalu premešanega hidrogela. Za vsako formulacijo smo imeli 3 paralele. V plastične epruvete s pokrovčkom smo s kapalko odmerili 1mL hidrogela, epruvete zaprli in jih postavili v termostatirano vodno kopel s temperaturo 37°C. Takoj, ko so bile epruvete v kopeli, smo vključili stoparico in nato preverjali ali je formulacija v epruvetah še tekoča ali je že gelirala. Dokler smo zaznali premikanje vsebine ob nagibanju epruvete, je bila formulacija še v tekočem stanju, ko premikanja vsebine ob nagibanju epruvet ni bilo več, je bila formulacija v trdnem stanju in smo preizkus zaključili. Preverjanje je bilo načrtovano po 20s, 40s, 60s, 90s, 120s, /.../ od začetka merjenja časa.

Ocena časa geliranja – rotacijska viskometrija

Čas geliranja je opredeljen kot čas, potreben da formulacija doseže prazno viskoznost $\eta=4000\text{mPas}$ pri temperaturi 36,5°C (24). V osnovi smo izvedli merjenje viskoznosti v odvisnosti od časa pri konstantni temperaturi in strižni hitrosti. Zaradi lastnosti naših hidrogelov vzorcev nismo mogli nanašati na ploščo, segreto na 36,5°C (v našem primeru 37°C), saj od nanosa vzorca do pričetka merjenja že preteče nekaj časa in bi tako vzorci popolnoma gelirali še pred samim začetkom meritve. Vzorce smo zato nanašali na ploščo ohlajeno na 10°C in s tem zagotovili, da se proces geliranja ni začel takoj z nanosom vzorca. Zaradi omejitev našega reometra pri hitrosti segrevanja smo pri nastavljanju pogojev določili časovni interval, v katerem naj se meritev izvede ter želeno (delovno) temperaturo 37°C. Pri teh pogojih je reometer tekom odrejenega časa meritve samodejno segrel ploščo z 10°C na končnih 37°C.

Meritve smo izvajali z reometrom Physica MCR 301, merilni sistem pa je bil plošča-plošča PP50 (d=50mm). Razdaljo med ploščama smo nastavili tako, da smo delali z 1mL vzorca, tako kot pri vizualni oceni časa.

Pogoji meritev:

- Razdalja med ploščama: $h=0,509\text{mm}$
- Čas trajanja meritve: $t=100\text{s}$
- Strižna hitrost: $\dot{\gamma}=10\text{s}^{-1}$
- Temperatura: $T=10-37^{\circ}\text{C}$

Najprej smo narisali graf temperature v odvisnosti od časa, da bi videli, kako se je spreminjala temperatura tekom meritve.

Iz dobljenih podatkov smo narisali tudi graf viskoznosti v odvisnosti od časa za vse formulacije skupaj. S pomočjo grafa smo nato za vsako formulacijo določili dve točki, ki sta nam služili za izračun časa geliranja. Prva točka (t_1) je bila čas, pri katerem viskoznost še ne začne naraščati, druga točka (t_2) pa je bila čas, pri katerem je bila viskoznost najbližje vrednosti 4000mPas . Čas geliranja smo izračunali kot razliko časov: $\Delta t=t_2-t_1$. Dobljeni časi geliranja vseh osmih formulacij so nam služili za primerjavo formulacij med seboj.

III. Sklop meritev: Preizkušanje sposobnosti parenteralne aplikacije hidrogelov

Ker so bile naše formulacije hidrogelov oblikovane z namenom podkožne aplikacije nas je zanimalo, kako se hidrogeli obnašajo med iztiskanjem skozi hipodermalno iglo. V ta namen smo izvedli dva preizkusa. Pri prvem preizkusu smo hidrokele dejansko iztiskali skozi brizgo in iglo, v drugem preizkusu pa smo želeli z uporabo reoloških metod podkrepiti dobljene rezultate prvega preizkusa.

Preizkus iztisljivosti skozi iglo (»Syringeability and injectability test«)

Preizkus smo izvajali z vzorci, ki so bili predhodno premešani na mešalu in ohlajeni na temperaturo hladilnika. V 2mL brizgo smo povlekli 1mL vzorca, obrisali rob in namestili iglo za podkožno aplikacijo. Uporabljali smo dve različni velikosti igel: 25G ($0,5\times 16\text{mm}$) in 21G ($0,8\times 38\text{mm}$) (slika 10). Skozi 21G iglo smo formulacijo iztiskali le v primeru, ko je bilo iztiskanje skozi 25G iglo težavno ter pri formulaciji P407 18% kot preizkus ene in druge velikosti igle. Za boljšo orientacijo smo skozi ožjo iglo (25G) iztisnili tudi prečiščeno vodo in jo ocenili kot zelo lahko iztisljivo. Glede na to smo formulacije po iztiskanju ovrednotili kot:

- Lahko iztisljivo
- Iztisljivo

- Težko iztisljivo
- Zelo težko iztisljivo



Slika 10: Uporabljeni hipodermalni igli. Oranžna barva – 25G, zelena barva – 21G.

Vpliv strižne hitrosti na viskoznost hidrogelov

Pri tem preizkusu smo spremljali viskoznost hidrogelov ob naraščajoči strižni hitrosti in konstantni temperaturi. Na ta način smo želeli ponazoriti pogoje iztiskanja hidrogelov skozi iglo (26). Meritve smo izvajali z reometrom Physica MCR 301 in merilnim sistemom stožec-plošča CP50-2 (premer: 50mm, kot: 2°). Za vsako formulacijo smo izvedli meritev pri temperaturi hladilnika (8°C) in sobni temperaturi 25°C.

Pogoji meritev:

- Strižna hitrost: $\dot{\gamma}=0,05-20\text{s}^{-1}$
- Temperatura: $T_1=8^\circ\text{C}$, $T_2=25^\circ\text{C}$

Iz dobljenih podatkov smo narisali graf viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti pri konstantni temperaturi. Vse formulacije, merjene pri isti temperaturi, smo združili na enem grafu. Z dobljenima grafoma smo nato želeli obrazložiti rezultate predhodnega preizkusa, ko smo hidrokele iztiskali skozi iglo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

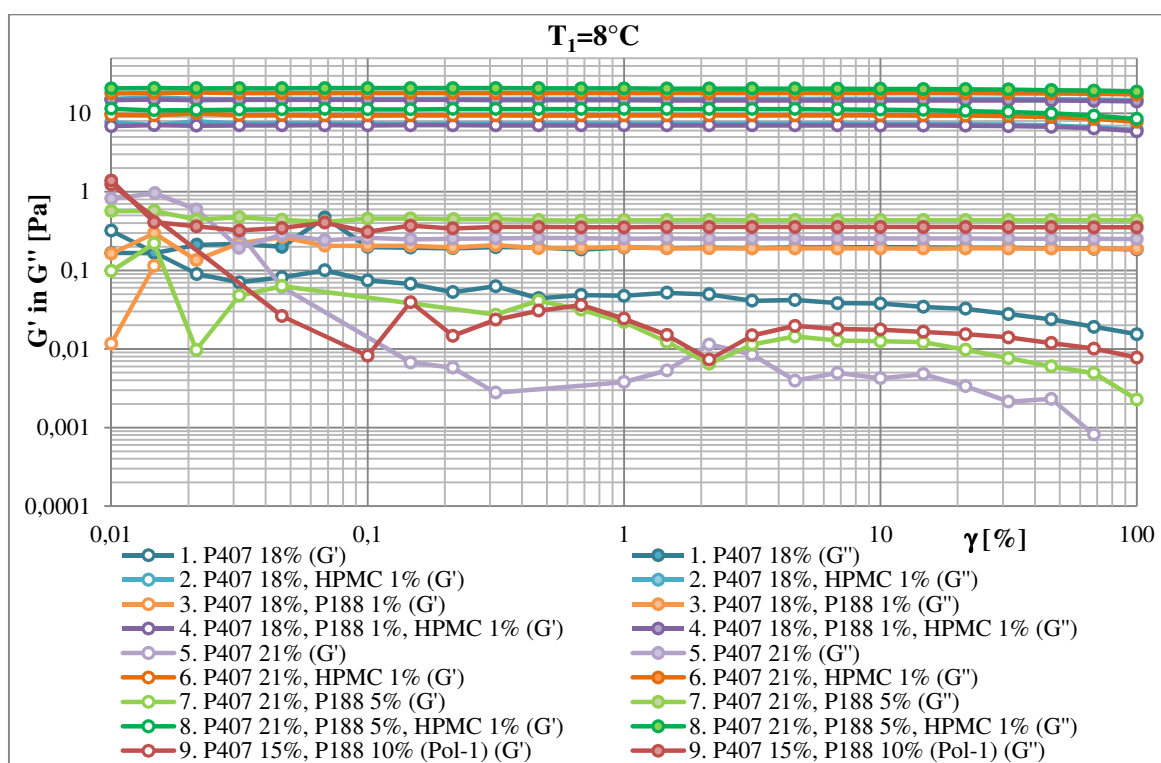
VREDNOTENJE HIDROGELOV

4.1. I. SKLOP MERITEV: OSCILACIJSKA VISKOMETRIJA

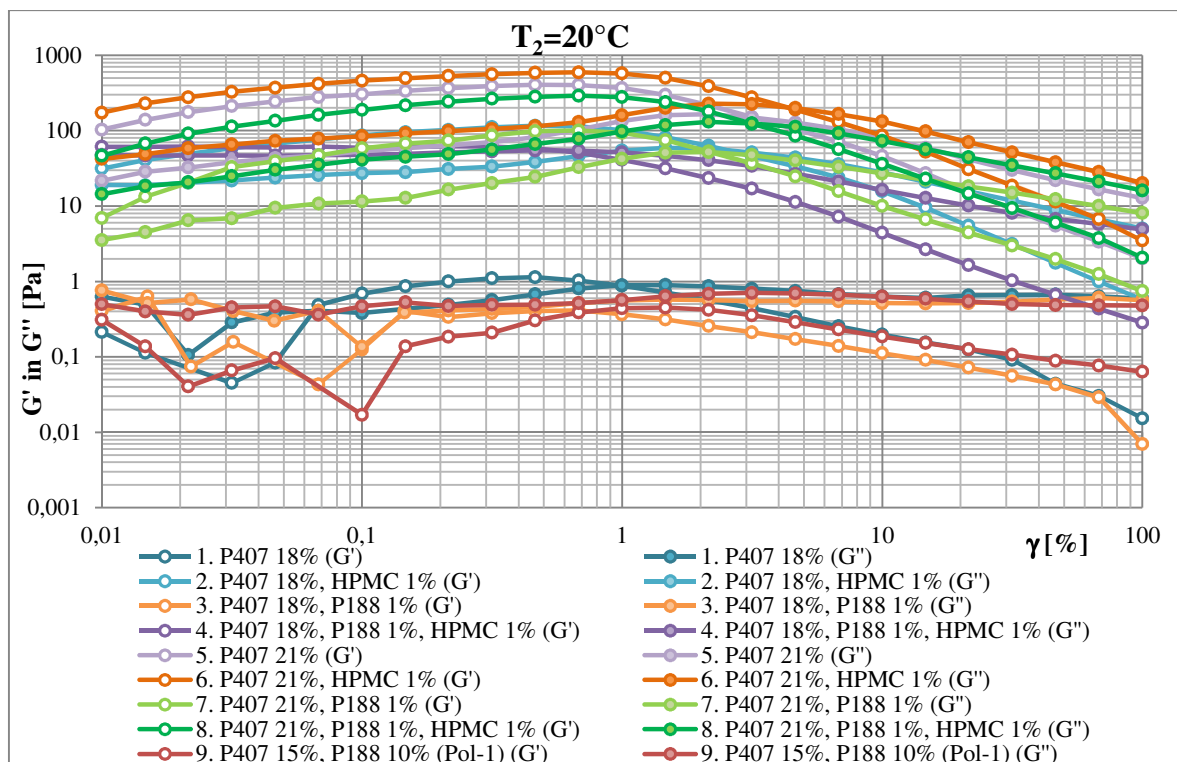
4.1.1. Določitev območja linearnosti elastičnega in viskoznega modula

Določitev linearnega območja formulacij je bila pomembna za vse nadaljnje meritve iz sklopa oscilacijske viskometrije. Z merjenjem vrednosti elastičnega (G') in viskoznega modula (G'') v odvisnosti od naraščajoče strižne deformacije (γ) pri konstantni frekvenci in temperaturi smo določili območje strižne deformacije, v katerem sta bili krivulji obeh modulov čim bolj vodoravni (konstantne vrednosti obeh modulov). Ta interval tako določa pogoje meritve, pri katerih ne pride do porušanja notranje strukture hidrogelov (območje reverzibilne deformacije hidrogelov) (20).

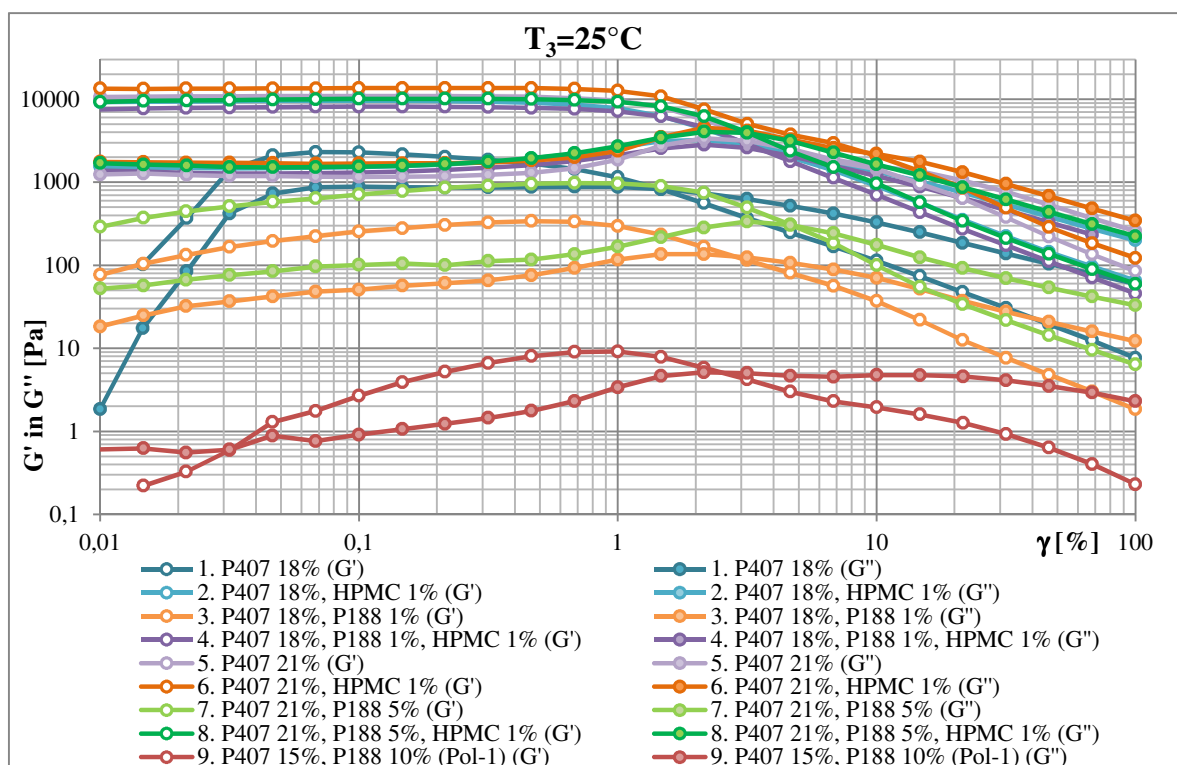
Po primerjavi grafov za vse 4 temperature smo ugotovili, da je bilo za večino formulacij območje linearnosti pri $\gamma=0,1-1,0\%$ (slike 11-14). Za nadaljnje meritve smo izbrali deformacijo $0,2\%$.



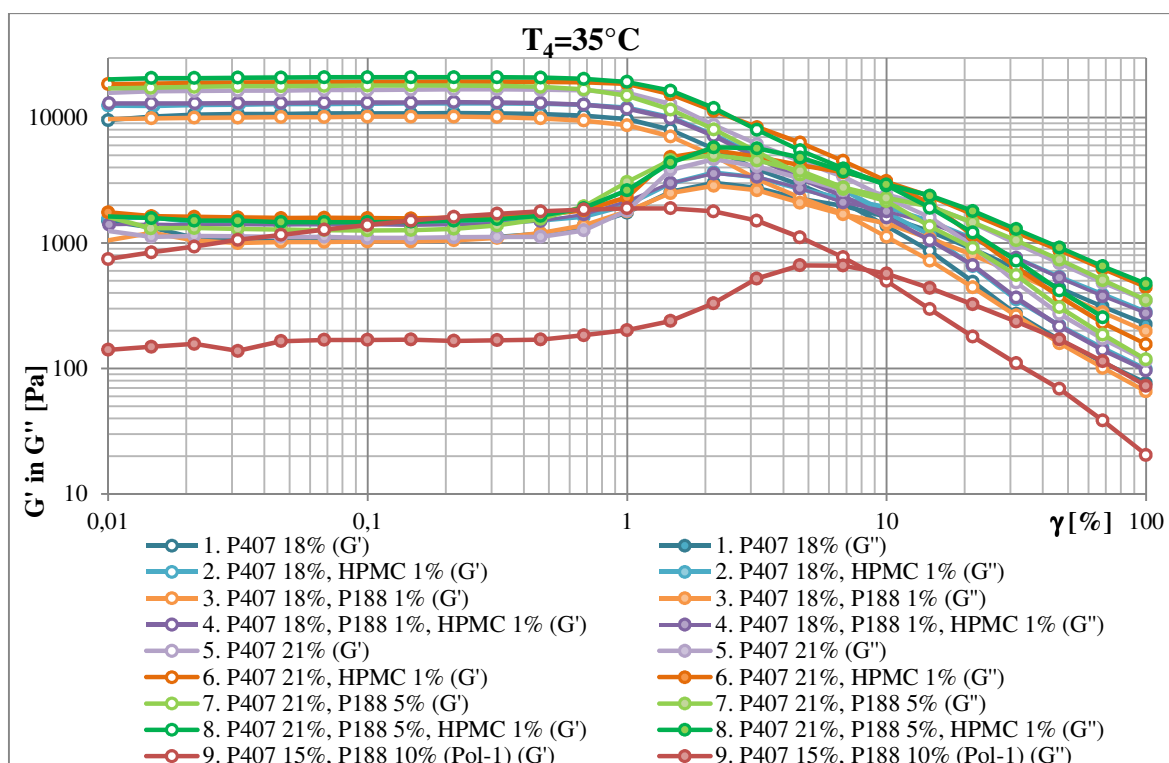
Slika 11: Vrednosti viskoznega in elastičnega modula v odvisnosti od strižne deformacije pri konstantni frekvenci 1 Hz in temperaturi 8°C .



Slika 12: Vrednosti viskoznega in elastičnega modula v odvisnosti od strižne deformacije pri konstantni frekvenci 1Hz in temperaturi 20°C.



Slika 13: Vrednosti viskoznega in elastičnega modula v odvisnosti od strižne deformacije pri konstantni frekvenci 1Hz. in temperaturi 25°C.

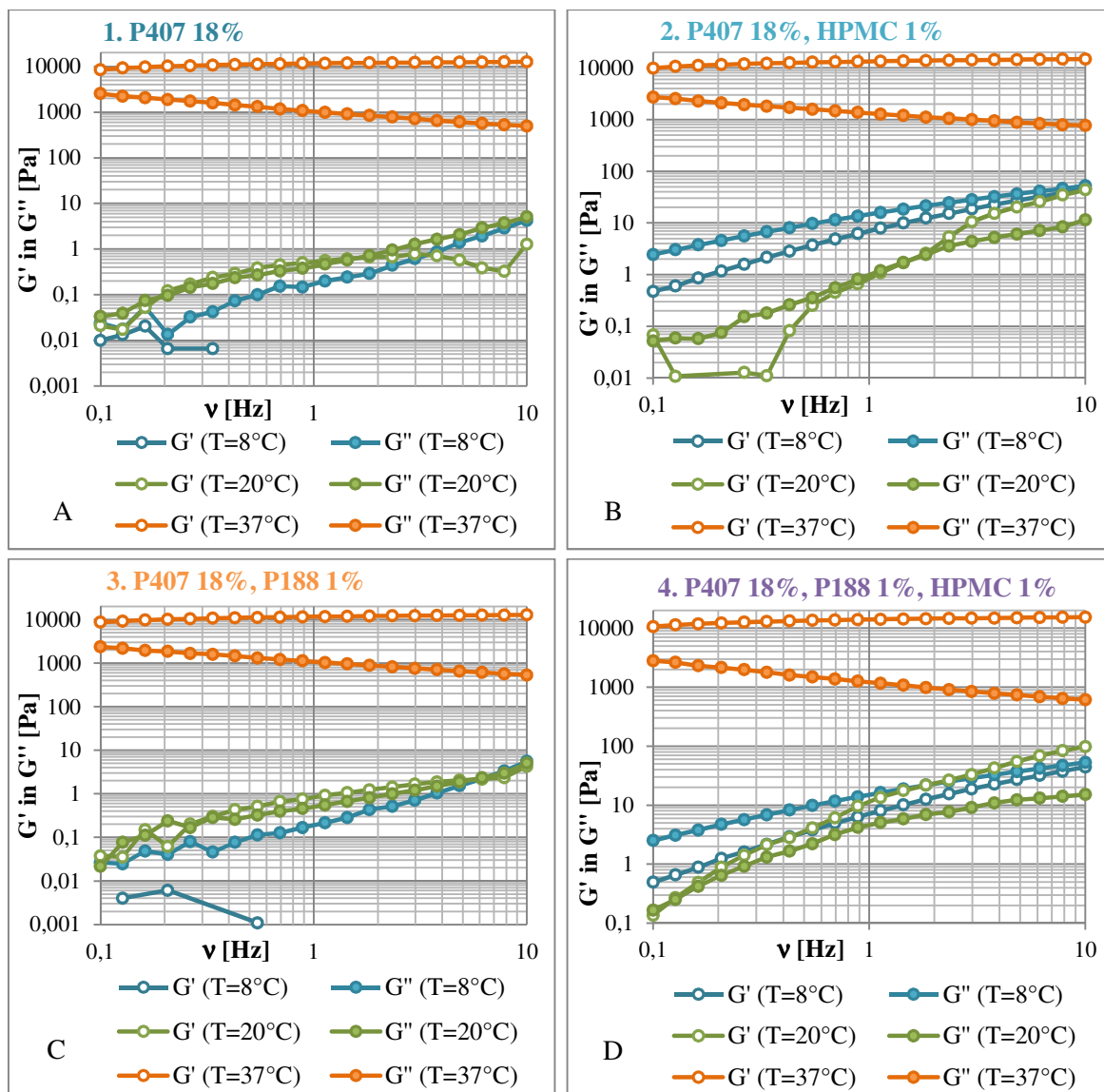


Slika 14: Vrednosti viskoznega in elastičnega modula v odvisnosti od strižne deformacije pri konstantni frekvenci 1Hz in temperaturi 35°C.

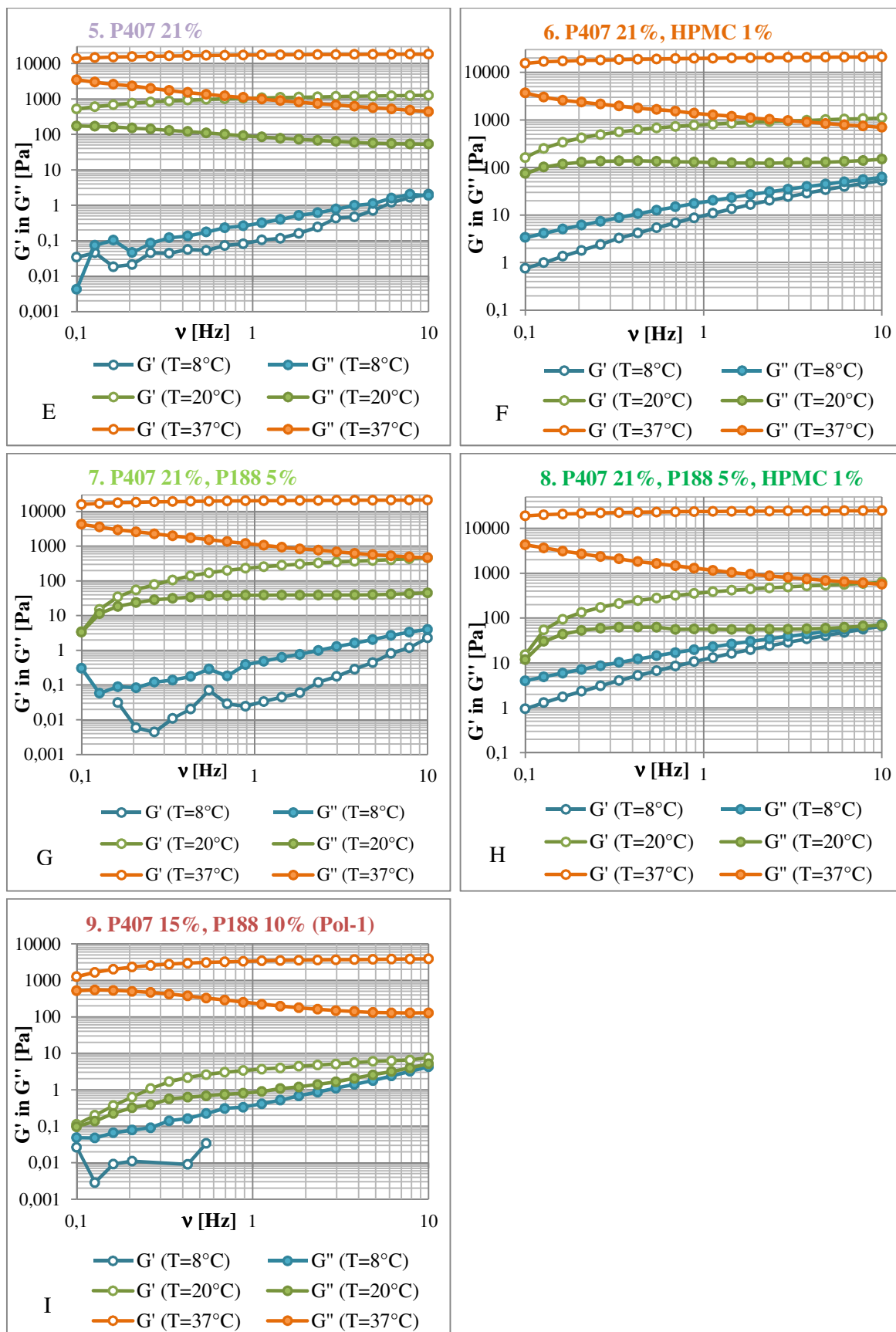
4.1.2. Frekvenčna odvisnost elastičnega in viskoznega modula (mehanski spekter)

Z meritvami frekvenčne odvisnosti smo preverjali viskoelastične lastnosti naših formulacij hidrogelov pri nedestruktivnih pogojih (območje reverzibilne deformacije) in različnih temperaturah, pri katerih so hidrogeli v različnih fazah geliranja. Pričakovali smo sledeče rezultate:

- $T_1=8^\circ\text{C}$: viskozni modul prevladuje. Prisotna je frekvenčna odvisnost obeh modulov. Formulacije izkazujejo značaj viskozne tekočine (22).
- $T_2=20^\circ\text{C}$: vrednosti obeh modulov so že višje. Pri formulacijah, ki imajo temperaturo geliranja blizu 20°C , je proces geliranja v teku, vendar vrednosti viskoznega modula še prevladujejo. Prisotna je frekvenčna odvisnost modulov.
- $T_3=37^\circ\text{C}$: elastični modul prevladuje. Frekvenčne odvisnosti modulov ni (vrednosti so večinoma konstantne). Formulacije izkazujejo gelski značaj (22).



Slika 15 A-D: Frekvenčna odvisnost formulacij hidrogelov 1-4 pri konstantni deformaciji 0,2% in treh različnih temperaturah.



Slika 16 E-I: Frekvenčna odvisnost formulacij hidrogelov 5-9 pri konstantni deformaciji 0,2% in treh različnih temperaturah.

Iz meritev smo ugotovili naslednje:

- $T_1=8^{\circ}\text{C}$:

Po pričakovanjih je viskozni modul prevladoval ($G''>G'$) in oba modula sta izkazovala frekvenčno odvisnost, saj so z naraščanjem frekvence naraščale tudi vrednosti modulov.

Pri formulacijah 1, 3 in testni formulaciji Pol-1 nismo dobili popolnih podatkov o vrednostih elastičnega modula (slika 15 A, C, I).

Vrednosti modulov pri HPMC-vsebujočih hidrogelih so se spreminjale bolj enakomerno in niso nihale tako kot pri formulacijah, ki niso vsebovale HPMC (slika 15 B, D in slika 16 F, H).

- $T_2=20^{\circ}\text{C}$:

Pri formulacijah 5-8, ki so vsebovale višje deleže polimerov, je do presečišča krivulj G' in G'' že prišlo, tako da so ves čas meritve prevladovale vrednosti elastičnega modula. Krivulji elastičnega in viskoznega modula sta bili že bolj podobni krivuljam modulov pri 37°C (večji gelski značaj teh formulacij), le da so bile vrednosti obeh modulov nižje pri 20°C . Tako smo opazili, da pri 5. in 6. formulaciji frekvenčne odvisnosti modulov praktično ni bilo (slika 16 E, F). Pri formulacijah 7 in 8 pa je bila prisotna frekvenčna odvisnost le do frekvence $\nu \approx 0,2\text{Hz}$ (slika 16 G, H).

Frekvenčna odvisnost modulov je bila prisotna pri formulacijah 1 in 3, vrednosti obeh modulov pa so bile ves čas meritve blizu skupaj (slika 15 A, C). Pri 2. formulaciji je bila frekvenčna odvisnost prisotna, a sta se krivulji modulov ločili pri frekvenci $\nu \approx 2\text{Hz}$ in z nadaljnjim višanjem frekvence so vrednosti elastičnega modula prevladovale (slika 15 B). Podobno sta se krivulji modulov 4. formulacije ločili pri frekvenci $\nu \approx 0,2\text{Hz}$, tako da je do konca meritve prevladoval elastični modul (slika 15 D).

Pri formulacijah 2 in 4, ki sta imeli delež P407 18% in sta vsebovali tudi HPMC smo opazili, da so se vrednosti elastičnega in viskoznega modula v primerjavi z vrednostmi pri 8°C nekoliko znižale, kot navaja tudi literatura (slika 15 B, D) (16).

Rezultati meritev za Pol-1 se niso ujemali z navedenimi rezultati v članku, kjer je bilo ugotovljeno, da formulacija pri 25°C izkazuje lastnosti viskozne tekočine, kjer prevladujejo vrednosti viskoznega modula in je prisotna frekvenčna odvisnost obeh modulov (slika 16 I) (22).

- $T_3=37^{\circ}\text{C}$:

Po pričakovanjih je pri vseh formulacijah prevladoval elastični modul ($G' > G''$). Vrednosti elastičnega modula niso izkazovale izrazite frekvenčne odvisnosti, medtem ko so vrednosti viskoznega modula rahlo upadale z naraščajočo frekvenco. To se ujema z elastičnim področjem polimernih raztopin (20).

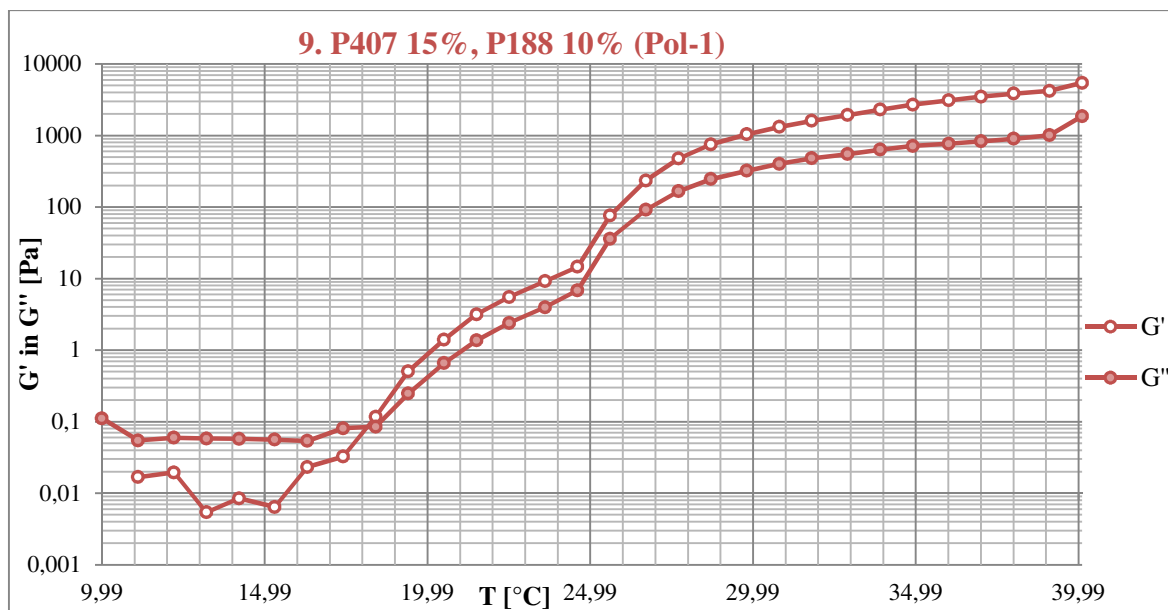
Tudi pri Pol-1 smo ugotovili, da elastični modul prevladuje, vendar so bile tu vrednosti obeh modulov precej nižje kot pri naših formulacijah (slika 16 I).

4.1.3. Temperaturna odvisnost elastičnega in viskoznega modula v intervalu 10-40°C (proces geliranja)

Preglednica II: Primerjava temperature geliranja (30) in temperaturnega intervala presečišča krivulj, dobljenega pri frekvenci 0,1Hz in deformaciji 0,2%.

Formulacija (vsebnost v % m/m)	Temperatura geliranja	Temperaturni interval presečišča krivulj
1. P407 18%	26,2°C	17,4-18,4°C
2. P407 18% + HPMC 1%	24,5°C	14,2-15,3°C
3. P407 18% + P188 1%	28,5°C	17,4-18,4°C
4. P407 18% + P188 1% + HPMC 1%	25,4°C	15,3-16,3°C
5. P407 21%	22,4°C	14,2-15,3°C
6. P407 21% + HPMC 1%	21,4°C	14,2-15,3°C
7. P407 21% + P188 5%	27,5°C	12,2-13,2°C
8. P407 21% + P188 5% + HPMC 1%	24,8°C	12,2-13,2°C

Za vseh osem formulacij smo ugotovili, da je prišlo do presečišča krivulj elastičnega in viskoznega modula pri mnogo nižjih temperaturah v primerjavi s predhodno določenimi temperaturami geliranja. To je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji, zato smo pod enakimi pogoji izvedli meritev tudi za testno formulacijo Pol-1 (slika 17).



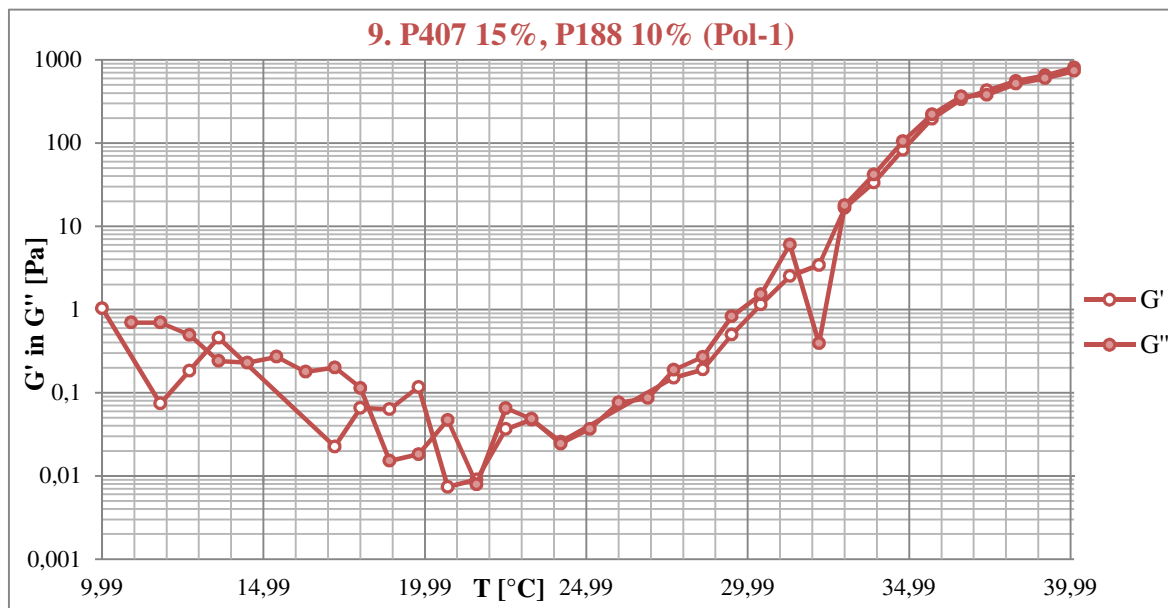
Slika 17: Temperaturna odvisnost formulacije Pol-1 v intervalu 10-40°C pri frekvenci 0,1Hz in deformaciji 0,2%.

Iz meritve smo dobili temperaturni interval presečišča krivulj med 17,4°C in 18,4°C. Po članku je temperatura geliranja te formulacije pri 37°C. L. Mayol in sodelavci so svoje meritve opravili pri frekvenci 0,01Hz z namenom, da le-ta ne bi vplivala na proces geliranja (22). Glede na območje delovanja našega reometra, ki ga spremljamo kot navor tekom meritve (območje delovanja pri oscilatornih pogojih: 2nNm-200mNm), smo sprva menili, da je frekvenca $\nu=0,1\text{Hz}$ dovolj visoka za izvajanje meritev in obenem dovolj nizka, da ne bo motila procesa geliranja (31). Ker pa se rezultati, dobljeni pri frekvenci 0,1Hz niso ujemali z navedenimi podatki o temperaturi geliranja, smo pogoje meritev prilagodili.

4.1.4. Prilagajanje pogojev meritev temperature odvisnosti

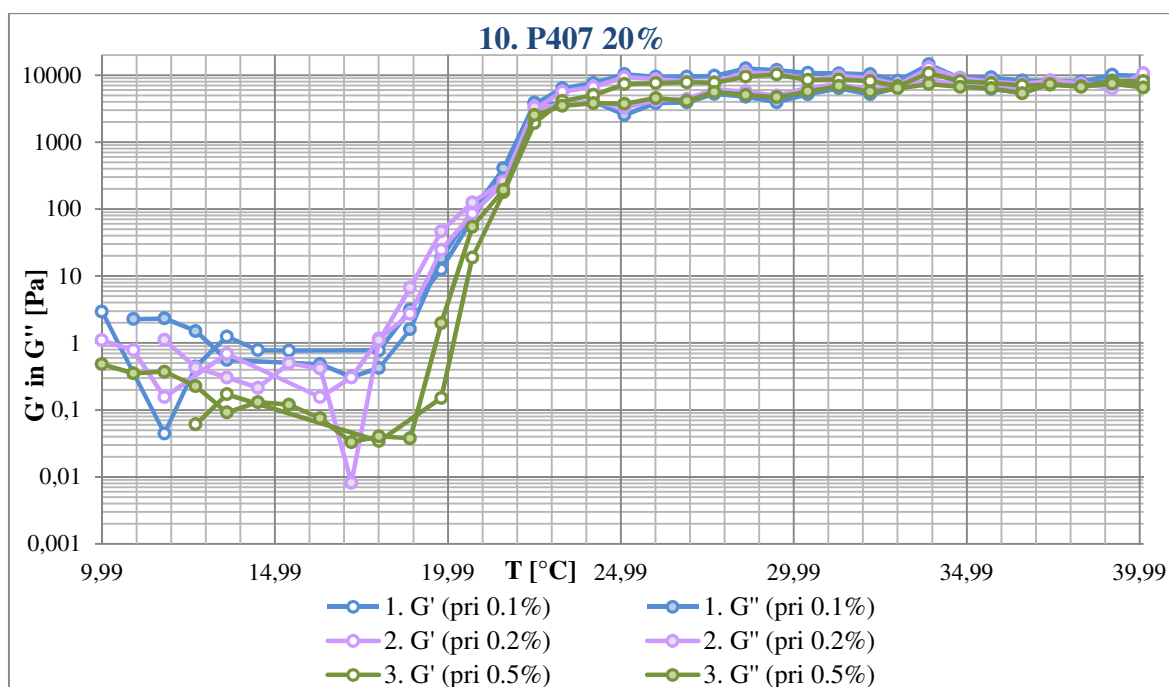
Ko smo s formulacijo Pol-1 izvedli meritev pri desetkrat nižji frekvenci – 0,01Hz, kot je bilo to storjeno v članku, smo ugotovili, da se je temperaturni interval presečišča krivulj tokrat ujemal z navedeno temperaturo geliranja 37°C. Do presečišča krivulj je namreč prišlo pri temperaturi med 36,6°C in 37,4°C (slika 18). V skladu s pričakovanji smo ugotovili tudi, da so bile vrednosti obeh modulov pri tako nizki frekvenci bolj neenakomerne in da smo dobili pri nižjih temperaturah več vrzeli med podatki, ko reometer vrednosti ni uspel izmeriti (predvsem pri elastičnem modulu). Prav tako smo opazili, da se krivulji modulov tudi pri temperaturi nad točko geliranja nista ločili, ampak sta ostali blizu skupaj. Kljub temu smo se odločili, da frekvenco za nadaljnje meritve

znižamo z 0,1 Hz na 0,01Hz, saj je bilo jasno razvidno, da je imela frekvenca močan vpliv na proces geliranja, tako da se je pri višji frekvenci temperatura geliranja močno znižala.



Slika 18: Temperaturna odvisnost formulacije Pol-1 v intervalu 10-40°C pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

Poleg vpliva frekvence na meritve temperaturne odvisnosti nas je zanimal tudi vpliv strižne deformacije, saj so L. Mayol in sodelavci navedli le, da so meritve izvajali znotraj območja linearnosti (22). Prav tako smo tudi pri določitvi linearnega območja ugotovili, da pri nekaterih formulacijah nismo dobili linearnega odziva modulov in da so vrednosti le-teh precej nihale tudi znotraj linearnega območja. Zato smo se odločili, da preverimo, kako vpliva strižna deformacija na vrednosti obeh modulov. V ta namen smo meritve izvedli na formulaciji P407 20%, za katero smo našli podatke o temperaturi geliranja, prav tako opredeljeni kot presečišče krivulj elastičnega in viskoznega modula. Za P407 20% je bilo ugotovljeno, da se krivulji modulov sekata pri temperaturi med 22°C in 23,4°C, oziroma da je temperatura presečišča $T_{\text{presečišča}} = 23 \pm 0,4^\circ\text{C}$ (27, 28).



Slika 19: Temperaturna odvisnost formulacije P407 20% v intervalu 10-40°C pri treh različnih deformacijah in frekvenci 0,01Hz.

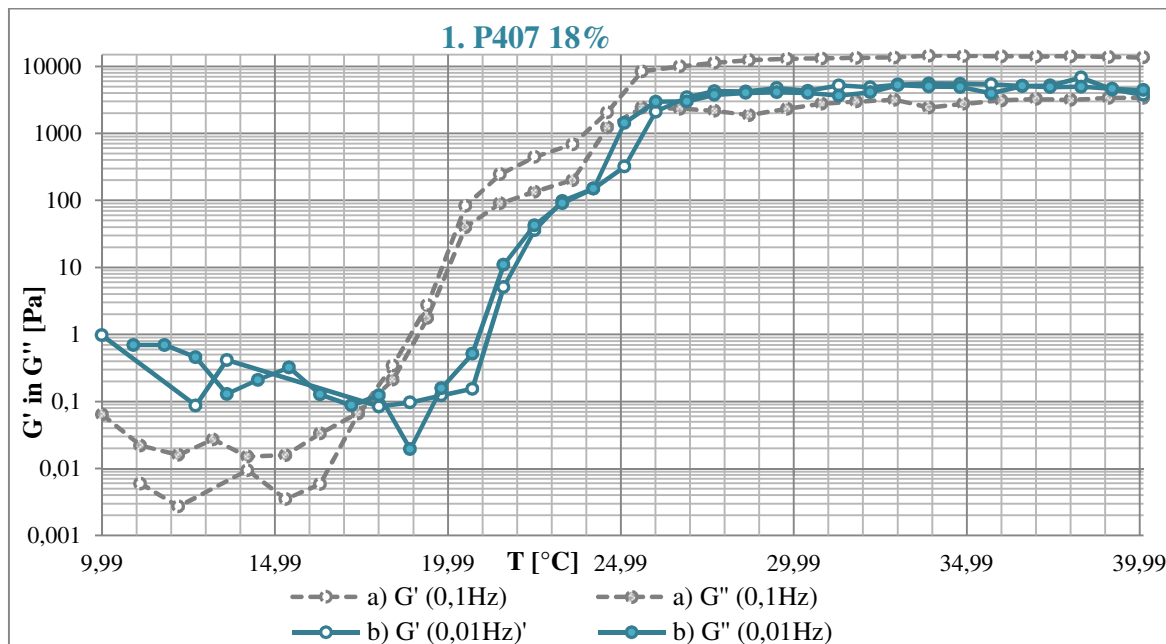
Meritve so pokazale, da so se s povečanjem deformacije vrednosti obeh modulov znižale (slika 19). To je veljalo za začetni del meritve, preden smo dosegli temperaturo geliranja. Ko smo temperaturo geliranja presegli, razlik med vrednostmi obeh modulov pri različnih deformacijah tako rekoč ni bilo več. Pri vseh treh strižnih deformacijah smo določili enak temperaturni interval presečišča krivulj, in sicer med 22,5°C in 23,3°C, kar se je ujemalo tudi s podatki iz člankov.

Za nadaljnje meritve naših osmih formulacij smo se odločili, da pustimo strižno deformacijo enako, in sicer: $\gamma=0,2\%$, frekvenco pa smo iz prvotnih 0,1Hz znižali na 0,01Hz.

Preglednica III: Primerjava temperature geliranja (30) in temperaturnega intervala presečišča krivulj, dobljenega pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

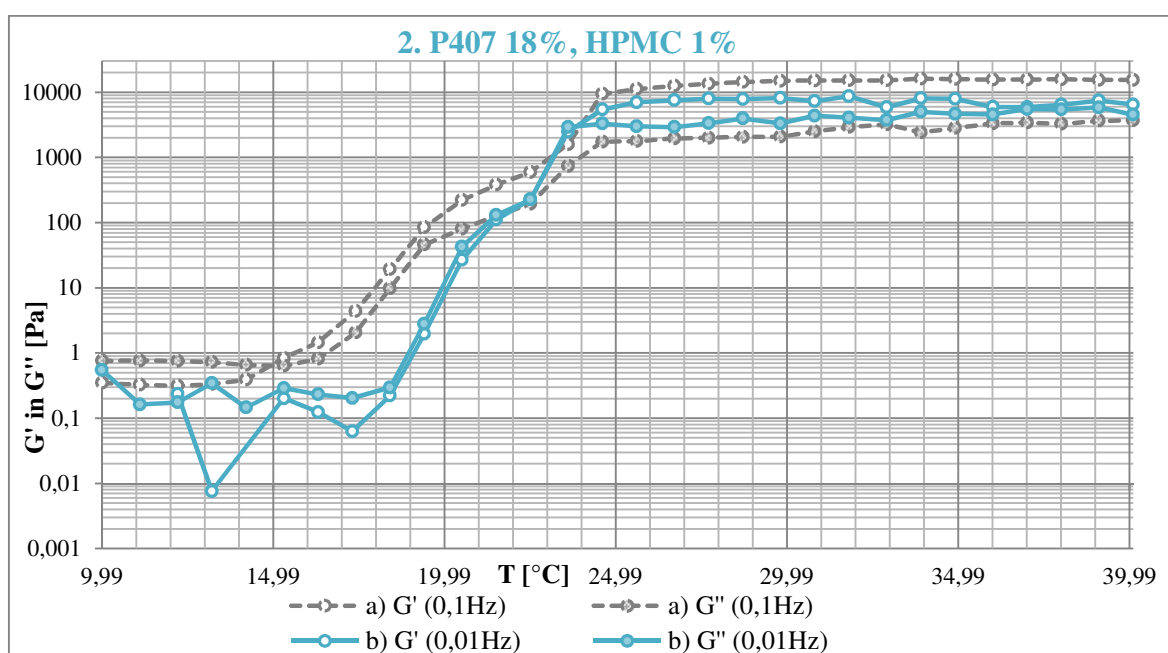
Formulacija (vsebnost v % m/m)	Temperatura geliranja	Temperaturni interval presečišča krivulj
1. P407 18%	26,2°C	26-26,9°C
2. P407 18% + HPMC 1%	24,5°C	23,6-24,6°C
3. P407 18% + P188 1%	28,5°C	/
4. P407 18% + P188 1% + HPMC 1%	25,4°C	25,1-26°C
5. P407 21%	22,4°C	21,6-22,5°C
6. P407 21% + HPMC 1%	21,4°C	20,7-21,6°C
7. P407 21% + P188 5%	27,5°C	/
8. P407 21% + P188 5% + HPMC 1%	24,8°C	27,7-28,6°C

Z meritvijo na prvi formulaciji smo ugotovili, da se je presečišče krivulj pri 0,01Hz dobro ujemalo s predhodno določeno temperaturo geliranja (preglednica III). Čeprav se krivulji po točki geliranja nista ločili, tako kot sta se pri 0,1Hz pa so vrednosti elastičnega modula prevladovali nad vrednostmi viskoznega modula (slika 20).



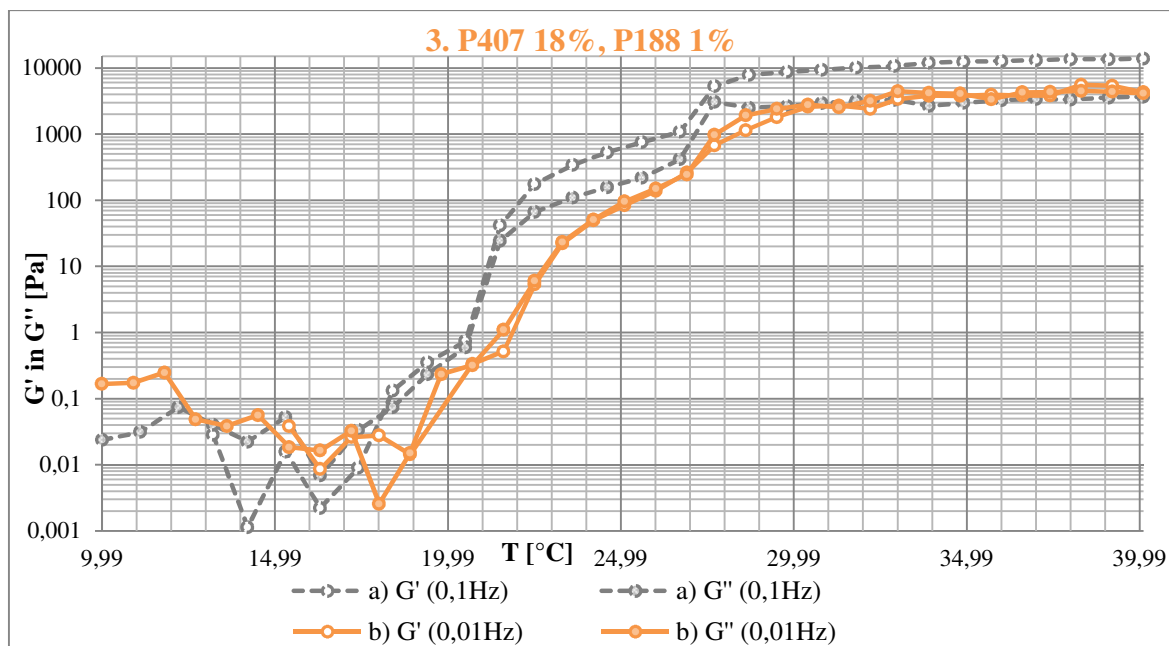
Slika 20: Temperaturna odvisnost 1. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz ter deformaciji 0,2%.

Tudi pri 2. formulaciji smo ugotovili, da se je presečišče krivulj, dobljeno pri frekvenci 0,01Hz, ujemalo s predhodno določeno temperaturo geliranja (preglednica III). Tudi potek krivulj se je ujemal s pričakovanim potekom, tako da so bile vrednosti elastičnega modula po doseženi točki geliranja do konca meritve višje od vrednosti viskoznega modula (slika 21). Ob primerjavi presečišč krivulj 1. in 2. formulacije, ki sta imeli enak delež P407, smo ugotovili, da se pri formulaciji z dodatkom HPMC krivulji sekata pri nižji temperaturi kot pri formulaciji, ki vsebuje samo P407. Prav tako smo opazili, da so začele vrednosti modulov pri drugi formulaciji, ki je vsebovala tudi HPMC, naraščati pri nižji temperaturi kot pri prvi formulaciji, ki je vsebovala le P407.



Slika 21: Temperaturna odvisnost 2. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz ter deformaciji 0,2%.

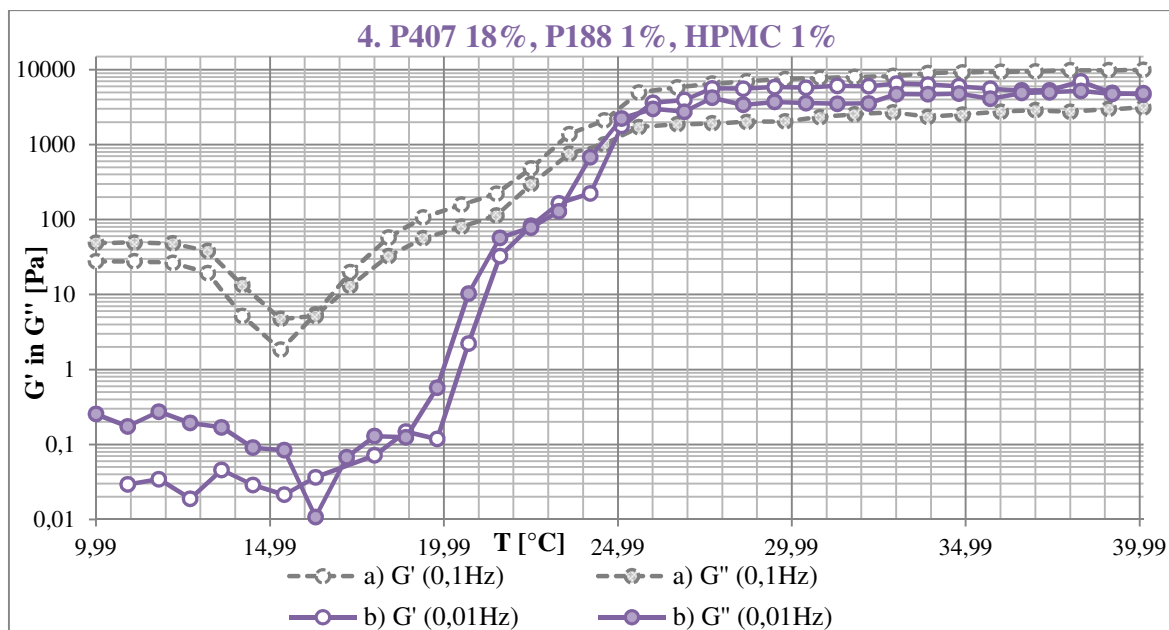
Pri tretji formulaciji temperature geliranja z meritvijo pri 0,01Hz nismo mogli določiti. Krivulji obeh modulov sta se namreč sekali tako pred pričakovano in predhodno določeno temperaturo geliranja kot tudi po njej. Prisotnih je bilo več presečišč krivulj in zadnje presečišče smo dobili pri temperaturi med 37,4°C in 38,3°C, kar se ni ujemalo s predhodno določeno temperaturo geliranja 28,5°C (slika 22).



Slika 22: Temperaturna odvisnost 3. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz ter deformaciji 0,2%.

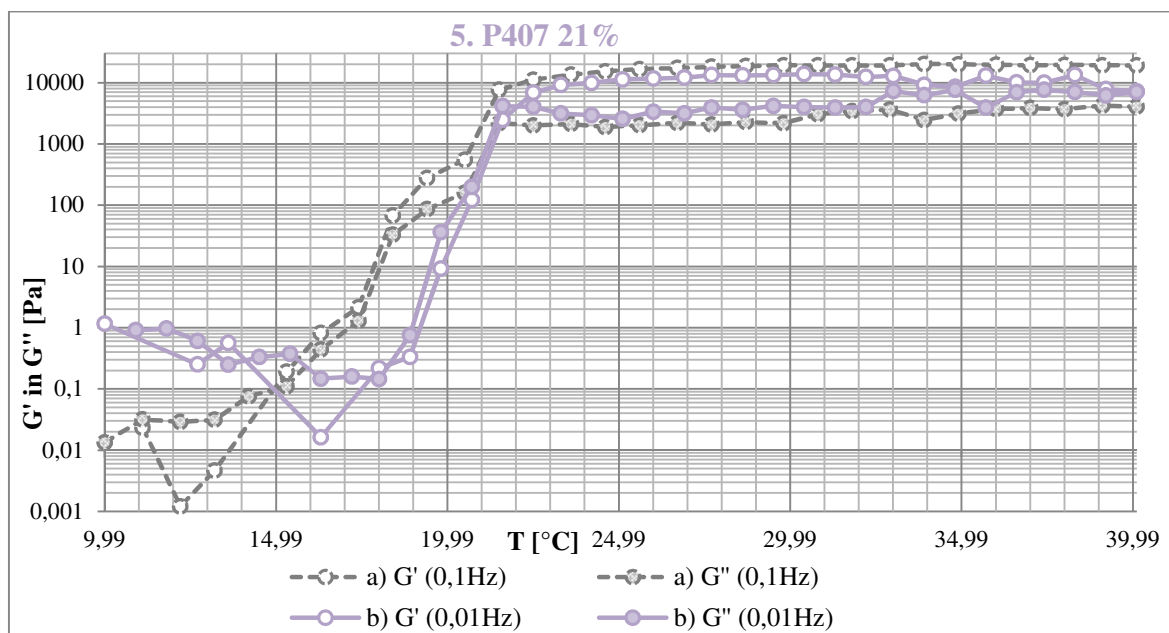
Pri primerjavi krivulj obeh modulov, dobljenih z meritvijo pri frekvencah 0,1Hz in 0,01Hz smo opazili, da so pri 0,1Hz vrednosti elastičnega modula po preseženi temperaturi 27,7°C narastle do vrednosti 10^4 Pa in ostale v tem območju do konca meritve. Po drugi strani so vrednosti viskoznega modula po temperaturi 27,7°C nekoliko upadle in nato ostale konstantne, v območju 10^3 Pa. Tak potek krivulj je značilen za gel stanje (20). V nasprotju z vrednostmi modulov in potekom krivulj pri 0,1Hz pa pri 0,01Hz elastični modul sploh ni dosegel vrednosti 10000Pa in je ostal tudi po temperaturi geliranja v enakem območju kot vrednosti viskoznega modula (10^3 Pa). Tako je možno, da so bili za formulacijo, ki poleg P407 vsebuje tudi 1% P188, pogoji meritve pri 0,01Hz premili in da proces geliranja ter točka prehoda sol→gel nista bila odvisna zgolj od temperature.

Kot pri tretji formulaciji je bilo tudi pri formulaciji 4 prisotnih več presečišč (slika 23). Tako sta se krivulji nekajkrat sekali že nekaj stopinj pred pričakovano temperaturo geliranja, vendar pa je bilo zadnje presečišče pri temperaturi med 25,1°C in 26°C, kar se je ujemalo tudi s predhodno določeno temperaturo geliranja (preglednica III). Od te točke dalje so ostale vrednosti elastičnega modula višje od vrednosti viskoznega modula. V primerjavi s formulacijo 2, ki je vsebovala le kombinacijo P407 in HPMC v enakih deležih, je bila T_{gel} pri 4. formulaciji višja. Iz tega smo lahko sklepali, da je dodatek P188 v 4. formulaciji zvišal T_{gel} .



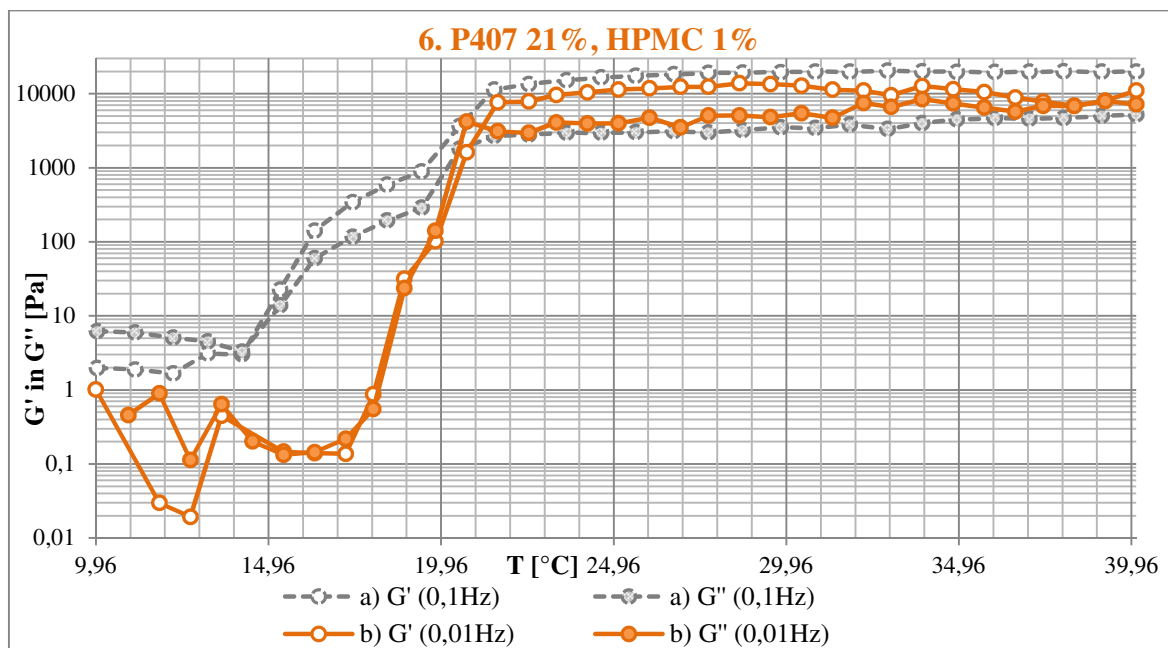
Slika 23: Temperaturna odvisnost 4. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz ter deformaciji 0,2%.

Presečišče krivulj pete formulacije se je ujemalo s predhodno določeno temperaturo geliranja (preglednica III, slika 24). Pri primerjavi te formulacije s prvo, ki je vsebovala nižji delež P407 (18% m/m), smo ugotovili, da so začele vrednosti modulov 5. formulacije naraščati pri nižji temperaturi kot vrednosti modulov 1. formulacije in tudi do presečišča krivulj je prišlo pri nižji temperaturi kot v primeru prve formulacije.



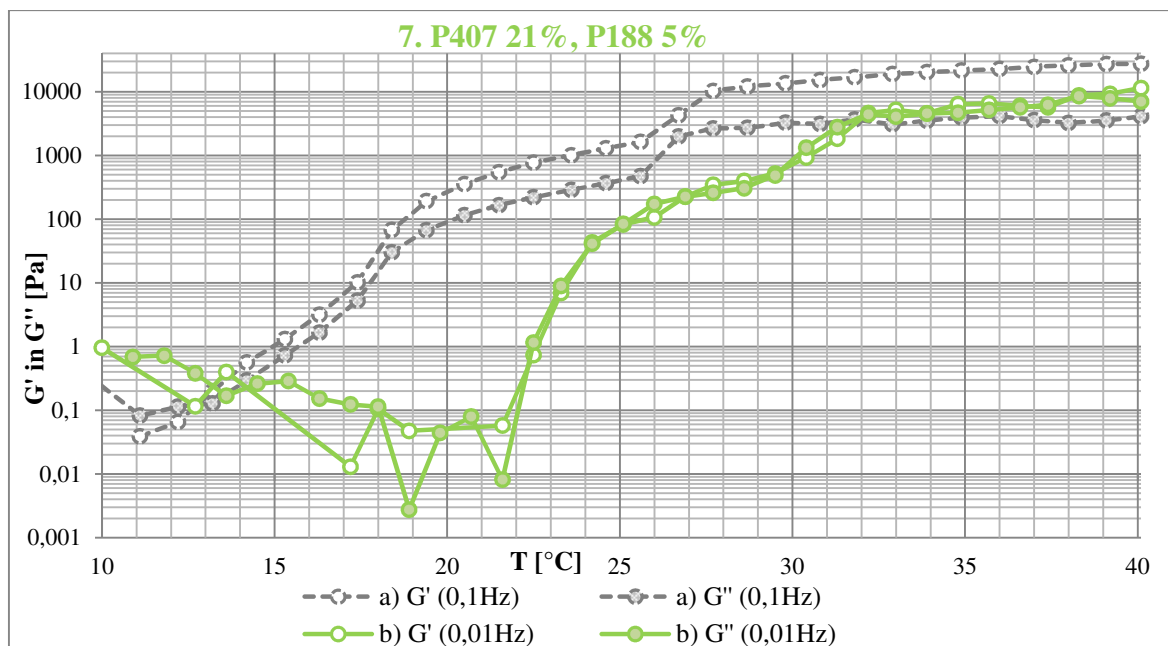
Slika 24: Temperaturna odvisnost 5. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz ter deformaciji 0,2%.

Predhodno določena temperatura geliranja in presečišče krivulj elastičnega in viskoznega modula sta se tudi pri šesti formulaciji ujemala (preglednica III, slika 25). Pri primerjavi te formulacije s formulacijo 5, ki HPMC ni vsebovala, smo opazili, da sta se z dodatkom HPMC krivulji modulov sekali pri nižji temperaturi kot pa pri 5. formulaciji, ki je imela enak delež P407 (21%*m/m*), a ni vsebovala HPMC. Zopet smo opazili, da so se pričele vrednosti modulov pri HPMC-vsebujočem hidrogelu dvigati pri nekoliko nižji temperaturi kot pri hidrogelu brez HPMC.



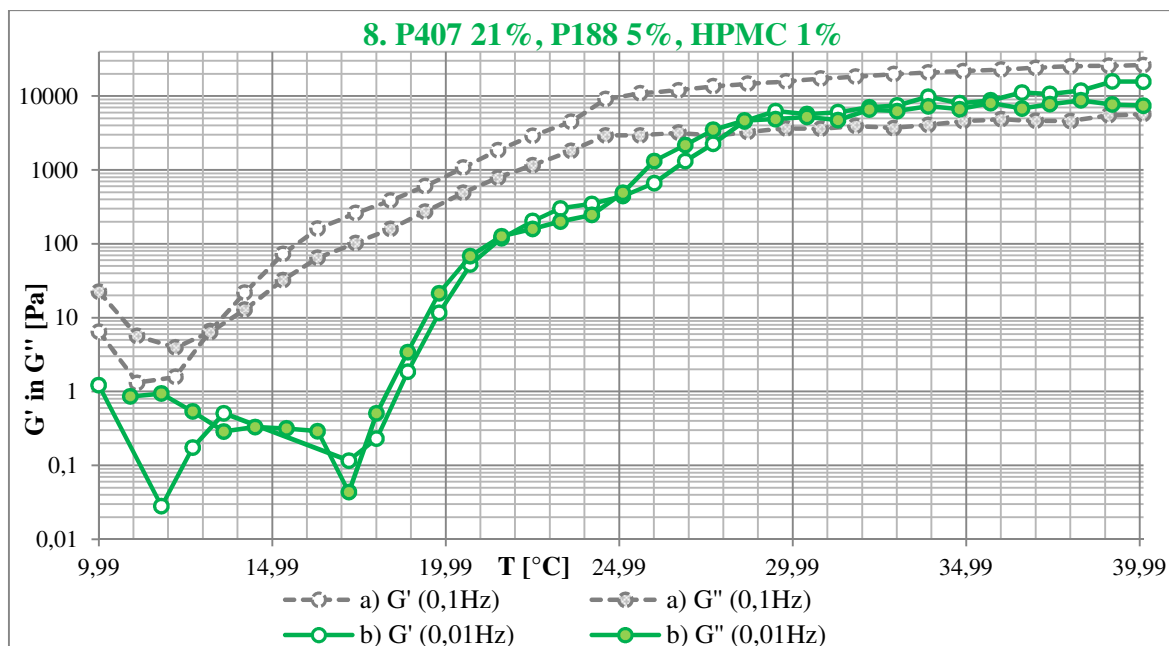
Slika 25: Temperaturna odvisnost 6. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz ter deformaciji 0,2%.

Enako kot pri tretji formulaciji, ki je vsebovala nižje deleže obeh poloksamerov, tudi pri sedmi formulaciji nismo mogli določiti temperaturnega intervala za presečišče krivulj (slika 26). Zopet je bilo prisotnih več presečišč, zadnje presečišče pa je bilo pri temperaturi med 37,4°C in 38,3°C. Tudi v tem primeru je možno, da pri danih pogojih merjenja proces geliranja in točka prehoda nista bila odvisna le od temperature, temveč je na proces geliranja vplivala tudi sestava hidrogela (dodatek P188).



Slika 26: Temperaturna odvisnost 7. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz in deformaciji 0,2%.

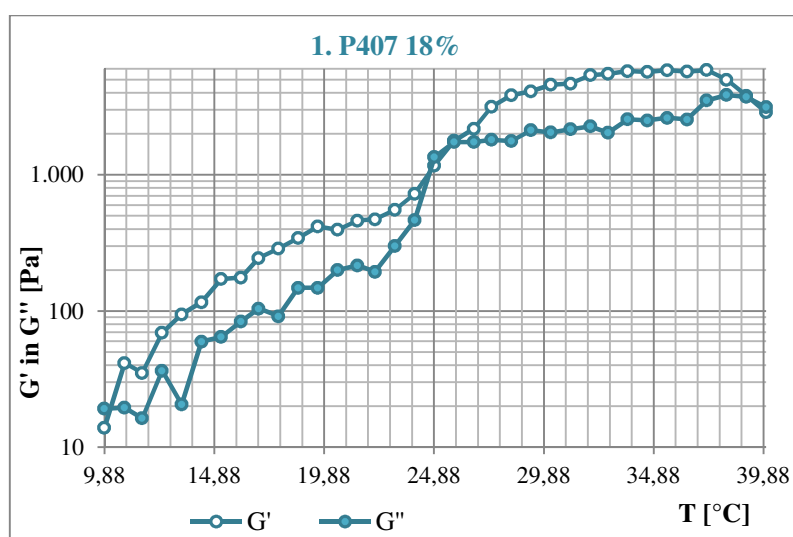
Tudi pri zadnji, osmi, formulaciji smo opazili podoben potek krivulj kot pri formulacijah 3 in 7, ki sta vsebovali samo kombinacijo obeh poloksamerov. Zadnje presečišče 8. formulacije je bilo tako pri temperaturi med 27,7°C in 28,6°C (slika 27). To presečišče je bilo sicer nižje kot pri hidrogelih 3 in 7, a se ni skladalo s predhodno določeno temperaturo geliranja (preglednica III). Pri primerjavi osme formulacije s četrto, ki je prav tako vsebovala vse tri polimere, smo opazili, da so se pri formulaciji 8 vrednosti modulov pričele dvigati pri nekoliko nižji temperaturi. Krivulji sta naraščali manj strmo in bolj podobno kot pri formulaciji 7, ki je vsebovala enak delež P407 in P188 (21% in 5%), a ni vsebovala HPMC. Tako lahko zaključimo, da je imel P188 pri formulaciji 8 večji vpliv kot pri formulaciji 4 zaradi višjega deleža le-tega. Potek krivulj tekom geliranja je bil tako bolj podoben formulacijama, ki sta vsebovali samo kombinacijo obeh poloksamerov.



Slika 27: Temperaturna odvisnost 8. formulacije v intervalu 10-40°C pri frekvencah 0,01Hz in 0,1Hz ter deformaciji 0,2%.

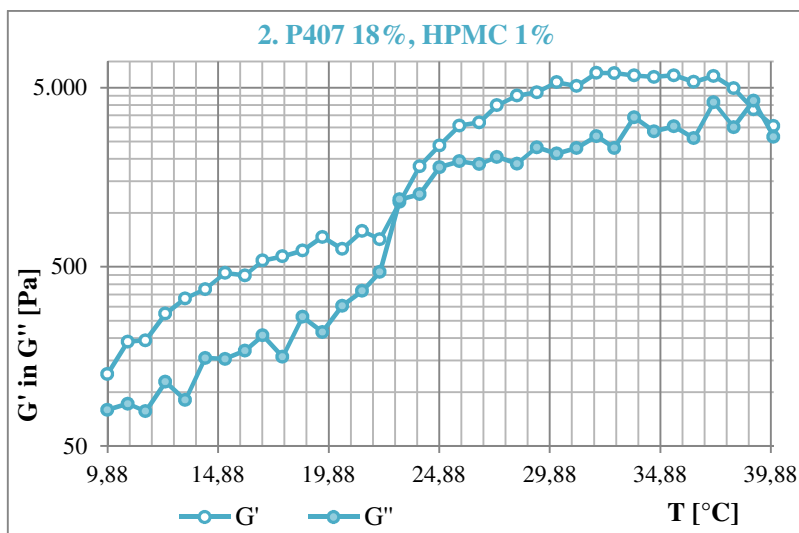
4.1.5. Temperaturna odvisnost modulov v intervalu 40-10°C

Vrednosti elastičnega modula pri 1. formulaciji so pričele močneje upadati od temperature 27,5°C dalje. Ta temperatura je bila nekoliko višja kot predhodno določena temperatura geliranja (preglednica III). Opazili smo, da sta se krivulji obeh modulov močno približali v temperaturnem območju, kjer se je nahajala temperatura geliranja (26,7-24,9°C). Ob nadaljnjem zniževanju temperature sta se krivulji ponovno ločili (slika 28).



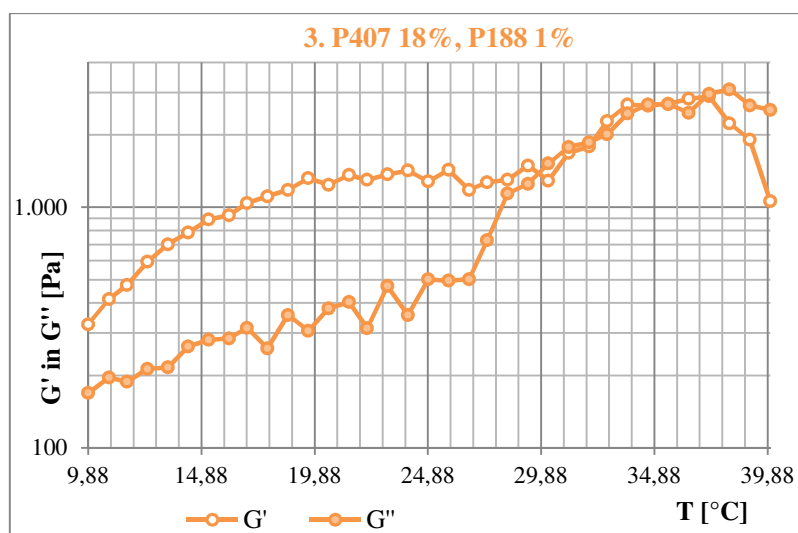
Slika 28: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 1. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

Pri 2. formulaciji so vrednosti elastičnega modula začele močneje upadati od temperature 25,8°C dalje, kar je bilo zopet nekoliko višje kot predhodno določena T_{gel} (preglednica III). Tudi v tem primeru sta se krivulji obeh modulov močno približali v območju T_{gel} (24,9-23,1) in se ob nadaljnjem zniževanju temperature zopet ločili (slika 29).



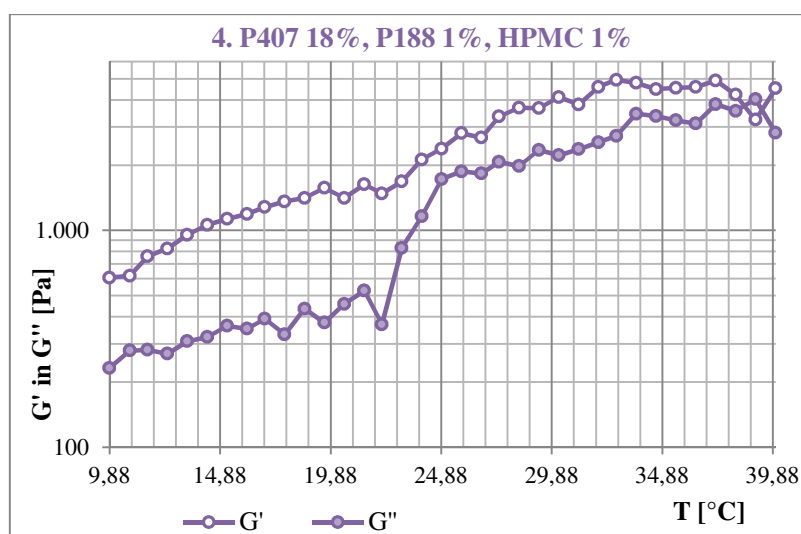
Slika 29: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 2. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

Vrednosti elastičnega modula so pri 3. formulaciji začele upadati že od temperature 33,7°C dalje, kar se ni ujemalo s T_{gel} , ki jo je določila diplomantka Sonja Balažek (preglednica III). Podobno kot pri temperaturni odvisnosti 10-40°C sta bili pri višjih temperaturah (območje gelskega značaja) krivulji obeh modulov zelo blizu skupaj in prisotnih je bilo tudi več presečišč. Vendar pa sta se krivulji povsem ločili po temperaturi 28,4°C in sta ostali ločeni do konca meritve (slika 30). Ta temperatura se je dobro ujemala s predhodno določeno $T_{gel}=28,5^{\circ}\text{C}$.



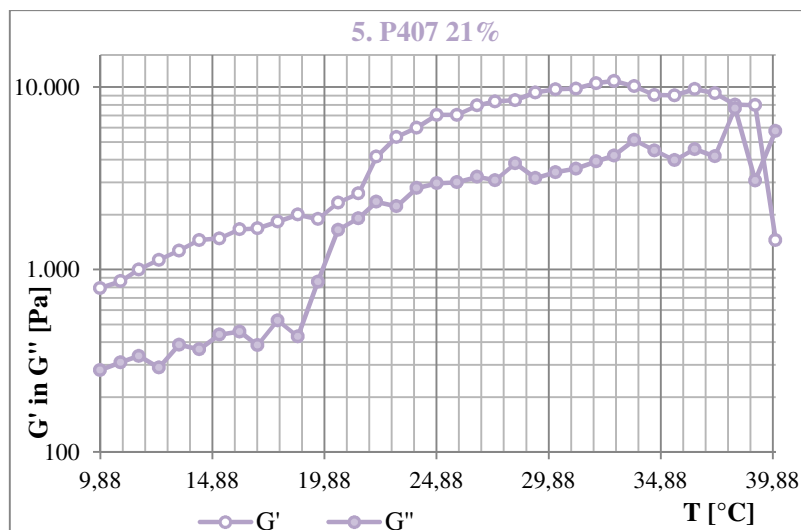
Slika 30: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 3. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

Vrednosti elastičnega modula so pri formulaciji 4 začele močnejše upadati od temperature 25,8°C dalje, kar se je dobro ujemalo s predhodno določeno T_{gel} (preglednica III). zopet smo opazili, da sta se krivulji obeh modulov pri določeni temperaturi (24,9°C) močno približali, se nato ločili in ostali ločeni do konca meritve (slika 31).



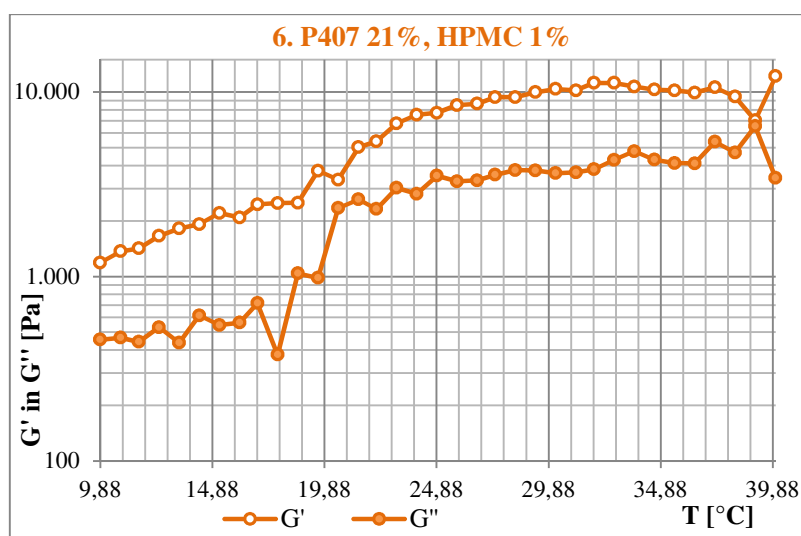
Slika 31: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 4. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

Pri formulaciji 5 so se vrednosti elastičnega modula močnejše znižale med temperaturama 22,2°C in 21,4°C, krivulji obeh modulov pa sta se močno približali v temperaturnem območju med 21,4 in 20,5°C in se nato zopet ločili (slika 32). V tem primeru se je padec vrednosti elastičnega modula dobro ujemal s predhodno določeno T_{gel} (preglednica III).



Slika 32: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 5. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

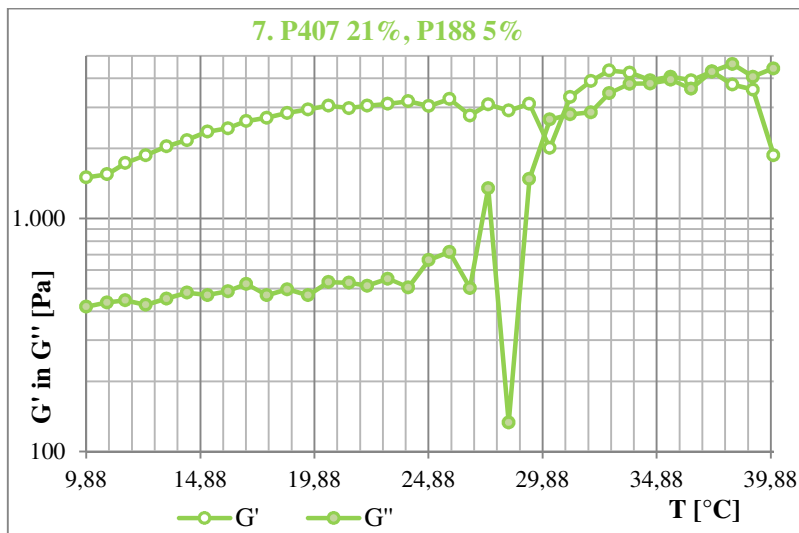
Močnejši padec vrednosti elastičnega modula smo pri formulaciji 6 opazili med temperaturama 21,4°C in 20,5°C, kar se je dobro ujemalo s predhodno določeno T_{gel} (preglednica III). Krivulji obeh modulov sta se močno približali pri temperaturi 20,5°C in se nato zopet ločili ter ostali ločeni do konca meritve (slika 33).



Slika 33: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 6. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

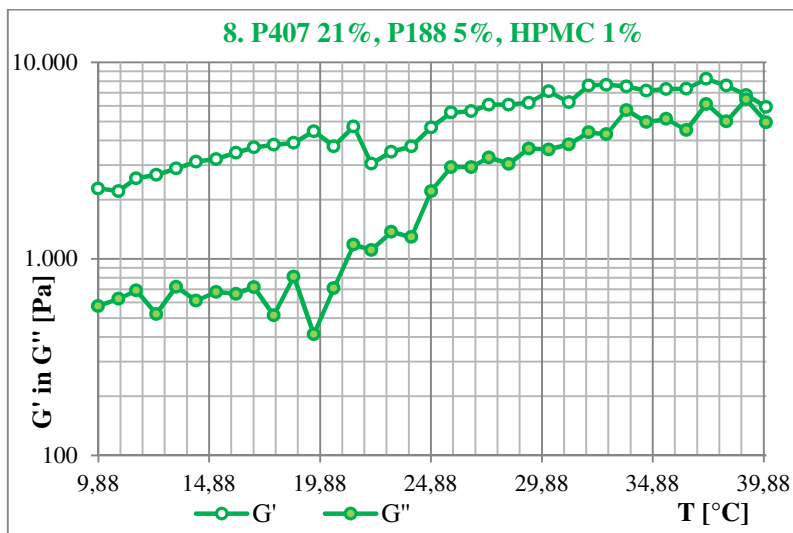
Podobno kot pri formulaciji 3 sta bili tudi pri 7. formulaciji krivulji obeh modulov zelo blizu skupaj pri visokih temperaturah. Prav tako je bilo v tem območju prisotnih več presečišč. Krivulji sta se popolnoma ločili od temperature 29,3°C dalje (slika 34). Močan

padec vrednosti elastičnega modula smo opazili med temperaturama 31,1°C in 30,2°C. V tem primeru se nobena temperatura (noben pojav) ni ujemal s predhodno določeno T_{gel} .



Slika 34: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 7. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

Vrednosti elastičnega modula so pri formulaciji 8 močnejše padale od temperature 25,8°C dalje. Krivulji obeh modulov se nista tako izrazito približali kot pri drugih formulacijah, vendar pa sta se pričeli močnejše oddaljevati od temperature 24,9°C dalje (slika 35). Ta temperatura se je dobro ujemala s predhodno določeno T_{gel} (preglednica III).



Slika 35: Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C 8. formulacije pri frekvenci 0,01Hz in deformaciji 0,2%.

Opazili smo, da med zniževanjem temperature ni prišlo do presečišča krivulj obeh modulov. Krivulji sta se blizu temperature geliranja približali, nato pa sta se spet oddaljili. Formulacije so tako izkazovale elastične lastnosti tudi pri temperaturah daleč pod temperaturo geliranja. To je lahko posledica robnih efektov zaradi intenzivnejšega izhlapevanja vode iz vzorca, kar vodi do nastanka nehomogenega vzorca z bolj izraženimi elastičnimi lastnostmi (27). Prav tako smo ugotovili, da so bile pri formulacijah 6-8, ki so imele višjo vsebnost polimerov, končne vrednosti elastičnega modula precej višje kot pri formulacijah 1-5 z nižjo vsebnostjo polimerov.

Z meritvami temperaturne odvisnosti v intervalu 40-10°C smo ugotovili, da je bil ta način meritve bolj primeren za primerjavo dobljene temperature geliranja z neko predhodno določeno vrednostjo ne pa za samo določanje T_{gel} . Prav tako smo ugotovili, da je bilo potrebno pri določanju temperaturnega prehoda iz gel v sol stanje poleg padca vrednosti elastičnega modula spremljati tudi vrednosti viskoznega modula. Padec elastičnega modula je bil v nekaterih primerih namreč premalo izrazit za potrditev $T_{gel-sol}$.

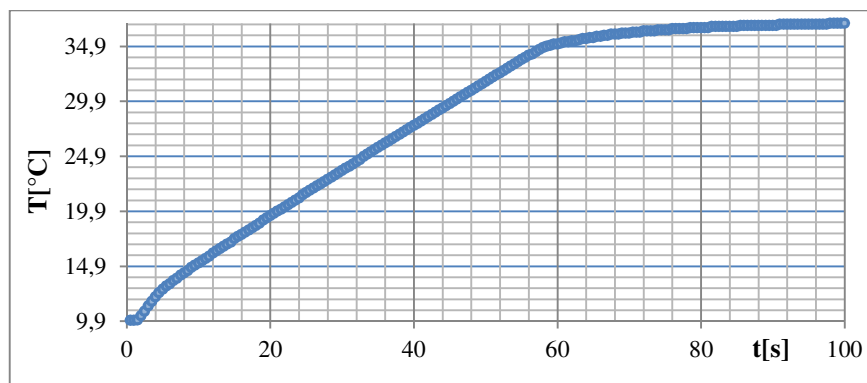
4.2. II. SKLOP MERITEV: OCENA ČASA GELIRANJA

4.2.1. Vizualna ocena časa geliranja

Pri vseh osmih hidrogelih smo ugotovili, da pri prenosu vzorca, ohlajenega na temperaturo hladilnika v termostatisirano kopel s temperaturo 37°C hidrogel gelira v manj kot 20s.

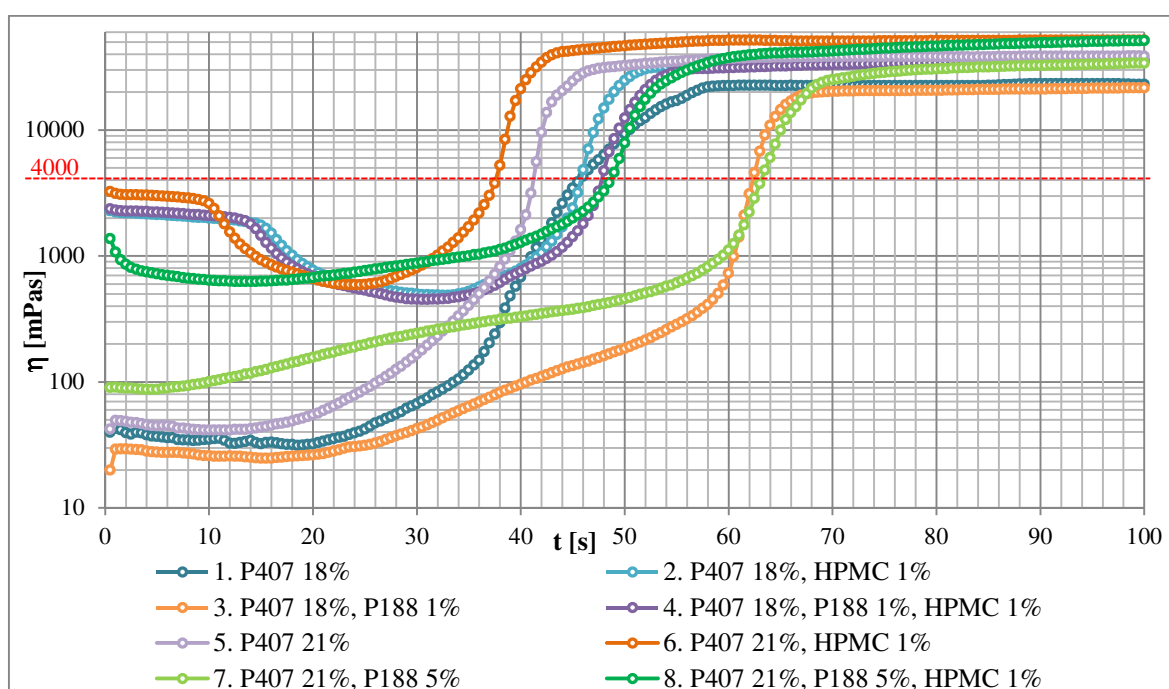
4.2.2. Ocena časa geliranja – rotacijska viskometrija

Opazili smo, da je reometer določen del meritve temperaturo dvigal linearno (slika 36). Ko smo primerjali izbrane točke za določitev časa geliranja hidrogelov, smo ugotovili, da smo pri vseh formulacijah točke izbrali znotraj linearne segrevanja plošče.



Slika 36: Naraščanje temperature v odvisnosti od časa pri meritvah časa geliranja.

Ob primerjavi vseh formulacij med seboj, smo opazili med njimi določene podobnosti. Tako sta imeli formulaciji 1 in 5, ki sta vsebovali le P407 podoben potek geliranja, s tem da je formulacija 5 začela gelirati nekoliko prej kot formulacija 1, ki je vsebovala nižji delež P407. Prav tako so imele podoben potek geliranja vse formulacije, ki so vsebovale HPMC, razen zadnje, osme, ki je gelirala podobno kot hidrogela, ki sta vsebovala samo kombinacijo obeh poloksamerov (3 in 7) (slika 37). Tak potek geliranja smo opazili že tudi pri temperaturni odvisnosti elastičnega in viskoznega modula. Podobno kot pri mehanskem spektru smo opazili, da se je viskoznost v HPMC-vsebujočih hidrogelih na začetku s segrevanjem znižala in se zopet pričela dvigovati, ko se je proces geliranja začel.



Slika 37: Viskoznost hidrogelov v odvisnosti od časa.

Preglednica IV: Izbrane točke za določitev časa geliranja in dobljeni čas geliranja formulacij.

Formulacija (vsebnost v % m/m)	$t_1[s]$	$\eta_1[mPas]$	$t_2[s]$	$\eta_2[mPas]$	$\Delta t[s]$
1. P ₄₀₇ 18%	19	31,4	46	4300	27
2. P ₄₀₇ 18%, HPMC 1%	33	487	46	4810	13
3. P ₄₀₇ 18%, P ₁₈₈ 1%	16,5	25	62,5	4560	46
4. P ₄₀₇ 18%, P ₁₈₈ 1%, HPMC 1%	31	452	48	4730	17
5. P ₄₀₇ 21%	13,5	41,9	41	3140	27,5
6. P ₄₀₇ 21%, HPMC 1%	24,5	591	37,5	3780	13
7. P ₄₀₇ 21%, P ₁₈₈ 5%	5	87	63,5	4780	58,5
8. P ₄₀₇ 21%, P ₁₈₈ 5%, HPMC 1%	14,5	625	49	4610	34,5

Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da sta imeli obe formulaciji, ki sta vsebovali le P407 podoben čas geliranja. Najnižji čas geliranja sta imeli obe formulaciji, ki sta vsebovali kombinacijo P407 in HPMC. Čas geliranja je bil pri obeh koncentracijah P407 enak, kar pomeni, da zvišanje deleža z 18% (m/m) na 21% (m/m) ni vplivalo na čas geliranja. Po drugi strani pa smo pri primerjavi obeh formulacij, ki sta vsebovali le P407 s formulacijama, ki sta imeli dodano tudi HPMC, ugotovili, da se je z dodatkom HPMC čas geliranja opazno znižal (preglednica IV).

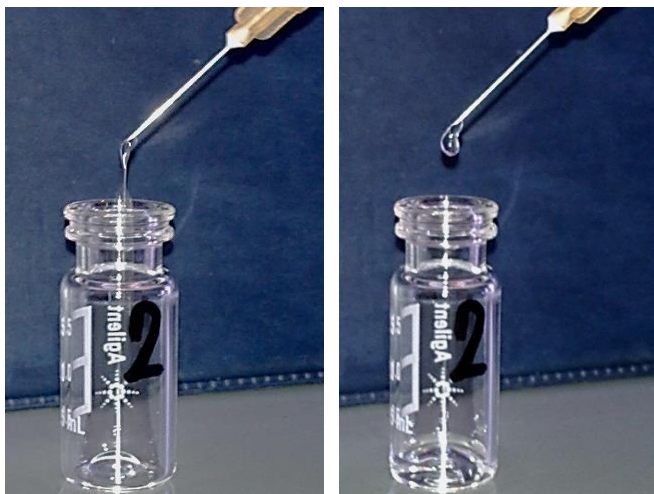
Najdaljši čas geliranja sta imeli formulaciji, ki sta vsebovali kombinacijo obeh poloksamerov. Pri tem smo opazili, da se je s povečanjem deleža poloksamerov tudi čas geliranja opazno podaljšal. Ker podaljšanja časa geliranja nismo opazili pri hidrogelih, ki P188 niso vsebovali, lahko zaključimo, da je na čas geliranja vplivalo zvišanje deleža P188 iz 1% (m/m) na 5% (m/m) (preglednica IV).

Pri formulaciji 4, ki je vsebovala kombinacijo vseh treh polimerov, smo opazili, da je bil čas geliranja sicer podoben kot pri formulaciji 2, ki je vsebovala le P407 in HPMC v enakih deležih, a je bil zaradi dodatka P188 nekoliko višji. To je bilo še bolj opazno pri formulaciji 8, ki je imela čas geliranja močno podaljšan v primerjavi s formulacijo 6, ki je vsebovala le P407 in HPMC v enakih deležih (preglednica IV).

43. IIL. SKLOP MERITEV: PREIZKUŠANJE SPOSOBNOSTI SUBKUTANE APLIKACIJE HIDROGELOV

4.3.1. Preizkus iztisljivosti skozi iglo (»syringeability and injectability test«)

Pri lahko iztisljivih hidrogelih smo vzorec iztisnili skozi 25G iglo brez večjega napora, tekočina pa je skozi iglo prišla sprva v obliki hitrega kapljanja, ki je nato prešlo v curek. Za iztis formulacij v kategoriji »iztisljivo« je bilo potrebno že močnejše iztiskanje. Tekočina, ki je prišla skozi iglo je bila viskozna ali zelo viskozna in je ves čas iztisa počasi kapljala (velike kapljice), oziroma je kapljanje prešlo v neenakomeren curek (polcurek) (slika 38). Podobno smo opazili tudi pri težko iztisljivih hidrogelih, le da je bilo pri tej kategoriji potrebno še močnejše iztiskanje. V obeh primerih zelo težko iztisljivih hidrogelov je bil upor tekočine v brizgi tako velik, da se je ob povečevanju sile iztiskanja igla ločila od brizge. Tekočina je skozi iglo prihajala po kapljicah (do ločitve igle od brizge).



Slika 38: Primer iztisa formulacij skozi hipodermalno iglo.

Preglednica V: Iztisljivost formulacij hidrogelov pri dveh različnih velikostih hipodermalnih igel.

Formulacija (vsebnost v % m/m)	Igla	Iztisljivost (»injectability«)
1. P ₄₀₇ 18%	25G	Lahko iztisljivo
	21G	Lahko iztisljivo
2. P ₄₀₇ 18%, HPMC 1%	25G	Iztisljivo
	21G	Lahko iztisljivo
3. P ₄₀₇ 18%, P ₁₈₈ 1%	25G	Lahko iztisljivo
	21G	Lahko iztisljivo
4. P ₄₀₇ 18%, P ₁₈₈ 1%, HPMC 1%	25G	Iztisljivo
	21G	Lahko iztisljivo
5. P ₄₀₇ 21%	25G	Lahko iztisljivo
	21G	Lahko iztisljivo
6. P ₄₀₇ 21%, HPMC 1%	25G	Težko iztisljivo
	21G	Lahko iztisljivo
7. P ₄₀₇ 21%, P ₁₈₈ 5%	25G	Zelo težko iztisljivo - igla se loči od brizge
	21G	Lahko iztisljivo
8. P ₄₀₇ 21%, P ₁₈₈ 5%, HPMC 1%	25G	Zelo težko iztisljivo - igla se loči od brizge
	21G	Iztisljivo

Po pričakovanjih pri prvi formulaciji, ki je vsebovala le P₄₀₇ (18% m/m), z iztisom skozi 25G iglo ni bilo težav. Pri formulaciji 5 z višjim deležem P₄₀₇ (21% m/m) je bilo sicer potrebno nekoliko močnejše iztiskati kot pri formulaciji 1, vendar pa je bilo tu potrebno šibkejše iztiskanje v primerjavi s kategorijo »iztisljivo«, tekočina pa je skozi iglo prišla v curku. Tako smo formulaciji 1 in 5 uvrstili v enako skupino (preglednica V).

Pri hidrogelih, ki so vsebovali tudi HPMC, smo zaradi višje viskoznosti raztopin pričakovali slabšo iztisljivost. Ugotovili smo, da se je z dodatkom HPMC iztisljivost skozi 25G iglo res poslabšala. Prav tako smo opazili, da so bili HPMC-vsebujoči hidrogeli z nižjim deležem poloksamerov lažje iztisljivi kot HPMC-vsebujoči hidrogeli z višjim deležem poloksamerov. Pri vseh formulacijah, ki so vsebovale HPMC, se je iztisljivost opazno izboljšala pri iztisu skozi širšo, 21G iglo (preglednica V).

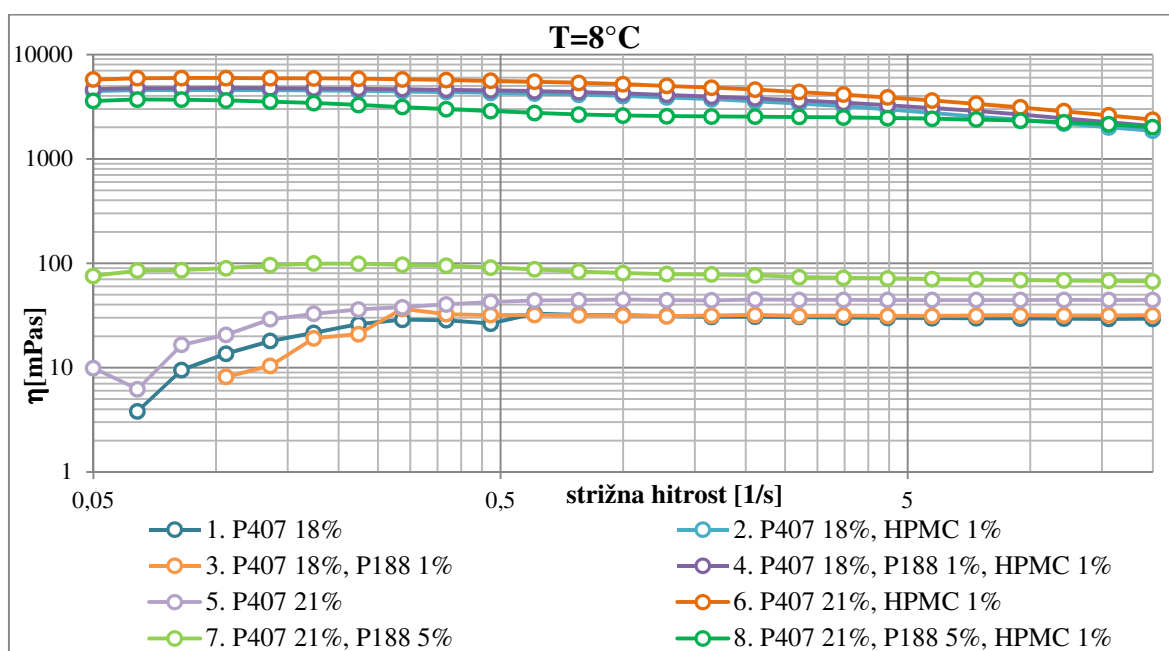
Za formulaciji 3 in 7, ki sta vsebovali kombinacijo obeh poloksamerov (P₄₀₇ in P₁₈₈) v različnih deležih, smo zaradi nizke viskoznosti raztopin pričakovali podobno iztisljivost kot pri formulacijah, ki sta vsebovali le P₄₀₇. V primeru 3. formulacije je bilo temu res

tako. V nasprotju s pričakovanji pa smo formulacijo 7, ki je vsebovala večji delež P188 (5%), zelo težko iztiskali skozi 25G iglo in pred koncem iztisa se je igla ločila od brizge. Pri iztisu skozi 21G iglo se je iztisljivost opazno izboljšala, v obeh primerih iztisa formulacije 7 pa je bila tekočina po iztisu rahlo bolj viskozna kot pred iztisom (preglednica V).

Tudi pri formulacijah 4 in 8, ki sta vsebovali kombinacijo vseh treh polimerov, smo opazili, da se je s povečanjem deleža poloksamerov iztisljivost opazno poslabšala in smo slabšo iztisljivost formulacije 8 opazili tako pri 25G igli, kjer se je igla ločila od brizge, kot tudi pri 21G igli, kjer je bilo potrebno močnejše iztiskanje kot v ostalih primerih iztisa skozi to velikost igle (preglednica V).

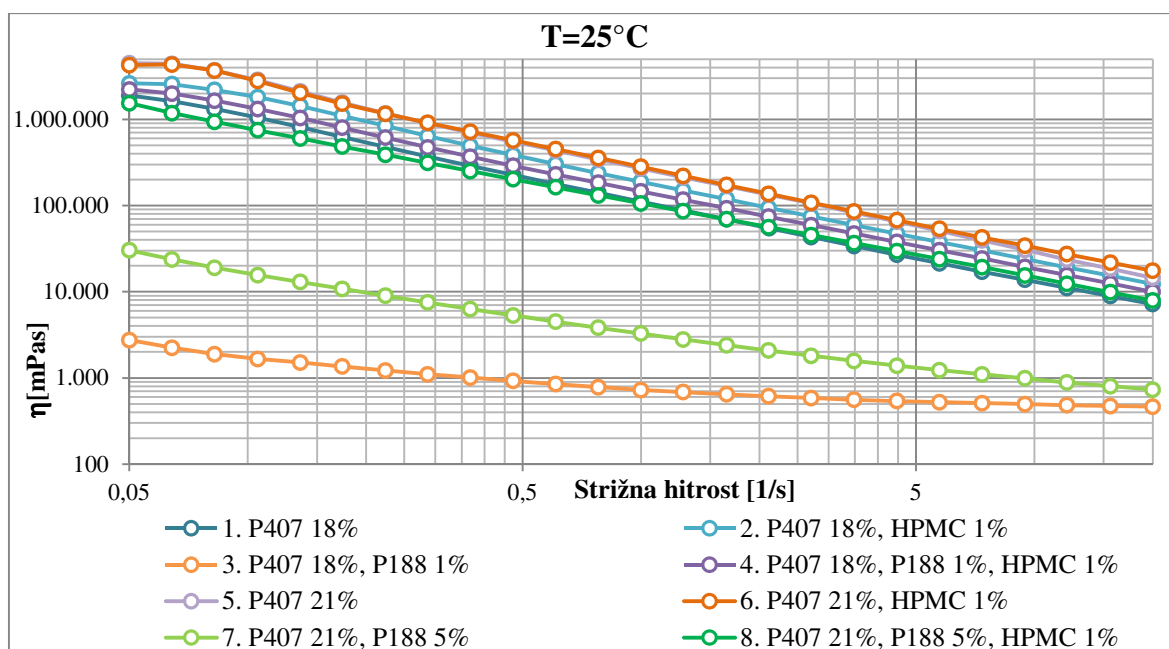
4.3.2. Vpliv strižne hitrosti na viskoznost hidrogelov

Pri 8°C, začetni temperaturi hidrogelov pri preizkusu iztisa skozi iglo, smo zasledili rahlo upadanje krivulje viskoznosti le pri HPMC-vsebujočih hidrogelih, medtem ko so pri formulacijah 1, 3 in 5 vrednosti viskoznosti na začetku obremenitve celo nekoliko narastle (slika 39).



Slika 39: Viskoznost hidrogelov v odvisnosti od strižne hitrosti pri temperaturi $T=8^{\circ}\text{C}$.

Ugotovili smo, da je pri 25°C viskoznost z naraščajočo strižno hitrostjo ($\dot{\gamma}$) upadala. Nižanje vrednosti je bilo prisotno pri vseh hidrogelih, vendar pa je krivulja viskoznosti pri formulacijah 3 in 7 upadala z manj strmo (slika 40).



Slika 40: Viskoznost hidrogelov v odvisnosti od strižne hitrosti pri temperaturi $T=25^{\circ}\text{C}$.

Z rezultati meritev viskoznosti v odvisnosti od strižne hitrosti nismo uspeli razložiti nepričakovanih rezultatov preizkusa iztisa hidrogelov skozi iglo.

5. SKLEP

Temperaturna odvisnost v intervalu 10-40°C:

- Frekvenca je imela močan vpliv na proces geliranja, tako da so formulacije, merjene pri 0,1Hz, gelirale pri nižji temperaturi kot pri 0,01Hz.
- Strižna deformacija (γ) ni imela vpliva na T_{gel} .
- Pri formulacijah 1,2,4,5 in 6 so se dobljene T_{gel} ujemale s predhodno določenimi T_{gel} .
- Pri formulacijah 3 in 7 T_{gel} nismo mogli določiti.
- Pri formulaciji 8 smo določili T_{gel} kot zadnje presečišče krivulj, a je bila le-ta mnogo višja kot predhodno določena T_{gel} . Krivulji obeh modulov sta bili bolj podobni krivuljam modulov 3. in 7. formulacije, iz česar smo lahko sklepali, da je vpliv dodatka P188 v formulaciji 8 prevladoval kljub dodani HPMC.
- Zvišanje koncentracije P407 v formulaciji je znižalo T_{gel} .
- Dodatek HPMC je znižal T_{gel} formulacij.
- Dodatek P188 je zvišal T_{gel} pri formulaciji 4.

Temperaturna odvisnost v intervalu 40-10°C:

- Za večino formulacij smo lahko potrdili $T_{gel-sol}$. Faznega prehoda nismo mogli določiti pri formulaciji 7, kjer se niti padec krivulje elastičnega modula niti točka ločitve krivulj obeh modulov nista ujemala s predhodno določeno T_{gel} .
- Med zniževanjem temperature ni prišlo do presečišča krivulj, vzorci pa so izkazovali elastične lastnosti ($G' > G''$) tudi pri temperaturah daleč pod T_{gel} . To je lahko posledica izhlapevanja vode iz vzorcev med meritvijo.
- Ugotovili smo, da ta način meritve ni najboljši za določanje T_{gel} , saj spremembe krivulj obeh modulov niso vedno dovolj izrazite. Ob primerjavi z neko predhodno določeno vrednostjo T_{gel} pa s temi meritvami lahko potrdimo predhodne rezultate.

Rotacijska viskometrija

- Povišanje deleža P407 ni imelo vpliva na čas geliranja.
- Dodatek HPMC je čas geliranja znižal.
- Dodatek P188 in višanje njegovega deleža sta zvišala čas geliranja formulacij.

Preizkus iztisljivosti skozi hipodermalno iglo

- Formulacije 1,3 in 5 so bile lahko iztisljive že pri iztisu skozi 25G iglo.
- Zvišanje koncentracije P407 v formulaciji je le v manjši meri vplivalo na iztis.

- Formulaciji 7 in 8 sta bili zelo težko iztisljivi, saj se je igla ločila od brizge pri iztisu skozi 25G iglo. Rezultat iztisa 7. formulacije skozi 25G iglo je bil v nasprotju s pričakovanji.
- Z dodatkom HPMC se je iztisljivost skozi 25G iglo poslabšala. HPMC-vsebujoči formulaciji z nižjim deležem poloksamerov (formulaciji 2 in 4) sta bili lažje iztisljivi kot HPMC-vsebujoči formulaciji z višjim deležem poloksamerov (formulaciji 6 in 8).

Vpliv strižne hitrosti na viskoznost hidrogelov

- Z rezultati meritev nismo uspeli obrazložiti rezultatov preizkusa iztisa skozi iglo. Morda bi bilo smiselno opraviti meritev odvisnosti viskoznosti od strižne hitrosti pri naraščajoči temperaturi $T=8-25^{\circ}\text{C}$. Med iztisom se je formulacija namreč segrevala iz temperature hladilnika na sobno temperaturo, tako da smo imeli med iztisom formulacije skupen vpliv temperature in strižne sile.

Rezultati reološkega vrednotenja različnih formulacij hidrogelov so pokazali, da so izbira merilnega sistema, iskanje ustreznih pogojev merjenja in predhodna strižna zgodovina formulacij zelo pomembni dejavniki, ki vplivajo na meritve in dobljene rezultate. Tako lahko na primer uporaba sistema plošča-plošča namesto sistema stožec-plošča ali majhne spremembe pogojev merjenja dajejo popolnoma različne rezultate.

6. LITERATURA

1. Formularium Slovenicum 3.0: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji na spletu: <http://www.formularium.si/>, dostopano: junij 2012.
2. Peppas N. A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H.: Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 27-46.
3. Hennink W. E., van Nostrum C. F.: Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 13-36.
4. Hoare T. R., Kohane D. S.: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008; 49: 1993-2007.
5. Van Tomme S. R., Storm G., Hennink W. E.: *In situ* gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm* 2008; 355: 1-18.
6. Klouda L., Mikos A. G.: Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68: 34-45.
7. Fusco S., Borzacchiello A., Netti P. A.: Perspective on: PEO-PPO-PEO triblock copolymers and their biomedical applications. *J Bioact Compat Polym* 2006; 21: 149-164.
8. Dumortier G., Grossiord J. L., Agnely F., Chaumeil J. C.: A review of Poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 2006; 23: 2709-2728.
9. Lutrol[®] L and Lutrol F-grades. Technical information. BASF 2010.
10. He C., Kim W. S., Lee D. S.: *In situ* gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *J Control Release* 2008; 127: 189-207.
11. Wei G., Xu P., Ding T. P., Li S. M., Zheng J. M.: Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. *J Control Release* 2002; 83: 65-74.
12. Ruel-Gariépy E., Leroux J. C.: In situ-forming hydrogels – review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 409-426.
13. METHOCEL[™] Product information. Colorcon 2009.

14. <http://en.wikipedia.org/wiki/HPMC>, dostopano: februar 2013.
15. Using METHOCEL cellulose ethers for controlled release of drugs in hydrophilic matrix systems. Colorcon 2000: 4-11.
16. Nanjawade B. K., Manvi F. V., Manjappa A. S.: In situ-forming hydrogels for sustained ophthalmic drug delivery. J Control release 2007; 122: 119-134.
17. Kansky A., Miljković J., et al.: Kožne in spolne bolezni. II. dopolnjena izdaja, Združenje slovenskih dermatovenerologov, Ljubljana, 2009; 11-17.
18. Šmitek J.: Parenteralno dajanje zdravil – intramuskularna injekcija. Obzor Zdr N 2005; 39: 63-71.
19. Vaje iz fizikalne farmacije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2006; 39-49.
20. Valant A. Z.: Uvod v reologijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2007; 9-66, 89-97.
21. Aulton M. E.: Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines, 3rd edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007; 55.
22. Mayol L., Quaglia F., Borzacchiello A., Ambrosio L., La Rotonda M. I.: A novel poloxamers/hyaluronic acid *in situ* forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and *in vitro* release properties. Eur J Pharm Biopharm 2008; 70: 199-206.
23. Veyries M. L., Couarraze G., Geiger S. Agnely F. Massias L., Kunzli B., Faurisson F., Rouveix B.: Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. Int J Pharm 1999; 192: 183-193.
24. Xuan J. J., Balakrishnan P., Oh D. H., Yeo W. H., Park S. M., Yong C. S., Choi H. G.: Rheological characterization and in vivo evaluation of thermosensitive poloxamer-based hydrogel for intramuscular injection of piroxicam. Int J Pharm 2010; 395: 317-323.
25. Ur-Rehman T., Tavelin S., Gröbner G.: Chitosan *in situ* gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. In J Pharm 2011; 409: 19-29.

26. Simões S. M. N., Veiga F., Torres-Labandeira J. J., Ribeiro A. C. F., Sandez-Macho M. I., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C.: Syringeable Pluronic- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 80: 103-112.
27. Grassi G., Crevatin A., Farra R., Guarnieri G., Pascotto A., Rehimers B., Lapasin R., Grassi M.: Rheological properties of aqueous Pluronic-alginate systems containing liposomes. *J Colloid Interface Sci* 2006; 301: 282-290.
28. Gratieri T., Gelfuso G. M., Rocha E. M., Sarmiento V. H., de Freitas O., Fonseca R., Lopez V.: A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 75: 186-193.
29. Choi H. G., Jung J. H., Ryu J. M., Yoon S. J., Oh Y. K., Kim C. K.: Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. *Int J Pharm* 1998; 165: 33-44.
30. Balažek S.: Izdelava in vrednotenje termoreverzibilnih hidrogelov za podkožno aplikacijo heparina. Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
31. http://www.anton-paar.com/MCR-Rheometer-Series/Rheometer/60_Corporate_en?product_id=45#Specifications, dostopano: avgust 2012.