

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MIHAEL LAH

**VPLIV IONSKE MOČI RAZTOPIN NA MEHANSKE
LASTNOSTI KSANTANSKIH VERIG IN NA
NABREKANJE TABLET**

**INFLUENCE OF IONIC STRENGTH OF SOLUTIONS
ON THE MECHANICAL PROPERTIES OF XANTHAN
CHAINS AND ON SWELLING TABLETS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Saši Baumgartner, za strokovno pomoč in usmerjanje pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi somentorici doc. dr. Biljani Janković za številne nasvete in pomoč pri eksperimentalnem delu ter pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

Posebno se zahvaljujem moji družini, Katji in prijateljem za podporo, spodbudo in potrpežljivost pri študiju in izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Saše Baumgartner in somentorstvom doc. dr. Biljane Janković.

Mihael Lah

Ljubljana, september 2013

Predsednica diplomske komisije: *prof. dr. Janja Marc, mag. farm.*

Član diplomske komisije: *doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.*

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

Somentorica: *doc. dr. Biljana Janković, mag. farm.*

KAZALO

POVZETEK	5
ABSTRACT	7
SEZNAM OKRAJŠAV	9
1 UVOD	10
1.1 Tablete s podaljšanim sproščanjem	11
1.1.1 Sproščanje nadzorovano z difuzijo	11
1.1.2 Sproščanje nadzorovano z raztapljanjem	12
1.2 Ogrodne tablete	12
1.2.1 Hidrofilne ogrodne tablete	12
1.3 Mehanske lastnosti snovi	14
1.3.1 Mehanske lastnosti polimernih verig	15
1.4 Vrstična preiskovalna mikroskopija	17
1.4.1 Mikroskopija na atomsko silo	18
1.5 Instrumentalna nanoindentacija	21
1.5.1 Analiza krivulje sila/globina vtisa	22
1.6 Ksantan	24
1.6.1 Struktura	24
2 NAMEN DELA	26
3 EKSPERIMENTALNO DELO	27
3.1 MATERIALI	27
3.2 NAPRAVE	27
3.3 POSTOPKI IN METODE	28
3.3.1 Priprava medijev za določanje nabrekanja in erozije, za pripravo raztopin za AFM in za pripravo filmov za nanoindentacijo	28
3.3.2 Izdelava tablet za vrednotenje nabrekanja in erozije	28
3.3.3 Priprava vzorcev za AFM slikanje	29
3.3.4 Priprava filmov za instrumentalno nanoindentacijo	29
3.3.5 Določanje stopnje nabrekanja in erozije	30
3.3.6 AFM analiza posameznih polimernih verig ksantana	31

3.3.7 AFM nanoindentacija polimernih filmov iz ksantana	32
3.3.8 Izdelava tablet in določanje hitrosti njihovega omočenja.....	33
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1 Nabrekanje in erozija ogrodnih tablet iz ksantana.....	34
4.2 AFM analiza posameznih polimernih verig ksantana	38
4.3 Instrumentalna nanoindentacija polimernih filmov iz ksantana.....	41
4.4 Povezave makro/mikro lastnosti sistemov na osnovi ksantana	43
4.4.1 Korelacije med razsežnostnim (<i>bulk</i>) in molekularnim (<i>single</i>) nivojem	43
4.4.2 Napovedovanje nabrekanja ksantanskih filmov	45
4.5 Hitrost omočenja	47
5 SKLEPI	49
6 LITERATURA	51

POVZETEK

Cilji oblikovanja tablet s podaljšanim sproščanjem so zagotavljanje varnih, učinkovitih in bolniku prijaznih zdravil. S podaljšanim sproščanjem dosežemo manjšo pogostost odmerjanja in s tem povečano sprejemljivost s strani pacientov (komplianca), izboljšano učinkovitost zdravilne učinkovine s ciljanim delovanjem, znižanje odmerkov in hkrati omogočamo doseganje optimalnih koncentracij učinkovine v plazmi ter na takšen način zmanjšanje neželenih učinkov.

Namen diplomske naloge je bil oceniti stopnjo nabrekanja in erozije hidrofилnih ogrodnih tablet iz ksantana na osnovi mehanskih lastnosti polimernih verig oziroma mehanskih lastnosti polimernih filmov na razsežnostnem nivoju. Osnovni faktor, s katerim smo vplivali na način in stopnjo nabrekanja ksantanskih ogrodnih tablet, je bila ionska moč raztopin.

Na razsežnostnem (*bulk*) nivoju smo dokazali zmanjšanje hitrosti nabrekanja in erozije tablet s povečanjem ionske moči medijev (stopnja nabrekanja: prečiščena voda > 0,001 M HCl > NaCl > 0,08 M HCl; erozija: prečiščena voda > 0,001 M HCl > 0,08 M HCl > NaCl). Rezultate smo pojasnili s senčenjem negativno nabitih karboksilnih skupin in manjšim elektrostatskim odbojem med verigami v medijih večjih ionskih moči. Poleg vpliva ionske moči, smo opazili tudi vpliv pH-ja (0,08 M HCl ($\mu=0,08$ M); NaCl ($\mu=0,2$ M)) na stopnjo nabrekanja ksantanskih ogrodnih tablet.

Za pojasnitev obnašanja ogrodnih tablet v medijih različnih ionskih moči smo uporabili metodi instrumentalne nanoindentacije in mikroskopije na atomsko silo. V ta namen smo najprej pripravili tanke filme iz raztopin ksantana z različnimi ionskimi močmi. Mehanske lastnosti smo opisali z *Young*-ovim modulom (parameter elastičnosti) ter vtisno trdnostjo (parameter plastičnosti). Rezultati kažejo, da z višanjem ionske moči medijev in znižanjem pH-ja postane film ksantana manj plastičen, kar je razvidno iz povečanega *Young*-ovega modula in vtisne trdnosti. To je posledica manjšega elektrostatskega odboja med verigami ksantana zaradi senčenja negativno nabitih karboksilnih skupin (raztopina NaCl) in nevtralizacije karboksilnih skupin s H^+ (0,08 M raztopina HCl). Večji *Young*-ov modul polimernega filma pomeni nižjo stopnjo nabrekanja v medijih višje ionske moči, kar smo potrdili na primeru ogrodnih tablet.

Ker so lastnosti na razsežnostni ravni posledica urejenosti strukture na molekularnem nivoju, smo določili tudi vpliv ionske moči medijev na mehanske lastnosti posameznih polimernih verig. Z večanjem ionske moči medijev se persistentna dolžina posameznih polimernih verig manjša (prečiščena voda > 0,001 M HCl > 0,08 M HCl > NaCl). Podoben trend smo ugotovili za vztrajnostni polmer (prečiščena voda > 0,001 M HCl > 0,08 M HCl > NaCl).

Nazadnje smo določili korelacije med posameznimi parametri na razsežnostni in molekularni ravni. Na razsežnostnem nivoju smo ugotovili linearno korelacijo med stopnjo nabrekanja in *Young*-ovim modulom ($R^2 = 0,979$) ter stopnjo nabrekanja in vtisno trdnostjo ($R^2 = 0,932$). Da je dogajanje na makroskopskem nivoju posledica dogajanja na molekularnem, smo ugotovili z linearno korelacijo med persistentno dolžino in *Young*-ovim modulom ($R^2 = 0,746$) ter vztrajnostnim polmerom in hitrostjo nabrekanja tablet ($R^2 = 0,780$).

ABSTRACT

The purpose of prolonged release tablets design is to provide safe, effective and patient-like medicines. With prolonged release is achieved less frequent dosing and increased patient compliance, improved efficiency and reduction of dose of active substance, less side effects due to optimal plasma levels of drug.

The purpose of diploma research was to evaluate degree of swelling and erosion of xanthan hydrophilic matrix tablets according to mechanical properties of single polymeric chains as well as mechanical properties of polymer films at a bulk level. Basic factor that had influenced on a way and degree of swelling xanthan matrix tablets was the ionic strength of solutions.

On the bulk level, reduction of swelling degree and tablet erosion in accordance to solutions ionic strength (swelling degree: distilled water > 0,001 M HCl > NaCl > 0,08 M HCl; erosion: distilled water > 0,001 M HCl > 0,08 M HCl > NaCl) was determined. The results can be explained with shading of negatively charged carboxylic groups and diminished electrostatic repulsions between the individual polymer chains in solutions with higher ionic strength. Beside the influence of ionic strength is also observed pH effect (0,08 M HCl ($\mu=0,08$ M); NaCl ($\mu=0,2$ M)) on swelling degree of xanthan matrix tablets.

To explain behavior of matrix tablets in solutions with different ionic strength, two methods were used: instrumental nanoindentation and atomic force microscopy. For that purpose the thin films from xanthan solutions with different ionic strength were prepared. Mechanical properties of films were evaluated with Young's modulus (parameter of elasticity) and hardness (parameter of plasticity). The results showed (increased Young's modulus and hardness) that the film of xanthan becomes less plastic with increasing of solution ionic strength and decreasing of pH. This is the consequence of reduced electrostatic repulsions between xanthan chains due to the shading of negatively charged carboxylic groups (NaCl solution) and neutralizing COO^- groups with H^+ (0,08 M HCl). Larger Young's modulus of polymeric films is related to lower degree of swelling in solutions of higher ionic strength, which was confirmed on the matrix tablet level.

Since the properties at the bulk level are closely related to the structural characteristics on the molecular scale, the main aim was to evaluate single mechanical properties of polymeric chains by using the atomic force microscopy. The persistence length of polymer chains is

reducing with increasing ionic strength of solutions (distilled water > 0,001 M HCl > 0,08 M HCl > NaCl). The similar trend was observed for radius of gyration (distilled water > 0,001 M HCl > 0,08 M HCl > NaCl).

Finally was determined the correlations between parameters on bulk and molecular level. At the bulk level was discovered linear correlation between the degree of swelling and Young's modulus ($R^2 = 0,979$) as well as swelling degree and hardness ($R^2 = 0,932$). The linear correlation between persistence length and Young's modulus ($R^2 = 0,746$) and also radius of gyration and swelling degree of tablets ($R^2 = 0,780$) indicate us that behavior at the bulk level is the result of action on the molecular level.

SEZNAM OKRAJŠAV

AFM – mikroskopija na atomsko silo (Atomic Force Microscopy)

E – elastični (Young-ov) modul

FS – Formularium Slovenicum (slovenski dodatek k evropski farmakopeji)

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

FO – farmacevtska oblika

HEMC – hidroksi etil metil celuloza

HPMC – hidroksi propil metil celuloza

HPC – hidroksipropil celuloza

MC – metil celuloza

NaCMC – natrijeva karboksimetil celuloza

T_m – temperatura konformacijskega prehoda

ZU – zdravilna učinkovina

XAN – ksantan

μ – ionska moč

1 UVOD

Zakon o zdravilih definira zdravilo kot vsako snov ali kombinacijo snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni pri ljudeh in živalih. Za zdravilo velja tudi vsaka snov ali kombinacija snovi, ki se lahko uporablja pri ljudeh ali živalih ali se daje ljudem ali živalim z namenom, da bi se ponovno vzpostavile, izboljšale ali spremenile fiziološke funkcije prek farmakološkega, imunološkega ali presnovnega delovanja ali da bi se določila diagnoza (1).

Na trg se zdravila dajejo v primerni farmacevtski obliki (FO). Poznamo različne FO, ki jih ločimo po načinu vnosa zdravilne učinkovine (ZU) v telo. Za kakšno FO se odločijo v procesu razvoja zdravila, je odvisno od fizikalno-kemijskih, farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti ZU (2). Zelo pomembna dejavnika, ki vplivata na izbor FO, sta tudi čim boljša terapevtska učinkovitost in sprejemljivost zdravila za uporabo s strani pacienta (komplianca) (3).

Peroralne FO so najpogostejša FO zdravil. Med njimi pa so najpogosteje uporabljene tablete (3, 4). Glede na način sproščanja ZU ločimo dve osnovni skupini FO (v našem primeru tablet). Prva skupina so FO z neprirejenim oziroma takojšnjim sproščanjem (ang. *immediate, conventional - release dosage forms*), pri katerih se ZU takoj po prihodu v GIT sprosti. Druga skupina pa so FO s prirejenim oziroma nadzorovanim načinom sproščanja (ang. *modified, controled – release dosage forms*), pri katerih je spremenjena hitrost, mesto ali čas sproščanja ZU, kar dosežemo s posebno sestavo, posebno FO ali posebnim postopkom izdelave (3, 5).

Tablete s prirejenim sproščanjem razdelimo glede na način sproščanja ZU na:

- tablete s podaljšanim sproščanjem (ang. *prolonged, sustained, extended, slow – release*), ki sproščajo ZU skozi daljše časovno obdobje;
- tablete z zakasnelim sproščanjem (ang. *delayed – release*), ki začnejo sproščati ZU z določenim časovnim zamikom;
- tablete s pulzirajočim sproščanjem (ang. *pulsatile – release*), ki sproščajo ZU v določenih časovnih intervalih (4, 5).

1.1 Tablete s podaljšanim sproščanjem

Pri oblikovanju tablet s podaljšanim sproščanjem se soočamo z različnimi mehanizmi, s katerimi dosežemo podaljšano sproščanje. Razdelimo jih v pet večjih skupin. Vsekakor pa je mehanizem sproščanja običajno kombinacija več različnih mehanizmov. V nalogi pa opisujemo dva najpogostejša.

1.1.1 Sproščanje nadzorovano z difuzijo

Osnova tega načina nadzorovanega sproščanja je difuzija molekul ZU skozi polimerno membrano ali iz polimernega ogrodja. Ločimo rezervoarne in ogrodne sisteme.

Rezervoarni sistem (Slika 1a) je sestavljen iz jedra, ki predstavlja rezervoar ZU, in polimerne obloge, ki nadzira sproščanje. Sproščanje (dm/dt) opišemo z Enačbo 1:

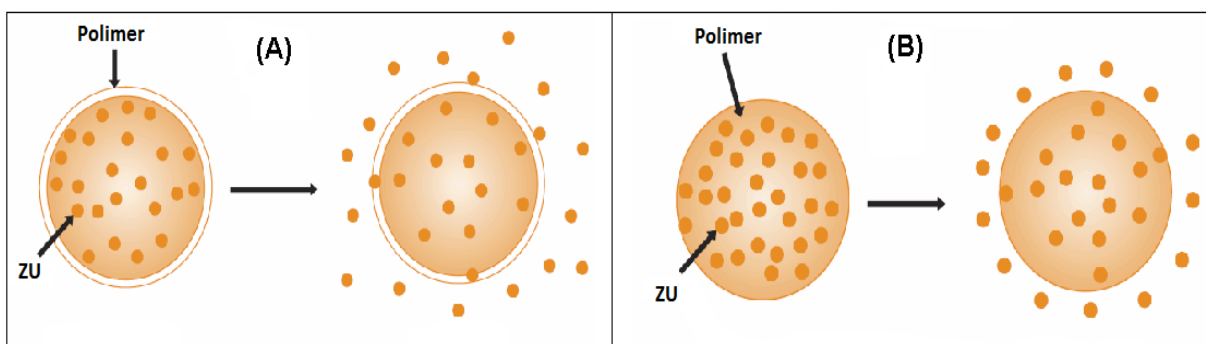
$$\frac{dm}{dt} = A \cdot D \cdot K \cdot \frac{\Delta c}{l} \quad \text{/Enačba 1/}$$

kjer je D difuzijski koeficient ZU, A je površina sistema, K je porazdelitveni koeficient ZU med jedrom in membrano, l je debelina difuzijske plasti in Δc je koncentracijski gradient ZU skozi membrano (3).

Druga možnost so ogrodni sistemi, ki so zaradi enostavne proizvodnje zelo pogosto v uporabi. Osnova teh sistemov je disperzija ZU v vodi netopnem ali v hidrofilnem polimeru (Slika 1b). Kinetiko sproščanja lahko predstavimo s *Higuchi*-jevo enačbo:

$$Q = S \cdot [D_s \cdot C_s \cdot \frac{p}{T} \cdot (2C_0 - pC_s) \cdot t]^{1/2} \quad \text{/Enačba 2/}$$

kjer je Q količina sproščene ZU, D_s je difuzijski koeficient v mediju za sproščanje, C_s je topnost ZU v mediju za sproščanje, p je poroznost ogrodja, T je vijugavost por v ogrodju in C_0 je celotna količina ZU na volumsko enoto ogrodja (3).



Slika 1: Shematski prikaz sproščanja nadzorovanega z difuzijo. 1a - rezervoarni sistem, 1b - ogrodni sistem (6).

1.1.2 Sproščanje nadzorovano z raztapljanjem

To lahko dosežemo z upočasnitvijo raztapljanja ZU v mediju za raztapljanje, z vgradnjo ZU v netopen polimer ali oblaganjem delcev ZU s polimernimi oblogami različne debeline. Faktor, ki upočasnjuje raztapljanje in s tem sproščanje, je difuzija ZU skozi vodno mejno plast. Raztapljanje (dm/dt), ki v tem primeru pomeni tudi sproščanje, lahko ponazorimo z Enačbo 3:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A \cdot D \cdot S}{h} \quad \text{/Enačba 3/}$$

kjer je S topnost ZU v vodi, A je površina delca, ki se raztaplja ali tablete, D je difuzijski koeficient ZU in h je debelina difuzijske plasti.

Prvi način za doseganje sproščanja nadzorovanega z raztapljanjem je enkapsulacija ZU z relativno netopnim polimerom v različno debelih plasteh. Take delce lahko potem napolnimo v kapsule ali jih stisnemo v tablete (3).

Druga in zelo pogosto uporabljena možnost je vgradnja ZU v hidrofobno ogrodje (npr. etilcelulozo, voske, polietilen, polipropilen) ali hidrofilno ogrodje (hidroksi propil metil celulozo - HPMC, hidroksipropil celulozo - HPC, metilcelulozo - MC, natrijeva karboksimetil celulozo - NaCMC). Tukaj je sproščanje nadzorovano s penetracijo vode v ogrodje (3).

1.2. Ogrodne tablete

Ogrodne tablete (ang. *matrix tablets*) so najpogosteje uporabljena FO za doseganje prirejenega sproščanja. Njihova široka uporaba je posledica enostavne sestave in proizvodnje. Zgrajene so iz funkcionalne pomožne snovi (polimera), ki tvori ogrodje in ZU, ki je v ogrodju enakomerno dispergirana. Glede na vrsto uporabljanega polimera ločimo hidrofobne in hidrofilne ogrodne tablete, bolj pogoste pa so hidrofilne (3, 4).

1.2.1 Hidrofilne ogrodne tablete

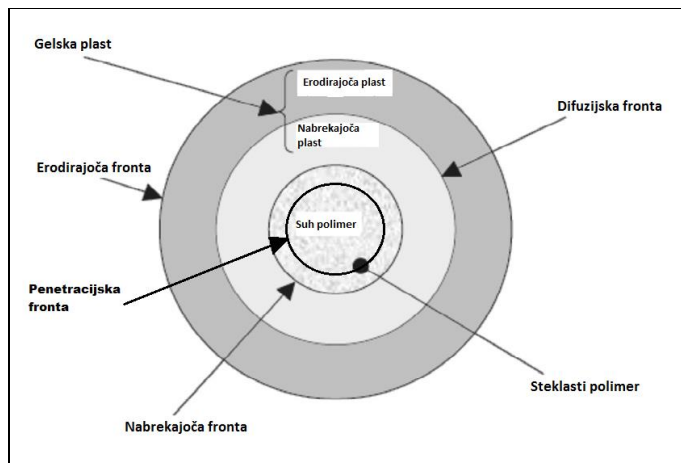
Hidrofilne ogrodne tablete so zgrajene iz hidrofilnega polimera in ZU, ki je enakomerno porazdeljena po celotnem volumnu tablete. Kot potencialni polimeri za pripravo hidrofilnih ogrodnih tablet s podaljšanim sproščanjem so bili preučeni že številni, tako naravni kot sintetični. Zelo pogosti so predvsem celulozni etri (HPMC, HEC, HPC), od naravnih pa ksantan (XAN), pektin, karagenan, galaktomanan, inulin (7, 8, 9).

Na sproščanje ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet imajo pomemben vpliv lastnosti ZU in polimera. Osnovni mehanizem sproščanja ZU v tem primeru predstavlja difuzija skozi gelsko barierno plast. Najpomembnejša od polimera odvisna procesa, ki vplivata na sproščanje, sta nabrekanje in polimerno raztapljanje oziroma erozija ogrodja (10).

Nabrekanje in erozija hidrofilnih ogrodnih tablet

Hidrofilna ogrodna tableta, preden pride v stik s topilom, vsebuje suh polimer (rigiden, ni sproščanja ZU). V stiku z medijem (voda, puferna raztopina) začne tekočina penetrirati v tableto in hidratirati polimer. Meja med suhim polimerom in hidratiranim polimerom v steklastem stanju je penetracijska fronta. Na površini se tvori plast hidrogela, v katerem polimer ni več v steklastem stanju, ampak molekule postanejo gibljive, saj temperatura prehoda steklastega polimera pade pod temperaturo sistema (hidratiran steklast polimer se pretvori v hidrogel – ang. *rubbery state*). V tableti nastanejo različne plasti polimera, kot to prikazuje Slika 2. Jedro tablete je še vedno suho, torej je polimer steklast. Na robu steklastega polimera je nabrekajoča fronta, ki predstavlja mejo med steklastim polimerom in nabrekajočo plastjo polimera. Nabrekajoča plast je na zunanji strani omejena z difuzijsko fronto. Ta predstavlja površino tablete, iz katere se sprošča ZU. V nabrekajoči plasti je ZU še ujeta v nastali hidrogel, difuzijska fronta pa predstavlja mejo, kjer so molekule ZU že dovolj mobilne, da začnejo z difuzijo prehajati iz sistema. Zunanji plasti, ki je najbolj oddaljena od jedra, pravimo erodirajoča plast. V tej plasti se molekule polimera že razpletejo in v raztopljenem stanju zapuščajo tableto (2, 10).

Iz zgoraj napisanega lahko zaključimo, da je glavna plast, ki nadzoruje sproščanje ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet, nabrekajoča plast. Zato je veliko raziskav narejenih prav na področju nabrekanja posameznih polimerov. Preučujejo se vplivi različnih raztopin na nabrekanje polimerov, na podlagi nabrekanja poskušajo napovedovati sproščanje, iščejo pa se tudi korelacije med obnašanjem polimerov na molekularnem nivoju in njihovim nabrekanjem na makroskopskem nivoju oziroma s hitrostjo raztapljanja ZU iz ogrodnih tablet.

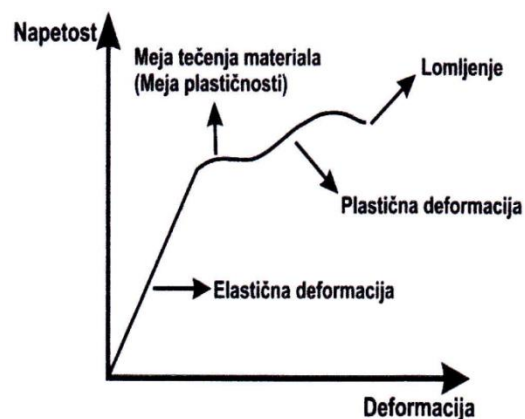


Slika 2: Plasti in fronte, ki se tvorijo med nabrekanjem hidrofilnih ogrodnih tablet (11).

1.3 Mehanske lastnosti snovi

Lastnosti snovi v osnovi razdelimo na kemijske, fizikalne in mehanske. Preučujemo jih lahko na dveh ravneh: razsežnostni oziroma makroskopski ravni (*bulk*) in na nivoju osnovnih molekul (delcev) oziroma mikroskopski ravni (*single*). Lastnosti na razsežnostni ravni so posledica vsote obnašanja osnovnih enot (interakcij, površinskih lastnosti). Lastnosti na mikroskopskem nivoju pa so posledica obnašanja posameznega osnovnega gradnika (npr. atoma, molekule) (12).

Mehanske (imenujemo jih tudi deformacijske) lastnosti snovi predstavljajo obnašanje snovi pod vplivom obremenitve. Razdelimo jih lahko v elastičnost, plastičnost in lomljenje. Na Sliki 3 je z diagramom napetost-deformacija predstavljen potek mehanskih spremembi v snovi pod vplivom obremenitve. V začetnem delu diagrama vidimo, da deformacija materiala narašča premosorazmerno z



Slika 3: Krivulja napetost/deformacija (12).

napetostjo. Če v tem območju vzorec razbremenimo, deformacija v celoti izgine, oziroma se material vrne v izhodiščno stanje. To območje imenujemo območje elastične deformacije in za njega velja *Hook-ov zakon*:

$$\frac{F}{S} = E \cdot \frac{\Delta l}{l}$$

/Enačba 4/

kjer (F/S) predstavlja obremenitev materiala (tlak), ($\Delta l/l$) deformacijo materiala (raztezek, skrčec) in E predstavlja modul elastičnosti (prožnostna konstanta) oziroma *Young*-ov modul. *Young*-ov modul lahko določimo iz naklona linearnega dela diagrama. Enoosni preizkusi kažejo, da je prečna deformacija (skrčec) v linearnem območju premosorazmerna vzdolžni deformaciji (raztezek). Razmerje med izmerjeno prečno in vzdolžno deformacijo imenujemo *Poisson*-ov količnik ali koeficient prečne kontrakcije (zoženja) (13).

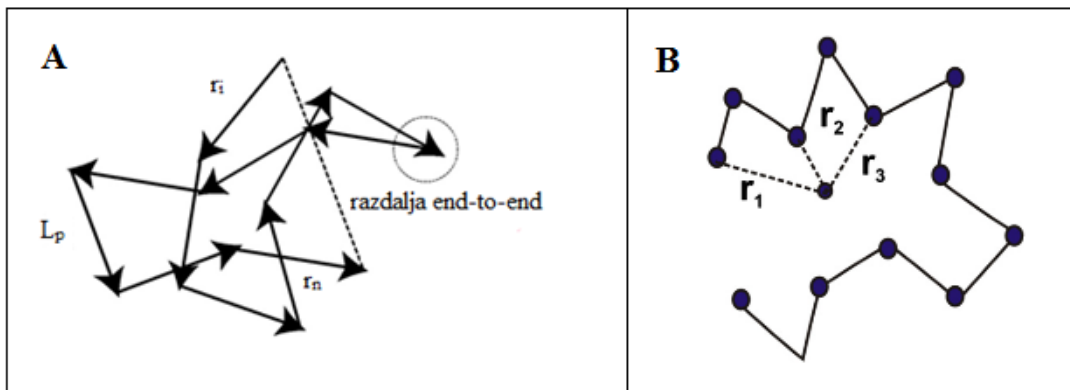
Nad mejo plastičnosti (meja tečenja) se materiali začnejo plastično deformirati, kar pomeni, da se ob razbremenitvi material ne vrne več v prvotno stanje. Ob nadaljnjem povečevanju obremenitve se lahko pojavi tudi lomljenje materiala oziroma fragmentacija (13).

1.3.1 Mehanske lastnosti polimernih verig

Polimeri so makromolekule sestavljene iz ponavljajočih se manjših monomernih enot. Delimo jih na naravne in sintezne, homopolimere (škrob, celuloza) in heteropolimere (nukleinske kisline (14).

Za razumevanje mehanskih lastnosti posameznih polimernih verig je potrebno definirati nekatere pojme:

- Dolžina konturja (ang. *contour length*): je dejanska razdalja vzdolž glavne verige polimerne molekule od i -tega do j -tega segmenta (L_{ij}). Celotna dolžina konturja (ang. *total contour length*) je razdalja od prvega do zadnjega segmenta ($L_0 = \sum_{i=1}^n r_i$) (Slika 4A).
- Razdalja "end-to-end" (ang. *end-to-end distance*): je razdalja med prvim in zadnjim segmentom polimerne verige (Slika 4A).
- Persistenčna dolžina (ang. *persistence length*): je dolžina konturja od i -tega do k -tega segmenta, kjer se izgubi smerna povezava med dvema segmentnima vektorjema (L_p – Slika 4A).
- Vztrajnostni polmer (ang. *radius of gyration*): je povprečna oddaljenost posameznega segmenta polimerne verige od masnega težišča celotne molekule (Slika 4B). Vztrajnostni polmer je bolj priročna oblika za izražanje velikosti linearnih in razvejanih polimerov (15).



Slika 4: A - Model polimerne verige kot prosto povezana veriga (ang. *Freely Jointed Chain* - FJC). Črtkana linija predstavlja razdaljo "end-to-end", L_p persistenčno dolžino in r_i dolžino posameznega segmenta (15). B - Vztrajnostni polmer: r_1 , r_2 in r_3 predstavljajo povprečno oddaljenost posameznih monomernih enot od centra mase polimera (16).

Modeli polimerov

Za opis mehanskih lastnosti polimernih verig se uporabljajo različni matematični modeli.

1) Model naključnega gibanja (ang. *random walk*)

Polimer je sestavljen iz N monomerov pri čemer ne upoštevamo lastne prostornine monomerov in korelacije med posameznimi členi verige. Naključno gibanje se začne v (poljubni) izhodiščni točki, ki predstavlja en konec polimera, in konča v končni točki, ki predstavlja drug konec polimera. Od enega do drugega konca pridemo v N korakih v naključni smeri, ki opisuje N naključno orientiranih, v verigo povezanih monomerov (Slika 4A).

Z vztrajnostnim polmerom (R_g), ki ga izračunamo v skladu z modelom naključnega hoda, ovrednotimo dimenzije polimera v raztopini. Izračunamo ga kot povprečje vsote kvadratov razdalj med posameznim monomerom in težiščem mase celotnega polimera:

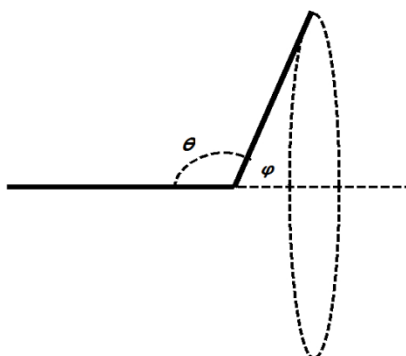
$$R_g = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (r_k - r_{mean})^2 \quad \text{/Enačba 5/}$$

kjer je N število monomerov v polimerni verigi, r_k je položaj k -tega monomera, r_{mean} pa položaj srednjega monomera (17).

2) Model prosto združene verige (ang. *Freely Jointed Chain* – FJC)

Osnovni model, ki opisuje idealno polimerno verigo, je model prosto združene verige (ang. *Freely Jointed Chain* – FJC). Ta predpostavlja, da so posamezni rigidni segmenti povezani z

univerzalnimi spoji, ki ne omejujejo relativne rotacijske svobode sosednjih segmentov (Slika 5). Tak polimer lahko zavzame številne konformacije (15).



Slika 5: Enostaven FJC model. θ predstavlja kot med dvema vezema, ϕ pa kot ki je posledica proste rotacije okrog svoje osi (15).

3) Model »črvom podobne verige« (ang. *Worm-like-chain model*)

Tretji model obravnava polimer kot "črvom podobno verigo" (ang. *worm-like-chain model* – WLC). Ta model za razliko od FJC predpostavlja polimerno verigo kot neskončno fleksibilno. V tem modelu je polimer karakteriziran z enim samim parametrom, fleksijsko persistenčno dolžino L_p . polimer je predstavljen kot črta, ki se gladko zvija zaradi naključnih termičnih fluktuacij. Po tem modelu je porazdelitev kotov med zaporednimi členi verige *Gauss*-ova in jo lahko zapišemo z nasledno enačbo:

$$P(\theta(l)) = \left(\frac{L_p}{2 \cdot \pi \cdot l}\right)^{\frac{1}{2}} \exp\left(-\frac{L_p \cdot \theta^2}{2 \cdot l}\right) \quad \text{/Enačba 6/}$$

kjer θ predstavlja kot pregiba, l razdaljo med dvema segmentoma in L_p perzistenčno dolžino polimera. Persistenčno dolžino nato izračunamo z uporabo Enačbe 7:

$$\langle \theta^2(l) \rangle = \left(\frac{l}{L_p}\right) \quad \text{/Enačba 7/}$$

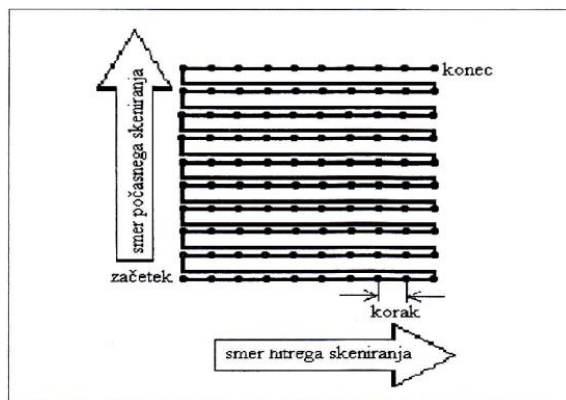
Z določitvijo persistenčne dolžine ovrednotimo glavno mehansko lastnost posameznih polimernih verig na molekularnem nivoju – togost (ang. *stiffness*) (18).

1.4 Vrstična preiskovalna mikroskopija

Z razvojem novih dostavnih sistem se vedno znova kaže tudi potreba po novih metodah za njihovo vrednotenje. Tako se je v 80. letih 20. stoletja razvila nova metoda za vrednotenje

površinskih lastnosti na nanometriškem nivoju, imenovana vrstična preiskovalna mikroskopija (*Scanning probe microscopy* – SPM). Osnovne vrste SPM tehnik so vrstična tunelska mikroskopija (ang. *Scanning Tunneling Microscopy*, STM), mikroskopija na atomsko silo (ang. *Atomic Force Microscopy*, AFM) ter bližnja vrstična optična mikroskopija (ang. *Near-field Scanning Optical Microscopy*, NSOM) (19). Skupno značilnost SPM metod je, da vzorcev ne opazujemo več s pomočjo elektromagnetnega valovanja (svetlobni in elektronski mikroskop), ampak površino "tipamo" (20).

Tipalo je sestavljeno iz nosilca in ostre konice. Med snemanjem tipalo privedemo v neposredno bližino površine vzorca, ali pa se z njo površine vzorca dotaknemo (odvisno od vrste SPM). Snemanje površine vzorca poteka tako, da konico sistematično pomikamo vzporedno po površini vzorca, kot to prikazuje Slika 6 (ang. *raster scanning*). Druga možnost, ki se pogosto uporablja, je, da premikamo vzorec glede na konico. Tako pridobimo podatke o topografiji vzorca in nekaterih drugih lastnostih (elastičnost, namagnetnost, naelektrenost), na izbranih koordinatah na površini vzorca (20).

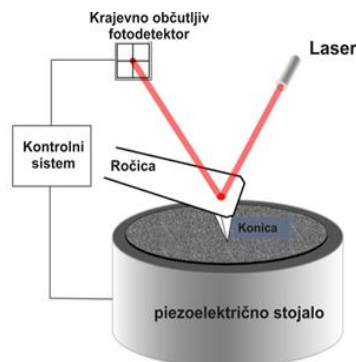


Slika 6: Način delovanja SPM. Podatki se zbirajo v smeri hitrega skeniranja, medtem ko se v nasprotni smeri ne zbirajo. Pravokotno na smer hitrega skeniranja je smer počasnega skeniranja, ki pomeni samo prehod skenerja v naslednjo vrstico (20).

1.4.1 Mikroskopija na atomsko silo

Mikroskopija na atomsko silo (AFM – *atomic force microscopy*) omogoča vizualizacijo prevodnih in neprevodnih vzorcev v tekočinah, zraku in vakuumu (19). Z njo topografsko preiskujemo površine velikosti do 100 μm v x in y smeri. Poleg tega jo uporabljamo za kvantitativno vrednotenje fizikalnih lastnosti materialov, kot so površinske, kemijske (lokalizacija različnih funkcionalnih skupin na površini), mehanske (elastičnost, plastičnost, viskoelastičnost/plastičnost), magnetne in elektrokemijske lastnosti (20).

Princip delovanja AFM (Slika 7) temelji na merjenju odmika tipala, ki ga premikamo po površini vzorca. Odmik tipala povzroči delovanje različnih sil med konico tipala in površino vzorca. Najpogostejše sile, ki se pri tem detektirajo, so *van der Waals*-ove, elektrostatske, magnetne, ionske in kapilarne. Upogib tipala določimo tako, da na vrh tipala svetimo z lasersko svetlobo. Odbiti laserski žarek detektiramo s krajevno občutljivim fotodetektorjem ter na ta način merimo vertikalni (topografija – razlika v napetosti med zgornjo in spodnjo fotodiodo) in lateralni (trenje – razlika v napetosti med levo in desno fotodiodo) premik konice (19).



Slika 7: Shematski prikaz delovanja AFM (12).

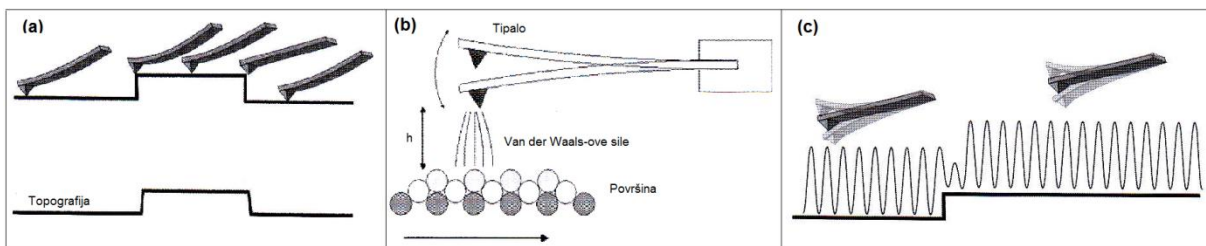
Načini snemanja površin vzorcev z AFM

Vzorec lahko z AFM vizualiziramo na različne načine in sicer:

- kontaktni način snemanja (ang. *contact mode*)
- nekontaktni način snemanja (ang. *non-contact mode*)
- tipalni način snemanja (ang. *tapping mode*)

Kontaktni način snemanja

Pri kontaktnem načinu snemanja površine vzorca privedemo konico tipala v stik s površino vzorca (Slika 8a). Ob stiku delujejo med njima medatomske odbojne sile. Obstajata dve različici kontaktnega načina snemanja. Prva možnost je delovanje mikroskopa pri konstantni sili. Pri tem načinu je vključena povratna zanka, ki omogoča, da se vertikalni položaj vzorca med meritvijo spreminja tako, da je sila med konico in vzorcem ves čas enaka. Tekom snemanja z dviganjem in spuščanjem vzorca sledimo ploskvi konstantne sile, oblika ploskve pa je enaka obliki površine, ki jo snemamo. Drugi način je delovanje mikroskopa pri konstantni višini. V tem primeru se položaj vzorca med snemanjem ne spreminja, ampak spremljamo lego tipala v vsaki točki skeniranja. Sila med konico in vzorcem se pri tem načinu spreminja. Kontaktni način uporabljamo za slikanje površin mehansko neobčutljivih vzorcev. Glede na to, da je konica v nenehnem stiku s površino vzorca, je možno s kontaktnim načinom doseči atomsko ločljivost (20).



Slika 8: Načini snemanja z AFM. a - kontaktni način, b - nekontaktni način, c - tiplni način (19).

Nekontaktni način snemanja

Za razliko od kontaktnega načina snemanja, kjer sta vzorec in konica tipala v neposrednem stiku, se pri nekontaktne načinu snemanja vzorec in konica ne stikata (Slika 8b). Tipalo niha z določeno amplitudo in lastno frekvenco na majhni oddaljenosti od vzorca (približno 1-10 nm). Pri tem delujejo med konico in vzorcem šibke privlačne sile (*van der Waals-ove*, elektrostatske, kapilarne), ki jih detektiramo. Ko pride konica tipala dovolj blizu vzorca, se znajde v polju prej naštetih sil, kar povzroči zmanjšanje frekvence osciliranja in zmanjšanje amplitude nihanja. Dobra lastnost te metode je nedestruktivnost, kar je še posebej pomembno pri snemanju površine občutljivih vzorcev (npr. biološki vzorci) (19, 20).

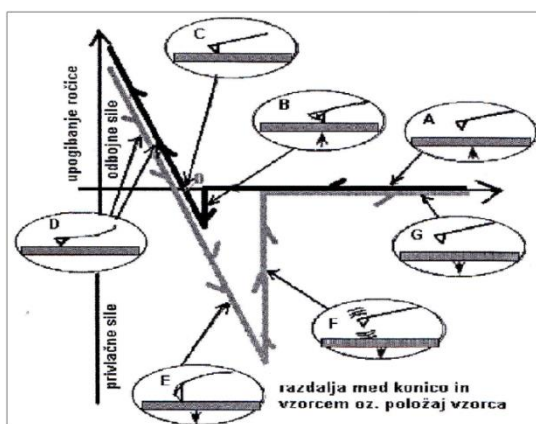
Tipalni način snemanja

V tem načinu snemanja ročica tipala niha z resonančno frekvenco, za kar potrebujemo mehanizem vzbujanja nihanja (Slika 8c). Za to poskrbi poseben piezoelement. Ko se tipalo tekom svojega nihalnega cikla dotakne površine, se amplituda nihanja zmanjša. To predstavlja merilo za ohranjanje konstantne razdalje med tipalom in površino vzorca. Tiplni način snemanja je primeren za občutljive vzorce. Kot problematične se lahko izkažejo mehke površine, saj se lahko ob stiku konica tipala kontaminira z vzorcem in povzroči dodatno obtežitev igle, to pa spremembo resonančne frekvence, zaradi česar je potrebno zamenjati konico (19, 20).

Spektroskopija sil (ang. Force spectroscopy)

Mikroskopija na atomsko silo ima številne možnosti uporabe. Topografsko preučevanje površin snovi je le ena izmed njih. Dodatno lahko z AFM posnamemo tudi silo med konico in površino vzorca v odvisnosti od razdalje med njima. To metodo imenujemo spektroskopija sil (ang. *Force spectroscopy*). Najpogosteje jo uporabljamo za merjenje adhezijskih sil in

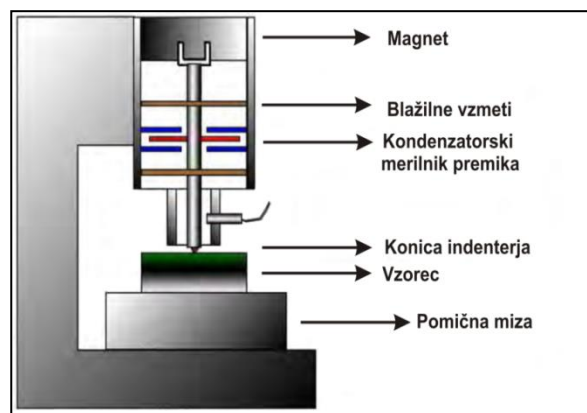
določanje nano-mehanskih lastnosti snovi (npr. elastičnost). Kot rezultat merjenja sil v izbrani točki na površini vzorca dobimo krivuljo sila/razdalja (ang. *force/distance*). Ta predstavlja v osnovi odvisnost upogiba tipala od premika piezoelektričnega vodila (Slika 9). Na začetku (položaj A) je konica daleč stran od vzorca in med njima ne deluje nobena sila. Nato se s konico začnemo približevati površini vzorca. V določenem trenutku se kontaminacijski plasti konice in vzorca zaradi delovanja kapilarnih sil stakneta. Pravimo, da konica "skoči" na površino vzorca (ang. *jump in*). Ta stik je odvisen od debeline plasti kondenzirane vlage na vzorcu, ki je prisotna, razen če meritve ne izvajamo v vakuumu. To povzroči rahel premik krivulje navzdol (položaj B). Ko sta vzorec in konica v stiku (položaj C, točka 0) začnejo delovati močne medatomske odbojne sile zaradi česar se začne ročica upogibati (položaj D). Sledi oddaljevanje konice od vzorca (položaj D), vendar ostaneta v stiku dokler sila ročice ne prevlada nad silo adhezije in se konica odbije od vzorca (položaj F) (20).



Slika 9: Shematski prikaz krivulje sila/razdalja in upogib ročice v odvisnosti od položaja vzorca (20).

1.5 Instrumentalna nanoindentacija

Instrumentalno nanoindentacijo izvajamo s pomočjo inštrumenta, ki se imenuje nanoindenter oziroma naprava za zaznavanje globine vtisa. Mehanske lastnosti različnih vrst materialov lahko določimo z nanoindenterjem na osnovi kontroliranega vtiskovanja diamantne konice v preiskovani vzorec. Shema

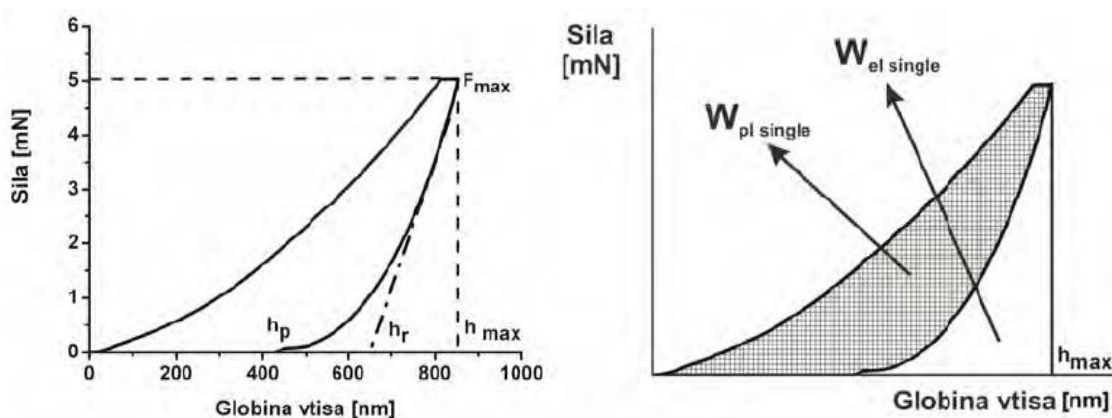


Slika 10: Shematičen prikaz nanoindenterja (12).

instrumenta je prikazana na Sliki 10.

Princip delovanja temelji na kontrolirani elektromagnetni obremenitvi konice, ki jo dovajamo proti vzorcu s pomočjo magneta in navitja nad nanoindenterjem. Ta nam omogoča natančen nadzor obremenitve in merjenje sile v merilnem območju od 10 nN do 10 N (12).

Nanoindentacija predstavlja kontrolirano kompresijo (vtiskovanje konice v vzorec) in dekompresijo (oddaljevanje konice v začetni položaj). Med ciklom obremenjevanja (*loading*) in razbremenjevanja (*unloading*) se zapisujejo podatki o globini in sili konice. Rezultat je krivulja, ki prikazuje odvisnost globine vtisa od uporabljene obremenitve (Slika 11 levo). Obtežitveni del krivulje opisuje odpornost vzorca proti prodiranju konice v material in posledično izraža elastične in plastične lastnosti preskušane materiala. Na drugi strani, pa razbremenitveni del krivulje vsebuje podatke o elastični relaksaciji vtisa (Slika 11 levo) (21).



Slika 11: Krivulja odvisnosti globine vtisa od sile levo (22) in deformacijske energije pri deformaciji vzorca z vtiskavanjem desno (21). Pomembni parametri so F_{max} – maksimalna sila stiskanja, h_{max} – maksimalna globina vtisa, h_p – globina vtisa po razbremenitvi, h_r – globina vtisa, ki odgovarja tangenti strmine razbremenitvene krivulje, $W_{el\ single}$ – energija elastične deformacije, $W_{pl\ single}$ – energija plastične deformacije.

1.5.1 Analiza krivulje sila/globina vtisa

Analiza temelji na predpostavki, da se površina pod konico deformira delno elastično in delno plastično. Na podlagi krivulj sila/globina vtisa in z upoštevanjem geometrije konice lahko izračunamo vtisno trdnost (H), *Young-ov* modul (E) na osnovi *Oliver-Pharr-ove* teorije in elastično (W_{el}) ter plastično energijo (W_{pl}) vzorca.

Osnovo *Oliver-Pharr-ovega* modela je postavil *Sneddon*, ki je prvi izračunal zvezo med silo (F), globino (h) in površino vtisa ob stiku polneskončno elastične površine ter toge konice različnih geometrij (Enačba 8):

$$F = \alpha(h - h_p)^m \quad \text{/Enačba 8/}$$

kjer je α konstanta odvisna od vrste materiala, m je konstanta odvisna od geometrije konice ($m = 1$ (ravni pečati); $m = 1.5$ (kroglasta in paraboloidna konica); $m = 2$ (stožčasta konica)), h je globina vtisa in h_p je globina vtisa po razbremenitvi.

Za določitev vtisne trdote (H) in *Young*-ovega modula (E) potrebujemo togost (S) in projekcijo površine kontakta med konico in vzorcem (A_p).

S predstavlja začetek strmine razbremenitvene krivulje (Slika 11 levo), ki jo lahko predstavimo z Enačbo 9. Stik med konico in vzorcem lahko v tem primeru modeliramo kot kontakt med popolnoma togo konico in izotropno snovjo z reduciranim elastičnim modulom E_r .

$$S = \frac{2}{\pi} E_r \sqrt{A_p} \quad \text{/Enačba 9/}$$

A_p je projekcija površine stika pri maksimalni sili, ki jo opisuje funkcija oblike konice $A_p = f(h_c)$. Ta za *Berkovich*-ev indenter znaša $23.96 h_c$.

Globino kontakta konice in vzorca pri maksimalni sili (h_c) dobimo kot:

$$h_c = h_{max} - \varepsilon_k(h_{max} - h_r) \quad \text{/Enačba 10/}$$

Young-ov modul preiskovanega materiala (E), lahko torej izračunamo z upoštevanjem *Young*-ovega modula (E_i) in *Poisson*-ovega števila (ν_i) diamantne konice (Enačba 11):

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu_i^2}{E_i} + \frac{1-\nu^2}{E} \quad \text{/Enačba 11/}$$

H predstavlja kvocient F_{max} in A_p in je merilo odpornosti materiala proti plastični deformaciji. Vtisna trdota je lahko opredeljena tudi kot odpornost materiala proti vdoru drugega telesa.

$$H = \frac{F_{max}}{A_p} \quad \text{/Enačba 12/}$$

Deformacijsko delo (W), kot vsoto elastičnega ($W_{el \text{ single}}$) in plastičnega ($W_{pl \text{ single}}$) prispevka, dobimo z integriranjem krivulje sile v odvisnosti od globine vtisa. Površina med obremenitveno in razbremenitveno krivuljo pomeni energijo plastične deformacije, energija elastične relaksacije pa odgovarja površini pod razbremenitveno krivuljo (Slika 11 desno) (12).

Kontinuirano merjenje togosti (ang. Continuous Stiffness Measurement - CSM)

CSM tehnika je ena izmed izboljšav klasičnega postopka nanoindentacije. Pri tej tehniki kontinuirano merimo globino, medtem ko vzorec obremenjujemo z manjšim dinamičnim nihanjem signala sile ter merimo fazni zamik pri vsaki določeni globini vtisa (najpogosteje na vsaka 2 nm) (23). Tako lahko, s pomočjo CSM tehnike, določamo *Young*-ov modul ter vtisno trdnost iz krivulje obremenjevanja in kot funkcijo globine vtisa.

Opisana tehnika nam ponuja nekaj prednosti. Z njo lahko kontinuirano spremljamo mehanske lastnosti kot funkcijo globine, kar je pomembno pri analizi heterogenih vzorcev. Ker osnovne količine mehanskih lastnosti pridobimo iz krivulje obremenjevanja, je čas analize značilno skrajšan. Omogoča nam tudi zelo natančno določitev točke kontakta konice indenterja s površino vzorca, kar je pomemben korak pri analizi večine podatkov pridobljenih z nanoindentacijo.

1.6 Ksantan

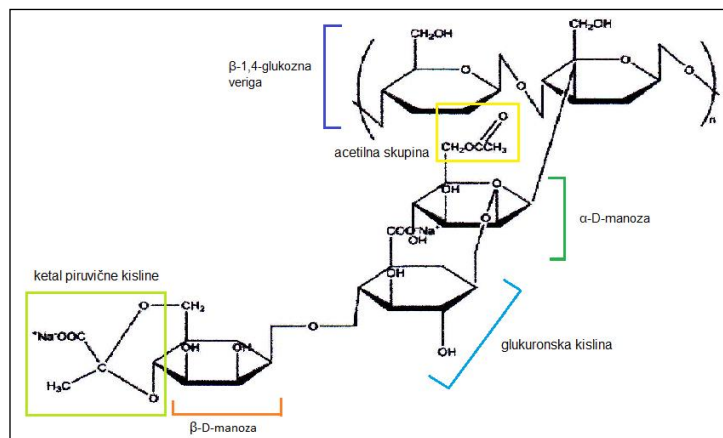
Ksantan (XAN) je naravni anionski ekstracelični polisaharid, ki ga proizvaja bakterija *Xanthomonas campestris*. Odkrili so ga v 50. letih 20. stoletja in ga nato zaradi njegovih uporabnih lastnosti začeli podrobno proučevati (24).

1.6.1 Struktura

XAN je heteropolisaharid, kar pomeni, da je sestavljen iz različnih monosaharidnih enot. Glavni gradnik primarne strukture je ponavljajoči se pentasaharidni fragment sestavljen iz dveh molekul glukoze, dveh molekul manoze in ene molekule glukuronske kisline (Slika 12) (24).

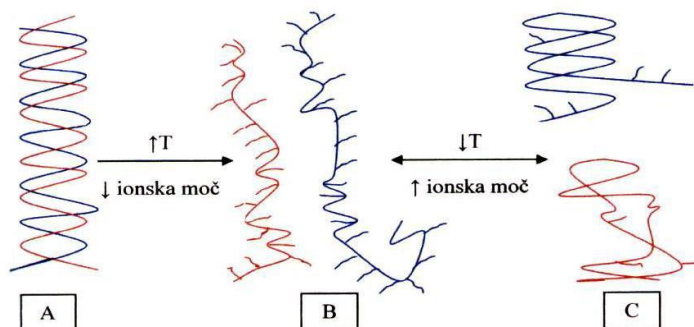
Osnovna veriga je zgrajena iz β -D-glukoznih enot povezanih z 1-4 glikozidno vezjo, kot pri celulozi. Na osnovno verigo je na vsako drugo glukozo na mestu O-3 pripeta trisaharidna stranska veriga sestavljena iz dveh D-manoz in ene D-glukuronske kisline, vezane med njima z glikozidno vezjo. Približno polovica terminalnih D-manoz vsebuje piruvatni ostanek v obliki ketala. Manoza, vezana na osnovno verigo, vsebuje na mestu 6 acetilno skupino. Zaradi prisotnosti piruvata in glukuronske kisline ima polisaharid negativni naboj (24). V raztopinah zavzame XAN obliko vijáčnice, s pomočjo katere se zmanjša sterična napetost in elektrostatski odboj v stranski verigi (16).

Sekundarna struktura XAN-a še vedno ni dokončno potrjena. Nekateri znanstveniki zagovarjajo tezo o enovijačni strukturi (neurejeno stanje), drugi se nagibajo k dvovijačni strukturi (urejeno stanje), spet tretji trdijo, da sta možni obe strukturi. V literaturi je objavljeno, da se v raztopinah z višjo ionsko



Slika 12: Primarna struktura ksantana (16).

močjo in pri temperaturah nižjih od temperature konformacijskega prehoda (T_m), XAN nahaja v dvovijačni urejeni strukturi (Slika 13). Pri kateri temperaturi pride do spremembe konformacije iz dvojne v enojno vijačnico, je odvisno od ionske moči raztopine. V prečiščeni vodi je T_m med 50 in 60 °C, medtem ko se v raztopini z ionsko močjo 0,1 M dvigne na 80 °C. Elektroliti namreč dvojno vijačnico stabilizirajo z nevtralizacijo nabojev v stranski verigi, kar povzroči zmanjšanje elektrostatskega odboja med nabitimi skupinami v stranskih verigah in te se prilegajo osnovni verigi preko vodikovih vezi (4). Če raztopini z nižjo ionsko močjo spet le to povišamo ali znižamo temperaturo (pod T_m) se enovijačna struktura uredi v renaturirano obliko, ki pa je manj urejena kot dvovijačna ampak bolj kot enovijačna (16).



Slika 13: Sekundarna struktura ksantana. Vpliv temperature in ionske moči na konformacijske spremembe ksantana v raztopini. A - nativna (urejena) konformacija, B - denaturirana (neurejena) konformacija, C - renaturirana (delno urejena) konformacija (4).

2 NAMEN DELA

Ksantan je v farmaciji široko uporabljan naravni polimer. Namen dela bo potrditi, da je nabrekanje in erozija ksantanskih ogrodnih tablet odvisna od ionske moči raztopin. Ker je obnašanje na makroskopskem nivoju vedno odvisno od dogajanja na molekularnem, bomo na polimernih filmih iz ksantana z metodo instrumentalne nanoindentacije določili njihove mehanske lastnosti (polimerne verige medsebojno povezane v strukturo filma), še bolj podrobno na molekularnem nivoju (na nivoju posamezne polimerne verige) pa s pomočjo mikroskopa na atomsko silo.

V prvem delu bomo izdelali hidrofilne ogrodne tablete iz ksantana. Zelo pomemben proces pri sproščanju ZU iz hidrofilnih ogrodnih tablet je nabrekanje. Zato bomo z gravimetrično metodo določili stopnjo nabrekanja in delež erozije izdelanih tablet v različnih medijih in sicer: 0,08 M raztopini klorovodikove kisline, 0,001 M raztopini klorovodikove kisline, prečiščeni vodi in 0,2 M raztopini natrijevega klorida.

V drugem delu se bomo osredotočili na obnašanje polimera na molekularnem nivoju z uporabo razredčenih raztopin ksantana v medijih različne ionske moči. Z mikroskopijo na atomsko silo bomo posneli posamezne molekule in poskušali preko parametrov, kot sta persistenčna dolžina in dolžina konturja ter vztrajnostnega polmera napovedovati nabrekanje ogrodnega ksantanskega matriksa v raztopinah različne ionske moči.

Kot vmesni sistem med tableto in posamezno ksantansko verigo, bomo proučili mehanske lastnosti njegovih polimernih filmov. S pomočjo instrumentalne nanoindentacije bomo določili parameter elastičnosti (*Young-ov* modul) in plastičnosti (vtisna trdnost). Cilj bo tudi pokazati korelacijo med mehanskimi lastnostmi polimernih verig in nanometrskimi deformacijskimi lastnostmi polimernih filmov oziroma makroskopskim obnašanjem ksantanskih ogrodnih tablet.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

- Ksantan – Sigma Aldrich, USA; CAS 11138-66-2, serija 060M0155V;
- NaCl: Merck KGaA, Nemčija;
- HCl (1M): Merck KGaA, Nemčija;
- Titrisol[®] – koncentrat za pripravo 1M HCl, Merck KGaA, Nemčija;
- Prečiščena voda – pripravljena na Fakulteti za farmacijo;

3.2 NAPRAVE

- Analitska tehtnica Mettler Toledo A6245, Švica
- Elektronska tehtnica Mettler Toledo AG245, Švica
- Magnetno mešalo IKE WERKE, Nemčija
- Avtomatske pipete BIOHIT 1-1000 μ L, Finska
- Sistem za preskušanje sproščanja z vesli (USP Apparatus 2), ERWEKA DTG, grelec ERWEKA T 1500, Nemčija
- Hidravlična tabletirka na udarec IMA Killian SP300, Cologne, Nemčija
- Naprava za določanje trdnosti tablet Tablet hardness tester VK 200, Vanderkamp, ZDA
- Mikroskop na atomsko silo – Nanoscope IIIa multimode, Veeco, Santa Barbara, Kalifornija, ZDA
- Nanoindenter, Agilent G200, Santa Clara, Kalifornija, ZDA.
- Ročna hidravlična stiskalnica za stiskanje prahov v ploščice Graseby Specac, Velika Britanija
- Naprava za merjenje stičnega kota Drop Shape Analysis System DSA 100 Contact Angle Meter KRUSS, Nemčija

3.3 POSTOPKI IN METODE

3.3.1 Priprava medijev za določanje nabrekanja in erozije, za pripravo raztopin za AFM in za pripravo filmov za nanoindentacijo

Medije za proučevanje nabrekanja in erozije hidrofilnih ogrodnih tablet iz ksantana, za pripravo raztopin za snemanje posameznih molekul z AFM in za izdelavo tankih filmov za AFM nanoindentacijo, smo pripravili tako, da smo zatehtali ustrezno maso NaCl ali odmerili ustrezen volumen HCl v bučko in dodali prečiščeno vodo do oznake. Sestava medijev je prikazana v Tabeli I.

Table I: Sestava raztopin.

Ime medija	Sestava (za 1 liter medija)	Ionska moč (mol/L)
Prečiščena voda	Prečiščena voda	0
0,001 M HCl	1 mL 1M HCl	0,001
0,08 M HCl	80 mL 1M HCl	0,08
NaCl	11,69 g	0,2

Sestavo posameznega medija smo izračunali tako, da smo dobili ustrezne ionske moči, kot je to razvidno v Tabeli I, z naslednjo enačbo:

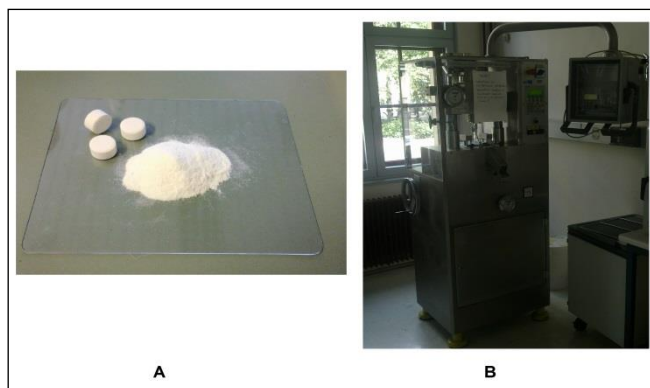
$$\mu = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i \cdot i^2 \quad \text{/Enačba 13/}$$

kjer μ predstavlja ionsko moč medija, c_i je koncentracija iona v molih na liter, i je naboj iona.

3.3.2 Izdelava tablet za vrednotenje nabrekanja in erozije

XAN je praškasta snov, ki ima slabe pretočne lastnosti. Ker v tabletah nismo želeli dodatkov za izboljšanje pretočnosti, ki bi lahko vplivale na potek nabrekanja (npr. Mg-stearat), smo tablete stisnili na polavtomatski način. Za vsako tableto smo posebej zatehtali 500 mg XAN-a na plastično kartico, ga vsuli v matrično vdolbino tabletirke in stisnili tableto (Slika 14). Za stiskanje tablet smo uporabili okrogle pečate s premerom 12 mm, z ravno ploskvijo in posnetimi robovi (ang. *flat-faced bevel-edge*).

Sila stiskanja na zgornjem pečatu je bila približno 5 kN. Tablete so imele približno enako trdnost (80 – 100 N) in povprečno maso 500 ± 10 mg (n=5).



Slika 14: A - Ksantan kot prašek in stisnjen v tableto, B - Tabletirka Killian SP 300.

3.3.3 Priprava vzorcev za AFM slikanje

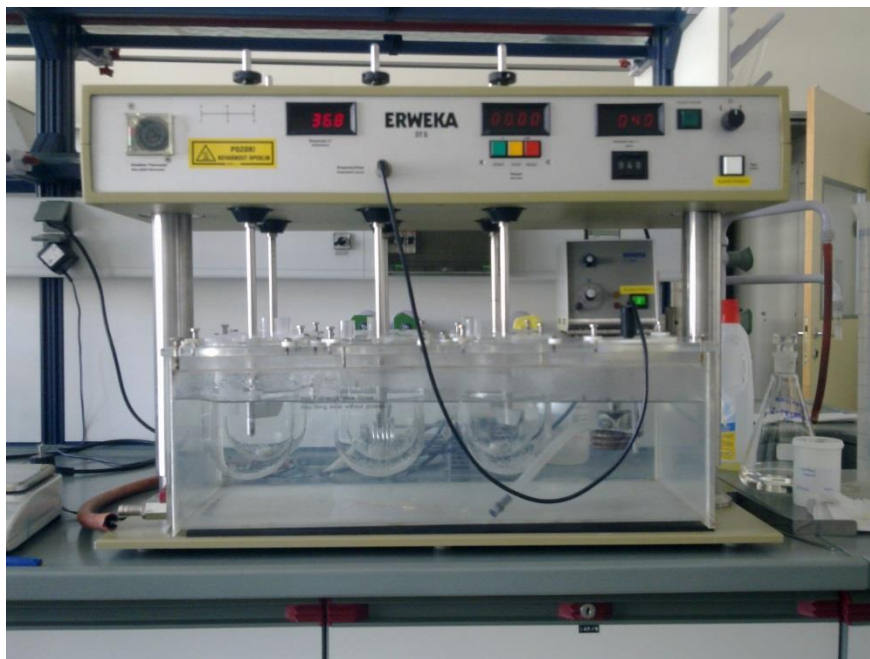
Koncentracija osnovne raztopine XAN-a iz katere smo pripravljali molekularne raztopine je bila 1 g/L, in sicer pripravljena z raztapljanjem ksantana v medijih, kot so prečiščena voda, 0,08 M HCl, 0,001 M HCl in raztopina NaCl. Čas priprave polimernih raztopin je bil 24 ur ob konstantnem mešanju na magnetnem mešalu. Koncentracije molekularnih raztopin ksantana so bile 0,0002 g/L, ki smo jih pripravili z razredčevanjem osnovne raztopine s pomočjo omenjenih topil. Po 5 μ L molekularnih raztopin smo odpipetirali na sveže očiščene nosilce iz sljude (ang. *mica*) in pustili da so se posušile na zraku pri normalnih laboratorijskih pogojih v zaprtih mikrotitrskih ploščicah.

3.3.4 Priprava filmov za instrumentalno nanoindentacijo

Na precizni tehtnici smo zatehtali po 2,0 grama XAN-a in ga prenesli v 100 mL bučke ter dopolnili z ustreznimi mediji do oznake, da smo dobili raztopine XAN-a s koncentracijo 20 g/L. Raztopine smo nato prelili v čaše in mešali na magnetnem mešalu čez noč, da so se homogeno premešale. Filme smo pripravili z metodo ulivanja viskoznih raztopin v kalupe oziroma matrice iz gume enakih velikosti (premer je 5 cm), v katere smo zatehtali po 5,0 g posamezne raztopine. Površino smo poravnali s spatulo in pustili, da so se filmi na zraku pri laboratorijskih pogojih posušili. Za podlago smo uporabili teflonsko ponev.

3.3.5 Določanje stopnje nabrekanja in erozije

Preskus, s katerim smo določili stopnjo nabrekanja in erozijo ksantanskih ogrodnih tablet, smo izvajali na napravi za sproščanje z vesli Erweka DT6 (*USP dissolution test for solid dosage forms, Apparatus 2 – Paddle apparatus*), ki je prikazana na Sliki 15. V steklene posode naprave smo nalili po 900 ml medija in počakali, da se je segrel na temperaturo $37 \pm 0,5$ °C. Hitrost mešanja oziroma vrtenja vesel je bila nastavljena na 50 obratov/minuto. Tablete smo dali v žičnate košarice (zaradi kasnejšega lažjega odstranjevanja iz medija ter da se niso prilepile na dno posode) in jih potopili v medij. Za vsako časovno točko in vsak medij smo naredili tri paralelke. Tablete smo vzeli iz medija v različnih časovnih točkah in sicer po 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 h. Ko smo tablete vzeli iz medija, smo jih takoj stehtali na analitski tehtnici. Nato smo jih prenesli na filter papir in dali sušit v sušilnik na suhi zrak pri temperaturi 60 °C. Maso posušenih tablet smo večkrat preverili na analitski tehtnici in ko je bila masa konstantna, smo predvideli, da so tablete suhe.



Slika 15: Preučevanje nabrekanja in erozije na napravi Erweka DS6.

Stopnjo nabrekanja smo iz pridobljenih podatkov izračunali z naslednjo enačbo:

$$\text{stopnja nabrekanja (\%)} = \frac{m_t - m_s}{m_s} \cdot 100 \quad \text{/Enačba 14/}$$

kjer m_t predstavlja maso hidratirane tablete po določenem času nabrekanja (g), m_s pa maso preostanka posušene tablete po nabrekanju (g).

Delež erozije ksantanskih ogrodnih tablet smo izračunali z Enačbo 15:

$$\% \text{ erozije} = \frac{m_0 - m_s}{m_0} \cdot 100 \quad \text{/Enačba 15/}$$

kjer m_0 predstavlja maso suhe tablete pred nabrekanjem (g).

3.3.6 AFM analiza posameznih polimernih verig ksantana

Pripravo vzorcev XAN-a za AFM snemanje smo opisali v podpoglavju 3.3.3. Meritve smo izvajali na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani, oddelek za fiziko trdnih snovi. Snemanje posameznih molekul XAN-a smo opravili z AFM Nanoscope IIIa (Slika 16).



Slika 16: AFM Nanoscope IIIa multimode (12).

Slike smo posneli s kontaktnim načinom v 1-butanolu, ki precipitira in fiksira ksantanske verige na površino sljude. Uporabili smo konice iz silicijevega nitrída (MSCT, Veeco, Santa Barbara, Kalifornija, ZDA) s konstanto vzmeti 0,1 N/m. Hitrost slikanja je bila 3 Hz. Posnete slike so bile shranjene v formatu 512 x 512 piksla. Za vsako raztopino smo posneli vsaj 30 posameznih verig XAN-a.

Za analizo so bile primerne samo verige polimera, ki so zadostile naslednjim pogojem:

- vidna sta bila oba konca verige
- posamezna veriga ni bila v stiku oziroma ni bila prepletena z drugo verigo polimera

Z uporabo 2D slikovne analize (Clarkson University, Potsdam, New York, ZDA) smo določili dolžino enega piksla na sliki in to uporabili za določanje dolžine posamezne polimerne verige

in izračun vztrajnostnega polmera. Persistenčno dolžino smo izračunali s pomočjo kota, ki ga zavzame tangenta segmenta pred spremembo smeri polimerne verige (Enačbi 6 in 7).

3.3.7 AFM nanoindentacija polimernih filmov iz ksantana

Za testiranje mehanskih lastnosti ksantanskih filmov smo uporabili nanoindenter Agilent G200 (Agilent, ZDA) opremljen z modulom za kontinuirano merjenje togosti (*continuous stiffness measurements* – CSM) na Naravoslovnotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, oddelku za metalurgijo. Ksantanske filme, ki smo jih pripravili v medijih različne ionske moči, smo s pomočjo dvokomponentne cianoakrilatne smole (UHU plus sofortfest, Baden, Nemčija) pritrdili na kovinski nosilec.

Za določanje mehanskih lastnosti smo uporabili *Berkovich*-ev indenter, ki ima obliko tristrane piramide. Preizkuse smo izvajali pri sobni temperaturi. Kot kriterij za nadaljnje izvajanje analize oziroma cikel obremenjevanja (približevanje konice površini vzorca z nastavljeno hitrostjo) smo postavili vrednost termičnega lezenja (ang. *thermal drift*) manjšo kot 0.05 nm/s. Na Sliki 17 je prikazan film XAN-a pripravljen z raztopino NaCl po nanoindentaciji, na katerem so razvidni vtisi s tristrano *Berkovich*-evo konico, kot posledica plastične deformacije vzorca.



Slika 17: Film po nanoindentaciji.

Vsi preizkusi so izvedeni v CSM načinu (poglavje 1.5), pri čemer smo kontinuirano spremljali odvisnost E in H od globine vtiskovanja. Hitrost obremenitve in razbremenitve je bila 0,05/s. Pri maksimalni globini vtisa (2000 nm) smo indenter zadržali 10 s preden smo vzorec

razbremenili. S tem smo zmanjšali vpliv časovno odvisne plastične deformacije (lezenje - *crip*) na elastično relaksacijo v razbremenitveni fazi.

Na vsakem vzorcu smo izvedli najmanj 30 poizkusov. Za obdelavo podatkov smo uporabili *Oliver* in *Pharr*-ovo teorijo (25, 26).

3.3.8 Izdelava tablet in določanje hitrosti njihovega omočenja

Na plastične kartice smo zatehtali po 400 mg praškastega XAN-a in ga na ročni hidravlični stiskalnici stisnili v okrogle tablete (ploščice) s silo približno 100 kN in premerom 12 mm.

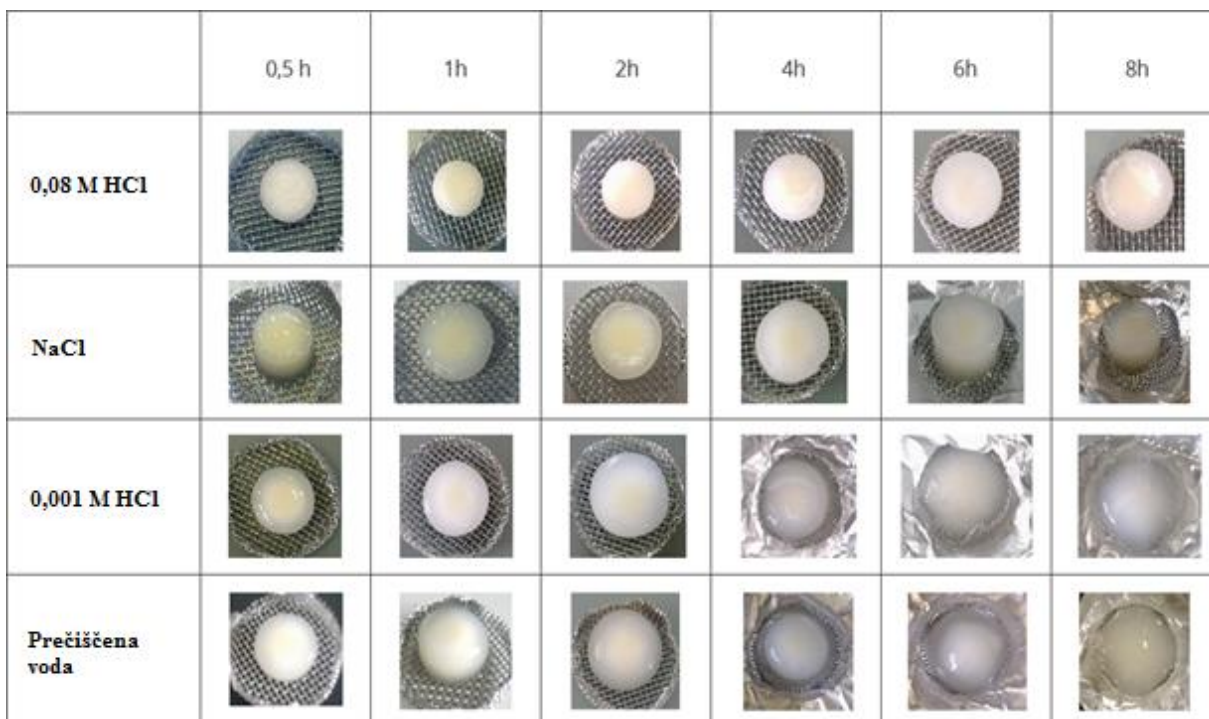
Za injiciranje medijev (prečiščena voda, 0,08 M HCl, 0,001 M HCl, raztopina NaCl) na tablete smo izbrali način z injekcijsko brizgo. Na tableto smo kanili kapljico medija in posneli filme spreminjanja oblike kapljice s časom (25 slik/sekundo). S programsko opremo smo obdelali posnete filme tako, da smo izračunali stične kote kapljic za vsako sliko posnetka ter hitrost spreminjanja stičnega kota za posamezen medij. Iz pridobljenih podatkov smo izračunali hitrost omočenja tablet v medijih različne ionske moči.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

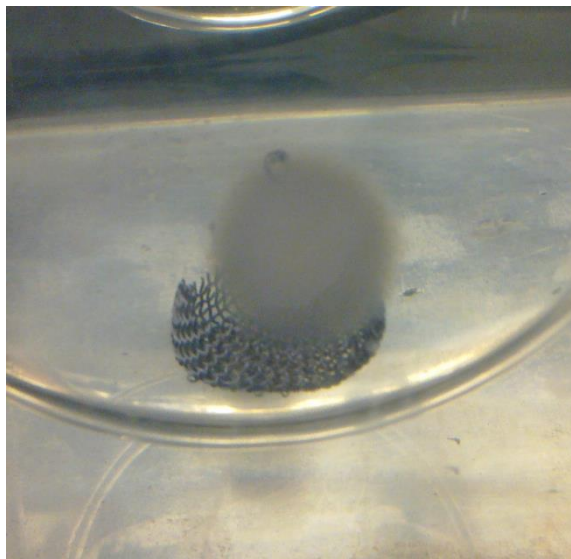
4.1 Nabrekanje in erozija ogrodnih tablet iz ksantana

V človeškem organizmu so po peroralni aplikaciji tablete podvržene različnim fiziološkim pogojem v gastrointestinalnem traktu (GIT). Ionska moč se skozi GIT spreminja od 0,01 do 0,166 M (16), zato smo tudi naše teste izvajali v medijih z ionskimi močmi od 0 do 0,2 M. Za razumevanje nabrekanja tablet iz XAN-a je zelo pomembno dejstvo, da je XAN naravni anionski polimer s pKa 3,1, kar pomeni, da na nabrekanje vplivata tako ionska moč, kot tudi pH (27).

Slika 18 prikazuje tablete po nabrekanju. Tablete, ki so nabrekale v medijih z večjo ionsko močjo (raztopini NaCl in 0,08 M HCl) so tvorile na pogled tanjši in bolj čvrsti hidrogelski plašč. Tudi po 8 urah nabrekanja so obdržale obliko in konsistenco. Za razliko od teh pa so tablete, ki so nabrekale v medijih z nižjo ionsko močjo (prečiščena voda, 0,001 M HCl), tvorile debelejšo in manj čvrsto hidrogelsko plast. Po približno 6 urah nabrekanja smo opazili, da nimajo več oblike tablete, ampak so nastali sferični kosmiči (Slika 19). Konsistenca preostanka teh tablet se je po odstranitvi iz testnega medija porušila.



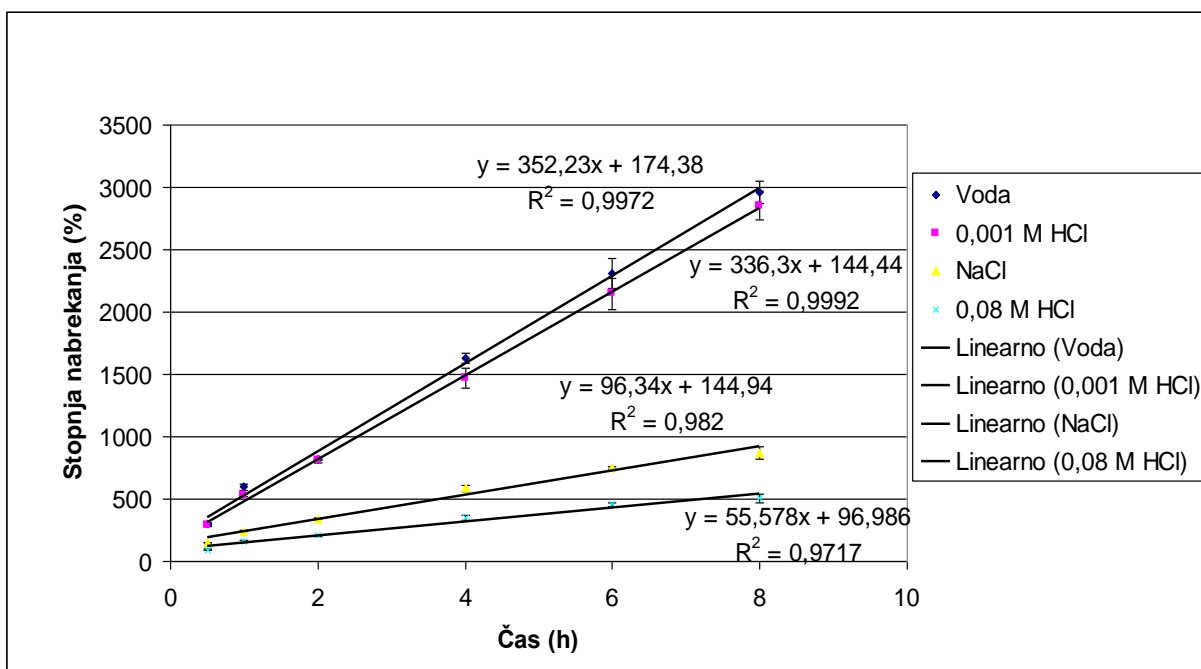
Slika 18: Slike tablete po nabrekanju v medijih različne ionske moči po različnem času.



Slika 19: Tableta v prečiščeni vodi po približno 6 urah izgubi svojo prvotno obliko.

Rezultate nabrekanja tablet v medijih z različnimi ionskimi jakostmi smo prikazali na Grafu 1. Največjo stopnjo nabrekanja smo ugotovili v medijih, kot sta 0,001 M HCl in prečiščena voda (medija z nizko ionsko močjo). Stopnja nabrekanja v teh dveh primerih doseže po 8 h nabrekanja skoraj 3000%. Ker je XAN polisaharid s številnimi karboksilnimi skupinami (karboksilne skupine glukuronske in piruvične kisline), so v prečiščeni vodi s pH približno 7,0 in $\mu=0$ M le-te ionizirane. Med negativno nabitimi verigami pride do elektrostatskega odboja, kar povzroči njihovo obilno hidratiranje ter hitrejše in močnejše razpletanje. Glede na rezultate sklepamo, da so verige XAN-a v medijih z nizko ionsko močjo naključno zvite (ang. *random coil*), torej v neurejenem stanju (28). Zato so številne hidrofilne skupine izpostavljene vodnim molekulam, kar pomeni, da so favorizirane interakcije med XAN verigami in vodo. Posledica je višja stopnja nabrekanja in tvorba debelejšje plasti hidrogela.

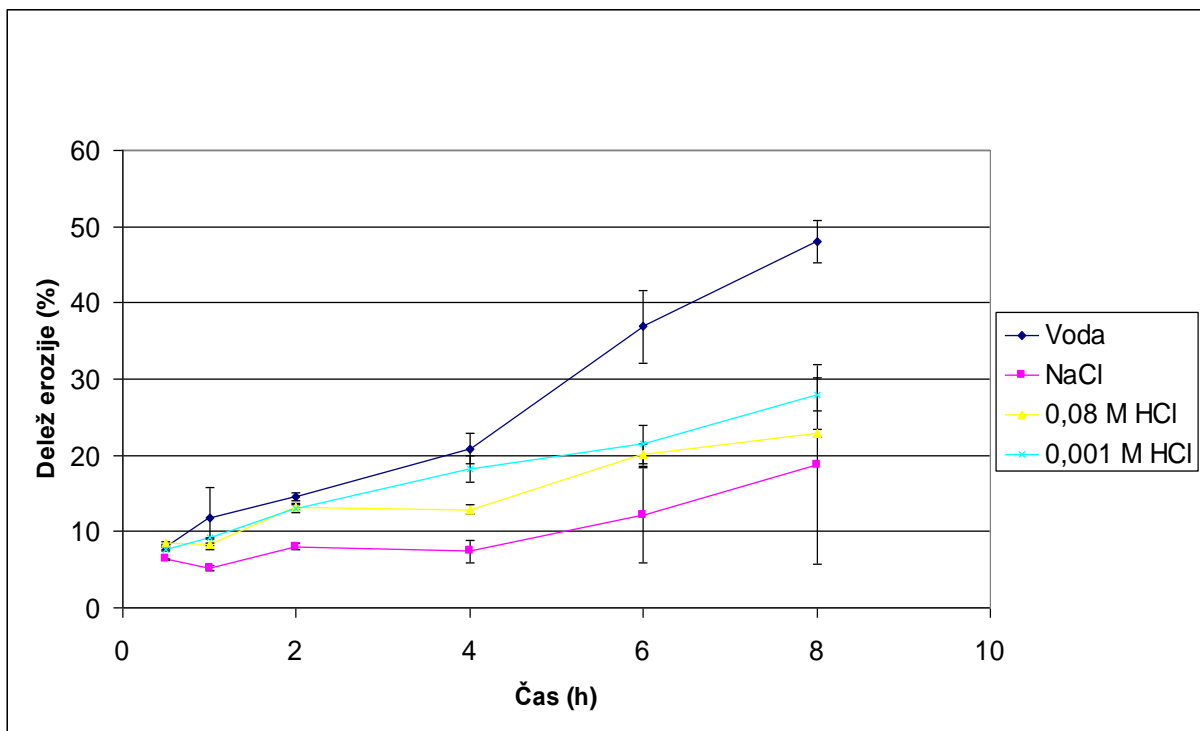
Graf 1: Nabrekanje ksantanskih ogrodnih tablet v medijih z različnimi ionskimi močmi in pH-ji (n=3).



Iz Grafa 1 je jasno razvidna razlika v stopnji nabrekanja v medijih z nižjimi in višjimi ionskimi močmi. V medijih z višjimi ionskimi močmi predvidevamo, da se verige XAN-a obnašajo bolj podobno palicam (ang. *rod-like*) (28). V primeru raztopine NaCl Na⁺ ioni senčijo ionizirane karboksilne skupine stranskih verig in s tem zmanjšajo elektrostatski odboj. Stranske verige se zato bolj prilegajo glavni verigi in možnosti za interakcije med vodnimi molekulami in XAN verigami so manjše, kar ima za posledico tvorbo dvojnih vijačnic. Posledica je manjša stopnja nabrekanja in tanjša plast nastalega hidrogela. Najpočasnejše je, kljub nižji ionski moči kot v raztopini NaCl, nabrekanje v 0,08 M HCl. V njej pride, zaradi nizkega pH-ja, do preprečevanja disociacije COOH skupin, posledično se zmanjšajo elektrostatske repulzije, kar omogoča nastanek dvojnih vijačnic.

Rezultati vpliva ionske moči in pH-ja medijev na nabrekanj hidrofilnih ogrodnih tablet iz XAN-a so primerljivi z literaturnimi (28).

Graf 2: Erozija ksantanskih ogrodnih tablet v medijih z različno ionsko močjo (n=3).

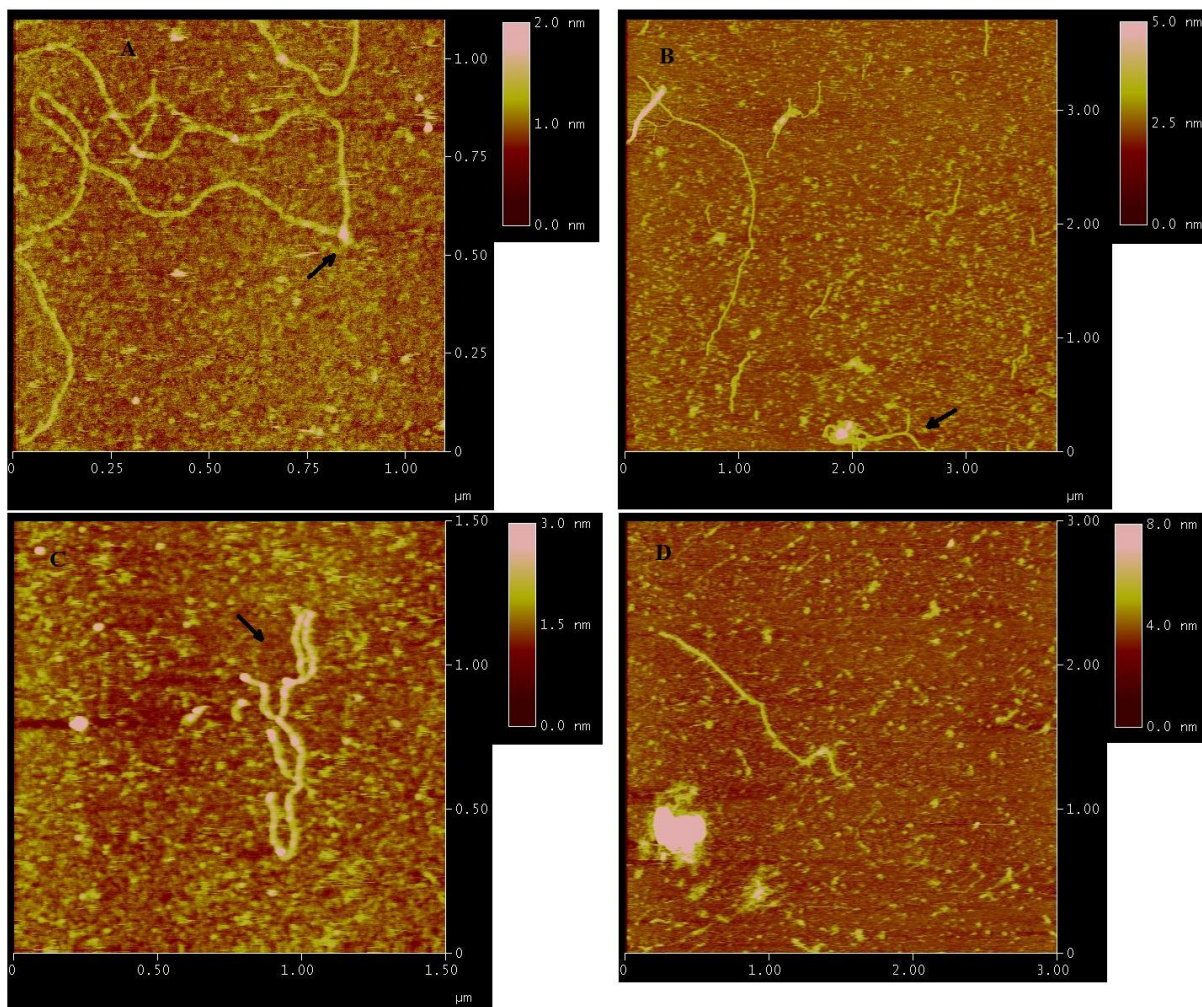


Rezultati preučevanja erozije XAN ogrodnih tablet (Graf 2) kažejo, da se z višanjem ionske moči medijev delež erozije zmanjšuje. Največjo stopnjo erozije dosežejo tablete v prečiščeni vodi, kar je glede na to, da je velik delež karboksilnih skupin v ioniziranem stanju in s tem bolj izpostavljen interakcijam z vodnimi molekulami, tudi pričakovano. Po 8 urni izpostavljenosti prečiščeni vodi je erodiralo skoraj 50% tablete. Izrazite so predvsem razlike v deležu erozije med prečiščeno vodo in ostalimi mediji. Nasprotno pa so razlike v deležu erozije v medijih 0,001 M HCl, 0,08 M HCl in NaCl majhne. Sicer smo pričakovali, da bo delež erozije v 0,001 M HCl višji in se bo bolj približal vrednostim doseženim v vodi, vendar tudi v literaturi (28) zasledimo podobno veliko razliko v deležu erozije med tema dvema medijema. Deleži erozije po osmih urah v medijih 0,001 M HCl, 0,08 M HCl in NaCl so sledeči 28%, 23% in 18%.

Na Grafu 2 opazimo tudi velike standardne deviacije v primerih vode in raztopine NaCl. To je slabost gravimetrične metode za določanje nabrekanja in erozije. Jemanje tablet iz testnih raztopin, kljub maksimalnemu trudu, niso vedno najbolj natančne, saj se del hidrogela lahko odlušči.

4.2 AFM analiza posameznih polimernih verig ksantana

Za AFM analizo smo se odločili z namenom, da bi vizualizirali posamezne molekule XAN-a v medijih z različnimi ionskimi močmi (Slika 20) in izračunali določene parametre, ki nam opisujejo mehanske lastnosti posameznih polimernih verig.



Slika 20: Primeri slik posnetih z AFM. A – prečiščena voda, B – 0,001 M HCl, C – 0,08 M HCl in D – NaCl.

Slika 20 prikazuje posamezne molekule XAN-a v medijih različnih ionskih moči. Opazimo lahko razvite molekule, ki pa občasno vsebujejo tudi zanke in razcep (Slika 20-B spodaj in C). Vzrok za nastanek zank naj bi bil prisotnost eno vijačnih posameznih verig oziroma razpletanje dvojnih in trojnih vijačnic v enojno (16). Na slikah so vidni tudi vozli (npr. Slika 20-A). To so vse svetlejše točke na polimernih verigah. Pojavljajo se na specifičnih mestih, kjer zaradi prisotnosti nepolarnih ostankov (npr. acetatne skupine), pride do intermolekularnih

povezav (16). Na sliki 20 C je vidna zelo zavita polimerna veriga v 0,08 M HCl, kar smo kasneje potrdili z izračunom persistenčne dolžine in vztrajnostnega radija.

Z AFM smo posneli posamezne molekule XAN-a in nato rekonstruirali njihovo konformacijo z uporabo 2D – slikovne analize, ki temelji na delu *Fontali et al* (12). Odločili smo se za izračun dveh parametrov in sicer persistenčne dolžine (ang. *persistence length*) in vztrajnostnega polmera (ang. *radius of gyration*) posameznih polimernih verig.

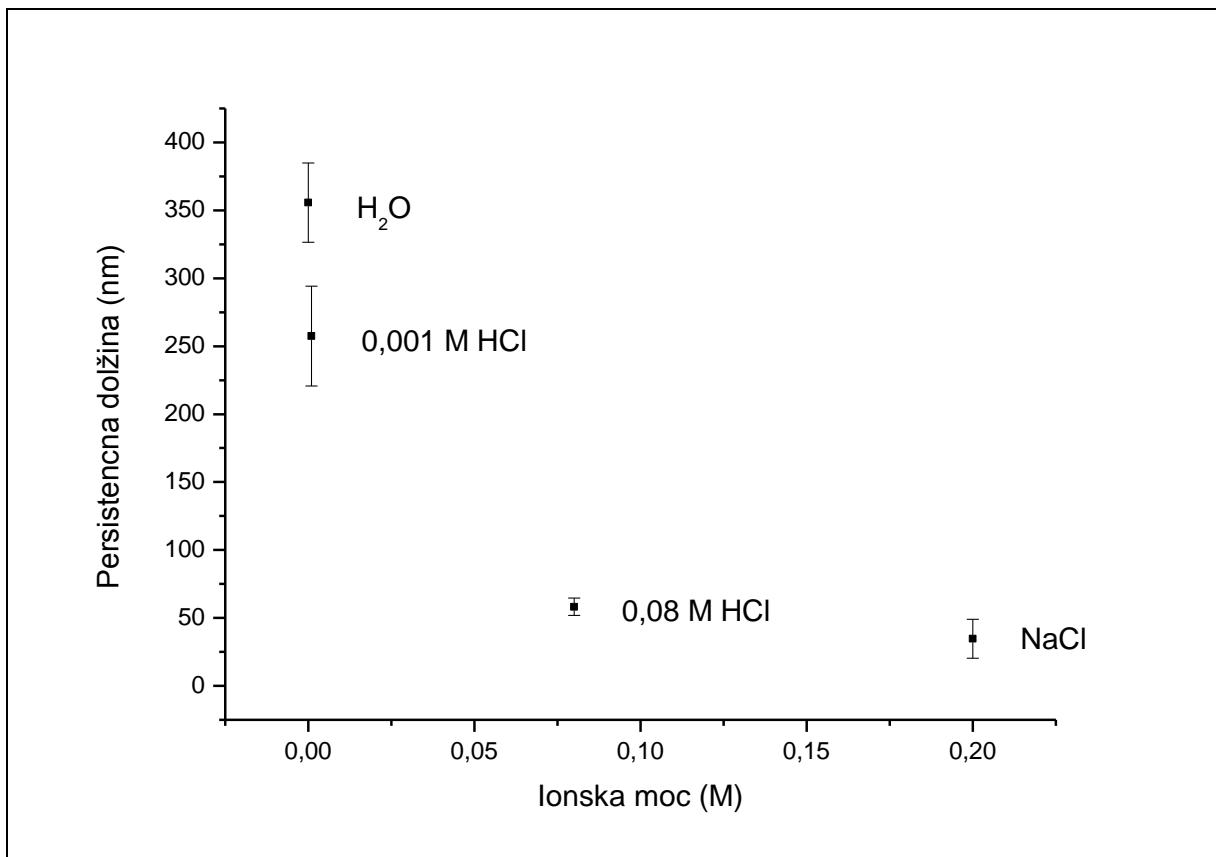
Rezultate smo podali v Tabeli II, Grafu 3 in 4.

Table II: Rezultati AFM analize posameznih molekul XAN-a.

Vzorec	Ionska moč (mol/L)	Persistenčna dolžina (nm)	Vztrajnostni polmer (nm)
Prečiščena voda	0,0	355,68 ± 29,12	288,75 ± 99,60
HCl pH=3,0	0,001	257,50 ± 36,76	180,18 ± 73,62
HCl pH=1,2	0,08	58,18 ± 6,398	58,29 ± 23,99
NaCl	0,2	34,63 ± 14,30	82,07 ± 37,69

Persistenčna dolžina je osnovna lastnost, s katero ovrednotimo togost polimernih verig. Na osnovi rezultatov lahko sklepamo, da se persistenčna dolžina zmanjšuje z večanjem ionske moči medijev ter da se povečuje togost posamezne polimerne verige. Slednje smo pojasnili s senčenjem negativnega naboja vzdolž molekule XAN-a, kar povzroči zvitje verige in posledično zmanjšanje persistenčne dolžine v medijih večje ionske moči. Zmanjšanje persistenčne dolžine v medijih, kot sta 0,08 M HCl in NaCl kaže na mogoči konformacijski prehod molekule XAN-a iz enojne v dvojno vijačnico oziroma iz neurejene enojne vijačnice v urejeno enojno ali dvojno vijačnico. V raztopinah z nižjimi ionskimi močmi (prečiščena voda, 0,001 M HCl) je zaradi večjega števila ioniziranih karboksilnih skupin prisoten velik elektrostatski odboj v stranskih verigah. Posledica so bolj ravne in daljše polimerne verige (višje vrednosti persistenčne dolžine). Rezultati naših meritev se ujemajo z drugimi literaturnimi podatki o persistenčni dolžini posameznih verig XAN-a pridobljeni z AFM analizo (16).

Graf 3: Persistenčna dolžina posameznih molekul XAN-a v odvisnosti od ionske moči medija.

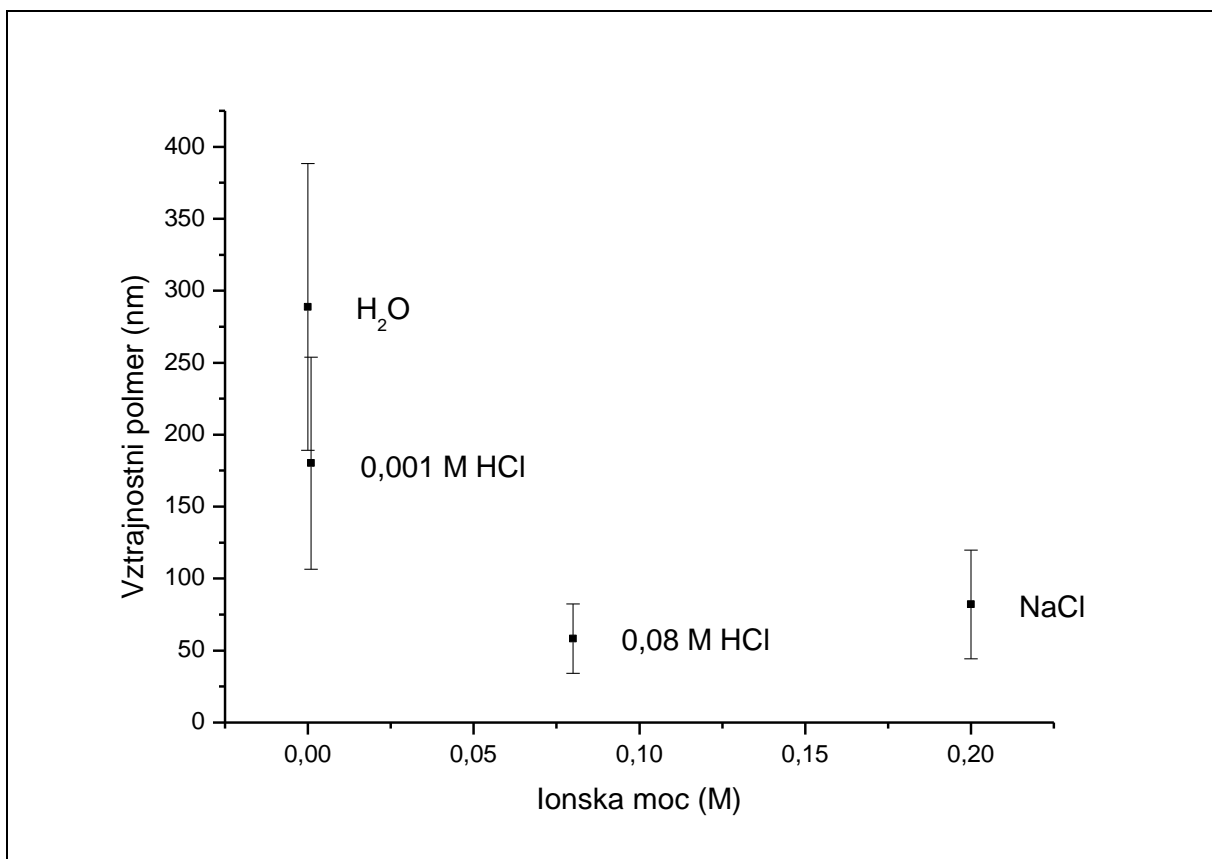


Drugi parameter, ki smo ga določili posameznim polimernim verigam XAN-a, je vztrajnostni polmer. Z njim ovrednotimo povprečno razdaljo posameznega segmenta polimerne verige od masnega težišča molekule. Rezultati meritev so podani v Tabeli II in Grafu 4.

Rezultati kažejo na zmanjšanje vztrajnostnega polmera s povečanjem ionske moči medijev. Na podlagi tega smo sklepali, da večji vztrajnostni polmer ustreza večji hidrataciji polimernih verig, kar makroskopsko opazamo kot izrazito nabrekanje polimerne ogrodja tablet v medijih manjše ionske moči. Nasprotno, v prisotnosti Na⁺ ionov oziroma pri nizkem pH, XAN zmerno nabreka, tako da v gelski plasti nastajajo področja nizke mikroviskoznosti, kar kvantitativno vidimo kot zmanjšanje vztrajnostnega polmera. Višji vztrajnostni polmer v medijih nižje ionske moči pomeni tudi večjo prepletenost polimernih verig v hidrogelski plasti (16).

Pri ocenjevanju vztrajnostnega polmera lahko na Grafu 4 opazimo veliko standardno deviacijo vzorcev, kar je kvantitativni kazalec velike heterogenosti vzorcev.

Graf 4: Vztrajnostni polmer posameznih molekul XAN-a v odvisnosti od ionske moči medija.



4.3 Instrumentalna nanoindentacija polimernih filmov iz ksantana

Sposobnost ukrivljanja ksantanskih verig je posledica ionskega senčenja in je zelo pomembna za elastične lastnosti struktur, ki jih XAN verige tvorijo z medsebojnim povezovanjem. Izdelali smo tanke ksantanske filme iz raztopin različnih ionskih moči, da bi ponazorili lastnosti gelske plasti ogrodnih tablet. Vpliv ionske moči na togost polimernih filmov in posledično način njihovega nabrekanja smo potrdili z mapiranjem deformacije vzorcev s pomočjo instrumentalne nanoindentacije.

Spremljali smo odvisnost globine vtisa od obremenitve vzorca, kot je prikazano na Grafu 5 (polimerni film XAN-a v prečiščeni vodi).

Graf 5: Primer krivulje obremenitev vzorca - globina vtisa filma pripravljene iz raztopine XAN-a v prečiščeni vodi.

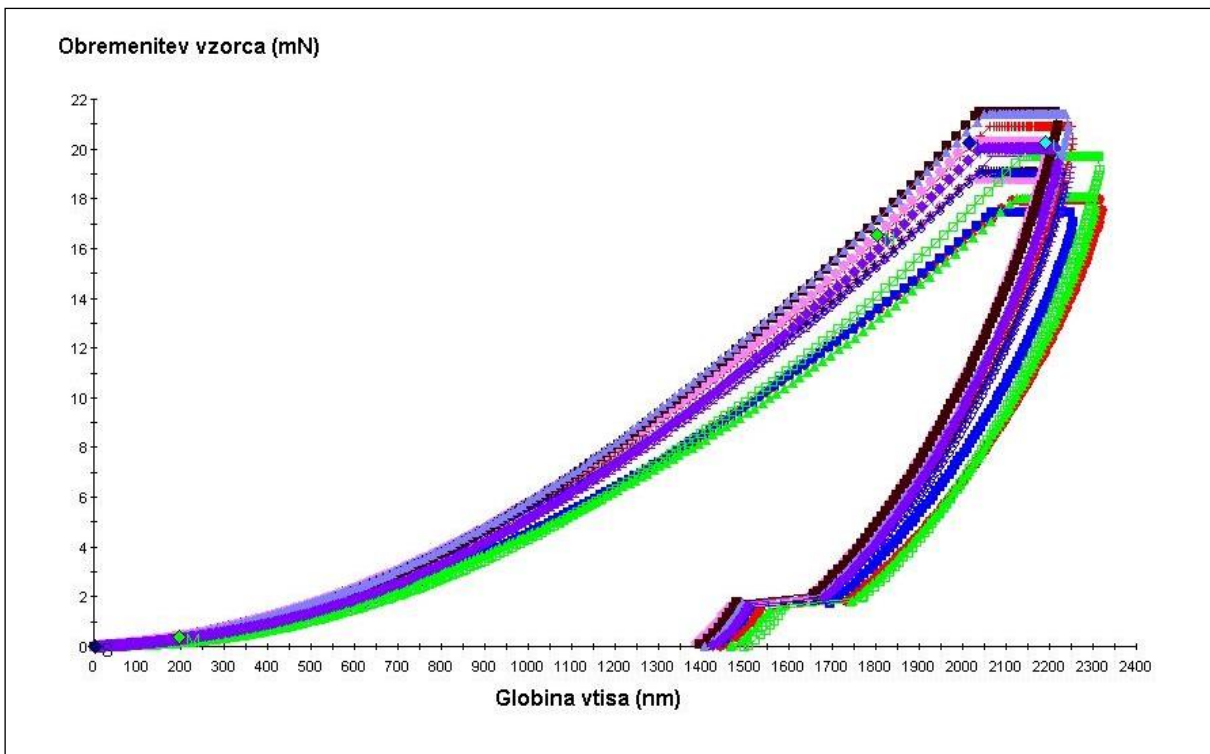


Tabela III: Young-ovi moduli (E) in vtisne trdote (H).

	E (GPa) \pm Std	H (MPa) \pm Std
XAN prečiščena voda	$5,5 \pm 0,6$	280 ± 50
XAN 0,001 M HCl	$5,4 \pm 0,5$	270 ± 40
XAN 0,08 M HCl	$7,5 \pm 0,8$	390 ± 60
XAN NaCl	$7,0 \pm 0,7$	350 ± 60

Na osnovi rezultatov (Tabela III) lahko sklepamo, da filma pripravljena iz medijev nizke ionske moči izkazujeta večjo plastičnost (nižje vrednosti vtisne trdnosti). Filma, ki smo jih naredili iz medijev večje ionske moči pa kažeta na bolj krhko strukturo (višje vrednosti vtisne trdnosti). V 0,08 M HCl je večina karboksilnih skupin XAN-a v neionizirani obliki, kar omogoča nastanek vodikovih vezi med verigami. Rezultat tega je večja togost filmov, kot posledica večjega števila interakcij med polimernimi verigami (višji E). Podobno je pri filmu pripravljene z raztopino NaCl. V tem primeru so ionizirane karboksilne skupine senčene s strani Na^+ ionov, kar spet omogoča nastanek večjega števila vodikovih vezi in rezultira v večji

togosti filma (višji E). Togost filmov, pripravljenih iz medijev z nižjo ionsko močjo, je manjša (nižji E), kar je posledica manjšega števila vodikovih vezi, zaradi večjega deleža COO^- skupin.

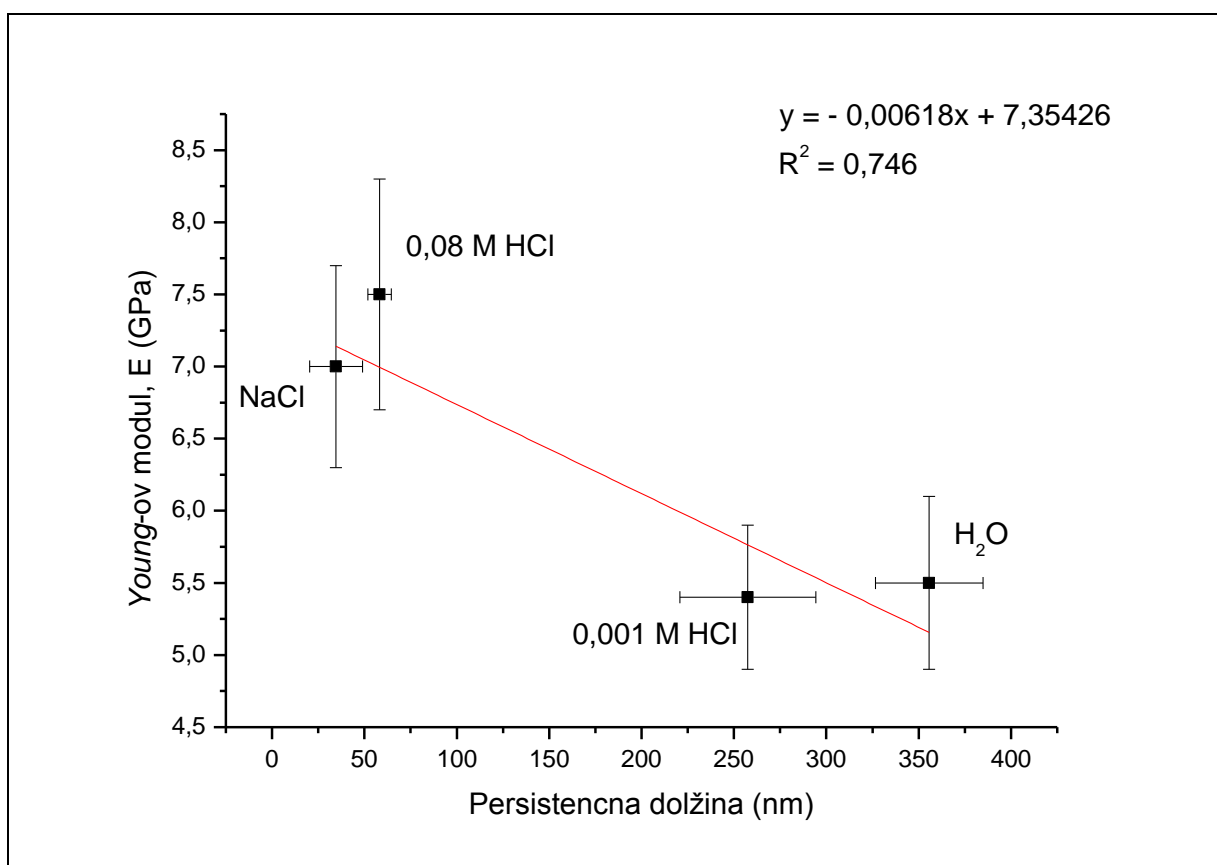
4.4 Povezave makro/mikro lastnosti sistemov na osnovi ksantana

4.4.1 Korelacije med razsežnostnim (bulk) in molekularnim (single) nivojem

Perzistenčna dolžina vs. Young-ov modul

Korelacija med mikro- (persistenčna dolžina) in makroskopskim parametrom (*Young-ov* modul filmov iz XAN-a) je predstavljena na Grafu 6.

Graf 6: Korelacija med *Young-ovim* modulom ksantanskih filmov in persistenčno dolžino posameznih molekul XAN-a v medijih z različnimi ionskimi močmi.

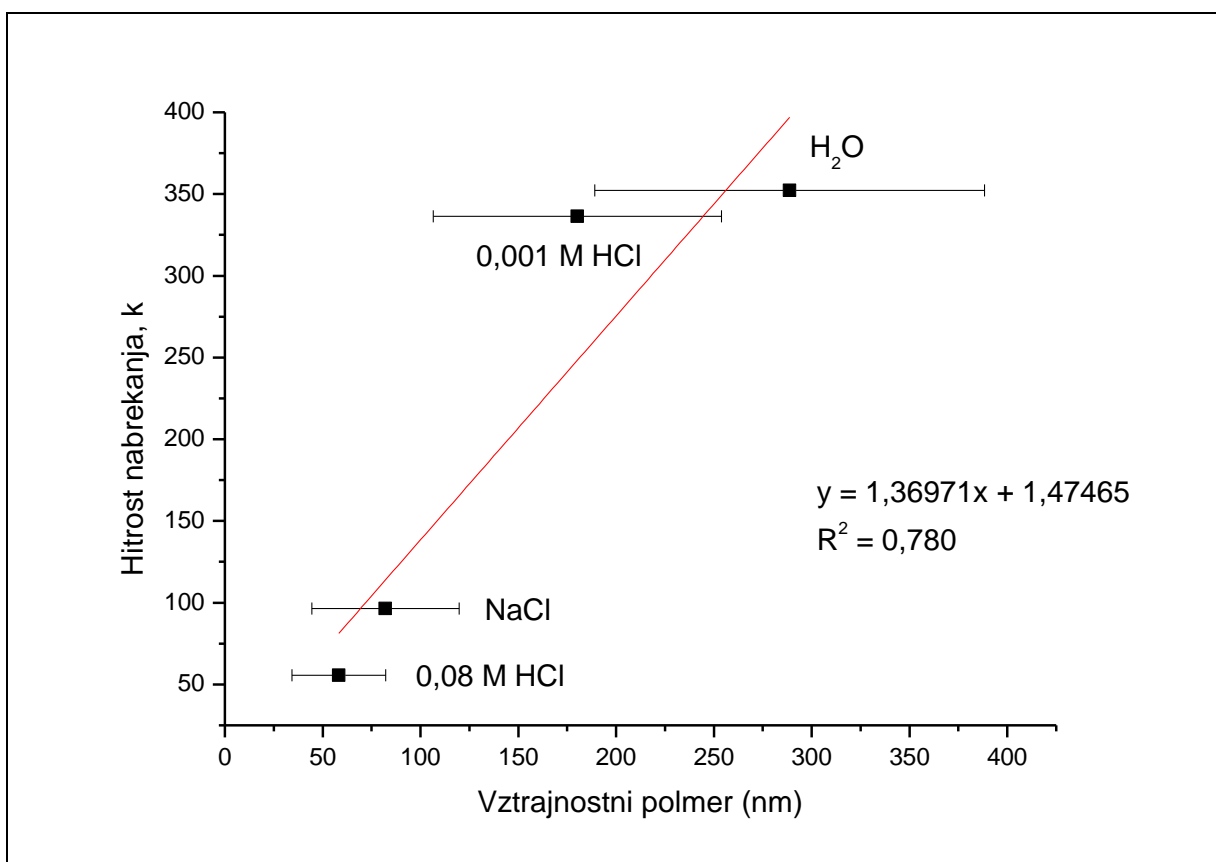


Persistenčna dolžina nam ovrednoti togost, kot eno od glavnih mehanskih lastnosti, posamezne molekule v raztopinah z različno ionsko močjo. Na razsežnostnem nivoju togost ovrednotimo z določanjem *Young-ovega* modula. Graf 6 nam kaže na linearno korelacijo

(determinacijski koeficient $R^2 = 0,746$) med tema dvema parametroma v odvisnosti od ionske moči medijev. Bolj ukrivljena polimerna veriga (manjša persistenčna dolžina) prispeva k bolj kompaktni ureditvi verig in večji togosti ksantanskih filmov v medijih večje ionske moči (višji E). Pri nižji ionski moči so verige XAN-a bolj raztegnjene (večja persistenčna dolžina) in so v filmski plasti manj urejene, kar se kaže v manjši togosti polimernih filmov (nižji E).

Nabrekanje kot makroskopski parameter vs. vztrajnostni polmer kot mikroskopski parameter

Graf 7: Korelacija med hitrostjo nabrekanja ksantanskih ogrodnih tablet in vztrajnostnim polmerom posameznih molekul XAN-a v medijih z različnimi ionskimi močmi.



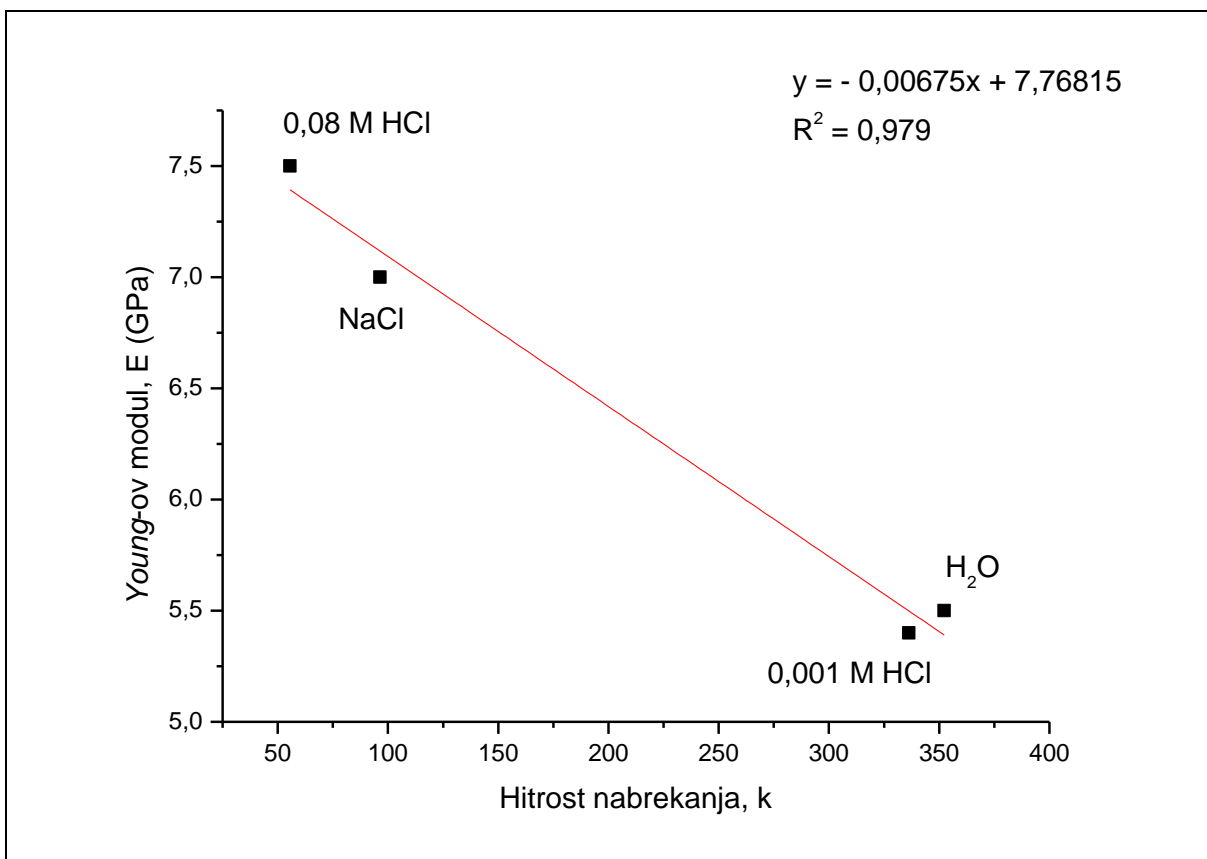
Na Grafu 7 je predstavljena korelacija med vztrajnostnim polmerom, kot mikroskopsko lastnostjo, in hitrostjo nabrekanja, kot makroskopsko lastnostjo. Na podlagi determinacijskega koeficienta ($R^2 = 0,780$) sklepamo na linearno korelacijo med omenjenima parametroma. Pri nižjih ionskih močeh (prečiščena voda, 0,001 M HCl) imajo posamezne molekule XAN-a

večji vztrajnostni polmer, kar je povezano z večjo velikostjo polimernih verig oziroma so te verige bolj razvite (oddaljenost posameznega segmenta od masnega težišča molekule je večja). To se kaže na makroskopski ravni kot večja hitrost nabrekanja in debelejša hidrogelska plast ogrodnih tablet XAN-a (vidno na Sliki 18). Nasprotno imajo molekule XAN-a v medijih z višjimi ionskimi močmi (0,08 M HCl, NaCl) manjši vztrajnostni polmer, kar pomeni bolj zvite molekule in manjšo oddaljenost posameznega segmenta verige od masnega težišča molekule. To prispeva k bolj tesnemu pakiranju polimernih verig, večji vrednosti vtisne trdnosti in posledično tanjši gelski plasti, kar se izraža v manjši hitrosti nabrekanja v medijih večje ionske moči.

4.4.2 Napovedovanje nabrekanja ksantanskih filmov

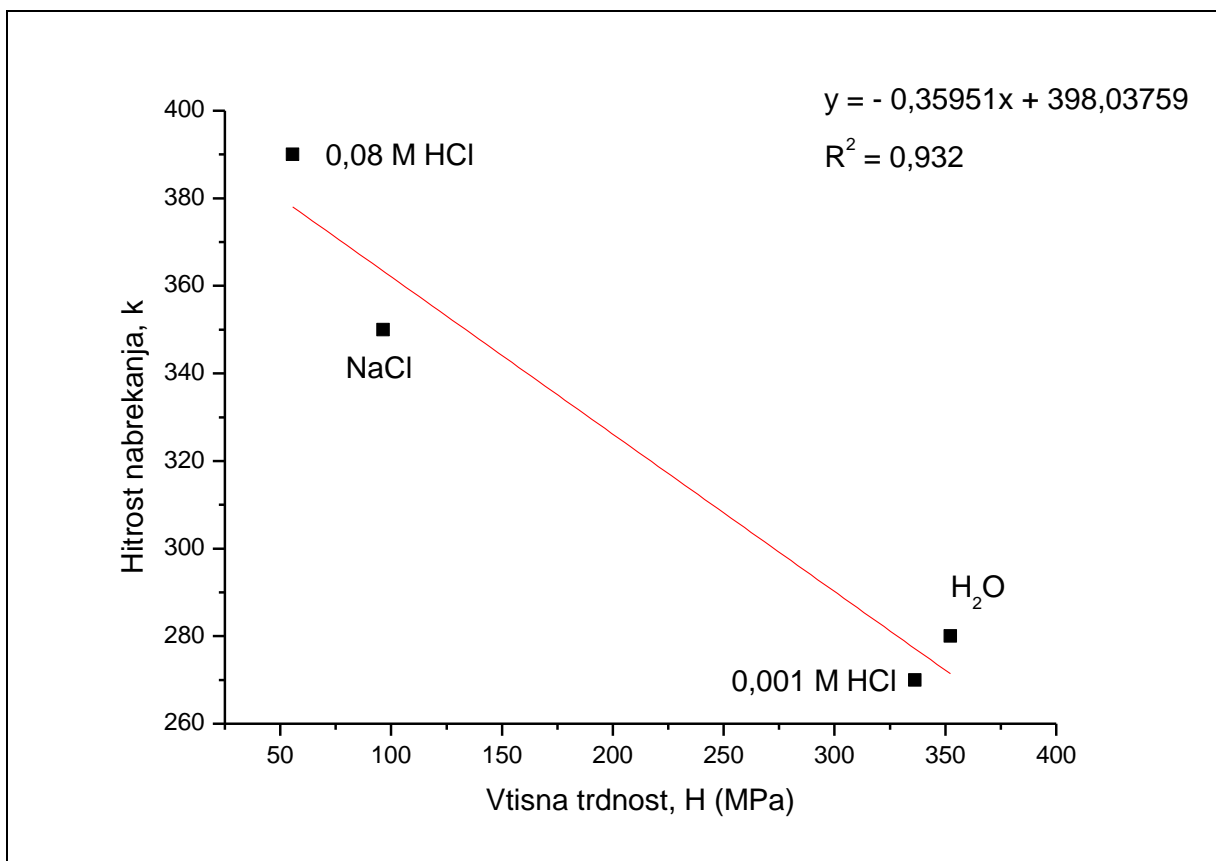
Glavni problem pri proučevanju nabrekanja z gravimetrično metodo je nenatančnost, saj se ob jemanju vzorcev iz testne raztopine (predvsem prečiščene vode in 0,001 M HCl, kjer se konsistenca tablet poruši) izgubi del hidrogelskega plašča tablet. Poleg tega je ta proces tudi časovno in materialno potraten. Zato smo poskušali najti povezavo med mehanskimi lastnostmi polimernih filmov (E , H) in nabrekanjem, s katero bi za napovedovanje nabrekanja porabili manj časa in materiala.

Graf 8: Korelacija med nabrekanjem (naklon, k) in *Young*-ovimi moduli v medijih z različnimi ionskimi močmi.



Na osnovi naših rezultatov lahko potrdimo linearno korelacijo med *Young*-ovim modulom in hitrostjo nabrekanja gelske plasti (Graf 8, $R^2 = 0,979$). Hkrati pa smo pokazali tudi, da med vtisno trdnostjo in stopnjo nabrekanja obstaja linearna korelacija (Graf 9, $R^2 = 0,932$). Višja vrednost vtisne trdnosti kaže na bolj kompaktno povezanost med polimernimi molekulami, kar pomeni da potrebujemo večjo silo, da material plastično deformiramo (Graf 9). Bolj kompaktni polimerni filmi ponazarjajo tanjšo gelsko plast ksantanskih ogrodnih tablet oziroma njihovo manjšo stopnjo nabrekanja.

Graf 9: Korelacija med hitrostjo nabrekanja (naklon, k) in vtisno trdnostjo.



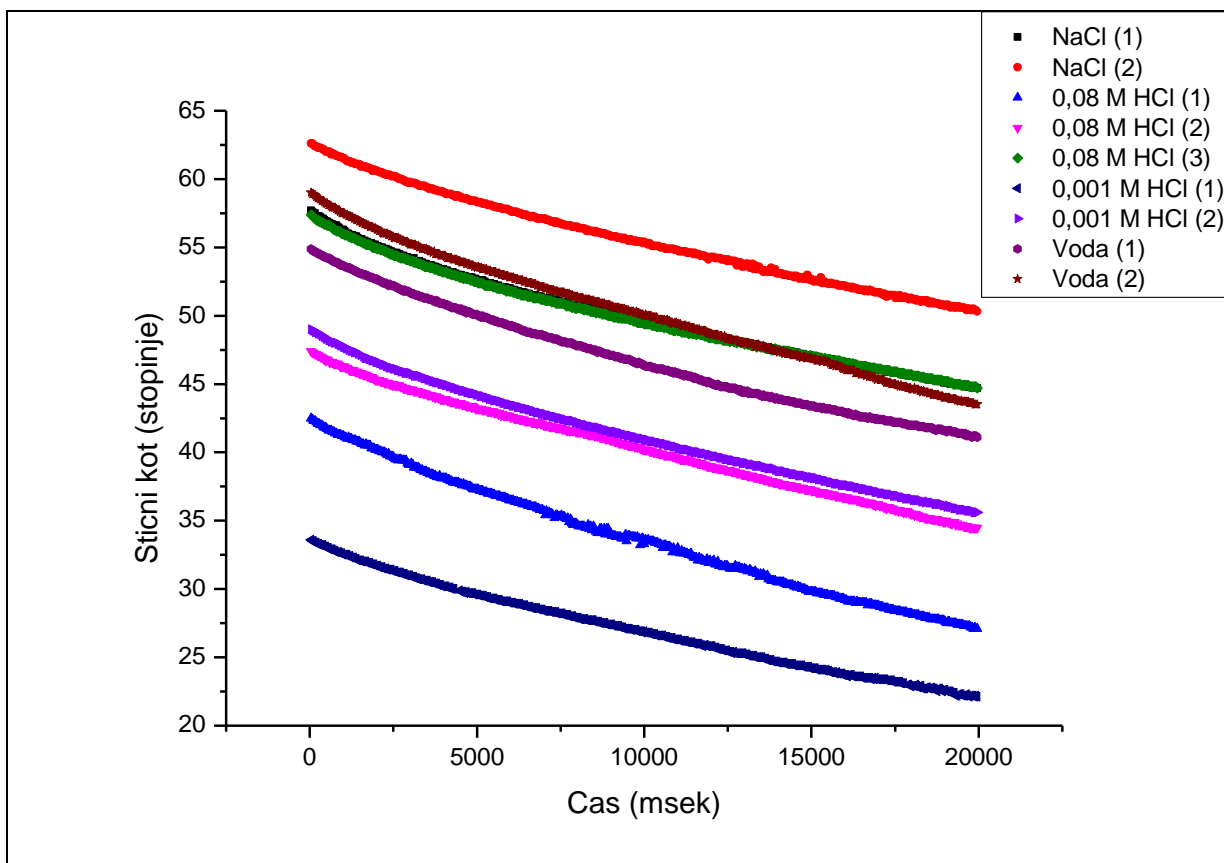
4.5 Hitrost omočenja

S testiranjem omočenja tablet smo poskušali ugotoviti vpliv ionske moči medijev na ta proces in ga nadalje povezati s procesom nabrekanja. Rezultati spreminjanja stičnih kotov s časom (Graf 10) so znotraj posameznega medija zelo slabo ponovljivi, kar opazimo kot velike razlike med posameznimi meritvami. Hitrost omočenja smo poskušali določiti z linearno regresijo začetnega dela krivulj, vendar tudi to ni dalo nobenih oprijemljivih rezultatov. Možni vzroki za veliko variabilnost rezultatov bi lahko bili naslednji:

- hrapava in neravna površina stisnjenih tablet;
- poroznost tablet;
- volumen kapljice (ta ne sme biti prevelik zaradi vpliva gravitacije; v našem primeru smo volumen kapljice odmerjali ročno);
- pronicanje tekočine v vzorec in s tem sprememba stičnega kota (29).

Zaradi omenjenih težav se v podrobno teorijo glede omočenja tablet nismo poglobili.

Graf 10: Spreminjanje stičnih kotov s časom. Za iste medije so razlike v stičnih kotih zelo velike, kar kaže na slabo ponovljivost meritev.



5 SKLEPI

Na podlagi preučevanja nabrekanja XAN hidrofilnih ogrodnih tablet v medijih z različnimi ionskimi močmi lahko zaključimo, da dosežejo tablete največjo stopnjo nabrekanja v prečiščeni vodi. Z naraščanjem ionske moči medijev stopnja nabrekanja tablet pada. Senčenje ioniziranih karboksilnih skupin v 0,08 M HCl in elektrolitsko ščitenje z Na⁺ ioni v primeru raztopine NaCl sta glavna razloga, da se med verigami XAN-a zmanjša elektrostatski naboj. Posledica je manjša stopnja nabrekanja v omenjenih medijih. Hkrati z nabrekanjem poteka tudi erozija tablet. Deleži erozije do določene mere sledijo stopnjam nabrekanja (prečiščena voda > 0,001 M HCl > NaCl > 0,08 M HCl). Razlika je samo pri raztopinah NaCl in 0,08 M HCl, ki sta pri nabrekanju zamenjana.

Z metodo AFM smo določili vpliv ionske moči medijev na mehanske lastnosti posameznih polimernih verig (persistenčna dolžina in vztrajnostni polmer). Z višanjem ionske moči se togost posameznih polimernih verig povečuje (persistenčna dolžina se z višanjem ionske moči medijev krajša). Ugotovili smo tudi, da se vztrajnostni polmer z zmanjševanjem ionske moči medija povečuje, kar ustreza večji hidrataciji polimernih verig. Na makroskopskem nivoju to opazamo kot izrazito nabrekanje polimernega ogrodja tablet v medijih manjše ionske moči (višje vrednosti vztrajnostnega polmera).

Z instrumentalno nanoindentacijo tankih filmov XAN-a pripravljenih iz raztopin z različnimi ionskimi močmi smo določili njihov vpliv na mehanske lastnosti (*Young-ov* modul in vtisno trdnost). Filmi pripravljene iz raztopin z nižjo ionsko močjo izkazujejo večjo plastičnost, kot filmi pripravljene iz raztopin z višjo ionsko močjo. Na podlagi izračunanih *Young-ovih* modulov lahko zaključimo, da se z višanjem ionske moči raztopin, togost filmov povečuje (višje vrednosti *E*).

Na podlagi podatkov pridobljenih z različnimi eksperimenti smo ugotavljali korelacije med njimi. Tako smo ugotovili linearni korelaciji na razsežnostnem nivoju med *Young-ovim* modulom in hitrostjo nabrekanja ($R^2 = 0,979$) ter vtisno trdnostjo in hitrostjo nabrekanja ($R^2 = 0,932$). S takšno korelacijo bi lahko na podlagi izmerjenega *Young-ovega* modula oziroma

vtisne trdnosti v prihodnje napovedovali hitrost nabrekanja ogrodnih tablet iz XAN-a. Prav tako smo ugotovili linearne korelacije med molekularnim in razsežnostnim nivojem in sicer med persistentno dolžino in *Young*-ovim modlom ($R^2 = 0,746$) ter vztrajnostnim polmerom in hitrostjo nabrekanja ($R^2 = 0,780$). Glede na dobro linearno korelacijo parametrov med *bulk* in *single* nivojem, lahko sklepamo, da lastnosti na razsežnostni ravni (nabrekanje) posledica urejenosti strukture na molekularni ravni (persistentna dolžina, vztrajnostni polmer).

6 LITERATURA

1. Zakon o zdravilih /ZZdr-1/, 2006, Ur.l. RS, št. 31/2006 (<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200631&stevilka=1266>, 22.05.2013)
2. Mikac U, Sepe A, Kristl J, et al. A new approach combining different MRI methods to provide detailed view on swelling dynamics of xanthan tablets influencing drug release at different pH and ionic strength. *J Controlled Release* 2010; 145: 247-256.
3. Venkatraman S, Davar N, Chester A, Kleiner L. An overview of controlled release systems. In: Donald L Wise (ed) *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. Marcel Dekker, New York, Basel, 2000: 431-463.
4. Pavli M: Načrtovanje, izdelava in vrednotenje ogrodnih tablet s prirejenim sproščanjem na osnovi naravnih polimerov. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2010
5. Farmacevtske oblike Ph. Eur. In: *Formularium Slovenicum, Slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 3.0*, tretja izdaja. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje, Javna Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, 2011: 101-160.
6. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/biomaterials/tutorial.html>, 07.03.2013
7. Talukdar M M, Michoel A, Rombaut P, Kinget R. Comparative study on xanthan gum and hydroxypropyl cellulose as matrices for controlled-release drug delivery I. Comcation and in vitro drug release behaviour. *Int J Pharm* 1996; 129: 233-241.
8. Jian H, Zhu L, Zhang W, Sun D, Jiang J. Galactomannan (from *Gleditsia sinensis* Lam.) and xanthan gum matrix tablets for controlled delivery of theophylline: In vitro drug release and swelling behavior. *Carbohydr polym* 2012; 87: 2176-2182.
9. Akhgari A, Abbaspour M R, Rezaee S, Kuchak A. Evaluation of the swelling, erosion and drug release from polysaccharide matrix tablet based on pectin and inulin. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2011; 6(1): 51-58.
10. Lowman A M, Peppas N A. Hydrogels. In Mathiowitz E: *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*. Wiley, New York, 2000; 397-417.
11. Silveira J L M, Bresolin T M B. Pharmaceutical use of galactomannans. *Quimica Nova*, 34 (2), 292-299.

12. Govedarica B: Vrednotenje površinskih in mehanskih lastnosti farmacevtskih surovin in izdelkov na nivoju delcev z uporabo mikroskopije na atomsko silo. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2011
13. Srpič S. Mehanika trdnih teles. Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Ljubljana 2003.
14. Boyer R. Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana 2005.
15. Ikai A. Chapter four – Polymer chain mechanics. In: The world of nano-biomechanics: Mechanical imaging and Measurement by atomic force microscopy. Elsevier science publishing company, 2007. 69-87.
16. Govedarica B, Sovány T, Pintye – Hódi K, Škarabot M, Baumgartner S, Muševič I, Srčič S. Addressing potent single molecule AFM study in prediction of swelling and dissolution rate in polymer matrix tablets. *European J Pharm and Biopharm* 2012; 80: 217-225.
17. http://www.princeton.edu/~achaney/tmve/wiki100k/docs/Radius_of gyration.html, 04.06.2013.
18. Abels J, Moreno-Herrero F, van der Heijden T, Dekker C, Dekker N H. Single-molecule Measurements of the persistence length of double-stranded RNA. *Biophys J* 2005; 88 (4): 2737-2744.
19. Govedarica B, Kerč J, Srčič S. Aplikacija mikroskopije na atomsko silo v farmacevtsko tehnoloških raziskavah. *Farm vest* 2011; 62: 139-146.
20. Tivadar A, Kočevar K, Muševič I, Srčič S. Mikroskopija na atomsko silo. *Farm vest* 2002; 53: 277-291.
21. Lucca D A, Herrmann K, Klopstein M J. Nanoindentation: measuring methods and applications. *Manuf Technol* 2010; 59: 803-819
22. http://www.nanoindentation.cornell.edu/Model/elastic_model.htm, 08.10.1012
23. Lucas B N, Oliver W C, Swindeman J E. Fundamentals of Nanoindentation and Nanotribology. *Mater Res Soc Symp Proc* 1998; 3: 522.
24. García - Ochoa F, Santos V E, Casas J A, Gómez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol Adv* 2000; 18: 549-579.

25. Oliver W C, Pharr G M. An improved technique for determining hardness and elastic-modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res* 1992; 7: 1564-1583.
26. Sneddon I N. The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int J Eng Sci* 1965; 3: 47–57.
27. Planinc N. Korelacija med reološkimi lastnostmi in hitrostjo sproščanja iz ogrodnih tablet iz ksantana. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2011.
28. Baumgartner S, Pavli M, Krist J. Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. *European J pharm and biopharm* 2008; 69: 698-707.
29. Planinšek O, Srčič S. Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2007.