

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA BENČAN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA BENČAN

**PREUČEVANJE VPLIVOV TEMPERATURNIH
OBREMENITEV NA FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI
VAZELINA IN NJEGOVO STABILNOST**

**STUDY OF THE EFFECTS OF TEMPERATURE ON THE
PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF WHITE
PETROLATUM AND ITS STABILITY**

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljala v Sandozovem razvojnem centru Slovenija, v Lek farmacevtski družbi d.d., na področju farmacevtske tehnologije pod mentorstvom prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom dr. Javorja Kaca, mag. farm. Določanje peroksidnega števila sem opravljala na oddelku razvojne analitike. Analize z diferenčno dinamično kalorimetrijo so opravili na oddelku fizikalne analitike, kromatografske analize visoke ločljivosti pa na oddelku analitike.

Izjava:

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janeza Kerča, mag. farm. in somentorstvom dr. Javorja Kaca, mag. farm.

Martina Benčan

ZAHVALA

Lepo se zahvaljujem mentorju prof. dr. Janezu Kerču za priložnost izdelave magistrske naloge in strokovne nasvete.

Zahvala gre tudi somentorju dr. Javorju Kacu za nasvete in pomoč pri izvedbi analitskega dela magistrske naloge.

Za strokovni pregled se zahvaljujem delovnemu mentorju dr. Mihi Homarju, somentorju dr. Javorju Kacu, mentorju prof. dr. Janezu Kerču in članoma komisije prof. dr. Urošu Urlebu in asist. dr. Ireni Prodan Žitnik.

Zahvaljujem se Leku, ki mi je omogočil izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge v Sandozovem razvojnem centru v Ljubljani.

Zahvaljujem se tudi svoji najljubši delovni ekipi – v veliko veselje in ponos mi je bilo delati z vami! Najprej se zahvaljujem dr. Mihi Homarju za izjemno potrpežljivost, veliko dobre volje in odlično jutranjo kavo. Lepo se zahvaljujem tudi Ani Miklavžin za odlično družbo, posredovanje številnih novih znanj in za pripravljenost za pomoč. Hvala tudi Valentini Božič, ker mi je s svojo družbo in pogovori popestrila ure v laboratoriju in izven njega. Nazadnje hvala še novi članici Maji Oven za druženje v mojem zadnjem mesecu v Leku.

Hvala tudi zaposlenim in študentom na razvojni analitiki za dobro družbo, lep sprejem in veliko novega strokovnega znanja.

Zahvalila bi se rada tudi svojim staršem vso finančno in moralno podporo ter potrpežljivost med študijem.

Na koncu pa bi se rada še zahvalila svojim priateljem, ki mi znajo polepšati dan in mi dajo zagona in spodbude za vedno nove izzive.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	V
ABSTRACT	XI
1. UVOD	1
1.1. ZGODOVINA VAZELINA.....	1
1.2. LASTNOSTI IN UPORABA BELEGA VAZELINA	3
1.3. VRSTE BELEGA VAZELINA	4
1.4. POSTOPKI ČIŠČENJA VAZELINA	5
1.5. STRUKTURA VAZELINA.....	5
1.6. FARMAKOPEJSKI PREDPISI IN NEČISTOTE	8
1.6.1. Regulativa različnih vrst vazelina	8
1.6.2. Nečistote.....	8
1.7. FIZIKALNE METODE VREDNOTENJA VAZELINA	9
1.7.1. Reologija	9
1.7.2. Diferenčna dinamična kalorimetrija.....	14
1.8. KEMIJSKO VREDNOTENJE STABILNOSTI VAZELINA	14
1.8.1. Peroxidno število vazelina.....	14
1.8.2. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	15
2. NACRT DELA.....	16
3. MATERIAL IN METODE	17
3.1. MATERIAL	17
3.1.1. Uporabljeni beli vazelini	17
3.1.2. Reagenti.....	17
3.1.3. Laboratorijska oprema.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Optimizacija metod obremenitev vazelina	19
3.2.2. Izbrane metode obremenitev vazelina	21
3.2.3. Centrifugiranje vazelina	21
3.2.4. Merjenje mazljivosti.....	22
3.2.5. Merjenje viskoznosti	23
3.2.6. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	23
3.2.7. Določanje peroksidnega števila.....	24
3.2.9. Slikanje vazelina za ugotavljanje sprememb barve.....	25

4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1.	Mazljivost in sinereza.....	27
4.2.	Reologija	29
4.3.	DSC	31
4.4.	Določitev vsebnosti antioksidantov s HPLC analizo	33
4.5.	Določanje peroksidnega števila.....	34
4.6.	Merjenje vrednosti rumenega kanala vzorcev vazelina.....	38
5.	ZAKLJUČEK.....	43
6.	LITERATURA.....	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Robert Augustus Chesebrough (1837-1933) (1)	1
Slika 2: Steklenica vezelina z začetka dvajsetega stoletja s seznamom predlaganih možnih uporab vezelina. Zamašek iz plute so leta 1908 zamenjali z navojnim pokrovom. (1).....	2
Slika 3: Strukturna formula parafina:	6
Slika 4: Sestavne komponente belega vezelina:	6
Slika 5: Geometrija senzorskega sistema koaksialnih sistemov (22)	10
Slika 6: Geometrija senzorskega sistema stožca in ploščice (22).....	11
Slika 7: Geometrija senzorskega sistema dveh vzporednih plošč (22).....	11
Slika 8: Primer vzorca z razvidnim linearним viskoelastičnim območjem	13
Slika 9: Shema najenostavnnejšega sistema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (24) ..	15
Slika 10: Primerjava mazljivosti pri treh serijah segrevanja in ciklanja vezelina 1.....	20
Slika 11: Primerjava mazljivosti pri treh serijah segrevanja in ciklanja vezelina 2.....	20
Slika 12: Mazljivosti vezelina 1 po različnih obremenitvah.....	27
Slika 13: Mazljivosti vezelina 2 po različnih obremenitvah.....	27
Slika 14: Mazljivosti vezelina 3 po različnih obremenitvah.....	27
Slika 15: Mazljivosti vezelina 4 po različnih obremenitvah.....	27
Slika 16: Mazljivosti vezelina 5 po različnih obremenitvah.....	28
Slika 17: Mazljivosti neobdelanih vezelinov 1, 2, 3, 4 in 5.....	28
Slika 18: Mazljivosti segretih vezelinov 1, 2, 3, 4 in 5.....	28
Slika 19: Mazljivosti ciklanih vezelinov 1, 2, 3, 4 in 5.	28
Slika 20: Ugotavljanje linearnega viskoelastičnega območja pri oscilacijski metodi (ciklan vezelin2).....	30
Slika 21: Ugotavljanje linearnega viskoelastičnega območja pri oscilacijski metodi (neobdelan vezelin 5).....	31
Slika 22: Primer DSC termograma (neobdelan vezelin 1).....	32
Slika 23: HPLC analiza vzorca vezelina 5, ki vsebuje antioksidant BHT	34
Slika 24: Peroxidno število vzorcev vezelina 1.....	36
Slika 25: Peroxidno število vzorcev vezelina 2.....	36
Slika 26: Peroxidno število vzorcev vezelina 3.....	36
Slika 27: Peroxidno število vzorcev vezelina 4.....	36
Slika 28: Peroxidno število vzorcev vezelina 5.....	37
Slika 29: Peroxidno število neobdelanih vezelinov 1, 2, 3, 4 in 5.	37
Slika 30: Peroxidno število segretih vezelinov 1, 2, 3, 4 in 5.	37
Slika 31: Peroxidno število ciklanih vezelinov 1, 2, 3, 4 in 5.	37

Slika 32: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 1	40
Slika 33: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 2	40
Slika 34: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 3	40
Slika 35: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 4	40
Slika 36: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 5	40
Slika 37: Vrednosti rumenega kanala pri neobdelanih vazelinih 1, 2, 3, 4 in 5.....	40
Slika 38: Vrednosti rumenega kanala pri segretih vazelinih 1, 2, 3, 4 in 5.	41
Slika 39: Vrednosti rumenega kanala pri ciklanih vazelinih 1, 2, 3, 4 in 5.	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljeni beli vazelini	17
Preglednica II: Uporabljeni reagenti	17
Preglednica III: Seznam uporabljene opreme	18
Preglednica IV: Primerjava deleža tekočega dela po centrifugiranju – vazelin 1	22
Preglednica V: Primerjava deleža tekočega dela po centrifugiranju – vazelin 2	22
Preglednica VI: Pogoji merjenja vsebnosti α -tokoferola, BHA in BHT s HPLC analizo	24
Preglednica VII: Oznake uporabljenih vzorcev belih vazelinov	26
Preglednica VIII: Endotermni vrhovi vzorcev vazelina	32
Preglednica IX: Rezultati merjenja vsebnosti antioksidantov v vazelinah 1, 2, 3, 4, 5	33
Preglednica X: Rezultati slikanja vzorcev vazelina	42

POVZETEK

Fizikalno-kemijsko vrednotenje belega vazelina predstavlja raziskovalcem velik izziv. Po strukturi predstavlja vazelin mešanico trdnih in tekočih n-, izo- in cikličnih parafinov z različno dolgimi verigami ogljikovodikov. Fizikalne lastnosti vazelina so odvisne od razmerja teh komponent in deleža tekoče faze, medtem ko na kemijske lastnosti bistveno vplivata vrsta in obseg čiščenja. Fizikalno-kemijske lastnosti belega vazelina pri temperaturnih obremenitvah so ključnega pomena za kakovost končnih formulacij iz vazelina.

Izbrane komercialne bele vazeline smo temperaturno obremenili na štiri različne načine in vrednotili spremembe njihovih fizikalnih in kemijskih lastnosti. Ugotovili smo, da segrevanje vzorcev zaščitenih pred svetlobo in segrevanje s homogeniziranjem ne vplivata bistveno drugače na lastnosti vazelinov kot samo segrevanje pri enakih pogojih segrevanja.

Fizikalne lastnosti vazelinov pri temperaturnih obremenitvah smo ovrednotili z merjenjem mazljivosti, s termično analizo ter reometrično. Pri reometričnem vrednotenju vzorcev nismo uspeli dobiti ponovljivih rezultatov, ker je prišlo do izpodrivanja vzorcev iz senzorskega sistema in posledično nadaljnje reološko vrednotenje ni bilo možno. Pri merjenju mazljivosti smo zaznali trende padanja mazljivosti pri temperaturno obremenjenih vazelinih, ki so bili značilni pri temperaturno ciklanih vazelinih. S termično analizo različno obremenjenih vzorcev nismo opazili značilnih razlik med različno obremenjenimi vazelini niti med različnimi vazelini.

Kemijske lastnosti smo vrednotili z določanjem peroksidnega števila, ki je merilo za vsebnost nenasičenih substanc v vazelinu, ter rezultate interpretirali s pomočjo rezultatov analize vsebnosti antioksidantov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Pri enem vazelinu se je peroksidno število po temperaturni obremenitvi zelo povečalo, kar smo pojasnili s pomanjkljivim čiščenjem vazelina ter z odsotnostjo antioksidantov.

Omenjenemu vazelinu se je po obremenitvah povečala tudi vrednost rumenega kanala in razvil se je neprijeten vonj. Pri ostalih vazelinih ni prišlo do večjih sprememb pri obremenitvah. Poskušali smo tudi uvesti metodo vrednotenja sprememb barve vazelina s fotografiranjem vazelina na belem papirju. Uspešno smo pokazali naraščanje vrednosti rumenega kanala, kjer so bile te spremembe vidne tudi s prostim očesom.

ABSTRACT

Physico-chemical evaluation of white petrolatum presents a great challenge to researchers. Petrolatum is structurally a mixture of solid and liquid n-, iso- and cyclic paraffins with different chain length of hydrocarbons. Physical properties of petrolatum depend on the ratio of these components and the proportion of liquid phase and chemical properties are significantly affected by type and extent of refining procedures. Physico-chemical properties of white petrolatum under temperature conditions are critical to quality of final petrolatum formulations.

Four different temperature conditions were applied to the selected commercially available white petrolatums and changes in their physical and chemical properties were evaluated. Heating the samples protected from light and heating with homogenization was found to have similar effect on petrolatum properties as heating alone under the same conditions.

Physical properties of petrolatum were evaluated by measuring its spredability, with thermal analysis and rheometrically. Reproducible results of rheological evaluation could not be obtained because of a displacement of samples from the sensor system and consequently impossible rheological evaluation. Trends of decreased spreadability were observed with temperature load, which were significant in temperature cycled samples. The thermal analysis of petrolatum samples did not show significant differences between petrolatum samples with different temperature load nor between different petrolatums.

Chemical properties were evaluated by determining the peroxide value, which is a measure for the content of unsaturated substances in petrolatum. These results were interpreted using the results of the antioxidants analysis by high performance liquid chromatography. In one petrolatum peroxide value significantly increased at temperature loads, which was explained by its insufficient refining and the absence of antioxidants. Its values of yellow channel were increased at temperature treatment and it developed unpleasant odour. In other petrolatums there were no major changes in chemical properties after the temperature treatment. The method of photographing the petrolatum on white paper was introduced to evaluate the changes in colour. Increase in the yellow channel value was successfully demonstrated, where these changes were also visible to the naked eye.

SEZNAM OKRAJŠAV

BHA	butil hidroksianizol (butylated hydroxyanisole)
BHT	butil hidroksitoluen (butylated hydroxytoluene)
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (differential scanning calorimetry)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high-performance liquid chromatography)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (International Organization for Standardization)
PAO	policiklični aromatski ogljikovodiki (polycyclic aromatic hydrocarbons)
PhEur	Evropska Farmakopeja (European Pharmacopoeia)
rpm	obrati na minuto (Revolution Per Minute)
UPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra Performance Liquid Chromatography)
USP	Ameriška Farmakopeja (United States Pharmacopeia)

1. UVOD

1.1. ZGODOVINA VAZELINA

Leta 1859 je polkovnik Edwin Drake (1819-1880) v Titusville, Pensilvaniji izvrtal prvo vrtino za črpanje surove nafte. Tam je kemik Robert Chesebrough (slika 1) prvič prišel v stik z črno voskasto substanco, ki se je nabirala na naftni ploščadi in ovirala delavce pri črpanju nafte. Iz te substance je leta 1869 ekstrahiral vazelin.



Slika 1: Robert Augustus Chesebrough (1837-1933) (1)

Leta 1874 je Chesebrough ustanovil podjetje Chesebrough Manufacturing Company preko katerega je prodajal vazelin. Njegova prva komercialna stranka je bil farmacevt Edmond Fougera (1821-1889), ki je vazelin prodajal v svojih lekarnah v Brooklyn-u od ustanovitve dalje. Fougera je opisal takratni postopek proizvodnje vazelina (Chesebrough-ova metoda).

»Postopek proizvodnje je dokaj preprost. Najprej lažje tekočine, pline, itd, naftnega olja odstranimo z destilacijo. Produkt, ki preostane, katran, namestimo v velik odprt železen kotel, obešen nad grelni ogenj na prostem, da odstranimo vonj, nato pustimo, da se ohladi. V komori z vročim zrakom (okoli 50°C) so veliki obrnjeni kositrni stožci, razporejeni v vrstah in polnjeni z živalskim ogljem; na njih zlijemo dezodoriran katran. Po nekaj urah je katran, ki prihaja skozi, "beli vazelin," čez nekaj časa, ko živalsko oglje postane delno izčrpano, izdelek ni več "bel", ampak

"blond". Ko živalsko oglje postaja še šibkejši absorbent, "blond" barva preide v "rdečo". Tako imamo bele, blond in rdeče vazeline.« (Fougera, 1884)

V Chesebrough-ovi brošuri je postopek proizvodnje vazelina opisan kot edini znani proces dezodoriranja nafte brez poslabšanja njegovih lastnosti za uporabo v medicinske, farmacevtske in kozmetične namene. Pri proizvodnji vazelina se ne uporablja kisline, nafto se samo koncentrirja s suho toploto do gela, in večkrat filtrira skozi živalsko oglje, podobno kot pri proizvodnji belega sladkorja, in je popolnoma neškodljiv. (Chesebrough-ova brošura, 1886). Čeprav Chesebrough-ove metode proizvodnje ne uporabljamo več, destilacija in filtracija še vedno ostajata osnovna procesa čiščenja vazelina. (1-3)

Chesebrough je patentiral postopek za izdelavo vazelina leta 1872. (U.S. patent št. 127,568, 1872). Vazelin je opisan kot snov s številnimi različnimi možnostmi uporabe poleg nege kože, kar prikazuje tudi signatura na steklenički na sliki 2. Delno je razlog za to, da pri postopkom izdelave nastane vazelin bele, rumene in rdeče barve – beli vazelin je najčistejši – kar pomeni, da se vsaka vrsta uporablja za različne namene, na primer bela za medicinske namene in za nego kože, rdeča za veterinarske namene in za nego usnjениh izdelkov. Hladilno mazilo iz vazelina je prvi komercialni izdelek za nego kože, izdelan iz rafinirane sestavine nafte. Njegovi glavni prednosti pred tradicionalnimi formulacijami hladilnih mazil so njegovi nižji stroški in daljši rok trajanja. Kmalu je vazelin postal sestavni del različnih krem za obraz in drugih kozmetičnih izdelkov.



Slika 2: Steklenica vezelina z začetka dvajsetega stoletja s seznamom predlaganih možnih uporab vezelina. Zamašek iz plute so leta 1908 zamenjali z navojnim pokrovom. (1)

Robert Chesebrough je bil odličen kemik in poslovnež obenem. Leta 1870 je začel prodajati Vaseline Petroleum Jelly kot zdravilno in blagodejno sredstvo in kot mazilno podlago. Prodaja je bila slaba, dokler ni odločil deliti brezplačne vzorce za gospodinje in zdravnike – v treh letih so njegovi zaposleni razdelili več kot pol milijona vzorcev. Chesebrough Manufacturing Company je bilo prvo podjetje, ki je delilo brezplačne vzorce v tako velikem obsegu in drugi so se učili iz tega uspeha in ga posnemali. Brezplačne vzorce so omogočili nizki stroški vazelina, enostavna proizvodnja, pakiranje in razdeljevanje, pa tudi dolg rok uporabnosti vazelina. Brezplačno razdeljevanje so kasneje nadomestili z zapakiranim vzorcem, ki so ga prodali po nominalni (neprofitni) ceni in brez poštnine strankam, ki so izpolnile in poslale kupon. (3) Chesebrough je veliko časa posvetil tudi demonstraciji uporabe vazelina potencialnim kupcem in poslovnim partnerjem. Pred občinstvom se je večkrat opekel s kislino ali z ognjem in nato na opekline nanesel vazelin in obenem pokazal stare opekline, ozdravljenе s pomočjo vazelina. Chesebrough je doživel visoko starost in je tako trdno verjel v svoj izum, da je večkrat trdil, da vsak dan poje eno žlico vazelina. (4,5)

Za izboljšanje prodaje vazelina ga je Chesebrough predstavil številnim znanstvenim in zdravstvenim ustanovam in na različnih nacionalnih in mednarodnih razstavah, kjer je prejel številna priznanja. Po počasnem začetku je tako postal mednarodna uspešnica in prvi med številnimi derivati nafta za uporabo v kozmetični in farmacevtski industriji. (3-5)

Obstajajo različne ideje o izvoru imena "vazelin". Najverjetnejša je ta, da je ime vazelin sestavljeno iz besed "Wasser" (nemška beseda za vodo) in "Elaion" (grška beseda za olje) – vazelin naj bi bil torej "voda-olje". Kot veliko drugih kemikov tistega časa je namreč tudi Chesebrough verjel, da naftno olje nastane s kemično reakcijo med ogljikom in vodikom v vodi, kar so ovrgli v dvajsetem stoletju. (6)

1.2. LASTNOSTI IN UPORABA BELEGA VAZELINA

Beli vazelin (ali tudi beli petrolat) je prečiščena in popolnoma ali delno razbarvana mešanica poltrdnih ogljikovodikov, pridobljenih iz petroleja. Vsebuje lahko ustrezni antioksidant in ni primeren za peroralno uporabo. (7)

Vazelin je inerten material z malo nekompatibilnostmi. Kljub temu je znano, da pri segrevanju razvije perokside, ki so neprimerni in nezaželeni. Vazelini za farmacevtske in kozmetične izdelke naj bi bili odporni proti kvarjenju in stabilni za razumno dolgo časa glede vonja, barve in razvoja peroksidov. Stabilnost je še posebej pomembna za

proizvajalce, ki izpostavljajo vazelin visokim temperaturam v več različnih časovnih obdobjih. (8,9)

Vazelina ne smemo greti dlje časa nad temperaturo, ki je potrebna za popolno stalitev (približno 70 °C), zaradi velikega koeficiente topotnega raztezanja. Z reološkimi in spektrofotometričnimi metodami so pokazali, da je vazelin podvržen faznemu prehodu (iz poltrdnega stanja v tekoče) v temperaturnem območju 30-40 °C. Vazelin lahko steriliziramo s suho topoto. Steriliziramo ga lahko tudi z ionizirajočim sevanjem, vendar ta proces vpliva na fizikalne lastnosti kot so nabrekanje, razbarvanje, vonj in reološke spremembe. Shranujemo ga v dobro-zaprtem vsebniku, zaščitenim pred svetlobo, na suhem in hladnem prostoru. (8)

Vazelin deluje kot okluziv: zaščiti kožo pred izgubo vlage. (10) Uporablja se tudi kot emoliens in kot glavno pomožno snov v mazilih za zdravilne učinkovine, ki so občutljive za hidrolizo. Pri izdelavi mazil ga običajno segrejemo do 75°C in mešamo. (11)

Pri izbiri ustreznega tipa vazelina za določen namen je treba upoštevati več pomembnih lastnosti, in sicer dolžino vlaken, tališče in konsistenco. Večinoma se uporablja srednje vlaknat vazelin, saj kratko- in dolgovlknati vazelin nimata ustrezne konsistence. Tališče mora biti dovolj visoko, da se končni izdelek ne utekočini pri rahlo povisani temperaturi. Daleč najpomembnejša lastnost pri določanju uporabe vazelina je primerna in enakomerna konsistenza. (9)

1.3. VRSTE BELEGA VAZELINA

Poznamo vsaj štiri vrste vazelinov (12-14):

- Naravni vazelin pridobivajo s procesom čiščenja nafte, s katerim odstranijo vonj in spremenijo barvo. Proses čiščenja je podaljšan pri belem vazelinu, ki mu odstranijo praktično vso rumeno barvo. Končni produkt ima INCI ime "petrolatum" in CAS številko 8009-03-08.
- Umetni vazelin je mešanica naravnih ogljikovodikov, ki jih pridobivamo iz surovega vazelina: mikrokristaliničnih voskov, trdnega parafina (parafinskega voska) in prečiščenih mineralnih olj (ali parafinskih olj). Proizvajalci uporabljajo različna razmerja teh komponent, da zagotovijo optimalne lastnosti vazelinov za različno uporabo. Ime takega vazelina je sestavljen iz imena vsake komponente: microcrystalline wax (CAS 63231-60-7), paraffin wax (CAS 8002-74-2) in mineral oil (CAS 8042-47-5). (7) Komponente umetnega vazelina so prikazane na sliki 4.

- "Gatsch" ali "slack" vosek (parafinski vosek, stiskani vosek, stisnjeni parafin, stiskani parafini) pridobivajo iz stranskih produktov destilirane nafte (iz destilatov nafte), ki jih pridobivajo za proizvodnjo lubrikantnih olj, in jih nato zmešajo s parafinskim oljem, da pridobijo želeno konsistenco, temperaturo tališča, viskoznost, itd.
- Sintetični vazelin nastane iz sintetičnih ogljikovodikov, pridobljenih s hidrogeniranjem ogljikovega monoksida.

V farmacevtski in kozmetični industriji se uporabljajo predvsem naravni in umetni vazelini. (12)

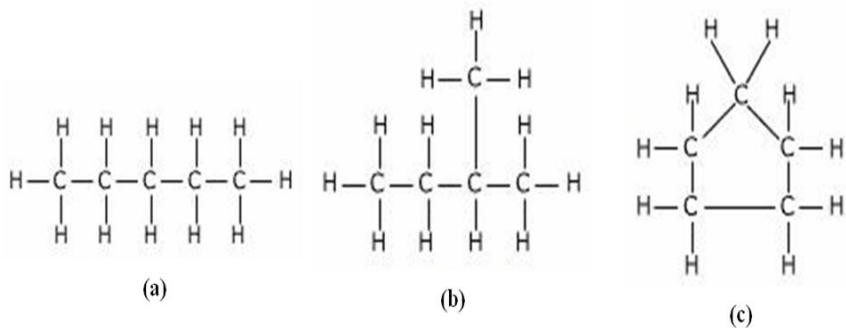
1.4. POSTOPKI ČIŠČENJA VAZELINA

Vse vaseleine naravnega izvora čistijo s kombinacijo različnih postopkov kot npr.: obdelava z žveplovo kislino, ki ji sledi nevtralizacija z natrijevh hidroksidom; filtracija skozi belilno zemljo, živalsko oglje, silikagel ali aluminijev silikat; selektivna ekstrakcija topila; katalitsko hidrogeniranje. Obdelava z žveplovo kislino povzroča neželene stranske produkte in tudi odstrani tiste ogljikovodike, ki zagotavljajo primerno konsistenco končnega izdelka, zato jo v veliki meri nadomeščajo adsorpcijske metode in katalitsko hidrogeniranje. Katalitsko hidrogeniranje poteka pri visokem tlaku in temperaturah med 250°C in 400°C z vodikom in posebnim katalizatorjem. To ne eliminira aromatskih in nenasičenih nečistot, ampak jih spremeni v manj škodljive snovi. Preostale trdne delce odstranijo z belilno zemljo in z metodami filtracije. Spojine z nizkim vreliščem in nizko molekulsko maso, pa tudi vonj in okus je mogoče odstraniti s "steam-top-distillation" pri 150°C v vakuumu. (12)

1.5. STRUKTURA VAZELINA

Vazelin predstavlja dvofazni sistem z strukturo gela. Tekoča fazo, ki predstavlja 70-90% celotnega vazelina, sestavljajo n-parafinski in izoparafinski ogljikovodiki (nasičeni ogljikovodiki), ter tekoči nenasičeni ogljikovodiki (npr. heptadecen in oktadecen). Trdna faza je sestavljena iz kristalne komponente (n-parafini, 10-20%) in manjše količine mikrokristalne komponente (izoparafini in majhne količine alicikličnih ogljikovodikov (cikloalkanov)). (15) Parafini so po svoji strukturi alkani. Molekula parafinskih ogljikovodikov je lahko nerazvezana (take parafine imenujemo n-parafini ali normalni parafini) ali razvezana (izoparafini). Alkani (n-parafini in izoparafini) s petimi do

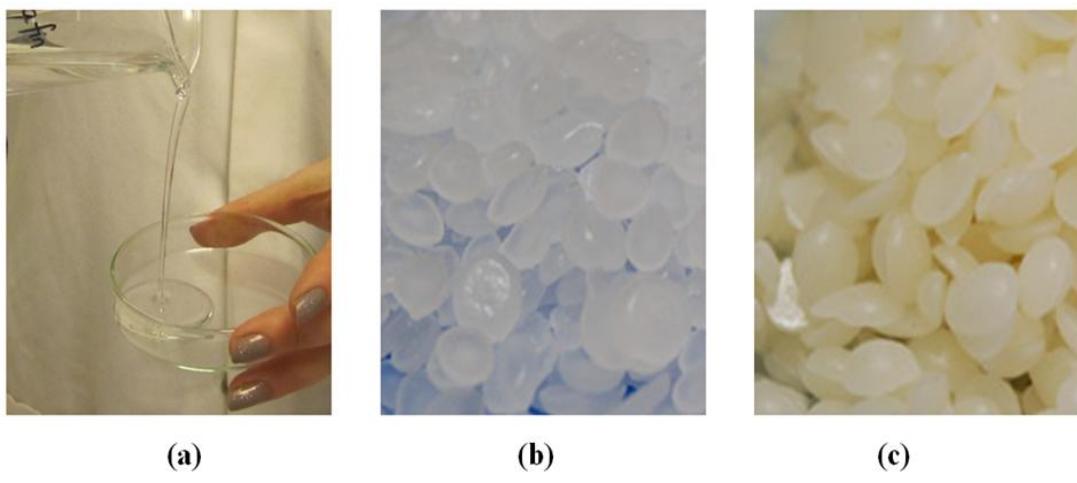
šestnajstimi ogljikovimi atomi so pri standardnih pogojih tekoči, višji alkani (sedemnajst in več ogljikovih atomov) pa so trdni. (16) Slika 3 prikazuje primere različnih strukturnih formul parafinov.



Slika 3: Strukturna formula parafina:

- (a) n-parafin (pentan),
 - (b) izoparafin (izopentan),
 - (c) ciklični parafin (ciklopantan).

Sestava in fizikalne značilnosti vezelina so odvisne od več faktorjev: (a) od vira destilatov surove nafte, (b) deleža hlapnih olj, ki jih med destilacijo odstranijo, (c) od tega, ali so pred razvoskanjem opravili čiščenje ali ne, (d) vrste postopka, ki so ga uporabili za ločevanje voskastih sestavin in (e) viskoznosti in drugih značilnosti olja, ki ga uporabijo za mehčanje surovega vezelina pred farmakopejsko predpisanim čiščenjem s filtriranjem. (17) Slika 4 prikazuje sestavne komponente belega vezelina.



Slika 4: Sestavne komponente belega vaseolina:

- (a) tekoči parafin,
 - (b) parafinski vosek,
 - (c) mikrokristalinični vosek.

Beli vazelin je pripravljen na enak način kot rumeni, le da se proces čiščenja nadaljuje, dokler (vizualno) rumena barva popolnoma ne izgine. Naravni vazelin vsebuje nasičene n-parafine v relativno majhnem deležu v primerjavi z umetnim vazelinom. (12) Za razlogo morfologije in koloidne strukture vazelina so uporabili model resastih micelov, ki so ga prvič postavili leta 1930. Trdni parafinski ogljikovodiki tvorijo koherentno tridimenzionalno rešetko, v katero so vgrajeni in immobilizirani tekoči parafinski ogljikovodiki. Dolgovertižni parafini tvorijo micle, ki podelijo vazelinu karakteristične lastnosti (plastičnost, tiksotropnost, vlečljivost). Razvezjani in nerazvezjani parafini v trdnem delu vazelina imajo različne funkcije: n-parafini predstavljajo kristalno, izoparafini pa amorfno frakcijo, ki vpliva na zmožnost vezanja tekočih parafinov. (18)

Polarizacijsko-mikroskopska preiskava je pokazala vazelin kot delno kristalizirano snov s številnimi, zelo majhnimi podolgovatimi področji imenovanimi trihit, ki se pojavljajo vedno neostro, brez izrazitih mejnih obrisov. Stabilni vazelini imajo zelo fino trihitno struktorno in so prosojni. Nasprotno vsebujejo manj stabilni vazelini velike, ostro omejene igličaste kristale. Videz teh proizvodov je snežno bel, manjka jim transparentnost, struktura pa je grobo zrnata, kar se negativno odraža na mazljivosti vazelina. (18)

Za kvaliteto vazelina so pomembne pretočne lastnosti, ki so odvisne od vsakokratne obdelave vazelina in od časa mirovanja vazelina. Po daljšem času mirovanja vazelin zopet pridobi višjo viskoznost zaradi ponovne tvorbe gelskega ogrodja, pojav se imenuje tiksotropija. (19)

Izstop tekoče faze iz trdne koherentne rešetke vazelina oz. sinereza je pomemben kriterij za vrednotenje kakovosti in uporabnih lastnosti vazelina. Pri staranju in daljšem shranjevanju pride v vazelinu do kristalografskih sprememb, ki povzročajo ta pojav. Pri ohlajevanju nastane v talini zelo fina kristalna mreža micelarnih vlaken z zelo majhnimi zankami in veliko vsebnostjo tekoče faze. Ta mreža ni termodinamsko stabilna in se sčasoma z asociacijo trdnih delcev stabilizira v vedno večje kristale. Ta proces stabilizacije vodi k tvorbi grobozankaste mreže, katere mehanska stabilnost in sposobnost vezanja tekočih delcev sčasoma pada. Kmalu pride do porušenja strukture in sesedanja ogrodja tako, da pride do izstopa tekočine. (18,19) Sinereza se lahko pojavi tudi po mehanski obdelavi vazelina, ko se zopet zgradi gelsko ogrodje, ker se lahko micelarna vlakna zgostijo in se pri tem izloči tekoča faza. Ker številne formulacije mazil zahtevajo disperzijo notranje faze vazelina, je potrebno veliko mešanja oziroma striga, da dosežemo želeno homogenost. Občutljivost vazelina na strig je torej glavna skrb v proizvodnih postopkih mazil. Pogosto

so težave, ki jih izkazuje mazilo, kot so ločitev tekoče faze in nehomogenost, neposredno povezane s stopnjo občutljivosti vezelina na strig (strižna občutljivost vezelina). (20) Strižna občutljivost vezelina je odvisna od razmerja med njegovimi glavnimi komponentami (n-parafin, izoparafin, ciklični alkani), pri čemer najboljši farmacevtski vezelini vsebujejo majhen delež n-parafinov. Med mehanskim strigom pride do kolapsa strukture v manjši meri pri izoparafinah kot pri n-parafinah. Glavni razlog za to je verjetno dejstvo, da izoparafini tvorijo gostejšo kristalno gelsko strukturo. Fina kristalna struktura je manj občutljiva na mehanski strig kot velika kristalna struktura. Ko se velikost kristalov zmanjša, se viskoznost vezelina poveča. (17)

1.6. FARMAKOPEJSKI PREDPISI IN NEČISTOTE

1.6.1. Regulativa različnih vrst vezelina

Razlike med vezelini na farmacevtskem tržišču so zelo velike, vsi pa morajo ustrezzati farmakopejskim predpisom in mejam. Farmakopeje določajo tališče med 35 in 70 °C. V USP 36 je navedba morebitnega dodanega antioksidanta predpisana, v najnovejši evropski farmakopeji (PhEur 8) pa ne več. Farmakopeji USP in PhEur priznavata pomembnost čistosti vezelina in zato vključujeta teste za vsebnost sulfatnega pepela, organske in anorganske kisline, baze, barvo, specifično gostoto, konsistenco in druge teste. (9) Francoska farmakopeja je še malo strožja, saj predpisuje tudi preverjanje vsebnosti nenasičenih ogljikovodikov. Vazelini, ki ustrezano njenim zahtevam, so primerni tudi za peroralno uporabo. (21)

1.6.2. Nečistote

Nečistote, ki lahko vplivajo na varnost in stabilnost vezelina, so predvsem policiklični aromatski ogljikovodiki in drugi nenasičeni ogljikovodiki. Naravni vezelin vsebuje majhne količine nenasičenih substanc, kot so olefini in aromatski ogljikovodiki. Količine teh substanc variirajo glede na vir uporabljenih naft in so lahko povečane zaradi krekinga povezanega z visokimi temperaturami pri destilaciji naft. Kreking pomeni, da so ogljikovodiki termično konvertirani, tako da se ogljikovodiki majhnih in visokih molekulskih mas ločijo. Nekateri znanstveniki menijo, da lahko kreking preprečimo s frakcionirno destilacijo vezelina v vakuumu. (12)

Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAO), znani tudi kot policiklični ogljikovodiki ali

polinuklearni aromatski ogljikovodiki, so kemijske spojine, ki so sestavljene iz kondenziranih aromatskih obročev in ne vsebujejo heteroatomov ali substituentov. Kot nečistoče so zaskrbljujoči zaradi potencialne kancerogenosti, mutagenosti in toksičnosti za reprodukcijo (genotoksičnosti). PAO so tudi alergogene snovi – najverjetnejši alergogeni PAO so derivati fenantrena. Količina teh nečistot je v veliki meri odvisna od vira in proizvodnega procesa, poleg tega pa so pogoste variacije v alergogenosti med znamkami vazelina različnih proizvajalcev. (12-14)

Druga skupina nečistot so nenasičeni ogljikovodiki, ki so nagnjeni k oksidaciji pri izpostavljanju svetlobi in kisiku in reagirajo z nekaterimi kislinami in bazami. Če je vazelin izpostavljen oksidacijskim procesom v formulaciji, je zdravilna učinkovina manj zaščitena in lahko njena učinkovitost močno upada med shranjevanjem. Torej je bistvenega pomena, da je proces hidrogeniranja vazelina nadzorovan, da zagotovimo njegovo kemijsko nevtralno obnašanje v formulaciji in pri aplikaciji. Oksidacija povzroči obarvanje vazelina in povzroči nastanek neprijetnega vonja. Zato je bistvenega pomena, da proizvajalec minimizira prisotnost nenasičenih spojin, ki so posledica proizvodnega procesa in ta parameter kontrolira z ustreznimi metodami. (8)

1.7. FIZIKALNE METODE VREDNOTENJA VAZELINA

1.7.1. Reologija (22)

Pri opisu možnosti reološke karakterizacije vazelina bomo najprej opisali inštrumente in senzorske sisteme, definirali pojem viskoelastičnosti, opisali meritve viskoelastičnih lastnosti in nazadnje opisali dinamične oz. oscilatorne teste.

Inštrumenti in senzorski sistemi

Proučevanje reološkega obnašanja snovi omogočajo viskozimetri in reometri. Inštrumente za reološko proučevanje snovi delimo v dve skupini:

- absolutni inštrumenti (rotacijski ter kapilarni reometri in viskozimetri), za katere lahko vrednosti strižnih hitrosti oz. strižnih napetosti izračunamo s pomočjo merljivih in reguliranih količin ter s pomočjo geometrijskih karakteristik izbranega senzorskega sistema;
- relativni inštrumenti (viskozimeter s padajočo kroglico, viskozimeter s turbinskimi mešali, penetrometer, Fordova čaša itd.).

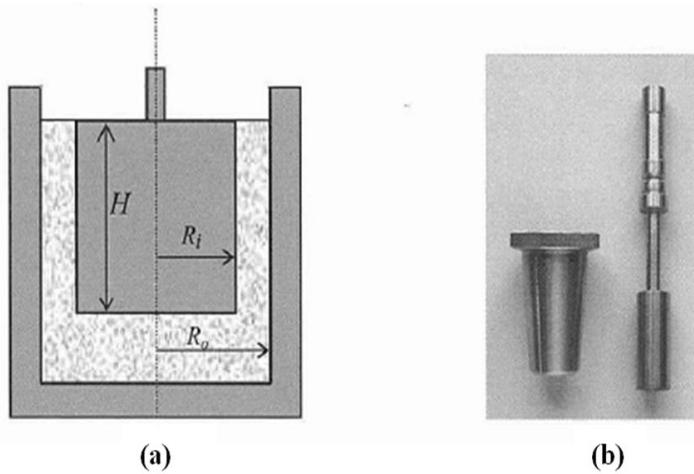
Pri merjenju z absolutnimi inštrumenti je potrebno izpolniti določene pogoje: laminarnost toka, izotermni pogoji merjenja, preprečevanje zdrsa na meji med proučevano snovjo in senzorskim sistemom, zagotavljanje pogojev enostavnega striga, izogibanje vplivu robnih pogojev.

Proučevanje reoloških lastnosti kompleksne snovi zahteva tudi izbiro primerenega senzorskega sistema.

Poznamo tri vrste senzorskih sistemov:

- **Senzorski sistem koaksialnih valjev (slika 5)**

Proučevana tekočina se nahaja v reži med valjema. Reometer s senzorskim sistemom koaksialnih valjev deluje tako, da en valj rotira, drugi pa miruje.



Slika 5: Geometrija senzorskega sistema koaksialnih sistemov (22)

(a) shema koaksialnega sistema,

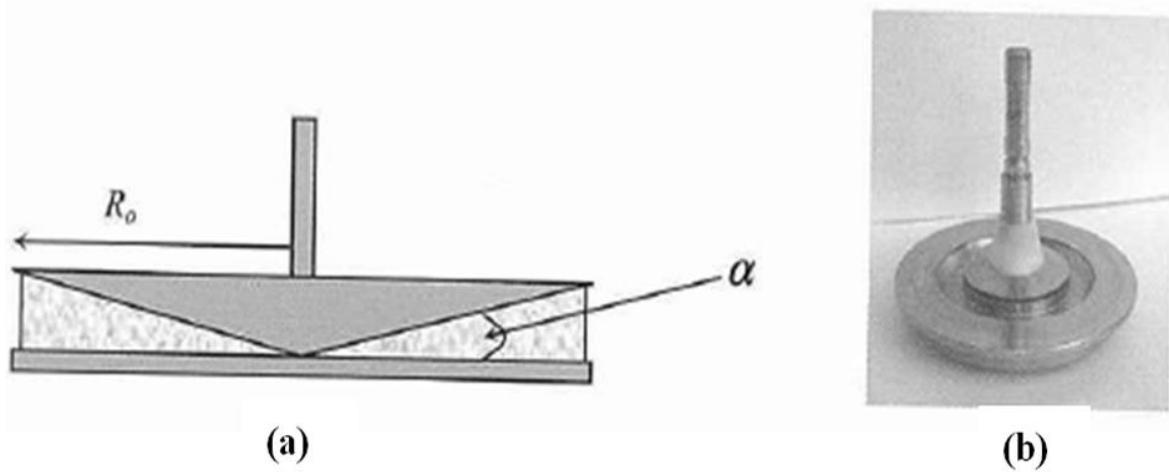
(b) slika koaksialnega sistema

- **Senzorski sistem stožca in ploščice (slika 6)**

Glavne prednosti tega sistema so enostavnost doziranja vzorca in čiščenja merilnega sistema po opravljeni meritvi, majhne količine potrebnega vzorca ter konstantna strižna hitrost po celotnem vzorcu za majhne kote stožca.

Znanih je več izvedb tega reometra:

- stožec rotira z določeno kotno hitrostjo, plošča miruje,
- plošča rotira z določeno kotno hitrostjo, stožec miruje,
- stožec in plošča rotirata hkrati in v nasprotno smer.

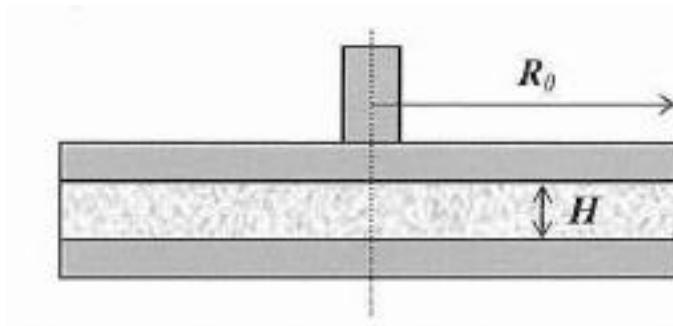


Slika 6: Geometrija senzorskega sistema stožca in ploščice (22)

- (a) shema senzorskega sistema stožca in ploščice,
- (b) slika senzorskega sistema stožca in ploščice

- **Senzorski sistem dveh vzporednih plošč (slika 7)**

Vzorec se nahaja v reži med ploščama s polmerom (R_0) in razdalje med njima (H).



Slika 7: Geometrija senzorskega sistema dveh vzporednih plošč (22)

Viskoelastičnost

Viskoznost in elastičnost sta dve osnovni lastnosti materialov (tekočin in trdnih snovi) kot odziv na delovanje strižnih, nateznih ali tlačnih sil. Neidealne snovi lahko del vstopajoče energije shranijo, po odvzemu napetosti pa lahko del deformacije povrnejo. Lastnost takih realnih snovi imenujemo viskoelastičnost. Proučevanje reološkega obnašanja poltrdnih snovi postaja vedno bolj pomembno na področju optimizacije procesov, kontrole kakovosti vstopnih surovin in izstopnih produktov in pri formulaciji novih ter pri reformulaciji že obstoječih produktov.

Meritve viskoelastičnih lastnosti

a) Nedestruktivni strižni pogoji – območje linearnega viskoelastičnega odziva

Za enolično določitev viskoelastičnih lastnosti je pomembno, da meritve izvajamo pri pogojih majhnih strižnih deformacij (nedestruktivni pogoji). Na ta način lahko zagotovimo, da se bo snov na strižno silo odzvala v območju linearnega viskoelastičnega odziva, reološke količine pa bodo enostavno merljive. Namenski meritve je določiti delež viskoznega in elastičnega doprinosha k viskoelastičnemu odzivu tekočine ali poltrdne snovi.

Meritve viskoelastičnih lastnosti v splošnem izvajamo z uporabo dveh merilnih tehnik, in sicer:

- dinamični testi – oscilatorni testi
- statični testi – testi lezenja in obnove (creep - recovery)

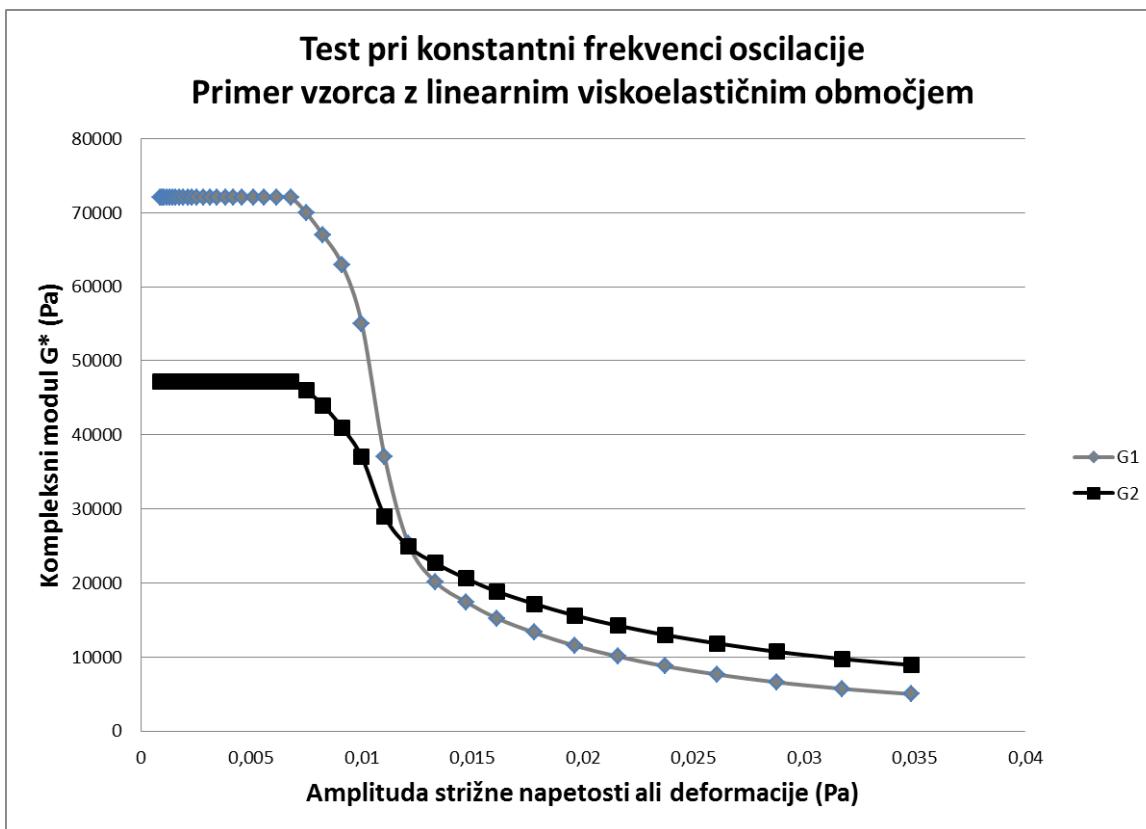
b) Destruktivni strižni pogoji – območje nelinearnega viskoelastičnega območja

Meritve pri destruktivni strižnih pogojih najpogosteje izvajamo z merilnima tehnikama določanja normalnih napetosti (weissenbergov efekt) in z deformacijskim nabrekanjem pri iztoku iz kapilare (die swell efekt). Te meritve so relativno zahtevne, potrebujejo veliko priprave in zahtevajo uporabo ustrezne instrumentalne opreme.

Dinamični – oscilatorni testi

Oscilatorno testiranje z dovolj majhno amplitudo deformacije omogoča določiti viskozno in elastično komponento viskoelastične snovi pri nedestruktivnih strižnih pogojih. V nasprotju z eksperimenti pri stacionarnih tokovnih pogojih, se pri meritvi strižna deformacija s časom spremiļja sinusno z določeno frekvenco in amplitudo. Glede na način izvajanja meritve poznamo dve osnovni merilni tehniki, ki se razlikujeta glede na nastavljene in merjene parametre pri oscilaciji. Pri reometrih z nastavljivo strižno hitrostjo je nastavljena količina deformacija, merimo pa odgovarjajočo strižno napetost, pri reometrih z nastavljivo strižno napetostjo pa ravno obratno.

Območje linearnega viskoelastičnega odziva je območje, kjer sta modula G_1 (elastični modul) in G_2 (viskozni modul) konstantna (pri majhnih amplitudah strižne deformacije), ko pa amplituda strižne deformacije doseže določeno vrednost, postane viskoelastično območje nelinearno oz. pride do porušenja notranje strukture vzorca (slika 8).



Slika 8: Primer vzorca z razvidnim linearnim viskoelastičnim območjem

Eksperimentalne metode

- **Testi pri konstantni frekvenci oscilacije**

Ta metoda je pogosto prvi korak za reološko obremenitev viskoelastičnih snovi, s katero določimo območje linearnosti. Testi na različnih viskoelastičnih snoveh so pokazali, da so reološke lastnosti v splošnem neodvisne od deformacije (oz. strižne napetosti) do neke kritične vrednosti γ_c (oz. τ_c). Nad to vrednostjo deformacije (oz. strižne napetosti) pričnejo vrednosti dinamičnih količin z naraščajočo deformacijo padati, kar pomeni, da je reološko obnašanje testirane snovi prešlo iz linearnega v nelinearno viskoelastično obnašanje. Meritve pri konstantni frekvenci oscilacije lahko z reometri z nastavljivo strižno hitrostjo izvajamo tako, da spremojemo amplitudo deformacije, pri reometrih z nastavljivo strižno napetostjo pa lahko spremojemo amplitudo strižne napetosti ali deformacije.

- **Meritve frekvenčne odvisnosti dinamičnih količin**

Ko določimo območje linearnega viskoelastičnega odziva, lahko na osnovi izpeljanih zvez izračunamo vrednosti dinamičnih tekočin. Meritve izvajamo v območju deformacij (ali amplitud strižne napetosti), ki zagotavljajo linearen viskoelastičen odziv pri različnih

frekvencah oscilacije. Na ta način določimo frekvenčno odvisnost dinamičnih količin (mehanski spektri) v pogojih, ko se struktura testirane snovi ne podira (ne-destruktivni strižni pogoji). Iz tako dobljenih mehanskih spektrov je možno sklepati na tip mikrostrukture, jakost vezi med strukturnimi elementi, stopnjo geliranosti ipd.

1.7.2. Diferenčna dinamična kalorimetrija

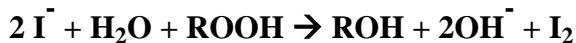
Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je metoda termične analize, ki je preprosta v svojem konceptu in daje zanesljive kvalitativne in kvantitativne informacije o substancah. Pri DSC analizi primerjalno segrevamo (ali ohlajamo) referenčni zaprti aluminijasti lonček in enak lonček z vzorcem z določeno hitrostjo. Pri tem merimo razliko v količini energije, ki se porabi, da je temperaturna razlika med vzorcem in referenco vedno enaka nič. Na ta način zaznamo topotne efekte, ki nastopajo pri faznih spremembah ali kemijskih reakcijah. Na podlagi teh podatkov določamo vrsto in notranjo strukturo posameznih substanc. (18)

1.8. KEMIJSKO VREDNOTENJE STABILNOSTI VAZELINA

Vazelin je po naravi zelo stabilen, kar je posledica nereaktivnosti njegovih ogljikovodikov. Večina problemov z nestabilnostjo se pojavi zaradi prisotnosti majhne količine nečistot. Pri izpostavljanju svetlobi se lahko te nečistote oksidirajo in pri tem obarvajo vazelin ter povzročijo nastanek neželenega vonja. Obseg oksidacije je odvisen od vira vazelina in stopnje rafinacije. Oksidacijo lahko inhibiramo z dodatkom ustreznih antioksidantov, kot na primer butil hidroksianizolom (BHA), butil hidroksitoluenom (BHT) ali α -tokoferolom (vitamin E). (8)

1.8.1. Peroxidno število vazelina

Peroxidno število je število, ki v miliekvivalentih (milimolih na kilogram) aktivnega kisika (enota mEq O₂/kg) izraža količino peroksidov v 1000 g substance. (23) Prva reakcija, ki poteče pri določanju peroksidnega števila je:



V reakciji je ROOH splošna formula za perokside. Bazične hidroksilne ione nevtraliziramo s presežkom ocetne kisline v topilu. Jod, ki se sprosti iz kalijevega jodida, nato titriramo s predhodno standardizirano raztopino natrijevega tiosulfata. (23)



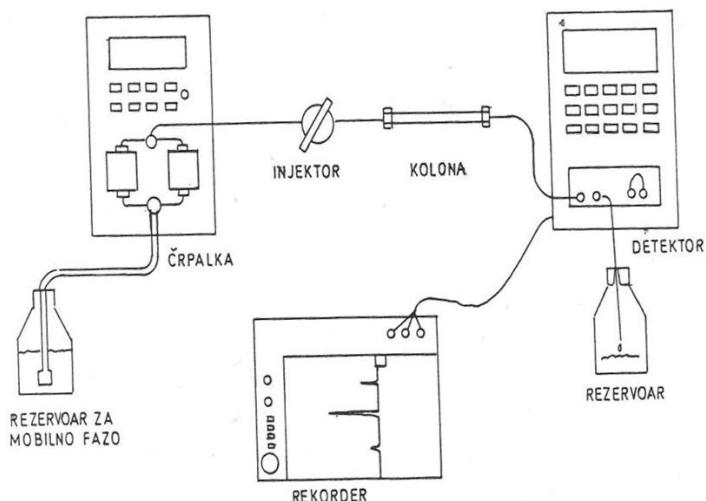
1.8.2. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrezno detekcijo s ciljem kvalitativne ali kvantitativne določitve.

Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj zaradi različnih fizikalnih in kemijskih reakcij z mobilno in stacionarno fazo.

Komponente najenostavnejšega HPLC sistema so naslednje (slika 9):

- Rezervoar za mobilno fazo,
- Črpalka,
- Injektor,
- Kromatografska kolona,
- Detektor,
- Instrument za zapis signala. (24)



Slika 9: Shema najenostavnejšega sistema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (24)

2. NAČRT DELA

Diplomska naloga bo poskušala ovrednotiti lastnosti vazelina in njegove spremembe pri različnih temperaturnih obremenitvah. Vazelin bomo vrednotili tako fizikalno (reologija, mazljivost, obnašanje pri centrifugiranju, optični videz, termična analiza), kot kemijsko (količina antioksidantov in peroksidno število). Vazelin bomo izpostavili različnim dejavnikom, ki se lahko pojavi med proizvodnjo izdelkov oz. shranjevanjem vazelina (vazelin na sobni temperaturi, talina vazelina na različnih temperaturah na svetlobi ali v temi, vazelin izmenično izpostavljen ciklom segrevanja in zmrzovanja (ciklan), talina izpostavljena velikim strižnim silam (rotor-stator homogenizator),...). Vpliv pogojev bomo vrednotili po zgoraj omenjenih fizikalnih in kemijskih metodah.

Potek dela:

1. Pregled literature za primere proučevanja stabilnosti vazelina in njegovih sprememb pod vplivom različnih dejavnikov.
2. Seznanjanje in preskušanje metod za vrednotenje vazelina. Poudarek na preskušenih fizikalnih metodah kot tudi na poskusu uvedbe novih metod.
3. Izpostavitev vazelina različnim okoljskim dejavnikom in proučevanje vpliva teh dejavnikov na vazelin.
4. Preverjanje vsebnosti antioksidantov v neobdelanih vzorcih in njihov vpliv na obnašanje vazelina pri različnih obremenitvah.

3. MATERIAL IN METODE

3.1. MATERIAL

3.1.1. Uporabljeni beli vazelini

Preglednica 1 prikazuje podatke o uporabljenih belih vazelinih, ki smo jih temperaturno obremenili.

Preglednica I: Uporabljeni beli vazelini

	Vazelin 1	Vazelin 2	Vazelin 3	Vazelin 4	Vazelin 5
Proizvajalec	Sasol GmbH	Sonneborn	Sonneborn	Sasol GmbH	Aiglon - Syntear – Civetea
Država	Nemčija	Nizozemska	Nizozemska	Nemčija	Francija
Ime produkta	MERKUR 500	WHITE PROTOPET 1SH	WHITE PROTOPET 1SH	MERKUR 500	Syntadex 88004
Številka šarže	F602371	599658	612178	F602157	11B14V01
Datum proizvodnje	2.5.2012	4.5.2012	6.6.2013	02/12	02/11
Rok uporabe	2.5.2015	2.5.2015	6.6.2016	02/15	02/15

3.1.2. Reagenti

Preglednica II: Uporabljeni reagenti

Uporabljen reagent	Proizvajalec	Država
Standardizirana 0.01 M raztopina natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Sigma Aldrich	ZDA
Kalijev jodid (KI)	Merck	Nemčija
MilliQ voda	Lek	Slovenija
Žveplova (VI) kislina (10% (m/V)) H_2SO_4 (5.7 mL koncentrirane 96% H_2SO_4 v 100 mL deionizirane vode)	Merck	Nemčija
Ocetna kislina (99.0 – 100.5 % m/m) – ledocet, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Merck	Nemčija
Kloroform, CHCl_3	Merck	Nemčija
α -tokoferol	Sigma Aldrich	ZDA
2-propanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OHCH}_3$	Merck	Nemčija
n-heksan C_6H_{14}	Merck	Nemčija
Butil hidroksitoluen (BHT) $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	Merck	Nemčija

Acetonitril (CH ₃ CN)	Avantor	ZDA
Metanol (CH ₃ OH)	Avantor	ZDA
Dinatrijev hidrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	Nemčija
85% fosforjeva (V) kislina (H ₃ PO ₄)	Merck	Nemčija
Tetrahidrofuran (THF), nestabiliziran (C ₄ H ₈ O)	Merck	Nemčija

3.1.3. Laboratorijska oprema

Preglednica III: Seznam uporabljene opreme

Oprema	Proizvajalec	Država
Analizna tehnica XP 205 DR	Mettler Toledo	Švica
eLine elektronska pipeta	Biohit	Finska
Titrator Mettler-Toledo T70	Mettler-Toledo	Švica
Elektroda DM147-SC (mV) (kombinirana elektroda iz platine)	Mettler-Toledo	Švica
Dve dispenzeti (Dispensette®) – za deionizirano vodo in za topilo	BrandTech Scientific	ZDA
Steklene plošče – zgornje plošče s težo 280 +/- 1 g, 200 x 200 x 3 mm		
Uteži samo za test mazljivosti 500 g in 2 kg	Häfner	Nemčija
Tehtnica Vibra AJP	Shinko Denshi	Japonska
Centrifuga Sigma 3-30 K	SIGMA Laborzentrifugen GmbH	Nemčija
Magnetna mešala	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Nemčija
T25 digital ULTRA-TURRAX homogenizator	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Nemčija
2494700 S25 NK – 19 G, nastavek za dispergiranje	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Nemčija
Rotacijski reometer Haake Rheostress RS 75	Thermo Scientific	ZDA
Termostatska kopel DC50 – K20	Thermo Scientific	ZDA
Waters 2695 Alliance, Auto sampler	Waters	ZDA
Hladilnik za kolono Spark Holland MISTRAL	Spark Holland	Nizozemska
Detektor Waters 2489 UV/Visible	Waters	ZDA
Waters Acquity UPLC sistem, Auto sampler, Binary Solvent Manager	Waters	ZDA
Detektor ACQUITY UPLC® Photodiode Array (PDA)	Waters	ZDA
Mettler Toledo DSC-1 kalorimeter	Mettler-Toledo	Švica

3.2. METODE

3.2.1. Optimizacija metod obremenitev vazelina

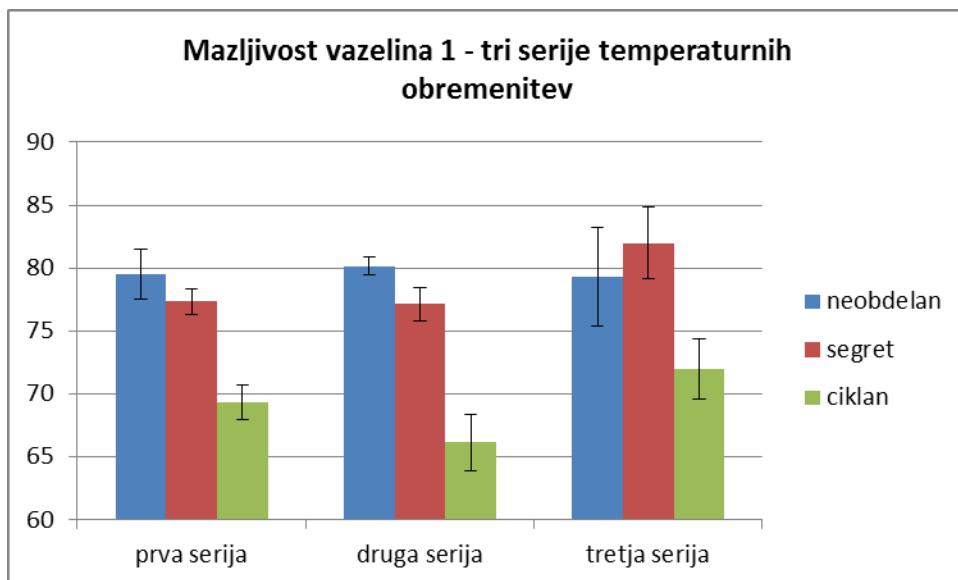
Pri iskanju primernih metod obremenitev vazelina smo vazeline:

- segrevali štiriindvajset ur z mešanjem (temperaturo vazelina smo vzdrževali med 78 in 84 °C),
- segrevali štiriindvajset ur z mešanjem (temperatura vazelina med 78 in 84 °C), po končanem segrevanju vazelin postavili za štiriindvajset ur v zamrzovalnik (temperature med -15 in -25 °C) in ponovili cikel segrevanja in zmrzovanja (pod enakimi pogoji) – v nadaljevanju bomo tako obremenjene vazeline imenovali ciklani vazelini, postopek pa ciklanje,
- segrevali štiriindvajset ur z mešanjem (temperatura vazelina 78-84 °C) in med segrevanjem štiri ure homogenizirali pri 8.000 obratih/minuto (rpm)
- segrevali štiriindvajset ur z mešanjem zaščiteno pred svetlobo (temperatura vazelina 78-84 °C).

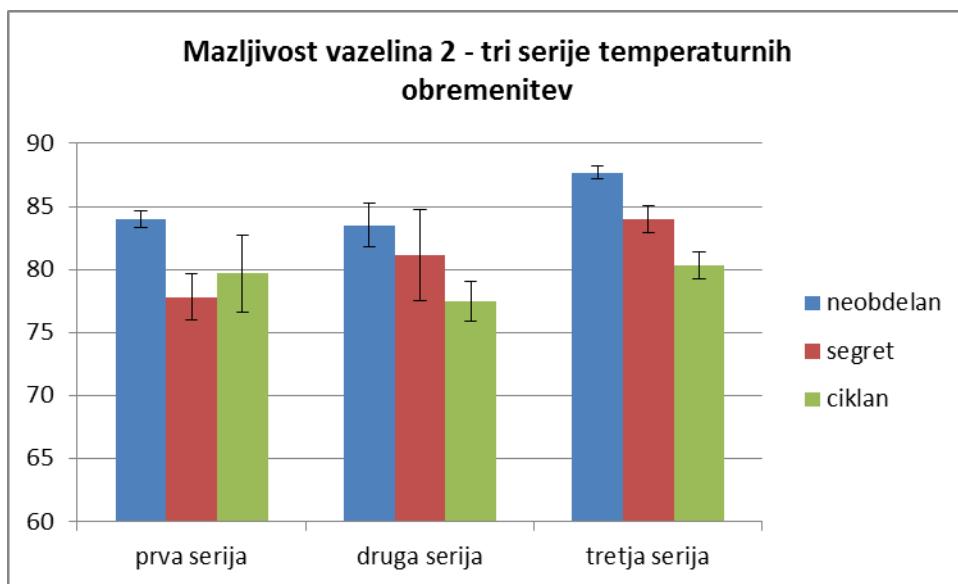
Pri iskanju primernih pogojev, ki bi lahko vplivali na stabilnost vazelinov, smo vazelin 1 in 2 najprej segrevali štiriindvajset ur na 78-84 °C in jima nato izmerili mazljivost po dvournem ohlajanju na sobni temperaturi in po enodnevnu ohlajanju. Mazljivost se je nekoliko zmanjšala, bolj pri krajšem ohlajanju. Pri štiriindvajset ur segretem in dobro ohlajenem vazelinu smo opazili trend zmanjševanja mazljivosti pri vseh petih vazelinah.

Strukturo vročega vazelina lahko porušimo tudi s hitrim ohlajevanjem v zamrzovalniku. Naredili smo dva cikla segrevanja in zmrzovanja (pogoji opisani zgoraj) z vazelinoma 1 in 2 in postopek ponovili v treh serijah. Nato smo vsem vzorcem izmerili mazljivost in jo primerjali z neobdelanim in segretim vazelinom. Največje zmanjšanje mazljivosti smo opazili pri obeh ciklanih vazelinah v primerjavi s segretim in z neobdelanim vazelinom (ciklan vazelin 1 je imel slabšo mazljivost kot segret in neobdelan vazelin 1, ciklan vazelin 2 je imel slabšo mazljivost kot segret in neobdelan vazelin 2). Po končanem ciklanju smo pred merjenjem mazljivosti vazelin pustili na sobni temperaturi najmanj štiriindvajset ur. Naredili smo tri serije segrevanja z ohlajanjem in tri serije ciklanja vazelina 1 in 2 in

opazili podoben trend zmanjševanja mazljivosti (sliki 10 in 11).



Slika 10: Primerjava mazljivosti pri treh serijah segrevanja in ciklanja vezelina 1.



Slika 11: Primerjava mazljivosti pri treh serijah segrevanja in ciklanja vezelina 2.

Pri izdelavi mazil je potrebno vezelin segreti ter ga intenzivno mešati. Takšno obremenitev smo posnemali s segrevanjem in homogeniziranjem vezelina. Vazelin smo najprej popolnoma raztalili in nato pričeli s homogeniziranjem. Homogenizirali smo z rotor-stator homogenizatorjem z nastavkom 19G, štiri ure pri 8.000 rpm. Segrevanje (T vezelina med 78 in 84 °C) je skupno trajalo štiriindvajset ur.

Na nastanek peroksidov bi lahko pri segrevanju vplivala tudi izpostavljenost svetlobi in zraku. Da bi preverili, ali izpostavljenost svetlobi bistveno vpliva na nastanek peroksidov, smo vse vazeline štiriindvajset ur segrevali (T vazelina med 78 in 84 °C) v temi in zaščitene pred svetlobo. Na ta način smo kasneje lahko primerjali vazeline, ki so izpostavljeni podobnim obremenitvam in ugotavliali vpliv vsakega dejavnika: svetlobe, homogeniziranja in zmrzovanja. Predvsem nas je zanimala primerjava peroksidnega števila segretega vazelina, ki ni bil zaščiten pred svetlobo in vazelina, segretega v temi.

3.2.2. Izbrane metode obremenitev vazelina

Odločili smo se za 4 različne obremenitve vseh petih vazelinov:

1. Štiriindvajseturno segrevanje (T vazelina med 78 in 84 °C) z mešanjem in ohlajanje na sobni temperaturi;
2. Ciklanje vazelina – štiriindvajseturno segrevanje (T vazelina 78-84 °C), ki mu sledi štiriindvajset ur zmrzovanja (temperatura v zamrzovalniku med -15 in -25 °C), ki mu sledi drugi cikel štiriindvajseturnega segrevanja in štiriindvajseturnega zmrzovanja;
3. Štiriindvajseturno segrevanje (T vazelina 78-84 °C) z mešanjem v temi in ohlajanje na sobni temperaturi;
4. Štiriindvajseturno segrevanje (T vazelina 78-84 °C) z mešanjem, znotraj katerega smo štiri ure vazeline homogenizirali, segrevanju sledi ohlajanje na sobni temperaturi.

Vse te obdelane vazeline smo fizikalno in kemijsko ovrednotili in medsebojno primerjali.

3.2.3. Centrifugiranje vazelina

Iz eksperimentov pri optimizaciji metod obremenitev vazelina (Poglavlje 3.2.1.) smo ugotovili, da je prihajalo med segretim in neobdelanim vazelinom do razlik pri mazljivosti. Vazelin smo pet ur segrevali z mešanjem (T vazelina med 78 in 84 °C) in nato za eno uro postavili v zamrzovalnik (T v zamrzovalniku med -15 in -25 °C). Tako segret vazelin in neobdelani vazelin smo uporabili za ugotavljanje razlik med različno temperaturno obremenjenimi vazelini pri centrifugiranju. Segret in neobdelan vazelin 1, ter segret in neobdelan vazelin 2 smo centrifugirali pri 20.000 rpm dve uri. Razlik pri deležu tekoče faze po centrifugiranju nismo opazili (preglednici 4 in 5), torej smo lahko sklepali, da

predhodna temperaturna obremenitev vazelina ne vpliva signifikantno na obnašanje pri centrifugiranju in v nadaljevanju te metode nismo več uporabljali.

Preglednica IV: Primerjava deleža tekočega dela po centrifugiranju – vazelin 1

Vazelin 1	% tekočega dela
Neobdelan - 1. meritev	51,5
Neobdelan - 2. meritev	51,1
Segret - 1. meritev	50,5
Segret - 2. meritev	52,3

Preglednica V: Primerjava deleža tekočega dela po centrifugiranju – vazelin 2

Vazelin 2	% tekočega dela
Neobdelan - 1. meritev	54,3
Neobdelan - 2. meritev	57,9
Segret - 1. meritev	54,8
Segret - 2. meritev	53,7

3.2.4. Merjenje mazljivosti

Oprema: 2 stekleni plošči z maso 280 +/- 1 g in merami 200 x 200 x 3 mm, 500 g in 2 kg utež, milimetrsko merilo, štoparica.

Pogoji:

- temperatura: $T = 23 \pm 1^\circ\text{C}$

Postopek: Na steklene plošče natehtamo na sredino približno 1 g vazelina. Drugo steklene plošče previdno položimo na prvo. Nato na zgornjo ploščo položimo utež in po petih in po petnajstih minutah odčitamo dva premera razmaza: po dolgem in počez. Za vsako obremenitev naredimo najmanj tri meritve in iz njih določimo srednjo vrednost polmerov premazov.

3.2.5. Merjenje viskoznosti

Meritve reoloških parametrov izvajamo z računalniško vodenim rotacijskim viskozimetrom stožec-ploščica v sestavi:

- osnovna enota Haake RheoWin 4.30.0023
- merilni sistem Haake RS75
- senzorski sistem stožec-ploščica LEK C35/2°
- vmesnik Rheocontroller RC 20 Haake
- računalnik in printer

Pogoji pri oscilacijski metodi:

- temperatura: $T = 23 \pm 0,1^\circ\text{C}$, termostatiranje 4 minute
- frekvence: $f = 1,0\text{Hz}$ (prva serija meritev) in $10,0\text{ Hz}$ (druga serija meritev)

Postopek:

Na ploščico damo potrebno količino vzorca, da zapolnimo režo med ploščico in stožcem, in jo približamo stožcu na razdaljo 100 mikrometrov. Meritve izvajamo po vnaprej določenem programu pri zgoraj navedenih pogojih.

Pogoji pri rotacijski metodi:

- temperatura: $T = 23 \pm 0,1^\circ\text{C}$
- strižna hitrost: $D = 0 \text{ s}^{-1} - 100.00 \text{ s}^{-1}$ trajanje meritve 60 s
 $D = 100.00 \text{ s}^{-1} - 0 \text{ s}^{-1}$ trajanje meritve 60 s

Postopek je enak kot pri oscilacijski metodi.

3.2.6. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

V posodico za vzorec smo vstavili vzorec in zabeležili njegovo maso. Posodico smo zaprli s pokrovčkom in postavili na prosto mesto v merilno celico. Kot referenco smo uporabili prazno posodico za vzorec.

Pogoji analize:

- temperaturno območje: $30 - 100^\circ\text{C}$
- hitrost segrevanja: 10 stopinj/min

3.2.7. Določanje peroksidnega števila

Določanje peroksidnega števila vezelina je v principu potenciometrična titracija. Uporabili smo titrator Mettler Toledo T70. Natehta vezelina za posamezno meritev je bila med 4 in 6 g, volumen titranta (standardizirana raztopina $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) je bil navzgor omejen na 1 mL. Pri višjih vrednostih smo prilagajali metodo: povečali smo volumen titranta na 5 mL, če pa tudi to ni bilo dovolj za dosego ekvivalentne točke, smo zmanjšali natehto vezelina, da smo ekvivalentno točko dosegli pri porabi titranta največ 5 mL.

3.2.8. Merjenje vsebnosti antioksidantov s HPLC metodo

Vsebnost antioksidantov α -tokoferola smo preverjali s HPLC metodo, vsebnost BHA in BHT pa z UHPLC. Določanja so v principu gradientni HPLC in UHPLC določitvi z metodo eksternega standarda. Pogoji merjenja so prikazani v preglednici 6.

Preglednica VI: Pogoji merjenja vsebnosti α -tokoferola, BHA in BHT s HPLC analizo

	Določanje vsebnosti α -tokoferola	Določanje vsebnosti BHA	Določanje vsebnosti BHT																																																																												
Sistem	Waters HPLC	Waters UHPLC	Waters UHPLC																																																																												
Kolona	Luna Silica (2) 5 μm 150 x 4,6 mm	Luna 2,5 μm C18(2) HST 100 x 3,0 mm s predkolono, SecurityGuard ULTRA Cartridge UHPLC C18	Luna 2,5 μm C18(2) HST 100 x 3,0 mm s predkolono, SecurityGuard ULTRA Cartridge UHPLC C18																																																																												
Mobilna faza (pufer)	pA: 99 % n-heksan, 1% 2-propanol, pB: 50 % n-heksan, 50 % 2-propanol	pA: 55 % fosfatni pufer pH = 6*8, 40 % acetonitril, 5 % metanol, pB: 90 % acetonitril, 5 % metanol, 5 % milliQ voda	pA: 55 % fosfatni pufer pH = 6*8, 40 % acetonitril, 5 % metanol, pB: 90 % acetonitril, 5 % metanol, 5 % milliQ voda																																																																												
Temperatura v koloni	25 °C	25 °C	25 °C																																																																												
Ekvilibracija	5 minut	5 minut	2,5 minute																																																																												
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Time (min)</th> <th>% pA</th> <th>% pB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>2,5</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>4,5</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>5,5</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>6</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		Time (min)	% pA	% pB	1	0	100	0	2	2,5	100	0	3	4,5	0	100	4	5,5	0	100	5	6	100	0	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Time (min)</th> <th>% pA</th> <th>% pB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>6</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>25</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>29</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>30</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		Time (min)	% pA	% pB	1	0	100	0	2	6	90	10	3	15	90	10	4	25	0	100	5	29	0	100	6	30	100	0	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Time (min)</th> <th>% pA</th> <th>% pB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>2,5</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>4</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>4,5</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> </tbody> </table>		Time (min)	% pA	% pB	1	0	25	75	2	2,5	25	75	3	3	0	100	4	4	0	100	5	4,5	25	75
	Time (min)	% pA	% pB																																																																												
1	0	100	0																																																																												
2	2,5	100	0																																																																												
3	4,5	0	100																																																																												
4	5,5	0	100																																																																												
5	6	100	0																																																																												
	Time (min)	% pA	% pB																																																																												
1	0	100	0																																																																												
2	6	90	10																																																																												
3	15	90	10																																																																												
4	25	0	100																																																																												
5	29	0	100																																																																												
6	30	100	0																																																																												
	Time (min)	% pA	% pB																																																																												
1	0	25	75																																																																												
2	2,5	25	75																																																																												
3	3	0	100																																																																												
4	4	0	100																																																																												
5	4,5	25	75																																																																												
Pretok	2,0 mL/min	0,7 mL/min	1,0 ml/min																																																																												
Detekcija	294 nm	265 nm	277 nm																																																																												
Volumen injiciranja	20 μL	50 μL	5 μL																																																																												

3.2.9. Slikanje vazelina za ugotavljanje sprememb barve

Pogoji slikanja vazelina za ugotavljanje sprememb barve:

Proizvajalec fotoaparata: Canon

Model fotoaparata: Canon PowerShot G10

Čas osvetlitve: 1/125 sekunde

ISO Standard: ISO-400

Velikost slike: 2592 x 1944

Format slike: JPEG

Način slikanja: Ročno

Program za določitev in primerjavo barv vazelinov: ImageJ/Fiji

Vazelin smo v debelem sloju namazali na pisarniški bel papir in slikali s fotoaparatom.

Slike smo nato prenesli na računalnik in obdelali s programom ImageJ 1.48q (Java 1.6.0_24 [64-bit]; Windows 7). Najprej smo homogenizirali barvo večjega dela slike vazelina (oznaka področja in izbira Image → Color → Average Color) in nato izmerili vrednost rdečega, modrega in zelenega kanala (ukaz Analyze → Color Histogram).

Vrednost rumenega kanala smo nato dobili z odštevanjem vrednosti modre barve od vrednosti zelene barve.

3.2.10. Obdelava podatkov

Pridobljene podatke smo tudi statistično obdelali. Uporabili smo dvostranski t-test z različnima variancama pri $\alpha = 0,01$ za vrednotenje rezultatov mazljivosti in $\alpha = 0,001$ za primerjavo vrednosti rumenega kanala ter za rezultate merjenja peroksidnega števila. Za mazljivost smo uporabili manj strog pogoj za statistično različnost, saj je metoda merjenja mazljivosti manj natančna in smo želeli zaznati trende spreminjanja mazljivosti.

Predpostavili smo, da so variance različne, ker smo želeli imeti strožje pogoje za zaznavo statistično pomembnih razlik in ker menimo, da smo imeli premalo meritev, da bi variance lahko natančneje ocenili in primerjali. Kot ničelno hipotezo smo postavili, da se vrednosti rezultatov različno temperaturno obremenjenih vazelinov ne razlikujejo. Alternativna hipoteza pa predvideva, da se rezultati različno obremenjenih vazelinov značilno razlikujejo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultati optimizacije metode obremenitev vazelina so prikazani in razloženi v poglavju 3.2.1.

Optimizacija metod obremenitev vazelina.

Za različno obdelane vzorce vazelina smo uporabili okrajšave, ki so prikazane v Preglednici 7. Prva je črka V, ki je okrajšava za vazelin, sledi zaporedna številka vazelina (V1 je oznaka za vazelin 1, V2 je vazelin 2 itd.). Sledi oznaka za obremenitev vazelina: N pomeni neobdelan vazelin, S segret vazelin, C ciklan vazelin, SH segret in homogeniziran vazelin, ter ST vazelin, segret v temi. Pogoji obremenitev so opisani v poglavju 3.2.2 Izbrane metode obremenitev vazelina. Pri optimizaciji metod obremenitev vazelina (poglavlje 3.2.1.) smo naredili tri serije ponavljanj segrevanja in ciklanja vazelinov 1 in 2. Za nadaljnje vrednotenje smo uporabili tretjo serijo secretega in ciklanega vazelina 1 in 2, ki je v preglednici 7 označena s številko 3 na koncu oznake (npr. tretja serija ciklanega vazelina 1 je označena kot V1C3).

Preglednica VII: Oznake uporabljenih vzorcev belih vazelinov.

V1N	neobdelan vazelin 1
V1S3	segret vazelin 1
V1C3	ciklan vazelin 1
V1SH	segret in homogeniziran vazelin 1
V1ST	vazelin 1 segret v temi

V2N	neobdelan vazelin 2
V2S3	segret vazelin 2
V2C3	ciklan vazelin 2
V2SH	segret in homogeniziran vazelin 2
V2ST	vazelin 2 segret v temi

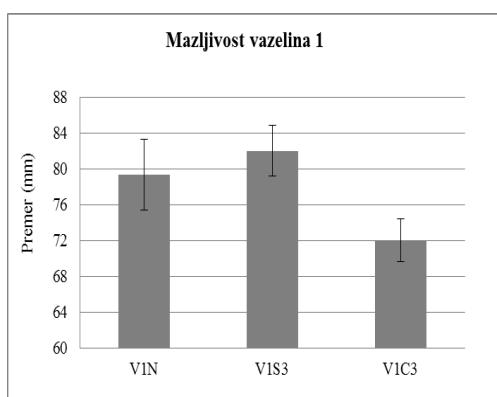
V3N	neobdelan vazelin 3
V3S	segret vazelin 3
V3C	ciklan vazelin 3
V3SH	segret in homogeniziran vazelin 3
V3ST	vazelin 3 segret v temi

V4N	neobdelan vazelin 4
V4S	segret vazelin 4
V4C	ciklan vazelin 4
V4SH	segret in homogeniziran vazelin 4
V4ST	vazelin 4 segret v temi

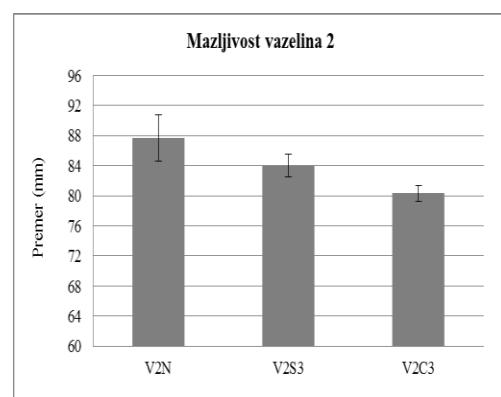
V5N	neobdelan vazelin 5
V5S	segret vazelin 5
V5C	ciklan vazelin 5
V5SH	segret in homogeniziran vazelin 5
V5ST	vazelin 5 segret v temi

4.1. Mazljivost in sinereza

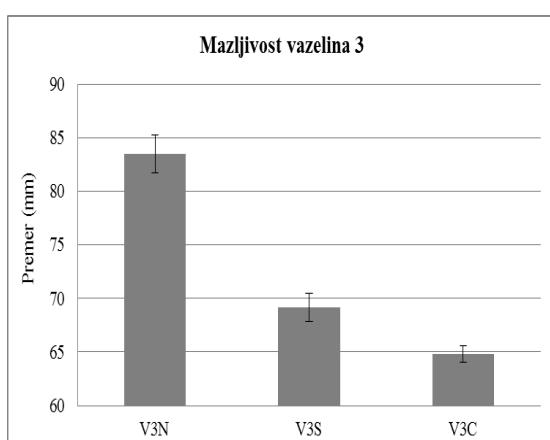
Za primerjavo mazljivosti smo izbrali vzorce, ki smo jih izmerili po 15 minutah obremenitve z 2 kilogramsko utežjo, saj menimo, da so bile razlike pri teh pogojih merjenja najbolj opazne. Kot lahko vidimo iz slik 12, 13, 14, 15 in 16, je mazljivost ciklanih vazelinov značilno manjša od mazljivosti neobdelanih vazelinov ($p(V1) = 0,0042$; $p(V2) = 0,0014$; $p(V3) = 8,7E-08$; $p(V4) = 4,9E-05$; $p(V5) = 0,00022$). Pri segretih vazelinah je mazljivost značilno manjša od neobdelanega vazelina le pri vazelinu 3 in vazelinu 5 ($p(V3) = 4,6E-08$, $p(V5) = 7,9E-05$), pri drugih vazelinah pa nismo opazili značilnih razlik ($p(V1) = 0,21$; $p(V2) = 0,033$; $p(V4) = 0,031$).



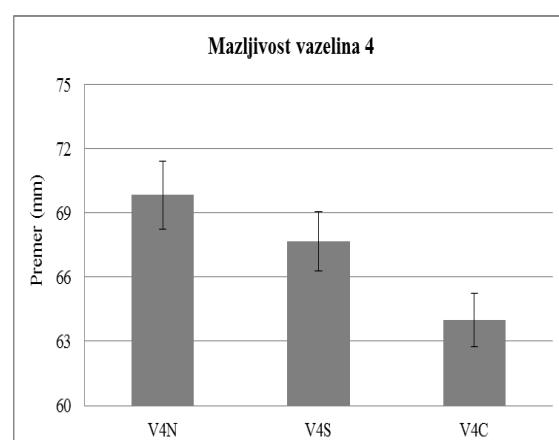
Slika 12: Mazljivosti vazelina 1 po različnih obremenitvah.



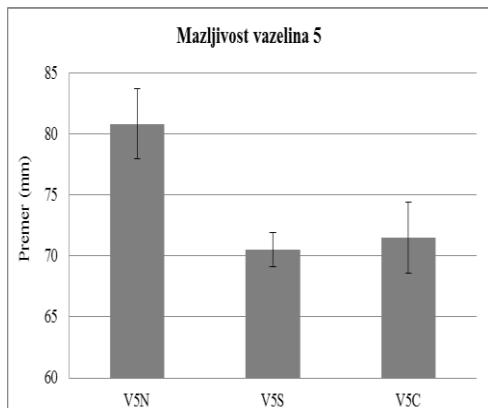
Slika 13: Mazljivosti vazelina 2 po različnih obremenitvah.



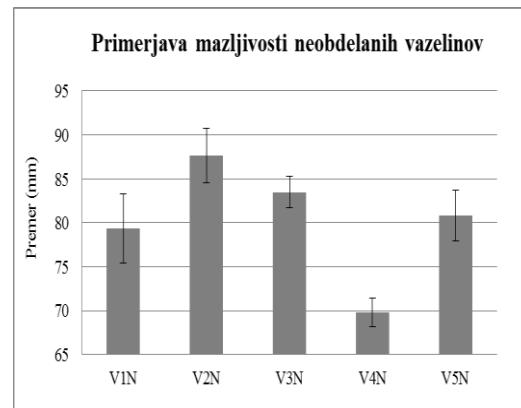
Slika 14: Mazljivosti vazelina 3 po različnih obremenitvah.



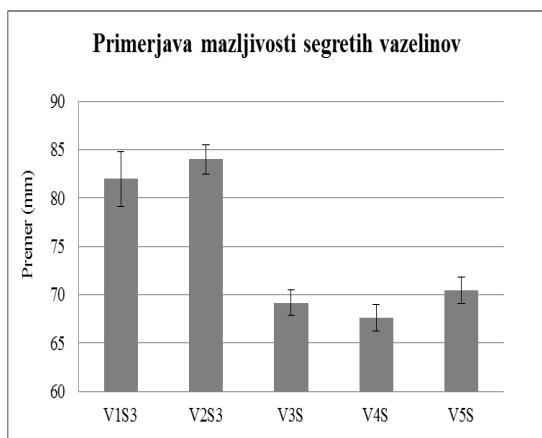
Slika 15: Mazljivosti vazelina 4 po različnih obremenitvah.



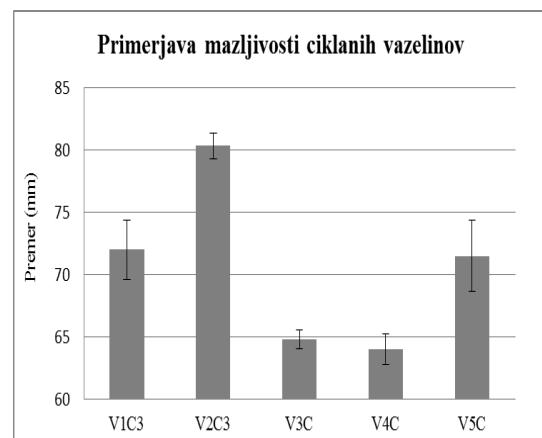
Slika 16: Mazljivosti vazelina 5 po različnih obremenitvah.



Slika 17: Mazljivosti neobdelanih vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5.



Slika 18: Mazljivosti segretih vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5.



Slika 19: Mazljivosti ciklanih vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5.

Uporabili smo tri različne vrste vazelina treh proizvajalcev. Vazelin 1 in vazelin 4 sta dve šarži vazelina MERKUR 500, proizvajalca Sasol GmbH, vazelin 2 in vazelin 3 sta dve šarži vazelina WHITE PROTOPET 1SH, proizvajalca Sonneborn. . Pričakujemo lahko, da imajo različne šarže enakih vazelinov podobne fizikalno-kemijske lastnosti. Vazelin 1 in 4 sta bila poleg tega proizvedena na enak datum, vazelin 2 pa je eno leto starejši od vazelina 3. Vse razlike v fizikalno-kemijskem vrednotenju dveh enakih vazelinov različne šarže bi v idealnem primeru bile posledica naključnega nihanja meritev.

Če primerjamo mazljivost vazelina 1 in vazelina 4, lahko vidimo, da ima neobdelan ($p = 0,0011$), segret ($p = 8,18E-06$) in ciklan ($p = 0,00011$) vazelin 4 značilno manjšo mazljivost kot vazelin 1. Primerjava mazljivosti neobdelanih vazelinov 2 in 3 ne kaže

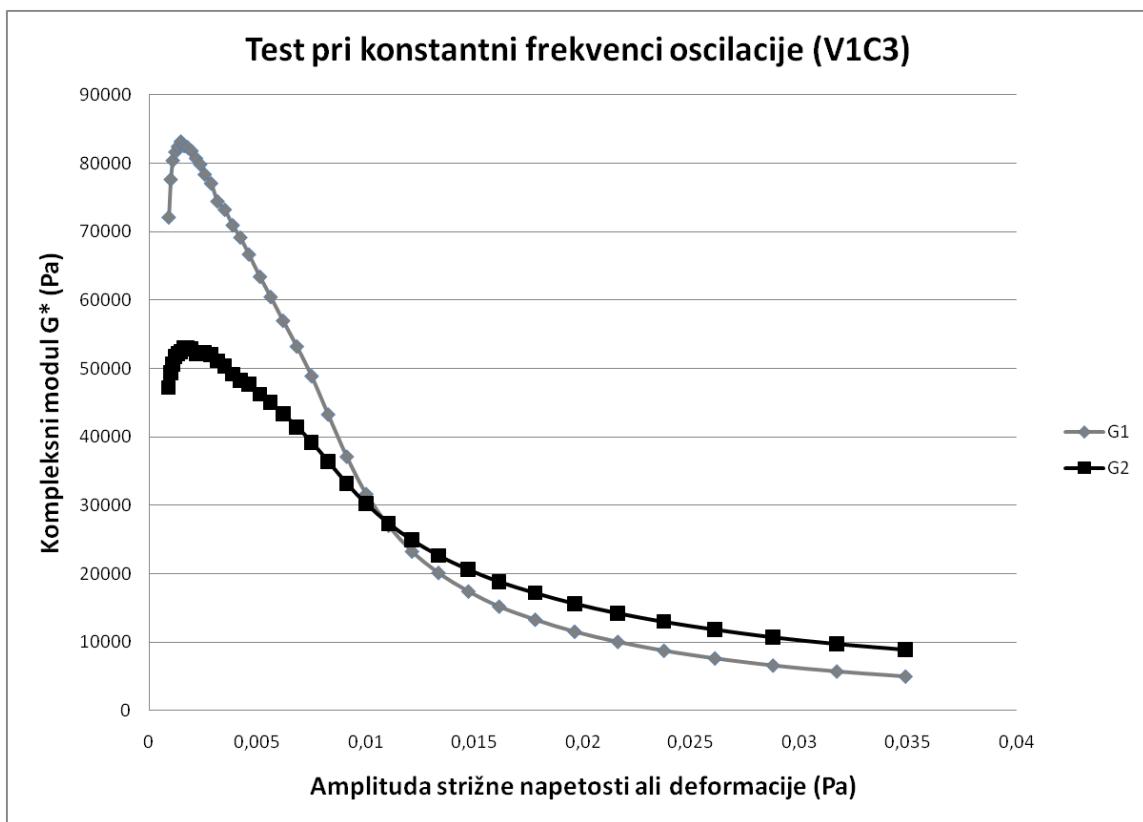
značilnih razlik v mazljivosti ($p = 0,020$), pri segrehih in ciklanih pa ima vazelin 3 značilno manjšo mazljivost kot vazelin 2 ($p = 8,99E-09$; $p = 2,08E-10$). Med enakimi vazelini različnih šarž je torej prišlo do značilnih razlik v mazljivosti, ki jih pripisujemo različnemu razmerju trdnih in tekočih komponent v vazelinu. Primerjava neobdelanih, segrehih in ciklanih vazelinov je predstavljena na slikah 17, 18 in 19.

Pri nekaterih neobdelanih vazelinih smo opazovali in zasledili izločanje tekoče faze (sinerezo). Sinereza je velik problem fizikalne stabilnosti in homogenosti vazelina, še posebej, kadar se vazelinu dodatno dodaja tekoči parafin z namenom zagotavljanja primerne viskoznosti in mazljivosti končnih formulacij. Pri vazelinu 1 in vazelinu 2 smo sinerezo opazili že pred začetkom izvajanja poskusov (oktobra 2013), po treh mesecih od začetka shranjevanja pa se je pojavila tudi pri vazelinu 3. Vazeljn 4 in vazelin 5 nista izkazovala opazne sinereze tudi po treh (vazeljn 4) in po štirih letih shranjevanja (vazeljn 5).

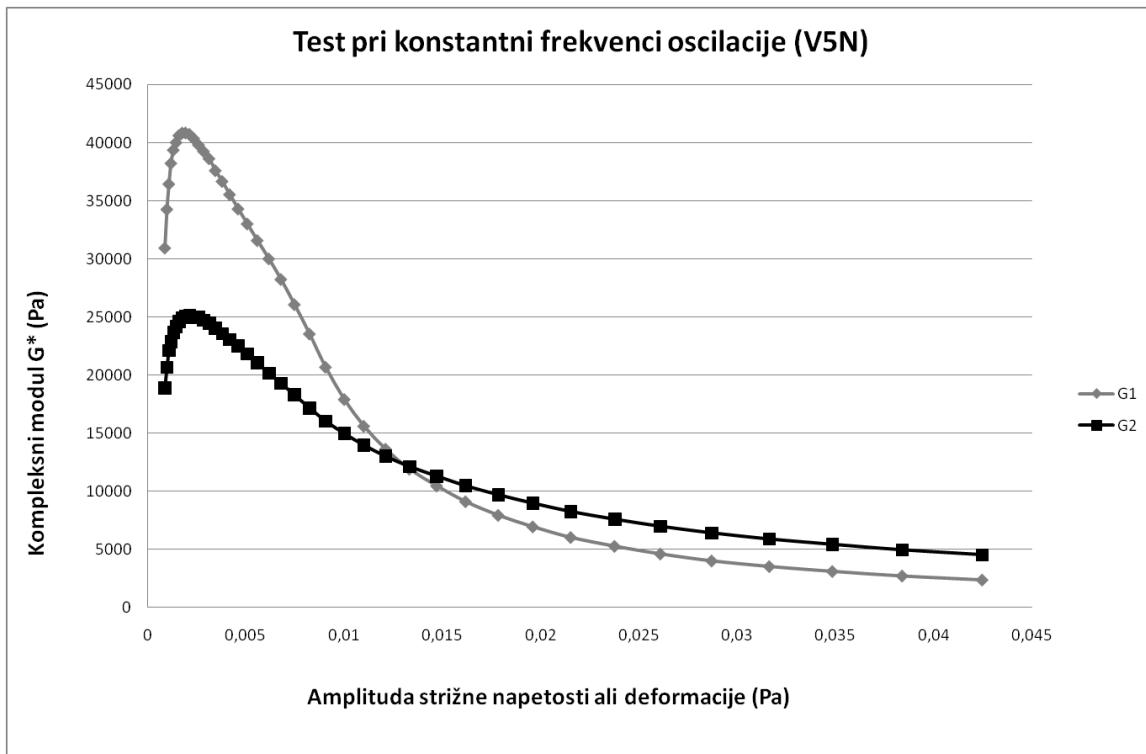
4.2. Reologija

Pri merjenju viskoznosti vazelinov z rotacijsko metodo je prišlo do izpodrivanja vzorcev vazelina iz senzorskega sistema stožec-ploščica, zato nismo uspeli dobiti ponovljivih rezultatov.

Z oscilacijsko metodo merjenja viskoznosti smo najprej poskušali določiti linearno viskoelastično območje na nekaj vzorcih. Kot je razvidno iz slik 20 in 21, vzorca ne izkazujeta območja linearne viskoelastičnosti, ampak se začne struktura vazelina takoj podirati. Takšen rezultat je neobičajen, saj linearno viskoelastično področje ponavadi lahko določimo. Predvidevamo, da je kljub zelo majhni frekvenci nihanja stožca prišlo do izpodrivanja vazelina iz senzorskega sistema oz. do zdrsov merilnega sistema, česar s prostim očesom nismo videli. Da bi izpodrivanje oz. zdrsevanje preprečili, bi lahko senzorski sistem stožec-ploščica zamenjali s senzorskim sistemom ploščica-ploščica, ga z obeh strani prelepili brusilnim papirjem pri točno določenih pogojih (določene lastnosti in debelina brusilnega papirja) ter ustrezno prilagodili razmik med ploščicama.



Slika 20: Ugotavljanje linearne viskoelastične območja pri oscilacijski metodi (ciklan vazelin 2).



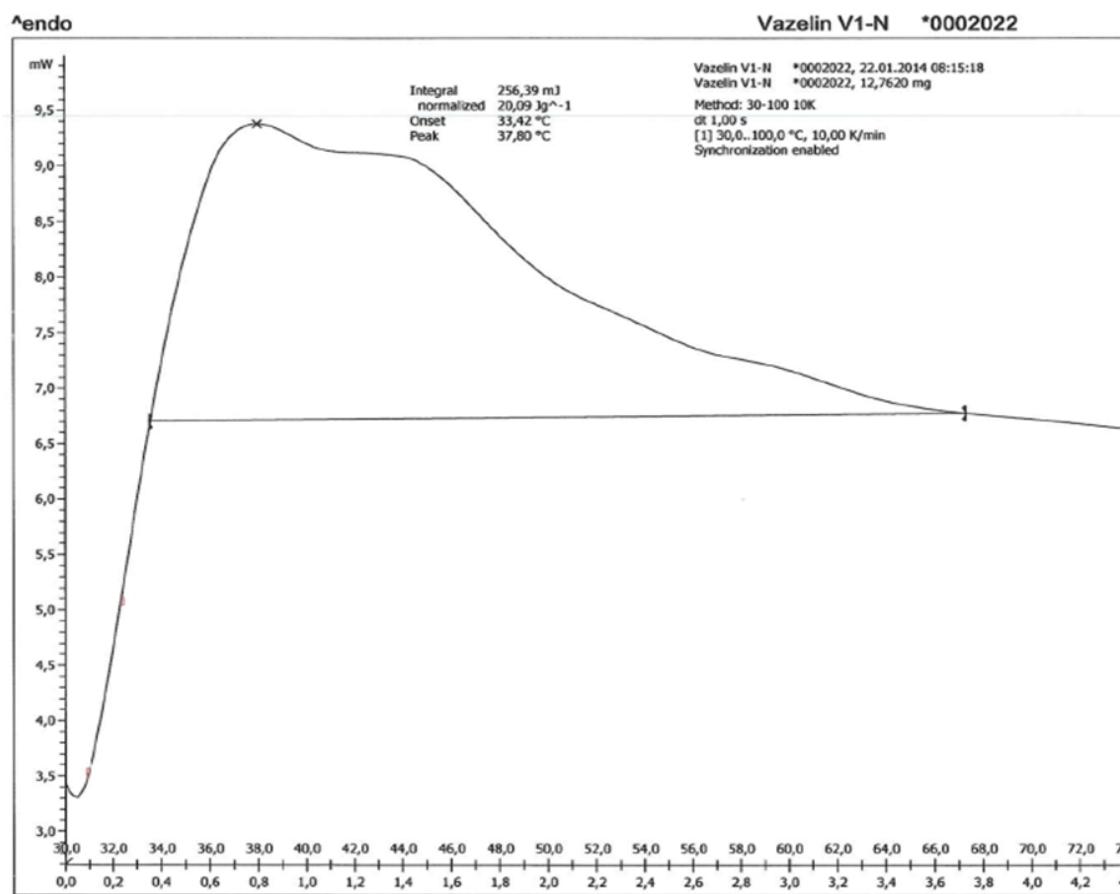
Slika 21: Ugotavljanje linearne viskoelastične območja pri oscilacijski metodi (neobdelan vazelin 5).

4.3. DSC

Iz določenih endotermnih vrhov vzorcev (preglednica 8) lahko opazimo, da se pri nekaterih vazelinah pri segretih in ciklanih vzorcih vrh premakne proti nekoliko višjim temperaturnim vrednostim kot pri neobdelanih vzorcih istega vazelina, vendar premiki niso konstantni (preglednica 8). Ne moremo ugotoviti, ali so spremembe temperatur endotermnih vrhov značilne, saj meritev nismo ponavljali. Ravno tako iz teh podatkov ne moremo sklepati na fizikalno stabilnost, saj nam DSC analiza ne da podatka o razmerju komponent v vazelinu, niti o sposobnosti zadrževanja tekoče faze. Zaključimo lahko, da na podlagi DSC meritev ne moremo razlikovati med neobremenjenimi vzorci in vzorci izpostavljenimi različnim obremenitvam, vazelin 2 pa izkazuje trend višjih temperatur endoternega vrha v primerjavi z ostalimi vazelini. Na sliki 21 je prikazan primer termograma.

Preglednica VIII: Endotermni vrhovi vzorcev vazelina

DSC - endotermni vrhovi (v °C)									
V1N	37,8	V2N	49,33	V3N	39,87	V4N	39,21	V5N	39,61
V1C1	45,03	V2S1	48,76	V3S	40,63	V4S	39,81	V5S	41,79
V1S2	38,25	V2C1	49,96	V3C	41,4	V4C	38,23	V5C	47,75
V1C2	43,72	V2S2	49,73	V3SH	39,4	V4SH	40,19	V5SH	47,8
V1S3	37,9	V2C2	50,88	V3ST	39,24	V4ST	40,81	V5ST	42,37
V1C3	39,23	V2S3	51,32						
V1SH	40,61	V2C3	51,5						
V1ST	38,21	V2SH	49,35						
		V2ST	49,96						



Slika 22: Primer DSC termograma (neobdelan vazelin 1)

4.4. Določitev vsebnosti antioksidantov s HPLC analizo

Da bi lahko bolje razložili dobljene vrednosti peroksidnega števila, smo pri vseh neobdelanih vazelinih uporabili HPLC analizo za določanje vsebnosti antioksidantov. Določali smo vsebnost vseh treh antioksidantov, ki so lahko prisotni v vazelinu. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 9. Vsebnost α -tokoferola smo zaznali pri vazelinah 1, 3 in 4. BHT smo zaznali le pri vazelinu 5 (slika 23). Vazelin 2 ne vsebuje nobenega od preverjanih antioksidantov.

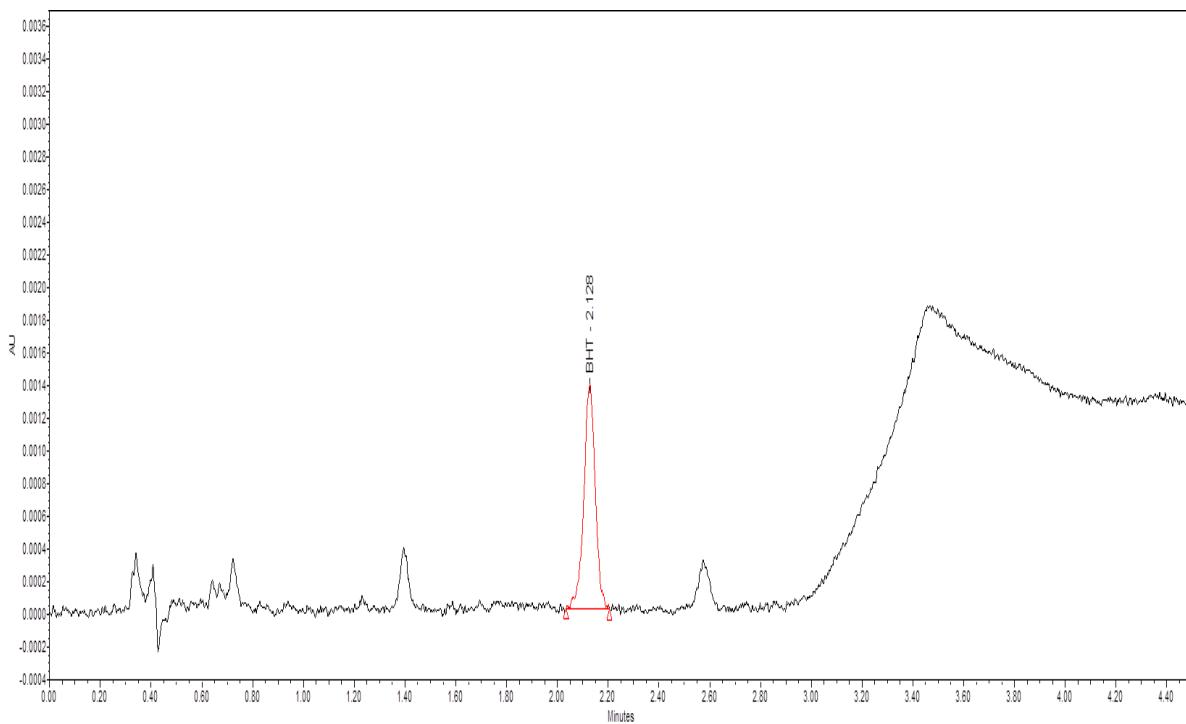
Če primerjamo še različne šarže enakih vazelinov, vidimo, da se vazelin 1 in vazelin 4 v vsebnosti α -tokoferola ne razlikujeta bistveno (21,5 ppm in 19,5 ppm). Vazelin 3 vsebuje manjšo vsebnost α -tokoferola (6,6 ppm), medtem ko ga vazelin 2 ne vsebuje.

Preglednica IX: Rezultati merjenja vsebnosti antioksidantov v vazelinah 1, 2, 3, 4, 5

Ime vzorca	Kontrolna številka	α -tokoferol	BHT	BHA
Vazelin	V1N	21.5 ppm	< LOQ ^Δ	< LOQ ^Δ
Vazelin	V2N	< LOD*	< LOQ ^Δ	< LOQ ^Δ
Vazelin	V3N	6.6 ppm	< LOQ ^Δ	< LOQ ^Δ
Vazelin	V4N	19.5 ppm	< LOQ ^Δ	< LOQ ^Δ
Vazelin	V5N	< LOD*	14.0 ppm	< LOQ ^Δ

* LOD je okrajšava za mejo detekcije (limit of detection)

^ΔLOQ je okrajšava za mejo kvantifikacije (limit of quantification)

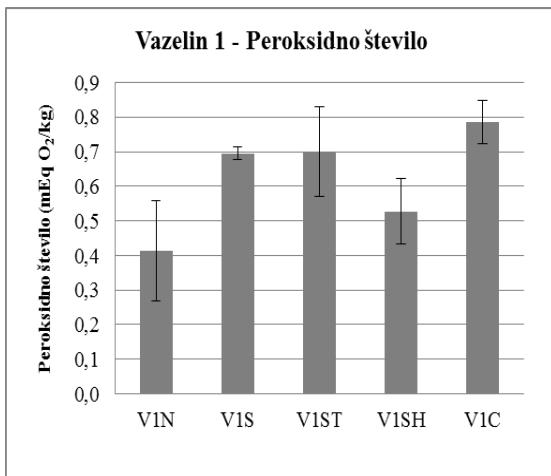


Slika 23: HPLC analiza vzorca vazelina 5, ki vsebuje antioksidant BHT

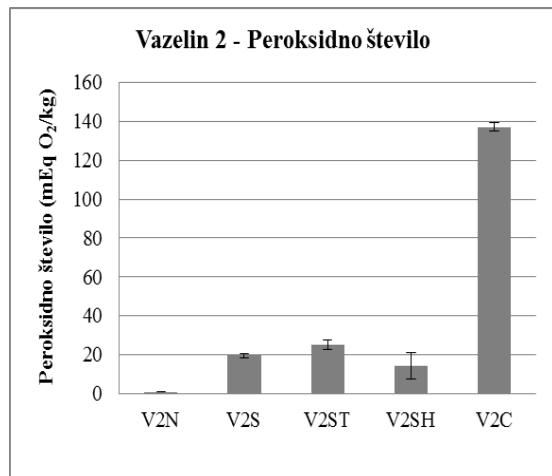
4.5. Določanje peroksidnega števila

Pri vazelinah 1, 3, 4 in 5 se je po temperaturnih obremenitvah peroksidno število malo in neznačilno povečalo in ni preseglo vrednosti 1 mEq O₂/kg. Iz tega lahko sklepamo, da so vazelini 1, 3, 4 in 5 dokaj odporni proti povečanju peroksidnega števila pri temperaturnih obremenitvah. Vazelinu 2 se je vrednost peroksidnega števila pri segrevanju v primerjavi z neobdelanim vazelinom 2 značilno povečala za en razred ($p = 0,00078$), pri ciklanju pa kar za dva razreda ($p = 8,6E-05$). Menimo, da je določen delež k temu povečanju prispevala odsotnost antioksidantov, v največji meri pa je šlo najverjetneje za pomanjkljiv obseg in/ali neustrezno vrsto čiščenja vazelina. Proizvajalec najverjetneje ni v zadostni meri odstranil nenasičene ogljikovodike v vazelinu 2, kar se je pokazalo z drastičnim povečanjem peroksidnega števila pri temperaturnih obremenitvah. Peroksidno število neobdelanega vazelina 2 je višje od ostalih neobdelanih vazelinov, kar bi lahko bila tudi posledica dolgotrajnega shranjevanja in predhodnih temperaturnih obremenitev, ki jih je lahko izvajal proizvajalec. Uporaba vazelina 2 v mazilih z zdravilno učinkovino, občutljivo na oksidacijo, ima lahko za posledico izrazito zmanjšanje vrednosti te zdravilne učinkovine ali popolno neučinkovitost mazila.

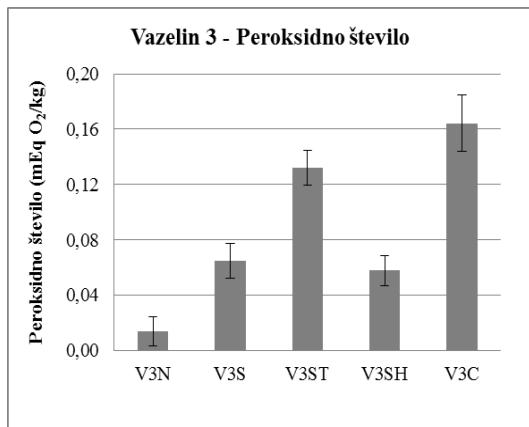
Pri merjenju peroksidnega števila smo žeeli preveriti, ali imajo vzorci, ki smo jih segrevali v temi in segrevali s homogeniziranjem, drugačno peroksidno število kot samo segreti vazelin pri enakih pogojih segrevanja. Pri segretem vazelinu 1 ni prišlo do značilnih razlik v peroksidnem številu v primerjavi z vazelinom 1, segretim v temi in vazelinom 1, segretim s homogeniziranjem ($p = 0,95$; $p = 0,95$) (slika 24). Ravno tako ni prišlo do značilnih razlik med segretimi vzorci vazelina pri vazelinu 2 ($p = 0,041$; $p = 0,32$), pri vazelinu 3 ($p = 0,0027$; $p = 0,50$), pri vazelinu 4 ($p = 0,27$; $p = 0,65$), niti pri vazelinu 5 ($p = 0,37$; $p = 0,21$) (slike 25, 26, 27 in 28). Zaključimo lahko, da imajo temperaturne obremenitve glavno vlogo pri povečanju peroksidnega števila uporabljenih vazelinov, odsotnost svetlobe in homogeniziranje pa najverjetneje nimata večjega vpliva na peroksidno število segrethih vazelinov. Primerjava peroksidnega števila neobdelanih, segrethih in ciklnih vazelinov je na slikah 29, 30 in 31.



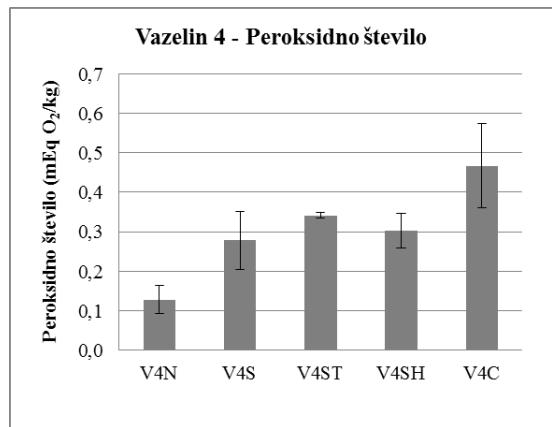
Slika 24: Peroksidno število vzorcev
vazelina 1.



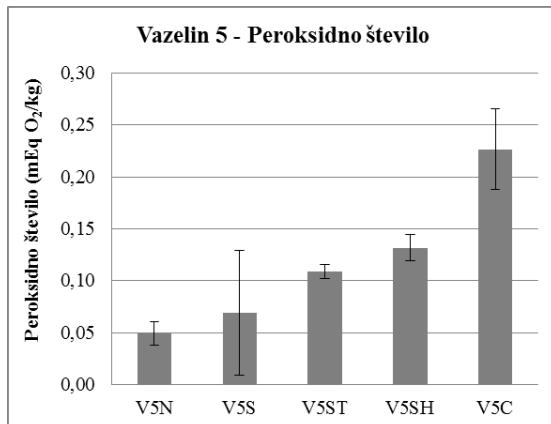
Slika 25: Peroksidno število vzorcev
vazelina 2.



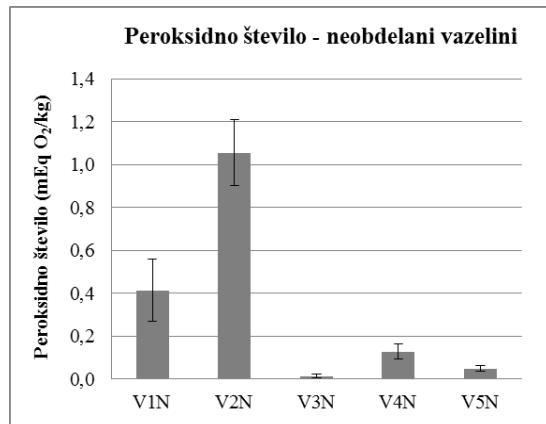
Slika 26: Peroksidno število vzorcev
vazelina 3.



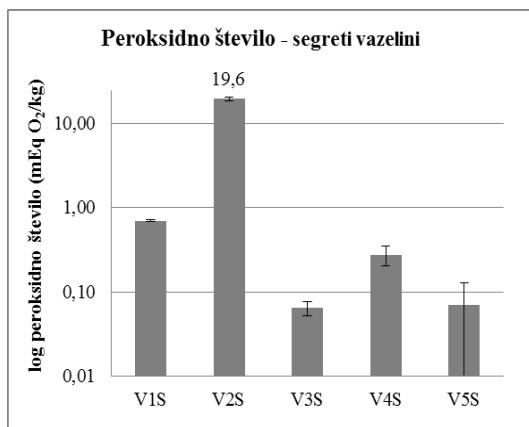
Slika 27: Peroksidno število vzorcev
vazelina 4.



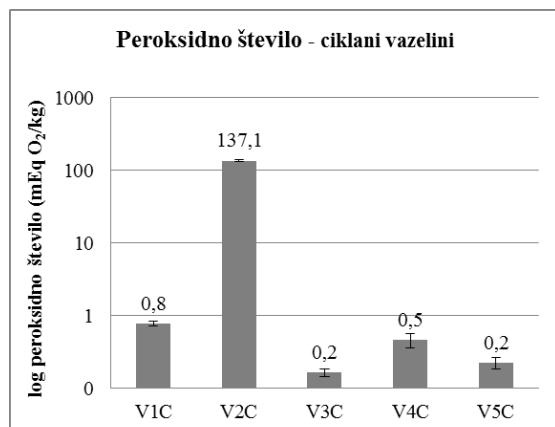
Slika 28: Peroxidno število vzorcev vazelina 5.



Slika 29: Peroxidno število neobdelanih vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5.



Slika 30: Peroxidno število segretih vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5.



Slika 31: Peroxidno število ciklanih vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5.

Kot smo že prej omenili, sta vazelin 2 in 3 enaka vazelina, ki se razlikujeta po šarži in po letu izdelave (vazelin 2 je eno leto starejši). Neobdelan vazelin 2 je edini med neobdelanimi vazelini dosegel vrednost peroksidnega števila okrog 1 mEq O₂/kg, medtem ko je peroksidno število neobdelanega vzelina 3 ostalo pod 0,1 mEq O₂/kg. Po segrevanju in ciklanju je vazelin 2 kazal značilno višje vrednosti peroksidnega števila ($p = 0,00089$ in $0,000091$). Zaključimo lahko, da so med tem dvema šaržama vazelina velike razlike v vsebnosti nenasičenih ogljikovodikov, kar je najverjetneje posledica nekonsistentne proizvodnje in čiščenja, deloma pa tudi morebitnih predhodnih temperturnih obremenitev vazelina 2, ki jih je lahko izvajal proizvajalec po proizvodnji vazelina.

Ker je vazelin 2 nagnjen k zelo visokemu zvišanju peroksidnega števila pri temperaturnih obremenitvah in ne vsebuje antioksidantov, je idealen za preverjanje pomena antioksidantov pri preprečevanju zvišanja peroksidnega števila. Vlogo antioksidantov pri preprečevanju nastanka peroksidov bi lahko ovrednotili z dodajanjem različnih koncentracij in vrst antioksidantov neobdelanemu vazelinu 2 pred temperaturnimi obremenitvami in primerjavo peroksidnih števil vzorcev brez in z dodanim antioksidantom po različnih temperaturnih obremenitvah.

Ko smo primerjali še peroksidno število vazelinov 1 in 4 (različni šarži enakega vazelina), nismo zaznali značilnih razlik med neobdelanimi ($p = 0,069$), segretima ($p = 0,0075$), niti med ciklanima ($p = 0,018$) vazelinoma 1 in 4. Vazelina 1 in 4 sta si torej podobna v vsebnosti antioksidantov in tudi v vrednostih peroksidnega števila pred in po obremenitvah.

Poudariti je potrebno, da ne obstaja t.i. »varna« meja peroksidnega števila, pod katero lahko z gotovostjo trdimo, da bo zdravilna učinkovina, občutljiva na oksidacijo, popolnoma varna pred oksidacijo, ampak je dobro, da je peroksidno število vazelina čim nižje.

4.6. Merjenje vrednosti rumenega kanala vzorcev vazelina

Vzorce smo fotografirali in analizirali, da bi ocenili, ali lahko razlike v barvi, ki so vidne s prostim očesom, tudi kvantitativno ovrednotimo s spremembjo vrednosti rumenega kanala.

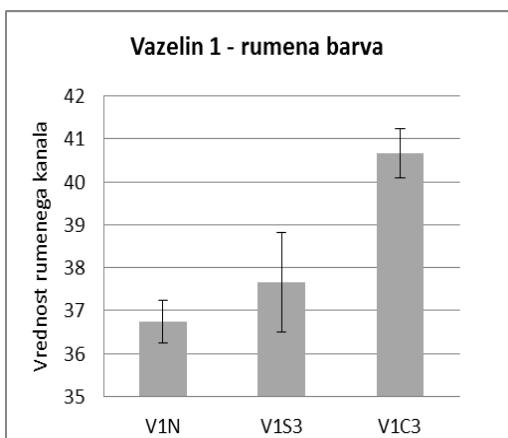
Vrednosti rumenega kanala neobdelanih vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5 so se gibale med 34 in 38 (slika 37). Teh razlik s prostim očesom nismo zaznali.

Vrednost rumenega kanala vazelinov 1, 2, 3, 4 in 5 pri različnih obremenitvah je prikazana na slikah 32, 33, 34, 35 in 36. Pri primerjavi različno obremenjenih vazelinov smo ugotovili, da se vrednost rumenega kanala segretega vazelina 1 najverjetneje ne razlikuje značilno od neobdelanega vazelina 1 ($p = 0,30$), ciklan vazelin pa se od neobdelanega vazelina 1 značilno razlikuje ($p = 0,00069$) (slika 32). Teh razlik s prostim očesom nismo zaznali (preglednica 10). Zvišanje vrednosti rumenega kanala tudi ni bilo zelo veliko – z 36,8 pri neobdelanem vazelinu 1 na 40,7 pri ciklanem vazelinu 1. To meritev bi bilo po našem mnenju potrebno ponoviti na nevtralni podlagi, da bi preverili, ali je vpijanje vazelina v podlago vplivalo na povečanje vrednosti rumenega kanala ciklanega vazelina 1. Med neobdelanim vazelinom 2 in temperaturno obremenjenimi vzorci vazelina 2 (segreti

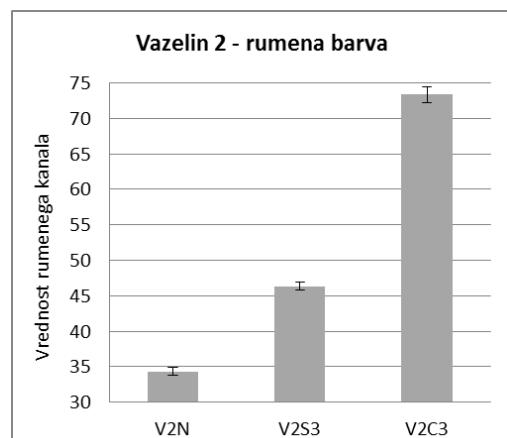
vazelin 2, ciklani vazelin 2) je prišlo do opaznega povišanja v vrednostih rumenega kanala ($p = 1,41E-05$ in $p = 1,84014E-05$) (slika 33), ki smo ga zaznali tudi s prostim očesom (preglednica 4). Med neobdelanim vazelinom 3 in temperaturno obremenjenimi vzorci vazelina 3 (V3S in V3C) ni prišlo do opaznih razlik v vrednostih rumenega kanala ($p = 0,18$ in $p = 0,053$) (slika 34). Pri vazelinu 4 nismo zasledili značilnih razlik med neobdelanim in obremenjenimi vzorci (segretimi, ciklanimi) ($p = 0,0014$ in $p = 0,013$) (slika 35). Med neobdelanim vazelinom 5 in temperaturno obremenjenimi vzorci vazelina 5 (segreti vazelin 5, ciklani vazelin 5) ni prišlo do opaznih razlik v vrednostih rumenega kanala ($p = 0,53$ in $p = 1$) (slika 36).

Če povežemo rezultate analize barve ter rezultate merjenja peroksidnega števila, lahko opazimo, da je vrednost rumenega kanala neobdelanega vazelina 2 kljub povišanemu peroksidnem številu še vedno primerljiva z ostalimi neobdelanimi vazelini. To bi lahko bila posledica beljenja vazelina 2 ali pa dejstva, da se vazelin tudi pri nekoliko povišanemu peroksidnem številu (okrog 1 mEq O₂ / kg) še neobarva in se značilno rumenoobarva šele pri višjih vrednostih peroksidnega števila.

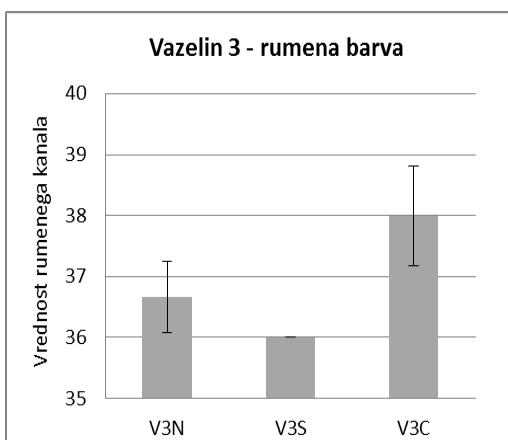
Primerjali smo tudi vrednosti rumenega kanala vzorcev vazelinov 1 in 4, ter vzorcev vazelinov 2 in 3, da bi ugotovljali spremembe med serijami enakih vazelinov. Med vazelinom 1 in 4 ni prišlo do značilnih razlik (p (neobdelana vazelina) = 0,85; p (segreta vazelina) = 0,039 in p (ciklana vazelina) = 0,013) (sliki 38 in 39). Med vazelinom 2 in 3 je prišlo do večjih razlik v vrednosti rumenega kanala pri neobdelanih, segretih in ciklanih vzorcih (p (neobdelana vazelina) = 0,0078; p (segreta vazelina) = 0,0010; p (ciklana vazelina) = 6,45E-06).



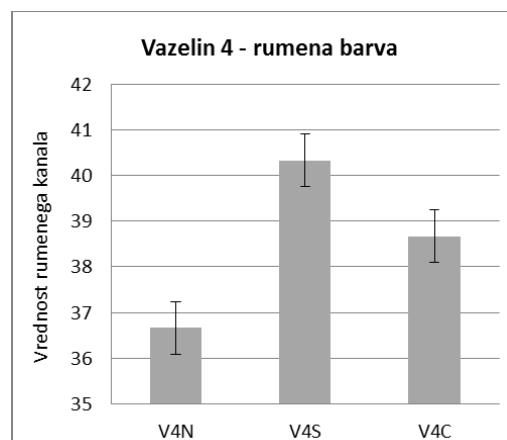
Slika 32: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 1.



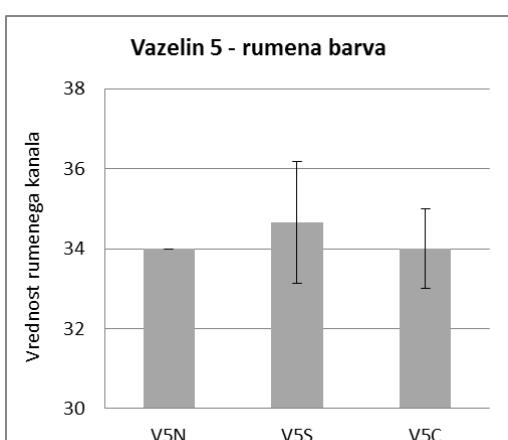
Slika 33: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 2.



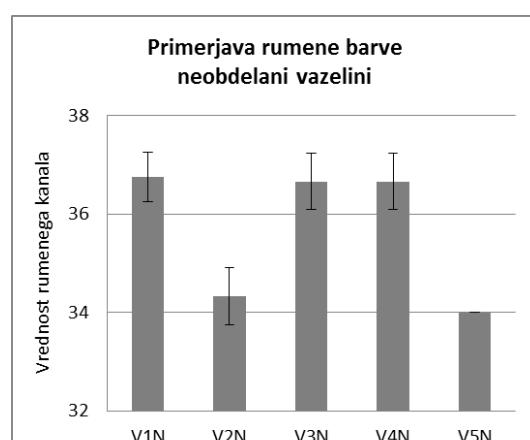
Slika 34: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 3.



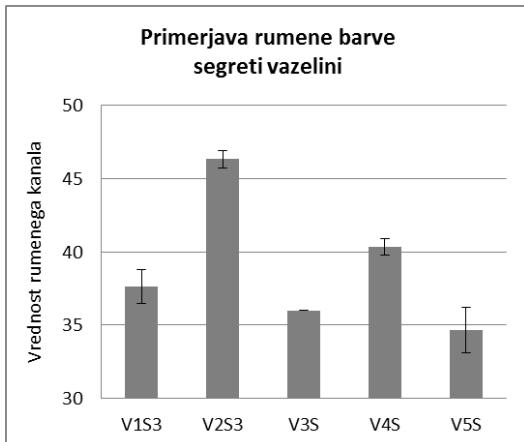
Slika 35: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 4.



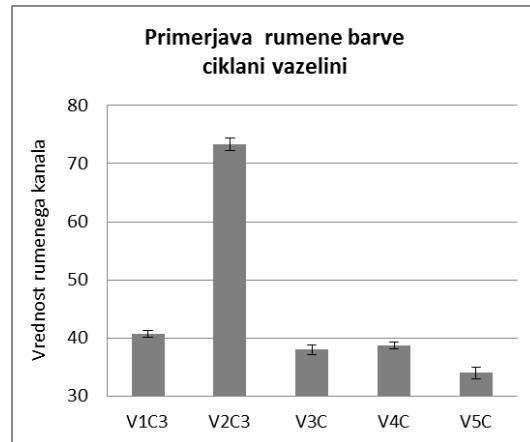
Slika 36: Vrednosti rumenega kanala pri vazelinu 5.



Slika 37: Vrednosti rumenega kanala pri neobdelanih vazelinih 1, 2, 3, 4 in 5.



Slika 38: Vrednosti rumenega kanala pri segretnih vazelinah 1, 2, 3, 4 in 5.



Slika 39: Vrednosti rumenega kanala pri ciklanih vazelinah 1, 2, 3, 4 in 5.

Preglednica 10 prikazuje rezultate slikanja vzorcev vazelina. Naraščanje vrednosti rumenega kanala je vidno pri segretem in ciklanem vazelinu 2.

Preglednica X: Rezultati slikanja vzorcev vazelina

Vzorec	Neobdelan	Segret	Ciklan
Vazelin 1			
Vazelin 2*			
Vazelin 3			
Vazelin 4			
Vazelin 5			

* Sprememba vrednosti rumenega kanala pri segretemu vazelinu 2 so bolje vidne v elektronski verziji kot v tiskani verziji.

Pri merjenju smo kot podlago za vzorce uporabili navaden pisarniški bel papir. Opazili smo, da so se nekateri vzorci vpili v papir in je zato podlaga deloma izgubila svojo nevtralnost in enakomernost barve. To je še posebej prišlo do izraza pri bolj prosojnih vzorcih. Da bi podlaga ohranila svojo nevtralnost pri različnih vzorcih, bi bilo bolje uporabiti podlago iz nevpojnega papirja.

5. ZAKLJUČEK

Fizikalno-kemijske lastnosti in stabilnost proučevanih petih vazelinov smo opredelili s številnimi uveljavljenimi metodami in z novo metodo vrednotenja barve vazelinov.

Kemijsko vrednotenje vazelina z uveljavljenimi metodami je zadovoljivo. Ugotovili smo, kateri vazelini so s stališča kemijske čistosti primerni za uporabo v farmacevtskih formulacijah. Ugotovili smo, da eden izmed testiranih vazelinov glede kemijskih lastnosti ni primeren za uporabo v farmacevtskih formulacijah, saj se mu je pri temperaturnih obremenitvah peroksidno število značilno povečalo in je presegalo vrednost peroksidnega števila $1 \text{ mEq O}_2/\text{kg}$. Omenjeni vazelin je edini, ki ne vsebuje nobenih antioksidantov, kar deloma razloži značilno povečanje peroksidnega števila pri temperaturnih obremenitvah, največjo vlogo pa pripisujemo njegovemu pomanjkljivemu čiščenju v procesu proizvodnje. Pri temu vazelinu smo zaznali značilno povečanje vrednosti rumenega kanala pri segrevanju in ciklanju, ki smo ga povezali z naraščanjem peroksidnega števila pri temperaturnih obremenitvah.

Mazljivost različno temperaturno obremenjenih vazelinov smo uspešno izmerili in ugotovili trende manjšega padanja mazljivosti pri temperaturnih obremenitvah, ki so bili značilni pri vseh ciklnih vzorcih vazelinov. Pri reoloških vrednotenjih nismo uspeli definirati linearne viskoelastičnega območja pri testiranih vzorcih, znotraj katerega smo želeli izbrati nedestruktivno frekvenco oscilacije in z nadaljnji analizami izvedeti pomembne podatke o premreženosti trdnih ogljikovodikov pri različnih vazelinah in pri različno temperaturno obremenjenih vzorcih vazelina.

6. LITERATURA

1. Cosmetics and skin: Chesebrough Manufacturing Company
<http://www.cosmeticsandskin.com/companies/chesebrough.php> (povzeto februarja 2014).
2. Fougera E.: 1. Vaseline. American Druggist, 1884: 62.
3. Cosmetics and skin: Petrolatum/Petroleum Jelly
<http://www.cosmeticsandskin.com/bcb/petrolatum.php> (povzeto februarja 2014).
4. Lindsay D: House of invention: the secret life of everyday products. New York, Lyons Press, 2000: 20-21.
5. Schwager E.: From Petroleum Jelly to Riches, Drug News & Perspectives, 1998; 11: 127.
6. The Online Etymology Dictionary
<http://www.etymonline.com/index.php?term=Vaseline> (povzeto februarja 2014).
7. European Pharmacopeia, Council of Europe, Strasbourg, 8. izdaja, 2014: 2966-2967.
8. Wiechers J. W.: Science and Applications of Skin delivery systems, 1. izdaja, Allured Publishing Corporation, Illinois, ZDA, 2008: 465–468.
9. Thompson J.E., Davidow L.W.: A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice, 3. izdaja, Williams and Wilkins, Baltimore, ZDA, 2009: 277-280.
10. Golden, M. J.: Qualitative and quantitative determination of peroxides in petrolatum. *J. Pharm. Sci.*, 1949; 38: 301–304.
11. Rowe R. C., Sheskey P. J., Cook W. G., Fenton M. E.: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6. izdaja. London: Pharmaceutical Press, 2009: 510-511.
12. Dooms-Goossens A., Degreef H.: Contact allergy to petrolatums (I). Sensitizing capacity of different brands of yellow and white petrolatums. *Contact Dermatitis* 1983; 9: 175-185.
13. Dooms-Goossens A., Degreef H.: Contact allergy to petrolatums (II). Attempt to identify the nature of the allergens. *Contact Dermatitis* 1983; 9: 247-256.
14. Dooms-Goossens A., Degreef H.: Contact allergy to petrolatums (III). Allergenicity

- prediction and pharmacopoeial requirements. Contact Dermatitis 1983; 9: 352-359.
15. Voigt R: Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie, 6. izdaja. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1987: 115, 261, 266-269.
16. Shipman J. T., Wilson J. D., Todd A. W.: An introduction to physical science, 11. izdaja, Boston; New York : Houghton Mifflin, 2006: 372-375.
17. Boylan J. C.: Rheological Estimation of the Spreading Characteristics of Pharmaceutical Semisolids; J. Pharm. Sci., 1967; 56: 1164-1169.
18. Šegula I.: Pomembnost določanja oljnega števila vazelina za vrednotenje fizikalne stabilnosti mazila, diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Oddelek za Farmacijo, 1993: 3-4, 17.
19. Čučnik N.: Vpliv kvalitete vazelina na izdelavo in stabilnost krem s silikonskim emulgatorjem, diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Oddelek za Farmacijo, 1991: 21.
20. Fu R. C., Lidgate D. M.: Characterisation of the Shear Sensitivity Property of Petrolatum, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1985; 74: 290-294.
21. Pharmacopée française, 11. spletna izdaja, monografija vazelina.
22. Zupančič Valant A.: Uvod v reologijo, 1. izdaja, Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2007: 26, 29-31, 35-45, 49-60.
23. European Pharmacopeia, Council of Europe, Strasbourg, 8. izdaja, 2014: 156.
24. Žorž M.: HPLC, samozaložba, Ljubljana, 1991: 5, 20, 37-49, 65-75, 79, 84-89, 93, 116-117, 119-120.