

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANA ŠVENCIR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANA ŠVENCIBIR

**VPLIV KONCENTRACIJE HEPARINA IN NIZKOMOLEKULARNEGA
HEPARINA NA TERMOODZIVNE LASTNOSTI POLOKSAMERNIH
HIDROGELOV**

**EFFECT OF HEPARIN AND LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN
CONCENTRATION ON THERMORESPONSIVE PROPERTIES OF
POLOXAMER HYDROGELS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag farm., za pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem dr. Maji Radivojša Matanović, za usmerjanje pri eksperimentalnem delu naloge ter tehničnima sodelavkama Mojci Keržan in Tatjani Horvatič za pomoč pri delu v laboratoriju.

Nenazadnje se zahvaljujem tudi svojim staršem in bratu Tadeju za vso podporo in pomoč v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar.

Jana Švencbir

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1 HIDROGELI.....	1
1.1.1 PREMREŽEVANJE HIDROGELOV	1
1.2 POLOKSAMERI	3
1.3 PODKOŽNA APLIKACIJA	5
1.4 HEPARIN	6
1.5 REOLOGIJA	7
1.5.1 VISKOELASTIČNI SISTEMI	8
1.5.2 SENZORSKI SISTEMI	9
1.5.3 OSNOVE OSCILACIJSKIH TESTOV	10
1.6 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA.....	12
2. NAMEN DELA	14
3. MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.2 NAPRAVE.....	15
3.3 METODE.....	15
3.3.1 IZDELAVA TEMPERATURNO ODZIVNIH HIDROGELOV	15
3.3.2 VREDNOTENJE TEMPERATURNO ODZIVNIH HIDROGELOV	18
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	21
4.1 REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV Z ROTACIJSKO VISKOMETRIJO	21
4.2 REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV Z OSCILACIJSKO VISKOMETRIJO	24
4.2.1 TEMPERATURNA ODVISNOST ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA	24
4.2.2 ČASOVNA ODVISNOST ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA... 40	
4.3 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA	46
4.3.1 MICELIZACIJA	46

4.3.2 DEMICELIZACIJA	51
4.3.3 GELIRANJE	52
4.3.4 DETEKCIJA STANJA VODE V HIDROGELIH.....	53
5. SKLEP	57
6.VIRI.....	59

POVZETEK

Hidrogele tvori tridimenzionalna mreža prečno premreženih polimerov, ki lahko sprejme večje količine vode. Polimeri, ki vsebujejo hidrofobne domene, imajo termoodzivne lastnosti. Primer termoodzivnih polimerov so poloksameri. Vodne raztopine poloksamerov so pri nižji temperaturi v tekočem stanju, medtem ko pri višji temperaturi gelirajo. Ko temperatura prične naraščati, se molekule pričnejo povezovati v micelle. Geliranje je posledica preurejanja micelov. Temperaturo geliranja je mogoče optimizirati. Zaradi vseh teh lastnosti lahko poloksamerne hidrogele uporabimo za subkutano dostavo zdravilnih učinkovin. Heparin in njegov derivat nizkomolekularni heparin sta antikoagulantna, ki ju uporabljamo za preprečevanje nastajanja krvnih strdkov in povečevanja obstoječih krvnih strdkov. Sta negativno nabita polisaharida in lahko interagirata z drugimi molekulami. Pripravili smo 12 različnih formulacij hidrogelov. Ustrezne količine poloksamera 407, poloksamera 188 in hidroksipropilmetilceluloze smo dodali predhodno ohlajeni prečiščeni vodi ali raztopini heparina ali nizkomolekularnega heparina in mešali, dokler ni nastala homogena raztopina. Pripravili smo hidrogele z različnimi koncentracijami heparina. Izvedli smo reološke teste in DSC-analizo, da bi ovrednotili vpliv koncentracije heparina in nizkomolekularnega heparina na lastnosti naših termoodzivnih hidrogelov. Na rotacijskem reometru smo izvedli oscilacijske in rotacijske teste z uporabo sistema stožca in ploščice. Spremljali smo viskoznost kot funkcijo temperature. Spremljali smo tudi viskozni in elastični modul kot funkcijo temperature, da bi določili temperaturo geliranja. Čas geliranja smo določili iz meritev elastičnega in viskoznega modula kot funkcije časa. Kalorimetrične meritve smo izvedli, da bi analizirali micelizacijo, geliranje in demicelizacijo pripravljenih vzorcev. Vzorce smo segrevali, ohlajali in ponovno segrevali, da bi določili njihove termoodzivne lastnosti. Spremljali smo tudi interakcije med polimeri in vodo ter taljenje in zmrzovanje vode. Ugotovili smo, da heparin in nizkomolekularni heparin znižata temperaturo micelizacije, temperaturo geliranja in čas geliranja vseh formulacij. Nizkomolekularni heparin ima večji vpliv na znižanje temperature micelizacije, temperature geliranja in časa geliranja kot heparin enake koncentracije. Vpliv heparina na termoodzivne lastnosti hidrogelov narašča z njegovo koncentracijo.

Ključne besede: termoodzivni hidrogeli, poloksamer, heparin, nizkomolekularni heparin

ABSTRACT

Hydrogels are three-dimensional networks of crosslinked polymer chains which can imbibe large amounts of water. Polymers with hydrophobic domains show thermoresponsive properties. Poloxamers are example of thermoresponsive polymers. At low temperature, aqueous solutions of poloxamers are in liquid state, but in gel form at higher temperature. When the temperature increases molecules start to self-assemble into micelles. Reorganisation of micelles results in gelation. The temperature at which gelation occurs can be optimised. All these characteristics make poloxamer hydrogels useful for subcutaneous drug delivery. Heparin and its derivative low molecular weight heparin are anticoagulants which are used for prevention of clot formation and extension of existing clots. They are highly negatively charged polysaccharides and can interact with other molecules. We prepared 12 different hydrogel formulations. Appropriate amounts of poloxamer 407, poloxamer 188, and hydroxypropylmethylcellulose were added to previously cooled purified water or heparin solution or low molecular weight heparin solution, and mixed until a homogeneous solution was obtained. Rheological tests and DSC analysis were used to characterize influence of concentration of heparin and low molecular weight heparin on properties of our thermoresponsive hydrogels. Rotational and oscillatory tests were carried out on rotational rheometer using cone and plate geometry. We determined viscosity as a function of temperature. Additionally we monitored the storage and loss moduli as a function of temperature to determine gelation temperature. We also measured the storage and loss moduli as a function of time to determine gelation time. Calorimetric measurements were carried out in order to analyse micellization, gelation and demicellization of prepared samples. Samples were heated and then cooled in order to determine their thermoreversible properties. We also monitored polymer-water interactions, freezing and melting of water. It was established that heparin and low molecular weight heparin lower the micellization temperature, the gelation temperature, and the gelation time of all formulations. Low molecular weight heparin produced higher decrease of micellization temperature, gelation temperature and gelation time than heparin of equal concentration. The effect of heparin on thermoresponsive properties increased with heparin concentration.

Keywords: thermoresponsive hydrogels, poloxamer, heparin, low molecular weight heparin

SEZNAM OKRAJŠAV

CMC: kritična micelarna koncentracija (angl. critical micelle concentration)

CMT: kritična micelarna temperatura (angl. critical micelle temperature)

DSC: diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. differential scanning calorimetry)

HPMC: hidroksipropilmeticeluloza

LCST: spodnja kritična temperatura raztopine (angl. lower critical solution temperature)

LMWH: nizkomolekularni heparin (angl. low molecular weight heparin)

P 188: poloksamer 188

P 407: poloksamer 407

LCST: spodnja kritična temperatura raztopine (angl. lower critical solution temperature)

UCST: zgornja kritična temperatura raztopine (angl. upper critical solution temperature)

1. UVOD

1.1 HIDROGELI

Hidrogele tvori tridimenzionalna mreža, ki nastane s prečnim premreževanjem verig hidrofilnih polimerov. Za izdelavo hidrogelov uporabljamo naravne in tudi sintetične polimere. Tridimenzionalna struktura lahko sprejme večjo količino vode ali bioloških tekočin (1, 2).

Hidrogeli lahko sprejmejo do tisočkrat večjo količino vode, kot je njihova suha masa. Vodo v hidrogelu lahko razdelimo glede na interakcije s polimernimi verigami. Vodo, ki hidratira polarne skupine polimera, imenujemo primarno vezana voda. Primarno vezana voda povzroči nabrekanje polimera. Pri tem se izpostavijo hidrofobne skupine, s katerimi interagira sekundarno vezana voda. Preostala voda, ki jo absorbira hidrogel, se porazdeli med polimernimi verigami in večjimi porami (3).

1.1.1 PREMREŽEVANJE HIDROGELOV

Poznamo kemijske in fizikalne metode premreževanja hidrogelov. Prednost kemijsko premreženih hidrogelov je predvsem počasnejši razpad gelske mreže v biološkem okolju. Kemijsko lahko hidrogele premrežimo z uporabo premreževalcev ali polimerov s predhodno derivatiziranimi funkcionalnimi skupinami. Slabost kemijsko premreženih hidrogelov je potencialna toksičnost zaradi rezidualnih premreževalcev v hidrogelu ali potencialna toksičnost z derivatiziranimi polimeri premreženih hidrogelov pri biorazgradnji zaradi možne vezave reaktivnih oligomerov na tkivo (4, 5).

FIZIKALNO PREMREŽEVANJE HIDROGELOV

Pri izdelavi fizikalno premreženih hidrogelov ni potrebno dodajanje prečnih premreževalcev ali predhodna kemijska modifikacija polimerov. S tem se izognemo tudi uporabi toksičnih reagentov in njihovemu vplivu na integriteto snovi, ki jih želimo vgraditi v hidrogel. Slabost fizikalno premreženih hidrogelov je hitrejše raztapljanje v fiziološkem okolju in posledično prehajanje polimernih molekul z mesta aplikacije (4, 5).

Hidrofobne interakcije

Polimeri, ki vsebujejo hidrofobne domene, lahko v vodnem okolju termoreverzibilno gelirajo. Temperatura geliranja je odvisna od koncentracije polimera, dolžine hidrofobnega dela in kemijske strukture polimera. Ti polimeri so topni v vodi pri nižjih temperaturah. Ko temperatura prične naraščati, hidrofobne domene tvorijo agregate, da bi se zmanjšala hidrofobna površina, ki je v stiku s prosto vodo in vodo, ki je strukturirana okrog hidrofobnih domen, saj je to termodinamsko ugodno (4).

Mejno temperaturo, pri kateri raztopina polimera gelira, imenujemo spodnja kritična temperatura raztopine (LCST, lower critical solution temperature). Pod to temperaturo prevladujejo vodikove vezi med hidrofilnimi skupinami polimera in molekulami vode, nad njo pa pričnejo prevladovati hidrofobne interakcije in vodikove vezi med molekulami vode, saj je to termodinamsko ugodneje. Nasprotno imajo hidrogeli, ki gelirajo pri ohlajanju, zgornjo kritično temperaturo raztopine (UCST, upper critical solution temperature) (6, 7).

Termoreverzibilni hidrogeli pri zvišanju temperature preidejo iz tekočega v gel stanje in obratno. To imenujemo prehod sol-gel. Zvišanje temperature je tako edini pogoj za njihov nastanek. Temu pogoju lahko zadostimo pri aplikaciji hidrogela, saj se pri tem njegova temperatura zviša na telesno temperaturo (6).

Ionske interakcije

Za premreževanje lahko uporabimo majhne molekule ali polimere nasprotnega naboja. Geliranje lahko sprožimo tudi s spremembo pH, ker pri tem nabite funkcionalne skupine ionizirajo oziroma se protonirajo. Vsi hidrogeli, ki nastanejo zaradi spremembe pH, vsebujejo polimere s kislimi ali bazičnimi skupinami. Takšne hidrogele najpogosteje uporabljamo za izdelavo formulacij s prirejenim sproščanjem za peroralno aplikacijo. Prednost uporabe hidrogelov, ki gelirajo zaradi ionskih interakcij, je predvsem enostavna biorazgradljivost po aplikaciji, saj se ioni v zunajcelični tekočini kompetitivno vežejo na komponente hidrogela (4, 7).

Vodikove vezi

Povezovanje z vodikovimi vezmi lahko dosežemo s kombinacijo dveh geometrijsko kompatibilnih naravnih polimerov. Takšni primeri so kombinacije želatina in agar, škrob in

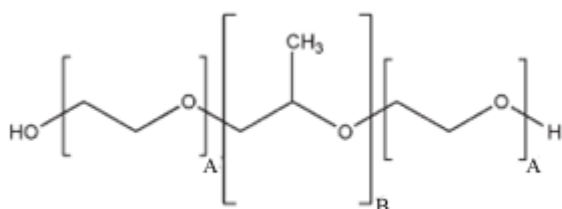
karboksimetilceluloza ter hialuronska kislina in metilceluloza. Takšni sistemi niso primerni za podaljšano sproščanje zdravilnih učinkovin, saj voda v biološkem okolju povzroči razpad in redčenje hidrogela (4).

Stereokompleksiranje

Majhne molekule ali polimerne verige, ki imajo enako kemijsko sestavo in različno stereokemijo (komplementarni enantiomeri), sinergistično interagirajo. Slabost te metode so omejene možnosti modifikacije polimernih verig, saj lahko majhne spremembe v strukturi ali razmerju med komplementarnimi enantiomeri oslabijo interakcije (4).

1.2 POLOKSAMERI

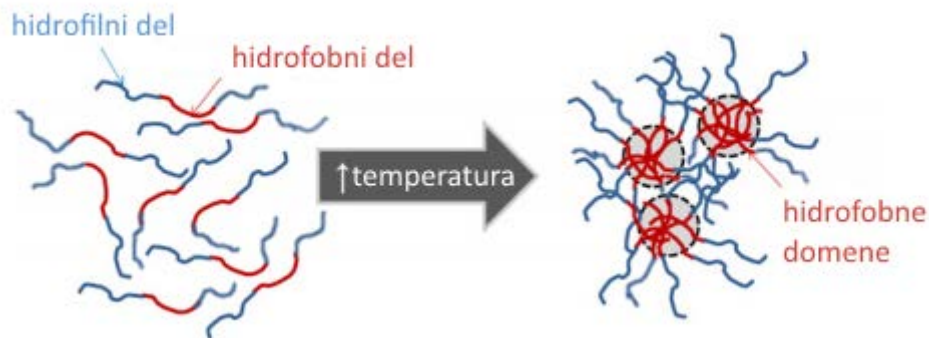
Poloksameri so triblok kopolimeri tipa A-B-A sinteznega izvora (slika 1). Pridobivajo jih s polimerizacijo monomernih enot propilenoksida in etilenoksida ob prisotnosti alkalnega katalizatorja, kot sta natrijev ali kalijev hidroksid. Poloksamere sestavljajo hidrofilne enote polietilenoksida (A) in hidrofobne enote polipropilenoksida (B). Delimo jih v tri razrede: tekočine (liquids-L), paste (paste-P) in kosmiče (flakes-F). V farmaciji jih uporabljamo kot emulgatorje, solubilizatorje, močljivce in tvorilce gelov (8, 9, 10, 11, 12).



Slika 1: Strukturna formula poloksamerov. (A) pomeni število zaporednih enot etilenoksida, (B) pa število zaporednih enot propilenoksida (prirejeno po 8).

Poloksameri v vodnih raztopinah termoreverzibilno gelirajo. S prilagajanjem njihove sestave, molekulske mase in koncentracije lahko dosežemo termoreverzibilno geliranje pri telesni temperaturi. Amfifilne molekule poloksamera se v vodnih raztopinah združujejo v micelle. Nad določeno koncentracijo, ki jo imenujemo kritična micelarna koncentracija (CMC, critical micelle concentration), se polimerne molekule, ki so bile pred tem raztopljene, pričnejo združevati in tvorijo micelle (slika 2). Tvorba micelov je tudi odvisna od temperature. Pod temperaturo, ki jo imenujemo kritična micelarna temperatura (CMT,

critical micelle temperature), so polietilenoksidne in polipropilenoksidne verige hidratirane. Z naraščanjem temperature postanejo hidrofobne polipropilenoksidne verige manj topne in se pričnejo združevati, zaradi česar pride do tvorbe micelov. Pri nadaljnjem segrevanju se pri določeni temperaturi, ki jo imenujemo temperatura geliranja, preuredijo in tvorijo urejeno strukturo. Pri tem se miceli navzkrižno povežejo z vodikovimi vezmi in se prenehajo premikati (6, 12, 3).



Slika 2: Združevanje poloksamernih molekul v micelle zaradi povišane temperature (prirejeno po 2).

Poloksamerne hidrogel je relativno enostavno izdelati. Vgrajevanje zdravilnih učinkovin je enostavno, saj so poloksameri pri sobni temperaturi v vodi raztopljeni. Primerni so za izdelavo formulacij za okularno, nazalno, oralno, peroralno, topikalno, subkutano, vaginalno in rektalno aplikacijo. Poloksameri zaradi etrskih funkcionalnih skupin niso biorazgradljivi, vendar lahko ledvice molekule velikosti 10–15 kDa filtrirajo in izločijo v urin. Biorazgradljivost so dosegli z zamenjavo polipropilenoksidnega segmenta z biorazgradljivo poli-L-mlečno kislino. Omejitve pri uporabi poloksamernih hidrogelov so njihova omejena stabilnost, slabe mehanske lastnosti in hitro raztapljanje po aplikaciji v biološkem okolju (7, 9, 14, 15, 16).

Poloksamer 407

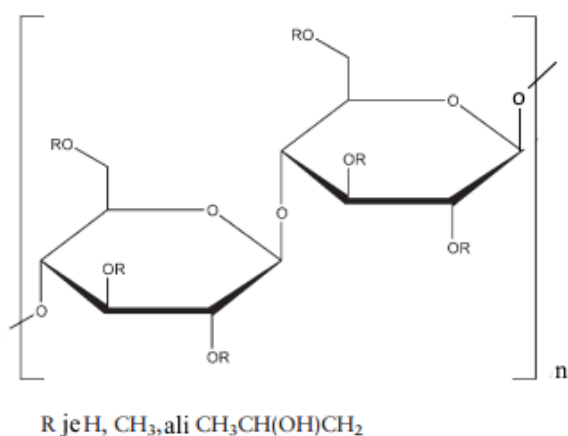
Poloksamer 407 (P 407) sestavljata dva bloka 101 zaporedne enote etilenoksida, med katerima je 56 zaporednih enot propilenoksida. Zaradi njegove biokompatibilnosti, stabilnosti ter nizke stopnje toksičnosti je primeren vehikel za dostavo zdravilnih učinkovin. Uporabljamo ga predvsem kot zgoščevalo, tvorilec gela in emulgator. Vodne raztopine, ki vsebujejo med 16 in 30 m/m % P 407, pri segrevanju termoreverzibilno gelirajo (4, 17, 18).

Poloksamer 188

Poloksamer 188 (P 188) sestavljata dva bloka 80 zaporednih enot etilenoksida, med katerima je 27 zaporednih enot propilenoksida. Uporablja se za optimizacijo temperature geliranja P 407. Vodne raztopine z več kot 20 m/m % P 188 termoreverzibilno gelirajo (8, 9, 18).

Hidroksipropilmetilceluloza

Hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) je derivat celuloze z delno O-metiliranimi in O-2-hidroksipropiliranimi hidroksilnimi skupinami (slika 3). Na voljo je v različnih stopnjah substitucije. V farmaciji jo uporabljamo za filmsko oblaganje, suspendiranje, kot stabilizator, vezivo, emulgator, zgoščevalo in sredstvo za preprečevanje koalescence. V hidrogelih jo uporabljamo kot tvorilec gelov, sredstvo za povečevanje viskoznosti in mukoadhezivnosti. Podaljša tudi čas zadrževanja učinkovine v poloksamernem hidrogelu in upočasni njegovo raztapljanje (8, 9, 19).



Slika 3: Struktura hidroksipropilmetilceluloze (prirejeno po 8).

1.3 PODKOŽNA APLIKACIJA

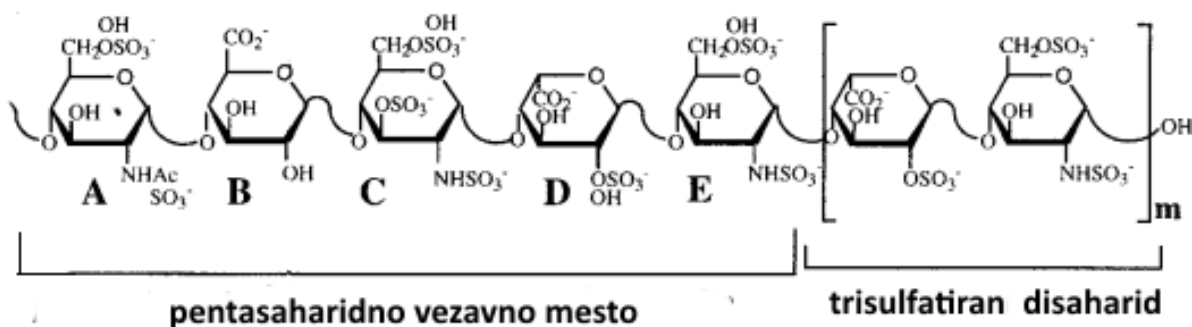
Podkožje se nahaja med kožo in mišično ovojnico. V njem se nahaja maščobno tkivo, ki je sestavljeno iz lobusov. Med posameznimi lobusi so pregrade iz mehkega vezivnega tkiva, ki predstavljajo večino zunajceličnega ogrodja. V podkožju potekajo krvne in limfne žile, ki so neenakomerno razporejene. Podkožno aplikacijo uporabljamo predvsem za zdravilne učinkovine, ki so neprimerne za peroralno aplikacijo. Običajno volumen injiciranja ne

presega 1 mL. Potek in hitrost absorpcije sta odvisna predvsem od molekulske mase in naboja učinkovine. Primerna mesta za injiciranje so trebuh, zgornji del hrbta, nadlaht in sprednji del stegen. Prednost uporabe hidrogelov za podkožno aplikacijo je njihova visoka biokompatibilnost, ki je posledica velike vsebnosti vode in fizikalno-kemijske podobnosti zunajceličnemu ogrodju (4, 20, 21).

1.4 HEPARIN

Heparin je anionski polisaharid z zapleteno heterogeno sestavo. Pridobivajo ga z ekstrakcijo iz živalskih tkiv, običajno iz črevesne sluznice prašičev. Ker je naravnega izvora, je variabilnost dolžine in sestave njegovih verig ter molekulske mase velika. Večinoma je sestavljen iz ponavljajoče se trisulfatirane disaharidne enote (slika 4).

Heparin spada med antikoagulate in ga uporabljamo za preventivo in zdravljenje tromboembolije. Nefrakcionirani heparin za antikoagulantno delovanje potrebuje kofaktor, ki se nahaja v plazmi in ga imenujemo antitrombin. Kompleks heparin-antitrombin inhibira več koagulacijskih encimov: trombin (faktor IIa) ter faktorje Xa, IXa, XIa in XIIa. Na inhibicijo s kompleksom heparin-antitrombin sta najbolj občutljiva trombin in faktor Xa. Samo heparin z zadosti dolgo verigo (18 saharidnih enot) lahko olajša vezavo antitrombina na trombin. Z inhibicijo trombina heparin prepreči nastanek fibrina in s trombinom inducirano aktivacijo faktorjev V in VIII. Nasprotno pa lahko verige heparina kakršne koli dolžine, ki vsebujejo pravilno pentasaharidno zaporedje, katalizirajo inhibicijo faktorja Xa z antitrombinom (slika 4) (28, 29, 30).



Slika 4: Pentasaharidno zaporedje v molekuli heparina (ABCDE), ki katalizira inhibicijo faktorja Xa, in trisulfatiran disaharid, ki prevladuje v strukturi heparina (prirejeno po 30).

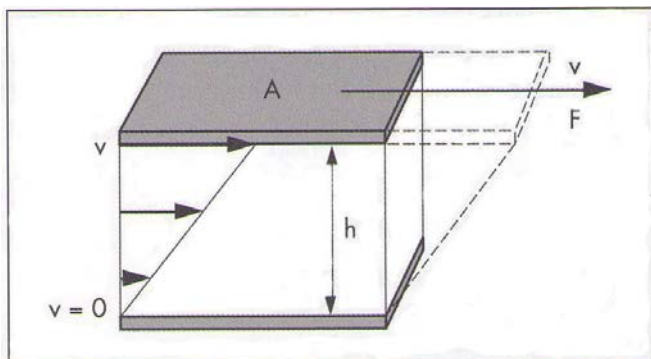
Ker lahko heparin tvori interakcije s širokim spektrom proteinov, ga v hidrogelih uporabljamo tudi za nekovalentno prečno premreževanje in dostavo zdravilnih učinkovin (31).

Nizkomolekularni heparin

Nizkomolekularni heparin (LMWH, low molecular weight heparin) pridobivajo iz nefrakcioniranega heparina z različnimi kemijskimi ali encimskimi depolimerizacijskimi procesi, pri čemer nastanejo produkti s približno tretjino molekulske mase nefrakcioniranega heparina. Manjša molekulska masa ima za posledico manjši inhibitorni učinek na trombin v primerjavi z inhibitornim učinkom na faktor Xa. S tem je omogočena inhibicija tromboze, hkrati pa je raven antikoagulantne aktivnosti nižja, kar pomeni manj krvavitev (28, 29).

1.5 REOLOGIJA

Reologija je veda, ki proučuje tokovno obnašanje in deformacijo materialov. Osnovne reološke parametre lahko opišemo s pomočjo modela dveh vzporednih plošč, med katerima se nahaja preiskovana tekočina (slika 5). Plošči s površino A [m^2] sta med sabo oddaljeni za razdaljo h [m]. Na zgornjo ploščo delujemo silo F [N], ki se zato prične premikati s hitrostjo v [m/s]. Spodnja stacionarna plošča medtem miruje. Pri tem nastane laminarni tok. Posamezne plasti tekočine se gibljejo z različnimi hitrostmi. Dve sosednji plasti sta med sabo oddaljeni za razdaljo dx glede na smer premikanja. Plošči se premikata za razliko dv v hitrosti. Tekočina se tej deformaciji upira z notranjim trenjem oziroma viskoznostjo (22, 23).



Slika 5: Sistem dveh vzporednih plošč (prirejeno po 23).

Glede na odziv posamezne tekočine pod obremenitvijo jih lahko delimo v več sistemov. Idealizirane ali newtonske tekočine so tiste, katerih viskoznost je odvisna samo od temperature in atmosferskega tlaka. Obnašanje realnih tekočin je večinoma bolj kompleksno. Njihova viskoznost je namreč odvisna od obremenitve in/ali časa trajanja le-te. Tako poznamo psevdoplastične, dilatantne, tiksotropne, reopeksne in viskoelastične sisteme (22, 24).

1.5.1 VISKOELASTIČNI SISTEMI

Viskoelastični sistemi hkrati izkazujejo viskozne in elastične lastnosti. Takšno obnašanje je značilno za večino realnih tekočin. Viskoelastične snovi imajo zakasnen in časovno odvisen odziv na obremenitev in na prenehanje obremenitve (23, 24).

Viskoznost

Viskozno obnašanje, ki je značilno za idealne tekočine, lahko prikažemo na primeru dušilke. Ta se pod vplivom zunanje sile deformira ireverzibilno. Energija, ki povzroči deformacijo, pa se po koncu obremenitve pretvori v toploto. Ta odziv opisuje Newtonov zakon (enačba 1) (24).

$$\tau = \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Enačba 1}$$

Elastičnost

Elastično deformacijo lahko opišemo na primeru odziva vzmeti. Energija, potrebna za elastično deformacijo, po prenehanju obremenitve omogoči, da se telo (vzmet) povrne v prvotno stanje. Hookov zakon opisuje zvezo med deformacijo in strižno napetostjo. Premosorazmernostni faktor med deformacijo in strižno napetostjo je elastični strižni modul G [Pa] (enačba 2) (24).

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

PROUČEVANJE VISKOELASTIČNIH LASTNOSTI SNOVI

Za proučevanje viskoelastičnih lastnosti različnih sistemov imamo na voljo več različnih reometrov in viskozimetrov. Za proučevanje nenewtonskih tekočin pogosto uporabljamo rotacijske reometre in viskozimetre. Merilni sistem rotacijskih reometrov sestavljata

mirujoči in rotirajoči del. Med meritvijo preiskovani vzorec na rotirajoči del deluje z zaviralno silo. Iz velikosti zaviralne sile in osnovnih pogojev lahko izračunamo vrednosti reoloških parametrov (22, 24).

1.5.2 SENZORSKI SISTEMI

Glede na lastnosti proučevanega vzorca lahko izberemo ustrezen senzorski sistem. Ti sistemi imajo znane dimenzije in so zasnovani tako, da zagotovijo pogoje enostavnega strižnega toka. Le ob takšnih pogojih lahko namreč z uporabo osnovnih enačb določimo reološke parametre vzorca. Izbira ustreznega sistema je odvisna predvsem od lastnosti vzorca in pogojev merjenja (24).

Sistem koaksialnih valjev

Merilni sistem je sestavljen iz zunanega in notranjega valja (slika 6). Med meritvijo se eden valj vrti, medtem ko drugi miruje. Vzorec se nahaja v reži med obema valjema, ki mora biti dovolj ozka, da zadostimo pogojem enostavnega strižnega toka. Ta merilni sistem je najprimernejši predvsem za vzorce z majhno viskoznostjo in vzorce z majhno površinsko napetostjo, saj tudi pri visokih strižnih hitrostih vzorec ne more steči iz merilne reže (23, 24).

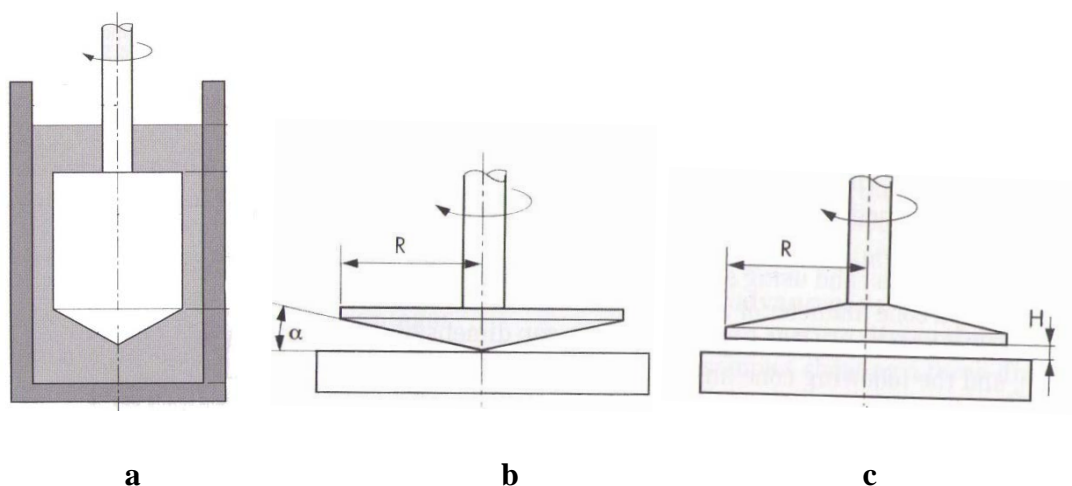
Sistem stožca in ploščice

Sistem sestoji iz statične okrogle ploščice, na katero nanese vzorec, in rotirajočega stožca (slika 6). Sistem stožca in ploščice je primeren tudi za meritve na majhnih volumnih vzorca. Glavna prednost sistema stožca in ploščice je konstantna strižna hitrost po celotni reži. Pri tem sistemu obstaja omejitev glede velikosti delcev v vzorcu, saj lahko preveliki delci vplivajo na rezultate meritev (23).

Poznamo tudi merilni sistem stožca in ploščice, pri katerem je konica stožca prisekana. Pri tej izvedbi je potrebno pred začetkom meritve vedno nastaviti širino reže med prisekanim stožcem in ploščico na razdaljo, pri kateri bi se navidezna konica stožca dotikala ploščice. Zaradi te prilagoditve ne prihaja do trenja med stožcem in ploščico, kar pomeni, da ne prihaja do obrabe sistema, pa tudi rezultati meritev so zaradi tega bolj natančni (23).

Sistem vzporednih plošč

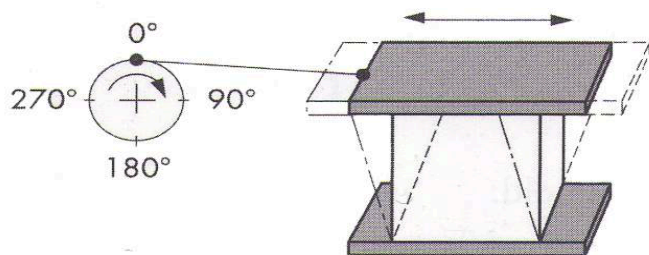
Sistem vzporednih plošč je sestavljen iz dveh vzporednih plošč, pri čemer ena izmed plošč miruje, druga pa se vrti (slika 6). Vzorec se med meritvijo nahaja med obema ploščama. Razdaljo med ploščama lahko nastavimo sami. Od prejšnjega sistema se razlikuje tudi v tem, da se strižna hitrost spreminja s polmerom plošče. Sistem vzporednih plošč je primeren za merjenje vzorcev, ki vsebujejo relativno velike delce ali pa so zelo viskozni in neprimerni za meritve s prej opisnima merilnima sistemoma (23).



Slika 6: Prikaz sistema koaksialnih valjev (a), sistem stožca in ploščice (b) in sistem vzporednih plošč (c) (prirejeno po 23).

1.5.3 OSNOVE OSCILACIJSKIH TESTOV

Oscilacijske teste uporabljamo za proučevanje lastnosti viskoelastičnih materialov. Princip oscilacijskih testov je mogoče razložiti z modelom dveh plošč (slika 7). Spodnja plošča je statična in od zgornje oddaljena za razdaljo h , med njima pa se nahaja vzorec. Na zgornjo ploščo je pritrjena palica. Palica povezuje rob zgornje plošče in obod kolesa. Ko se prične kolo vrteti, s tem prične potiskati zgornjo ploščo naprej in nazaj. Pri tem vzorec, ki je adheriran na obe plošči in se homogeno deformira, niha levo in desno od prvotne lege. Na sliki 7 vidimo, da je amplituda največja, ko se kolo zavrti za 90° oziroma 270° in najmanjša pri 180° in 360° , kar kaže, da gre za sinusno deformacijo (23).



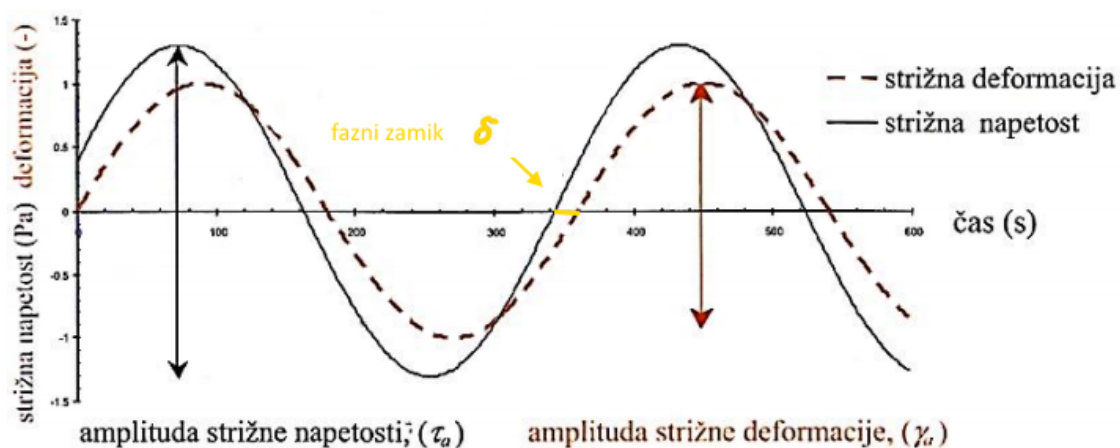
Slika 7: Model dveh vzporednih plošč za prikaz principa oscilacijskih testov (prirejeno po 23).

Odziv idealne trdne snovi (elastični odziv) in odziv idealne tekočine (viskozni odziv) na vsiljeno nihanje z amplitudo γ_a in frekvenco ω lahko ponazorimo z enačbama 3 in 4. Enačbi opisujeta spreminjanje strižne napetosti v odvisnosti od časa (24).

Elastični odziv: $\tau(t) = G \cdot \gamma_a \cdot \sin(\omega \cdot t)$ Enačba 3

Viskozni odziv: $\tau(t) = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_a \cdot \cos(\omega \cdot t)$ Enačba 4

Celokupen odziv realne viskoelastične snovi na strižno napetost je sestavljen iz elastičnega in viskoznega dela (slika 8). Elastični del odziva se kaže predvsem v faznem zamiku (δ) odziva oziroma strižne deformacije snovi na vnešeno strižno napetost (enačbi 5 in 6). Fazni zamik za viskoelastično snov znaša med 0° in 90° . Idealna elastična snov ima namreč fazni zamik 0° , idealna viskozna snov pa 90° . Viskozni del odziva snovi se zaradi izgube energije pri celotem odzivu pozna kot zmanjšanje amplitude strižne napetosti (23, 24).



Slika 8: Odziv viskoelastične snovi na strižno napetost. Prirejeno po (24).

$\gamma(t) = \gamma_a \cdot \sin(\omega \cdot t)$ Enačba 5

$\tau(t) = \tau_a \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta)$ Enačba 6

Celoten odpor snovi na vsiljeno deformacijo podaja kompleksni modul G^* (enačba 7).

$$|G^*| = \frac{\tau_a}{\gamma_a} \quad \text{Enačba 7}$$

Kompleksni modul je sestavljen iz dveh dinamičnih komponent.

Elastični modul (G' , storage modulus) je merilo za količino energije, ki se je ob deformaciji akumulirala (enačba 8). Ta energija je po prenehanju obremenitve na voljo za delno ali popolno povrnitev snovi v prvotno stanje (24).

$$G' = \left(\frac{\tau_a}{\gamma_a}\right) \cdot \cos\delta \quad \text{Enačba 8}$$

Viskozni modul (G'' , loss modulus) je merilo za energijo, ki se je med procesom deformacije porabila (enačba 9) (24).

$$G'' = \left(\frac{\tau_a}{\gamma_a}\right) \cdot \sin\delta \quad \text{Enačba 9}$$

Iz enačb 8 in 9 je razvidno, da tangens δ podaja razmerje med viskoznim in elastičnim modulom (enačba 10) (24).

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Enačba 10}$$

1.6 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC, differential scanning calorimetry) temelji na merjenju razlik toplotnega toka med vzorcem in referenco v odvisnosti od temperature in časa. Vzorec in referenca se med meritvijo nahajata v enakih lončkih, ki so običajno aluminijasti. Referenca je največkrat prazen lonček. Meritev poteka v kontrolirani atmosferi. Za prepihanje običajno uporabljamo dušik ali helij, ki odnašata hlapne produkte in zagotavljata inertno atmosfero. Za izvedbo meritve potrebujemo majhno količino vzorca, kar običajno znaša od 5 do 10 mg. Prednosti uporabe DSC-metode so tudi enostavnost in hitrost izvedbe meritve ter širok temperaturni interval, znotraj katerega lahko izvajamo meritve. Rezultat meritve je termogram, ki prikazuje spremembe toplotnega toka v odvisnosti od časa ali temperature. Termogram prikazuje eksotermne in

endotermne procese, kot so taljenje, steklast prehod, kristalizacija ali razpad, ki so potekli v vzorcu med meritvijo (25, 26, 27).

Poznamo dva različna tipa DSC-kalorimetrov:

Heat flux DSC ima en grelec, ki segreva tako vzorec kot tudi referenco. Med eksperimentom s senzorskim sistemom merimo razliko v temperaturi med vzorcem in referenco. Iz izmerjene temperaturne razlike nato računsko določimo toplotni tok (27).

Power compensation DSC ves čas eksperimenta ohranja temperaturno razliko med vzorcem in referenco enako nič. Grelca za vzorec in referenco sta ločena, zato lahko na vsakem grelcu sproti prilagajamo količino toplotnega toka, ki je potrebna za ohranjanje temperaturne razlike, enake nič (26, 27).

2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo izdelali in ovrednotili različne formulacije temperaturno odzivnih hidrogelov z različno koncentracijo nizkomolekularnega heparina ali heparina. Za primerjavo bomo izdelali osnovne formulacije brez nizkomolekularnega heparina in heparina, da bomo lahko raziskali, kakšen vpliv imajo njune različne koncentracije na lastnosti termoreverzibilnih hidrogelov. Predvsem nas bo zanimal vpliv na temperaturo geliranja.

Najprej bomo pripravili hidrogele, ki bodo vsebovali različne kombinacije in deleže poloksamerov P 407 in P 188 ter hidroksipropilmetilceluloze. Medij za izdelavo hidrogelov bo prečiščena voda, raztopina nizkomolekularnega heparina ali raztopina heparina. Hidrogele bomo nato reološko ovrednotili. Z reometrom Physica MCR 301 bomo izvedli meritve viskoznosti v odvisnosti od temperature v intervalu od 20 do 40 °C in grafično določili temperaturo geliranja. Nato bomo izvedli oscilacijski test, pri katerem bomo v temperaturnem intervalu od 10 do 40 °C merili vrednosti elastičnega in viskoznega modula ter grafično iz presečišča določili temperaturo geliranja. Čas geliranja bomo določili tako, da bomo merili vrednost elastičnega in viskoznega modula v odvisnosti od časa v določenem časovnem intervalu.

Izvedli bomo tudi DSC-analizo vzorcev. Vzorce bomo najprej segrevali v temperaturnem območju od 0 do 45 °C. Nato bomo vzorce ohlajali med 45 in –60 °C in zopet segrevali od –60 do 45 °C. Pri tem bomo spremljali micelizacijo, geliranje, demicelizacijo, zamrzovanje proste vode in vezane vode, ki ne zmrzuje. S segrevanjem, ohlajanjem in ponovnim segrevanjem bomo ovrednotili termoreverzibilne lastnosti vzorcev.

3.MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

- Heparin Braun 5000 i.e./ml raztopina za injiciranje, Melsungen, Nemčija
- Fragmin 10.000 i.e./ml raztopina za injiciranje, (dalteparin, LMWH), Luxembourg, Luksemburg
- Lutrol® F 127, INCI: Poloxamer 407, (P 407), Ludwigshafen, Nemčija
- Lutrol® F 68, INCI: Poloxamer 188, (P 188), Ludwigshafen, Nemčija
- Methocel K4M Premium: hidroksipropilmetilceluloza, (HPMC), Dartford Kent, Velika Britanija
- prečiščena voda

3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica Mettler Toledo XS 205, Schwerzenbach, Švica
- avtomatske pipete (20–100 µL, 50–1000 µL, 100–5000 µL), Biohit, Finska
- vodna kopel, WB13, Kambič laboratorijska oprema d.o.o., Semič, Slovenija
- magnetno mešalo IKA-WERKE RO 15 power, Staufen, Nemčija
- reometer Physica MCR 301, Anton Paar GmbH, Gradec, Avstrija
- stiskalnica DSC-lončkov
- diferenčni dinamični kalorimeter DSC1, STARe SYSTEM (programska oprema STARe Software v9.30), Mettler Toledo Schwerzenbach, Švica

3.3 METODE

3.3.1 IZDELAVA TEMPERATURNO ODZIVNIH HIDROGELOV

Osnova za izdelavo temperaturno odzivnih hidrogelov je bil polimer poloksamer 407, ki smo mu dodajali različne deleže poloksamera 188 in ostalih snovi, ki vplivajo na temperaturo geliranja ali viskoznost temperaturno odzivnih hidrogelov. Medija za izdelavo termoreverzibilnih hidrogelov sta bila prečiščena voda, raztopina heparina ali raztopina LMWH. Omenjena medija smo uporabili, da bi ugotovili kakšen vpliv ima raztopina

heparina ali LMWH na lastnosti termperaturno odzivnih hidrogelov. Sestave posameznih formulacij so navedene v preglednici I.

Preglednica I: Sestava formulacij termoodzivnih hidrogelov (mase polimerov, ki smo jih dodali 10 mL vode, raztopine LMWH oziroma raztopine heparina).

Osnovne formulacije	Mase dodanih polimerov		
	P 407	P 188	HPMC
F1: 18 % P 407	2,195g	/	/
F2: 18 % P 407 + 1 % P 188	2,220g	0,123g	/
F3: 18 % P 407 + 1 % P 188 + 1 % HPMC	2,250g	0,125g	0,125g
Formulacije z LMWH	P 407	P 188	HPMC
F1/F 1,125: 18 % P 407 + F 1,125	2,195g	/	/
F2/F 1,125: 18 % P 407 + 1 % P 188 + F 1,125	2,220g	0,123g	/
F3/F 1,125: 18 % P 407 + 1 % P 188 + 1 % HPMC + F 1,125	2,250g	0,125g	0,125g
Formulacije s heparinom	P 407	P 188	HPMC
F1/H 1,125: 18 % P 407 + H 1,125	2,195g	/	/
F1/H 5,625: 18 % P 407 + H 5,625	2,195g	/	/
F1/11,25: 18 % P 407 + H 11,25	2,195g	/	/
F1/H 16,875: 18 % P 407 + H 16,875	2,195g	/	/
F2/H 1,125: 18 % P 407 + 1 % P 188 + H 1,125	2,220g	0,123g	/
F3/H 1,125: 18 % P 407 + 1 % P 188 + 1 % HPMC + H 1,125	2,250g	0,125g	0,125g

Najprej smo natehtali ustrezne mase P 407, P 188 in HPMC. Nato smo na magnetno mešalo postavili petrijevko z ledom. Na led smo postavili 50-mililitrske erlenmajerice, ki so vsebovale 10 mL prečiščene vode ali raztopine heparina oziroma LMWH in magnet. Nato smo ob stalnem mešanju v prečiščeno vodo, raztopino heparina oziroma raztopino LMWH postopoma dodajali polimere. Med posameznimi dodatki smo počakali, da se je že dodana količina polimera raztopila. Vedno smo pričeli z dodajanjem P 407, sledil je P 188

in nato še HPMC. Led smo med izdelavo dodajali, ko se je predhodna količina raztopila. Izdelane hidrogelne smo za 24 ur shranili v hladilnik.

Izdelava raztopine LMWH

Osnovna raztopina LMWH je vsebovala 10000 IU/ mL LMWH (daltoparina), kar ustreza 64 mg/mL. Iz nje smo pripravili 10 mL raztopine LMWH koncentracije 1,125 mg/mL.

Izdelava raztopine heparina

Izhajali smo iz raztopine heparina z vsebnostjo 5000 IU/mL, kar ustreza 50 mg/mL. V 10-mililitrsko bučko smo nato glede na želeno koncentracijo odpipetirali ustrezen volumen osnovne raztopine (preglednica II). Bučko smo nato dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

Preglednica II: Volumni osnovnih raztopin LMWH in heparina v posameznih formulacijah in koncentracije pripravljenih raztopin.

Formulacije z LMWH	Volumen osnovne raztopine LMWH [mL]	Koncentracija pripravljenih raztopin LMWH [mg/mL]
F1/F 1,125	0,176	1,125
F2/F 1,125	0,176	1,125
F3/ F 1,125	0,176	1,125
Formulacije s heparinom	Volumen osnovne raztopine heparina [mL]	Koncentracija pripravljenih raztopin heparina [mg/mL]
F1/H 1,125	0,225	1,125
F1/H 5,625	1,125	5,625
F1/11,25	2,25	11,25
F1/H 16,875	3,375	16,875
F2/H 1,125	0,225	1,125
F3/H 1,125	0,225	1,125

3.3.2 VREDNOTENJE TEMPERATURNO ODZIVNIH HIDROGELOV

3.3.2.1 Reološko vrednotenje termoreverzibilnih hidrogelov

Meritve smo izvajali na reometru Physica MCR 301 z uporabo merilnega sistema stožca s prisekano konico in ploščice CP50-2 (premer: 50 mm, kot: 2°, stožec, prisekan za 210 µm). Pred začetkom meritev smo vzorce vzeli iz hladilnika in jih nato segrevali na vodni kopeli, dokler niso gelirali. Potem smo vzorce nanesti na ploščico, predhodno uravnano na želeno temperaturo. Stožec smo spustili na merilno pozicijo, obrisali odvečno količino vzorca in počakali 5 minut, da se je vzorec termostabiliziral, ter začeli z meritvami.

- **Temperaturna odvisnost elastičnega in viskoznega modula**

Meritve smo izvajali v temperaturnem intervalu od 10 do 40 °C, v katerem smo izvedli 35 meritev, pri hitrosti segrevanja 0,015 °C/s in strižni deformaciji $\gamma = 0,2$ %. Meritve smo izvedli pri frekvenci $\nu = 0,01$ Hz, saj tako nizka frekvenca ne vpliva na določeno temperaturo geliranja (14). S pomočjo izmerjenih vrednosti viskoznega in elastičnega modula v odvisnosti od temperature smo opazovali geliranje vzorcev. Rezultate smo prikazali grafično. Iz grafa smo nato odčitali temperaturo geliranja, in sicer kot temperaturni interval, katerega mejni vrednosti sta temperatura, do katere je vrednost viskoznega modula višja od vrednosti elastičnega modula, ter temperatura, kjer vrednost elastičnega modula preseže vrednost viskoznega modula. V primeru, da sta se krivulji viskoznega in elastičnega modula na posameznem grafu sekali večkrat, smo za določanje temperature geliranja upoštevali zadnje presečišče krivulj. Temperaturne intervale osnovnih formulacij smo primerjali s temperaturnimi intervali, ki so bili že predhodno določeni po enaki metodi (32).

Optimizacija pogojev meritev

Spreminjali smo frekvenco oscilacije, saj so se v rezultatih meritev pri nekaterih formulacijah, ki so vsebovale 18 % P 407 in 1 % P 188 pojavljali širši intervali prekrivanja elastičnega in viskoznega modula ali širše vrzeli, kjer reometer vrednosti modulov ni mogel določiti. Zaradi tega nismo mogli odčitati intervala temperature geliranja pri formulaciji F2. Meritve za formulacijo F2 smo zato opravili še pri frekvencah 0,05 Hz, 0,1 Hz in 0,2 Hz. Ostali pogoji meritev so ostali nespremenjeni. Po pregledu rezultatov meritev

smo ugotovili, da se pri meritvah pri frekvencah 0,05 Hz, 0,1 Hz, 0,2 Hz vrednosti elastičnega in viskoznega modula še vedno prekrivajo, zato smo frekvenco zvišali na 1 Hz. Pri meritvah, izvedenih pri frekvenci 1 Hz, sta se elastični in viskozni modul sekala le enkrat, do prekrivanja pa ni prišlo. Odločili smo se, da bomo meritve izvajali tudi pri frekvenci 1 Hz in jih primerjali z rezultati pri frekvenci 0,01 Hz. Zaradi vpliva frekvence na temperaturo geliranja smo se odločili, da bomo temperaturo geliranja pri frekvenci 1 Hz odčitali kot temperaturo, pri kateri bo elastični modul po strmem naraščanju dosegel najvišjo vrednost. Nad to temperaturo se namreč vrednosti obeh modulov ustalijo, pri čemer vrednosti elastičnega modula prevladujejo nad vrednostmi viskoznega modula. To pa pomeni, da je preiskovani vzorec v gel stanju.

- **Časovna odvisnost elastičnega in viskoznega modula**

Čas geliranja definiramo kot čas, pri katerem vrednost elastičnega modula preseže vrednost viskoznega modula (33). Najprej smo meritev izvedli pri konstantni temperaturi 37 °C. Meritev je trajala 300 sekund, med posameznima merilnima točkama pa je preteklo 15 sekund. Vzorec je na ploščici pri tej temperaturi geliral, še preden smo lahko začeli z meritvijo.

Optimizacija pogojev meritev

Meritev smo zato prilagodili tako, da smo temperaturo ploščice uravnali na 10 °C in nanjo nanesli vzorec. Ob pričetku meritve smo temperaturo ploščice nastavili na 37 °C. Zaradi kratkih časov geliranja smo trajanje meritve skrajšali na 120 sekund. Skrajšali smo tudi časovni interval med posameznima merilnima točkama, na 2 sekundi, saj so vzorci gelirali v ozkem temperaturnem intervalu. Čas geliranja smo iz grafa odčitali kot prvo točko po presečišču elastičnega in viskoznega modula.

- **Rotacijska viskometrija**

V tem sklopu meritev smo spremljali viskoznost vzorcev v odvisnosti od temperature. V temperaturnem intervalu od 20 do 40 °C smo izvedli 60 meritev ob hitrosti segrevanja 1 °C/min in strižni hitrosti 10 s⁻¹. Iz dobljenih grafov smo odčitali temperaturo geliranja, in sicer kot temperaturo po nenadnem skoku viskoznosti, pri kateri viskoznost preneha naraščati.

3.3.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

V aluminijast lonček smo s pomočjo merilne pipete natančno natehtali 1 kapljico vzorca (približno 10 mg), ki smo ga predhodno shranjevali v hladilniku. Nato smo preluknjali pokrovček lončka in lonček zaprli s stiskalnico. Meritev smo izvedli na diferenčnem dinamičnem kalorimetru DSC1, v dušikovi atmosferi, ob pretoku dušika 50 mL/min. Meritev je trajala 82,5 minut. Vzorec smo najprej segrevali s hitrostjo 5 °C/min v temperaturnem območju od 0 do 45 °C, nato smo ga ohlajali s hitrostjo 2 °C /min med 45 in –60 °C in zopet segrevali s hitrostjo 5 °C /min od –60 do 45 °C.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Ustrezna temperatura geliranja temperaturno odzivnih hidrogelov mora biti višja od sobne temperature. Tekoče stanje namreč omogoča enostavno injiciranje. Hkrati mora biti temperatura geliranja nižja od telesne temperature, saj v nasprotnem primeru formulacija v podkožju ne gelira in posledično ne dosežemo podaljšanega sproščanja učinkovine (13).

4.1 REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV Z ROTACIJSKO VISKOMETRIJO

Viskoznost raztopin poloksamerov se poveča, ko se pričnejo molekule poloksamerov združevati v micelle, ki se nato povezujejo med sabo. Viskoznost raztopin pri segrevanju narašča, dokler pri temperaturi geliranja ne opazimo končne viskoznosti (34).

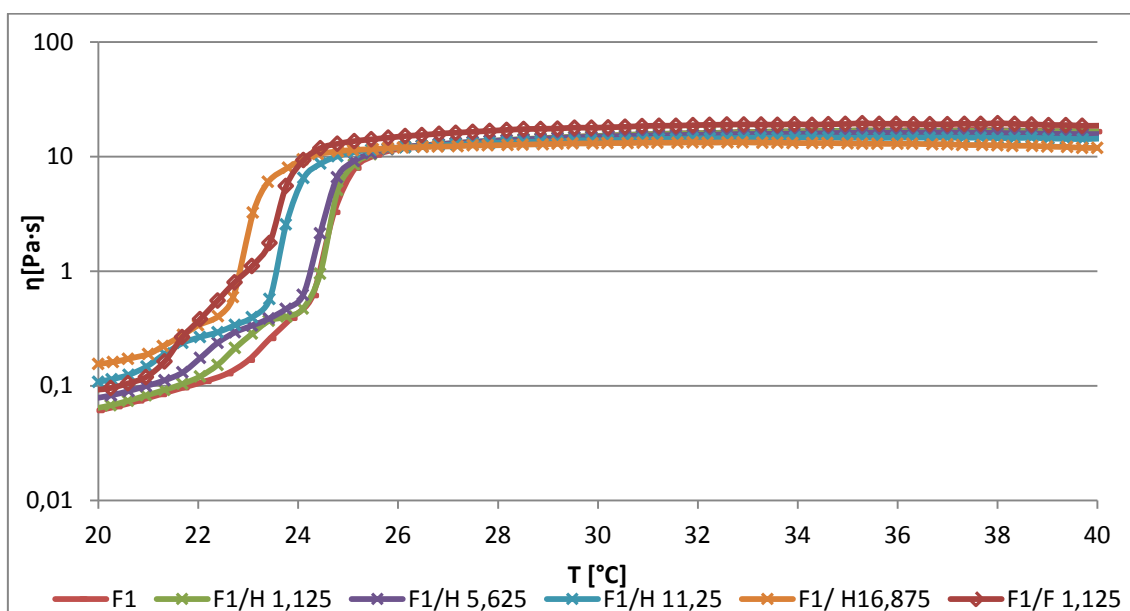
Formulacije z 18 % P 407

Iz primerjave krivulj vidimo, da je viskoznost formulacij F1 in F1/H 1,125 v večini temperaturnega intervala izvajanja meritve praktično enaka (slika 9). Razlika v naraščanju viskoznosti se pojavi pri 22,0 °C. Nad to temperaturo prične viskoznost pri formulaciji F1/H 1,125 hitreje naraščati in je večja od viskoznosti formulacije F1 do temperature 24,1 °C. Pri tej temperaturi se viskoznost obeh formulacij zopet izenači. Sledi območje zvečanja naklona krivulje viskoznosti. Vrednosti viskoznosti se ustalijo nad temperaturo geliranja, ki za obe formulaciji znaša 26,0 °C. Nato se povečevanje viskoznosti upočasni, dokler se vrednosti do konca meritve ne ustalijo pod 17 Pas.

Potek krivulj formulacij z večjimi koncentracijami heparina je podoben kot pri formulaciji F1/H 1,125. Vrednost viskoznosti je na začetku meritve najmanjša pri formulaciji z najmanjšo koncentracijo heparina in nato z zvečanjem koncentracije heparina v formulacijah narašča. Opazno je povečanje viskoznosti pri vseh formulacijah po nekaj merilnih točkah. Z naraščanjem koncentracije heparina pri formulacijah F1/H 5,625, F1/H 11,25 in F1/H 16,875 temperatura, pri kateri opazimo prvo zvečanje naklona krivulj, pada. Viskoznost pri vseh formulacijah s heparinom se nato povečuje, dokler se hitrost naraščanja viskoznosti za posamezno formulacijo ne poveča. Temperatura, pri kateri se pojavi povečanje hitrosti naraščanja viskoznosti, je najnižja pri formulaciji F1/H 16,875 in

najvišja pri formulaciji F1/ H 1,125. Tudi mejna vrednost, pod katero se viskoznost ustali, je najmanjša pri formulaciji F1/H 16,875 in znaša 13,4 Pas, ter nato narašča s padanjem koncentracije heparina do 36 Pas pri formulaciji F1/H 1,125.

Pri formulaciji z LMWH, F1/F 1,125 je povečevanje viskoznosti v temperaturnem območju meritve podobno kot pri formulacijah s heparinom. Odstopa predvsem prvi interval hitrejšega povečevanja viskoznosti, ki je širši in ima večji naklon kot vse preostale formulacije z 18 % P 407. Spremembo naklona doseže pri 21 °C, kar je enako kot pri formulaciji F1/F 11,25. Interval se zaključi pri 23,5 °C. V tem območju doseže tudi večjo vrednost kot preostale formulacije. Prav tako ta formulacija doseže največjo mejno vrednost viskoznosti, ki znaša 35,3 Pas.

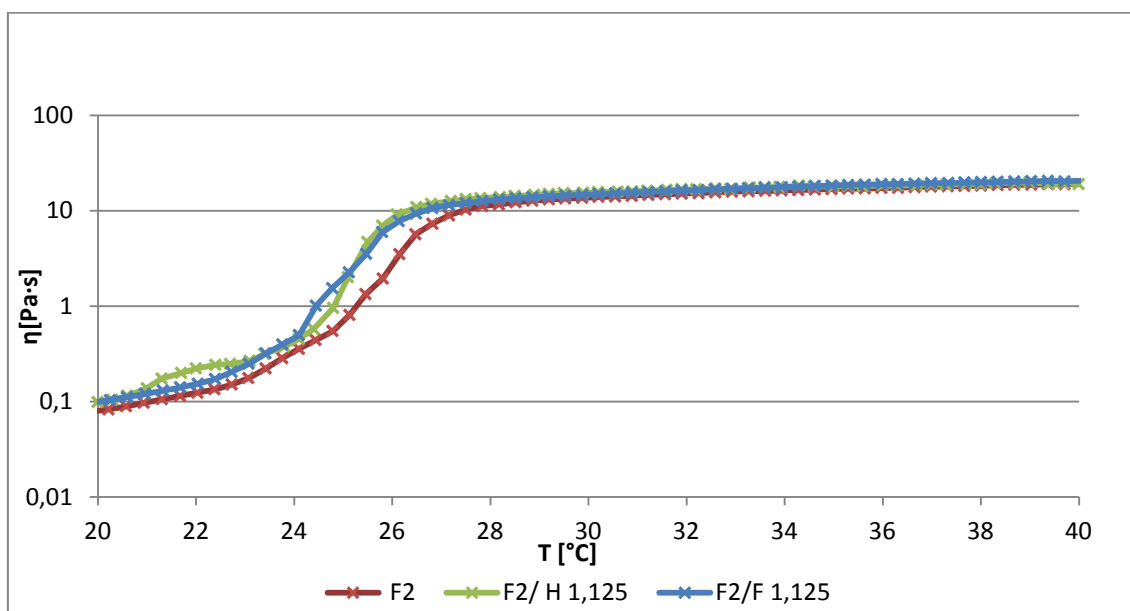


Slika 9: Viskoznost v odvisnosti od temperature za formulacije, ki vsebujejo 18 % P 407.

Formulacije z 18 % P 407 in 1 % P 188

Potek krivulj viskoznosti v odvisnosti od temperature vseh treh krivulj za formulacije z 18 % P 407 in 1 % P 188 je podoben (slika 10). Viskoznost formulacij F2/H 1,125 in F2/F 1,125 je v večini temperaturnega intervala meritve enaka in v celotnem temperaturnem intervalu nekoliko večja od viskoznosti formulacije F2. V primerjavi s formulacijami z 18 % P 407 viskoznost narašča počasneje, z manjšim naklonom. Dve območji povečevanja viskoznosti pa lahko opazimo samo pri formulaciji F2/F 1,125. Med temperaturama 21,0 in 23,1 °C je namreč viskoznost večja kot pri formulaciji F2/H 1,125. Vrednosti

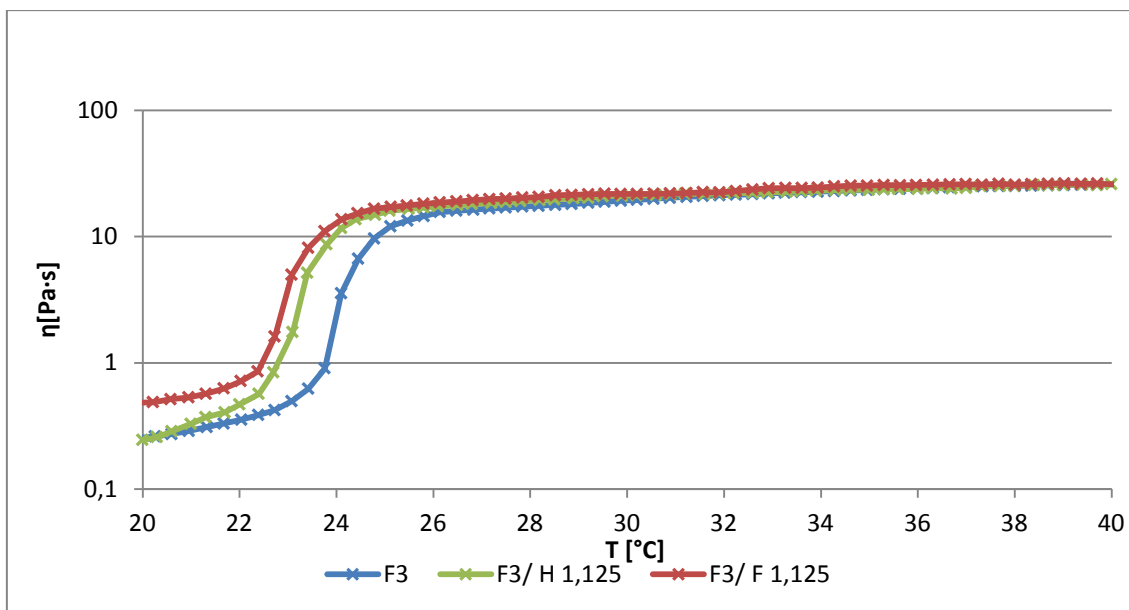
viskoznosti vseh treh formulacij so tudi v celotnem intervalu večje od vrednosti viskoznosti osnovne formulacije F1 in formulacij z enako vsebnostjo heparina in LMWH F1/H 1,125 in F1/F 1,125. Začetne vrednosti viskoznosti vseh treh formulacij s P 407 18 % in P 188 1 % so tako večje ali enake 0,1 Pas.



Slika 10: Viskoznost v odvisnosti od temperature za formulacije, ki vsebujejo 18 % P 407 in 1 % P 188.

Formulacije z 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC

Formulaciji F3 in F3/H 1,125 imata pri nižjih temperaturah enako viskoznost (slika 11). Nato prične viskoznost formulacije F3/H 1,125 hitreje naraščati in se pri 24,1 °C približa vrednosti viskoznosti formulacije F3/F 1,125. Viskoznost vseh treh formulacij je v primerjavi s formulacijami z 18 % P 407 in 1 % P 188 ter 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC v celotnem merilnem intervalu večja.



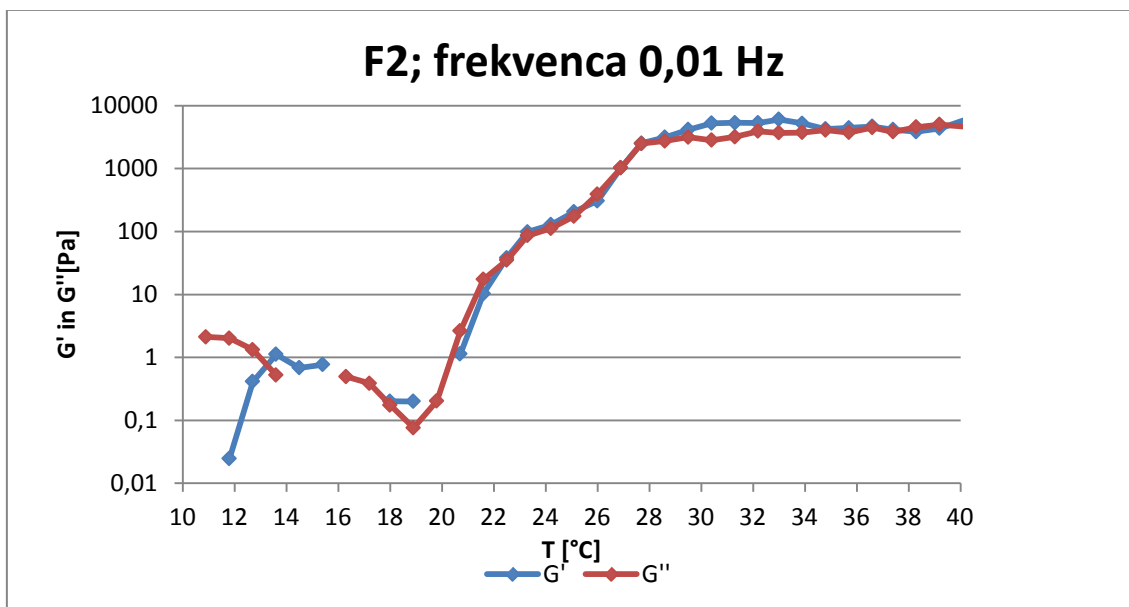
Slika 11: Viskoznost v odvisnosti od temperature za formulacije z 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC.

4.2 REOLOŠKO VREDNOTENJE HIDROGELOV Z OSCILACIJSKO VISKOMETRIJO

4.2.1 TEMPERATURNNA ODVISNOST ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA

Z meritvami pri frekvenci 0,01 Hz nismo mogli določiti temperaturnega intervala geliranja pri formulaciji F2 (slika 12). Vrednosti elastičnega in viskoznega modula se namreč od temperature 20,7 do 29,5 °C prekrivajo oziroma se minimalno razlikujejo. Nad to temperaturo se krivulji obeh modulov zopet pričneta prekrivati pri temperaturi 34,8 °C in se ne ločita do konca merilnega območja. Temperature geliranja za formulacijo F2 pri frekvenci 0,01 Hz tako nismo mogli določiti zaradi širokih intervalov prekrivanja. Tudi po literaturnih podatkih temperature geliranja za formulacijo z enako sestavo po enaki metodi ni bilo mogoče določiti (32). Pričakovali smo tudi večje razlike med vrednostmi obeh modulov na začetku in koncu merilnega intervala. Dokler je vzorec v tekočem stanju, bi namreč moral prevladovati viskozni modul, po točki geliranja pa elastični modul. Na začetku meritve se je pri obeh krivuljah pojavilo več intervalov, kjer reometer ni mogel določiti vrednosti obeh modulov, zato ne moremo določiti, kateri modul prevladuje. Pri višjih temperaturah, med 29,5 in 34,5 °C, prevladuje elastični modul, kar je značilno za gel

stanje, vendar se krivulji obeh modulov nad to temperaturo zopet pričneta prekrivati. Zato smo se odločili za prilagoditev metode. Meritve smo želeli izvesti pri višji frekvenci, pri kateri bi lahko določili temperaturo geliranja in obenem ne bi bila tako visoka, da bi vplivala na rezultate meritev. Odločili smo se, da meritev ponovimo pri frekvencah 0,05 Hz, 0,1 Hz in 0,2 Hz.

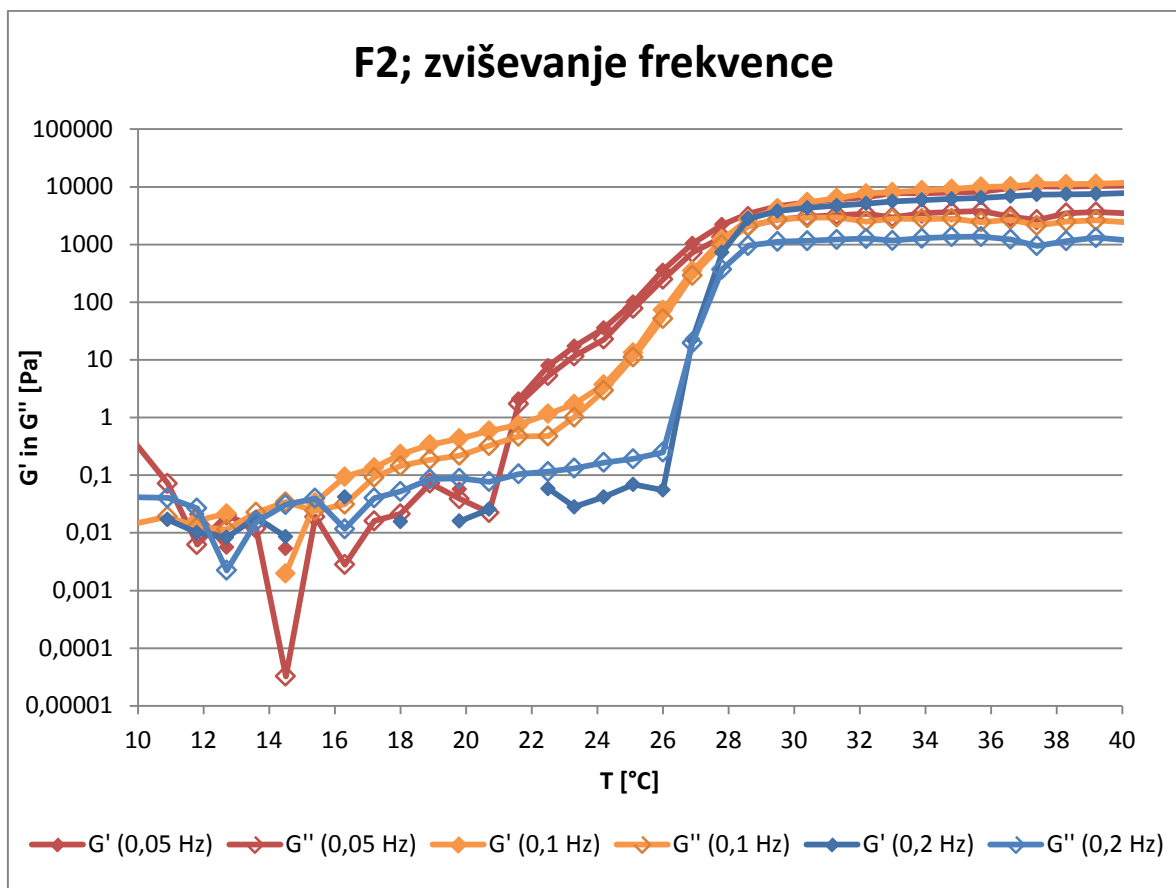


Slika 12: Elastični in viskozni modul formulacije F2 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 0,01 Hz.

Optimizacija pogojev meritev

Rezultati meritev pri frekvencah 0,05 Hz, 0,1 Hz in 0,2 Hz so prikazani na sliki 13. Iz rezultatov za meritev pri frekvenci 0,05 Hz je razvidno, da reometer pri temperaturah do 21,6 °C ni mogel določiti vrednosti elastičnega modula, pa tudi vrednosti viskoznega modula zelo nihajo. Nad to temperaturo se vrednosti elastičnega modula minimalno razlikujejo od vrednosti viskoznega modula vse do temperature 26,9 °C. Nad to temperaturo pričnejo vrednosti elastičnega modula prevladovati. Pri frekvenci 0,1 Hz je pri nižjih temperaturah zopet območje, kjer vrednosti elastičnega modula ni bilo mogoče določiti. Po preseženi temperaturi 14,5 °C so vrednosti elastičnega in viskoznega modula blizu skupaj. Območje prekrivanja vrednosti se pri frekvenci 0,1 Hz prične pri višji temperaturi, pri 24,2 °C, in se konča pri 28,6 °C. Nad to temperaturo vrednosti elastičnega modula prevladujejo do konca merilnega območja. Pri rezultatih meritve, izvedene pri 0,2 Hz, se pri temperaturi, nižji od 22,5 °C pojavi več območij, v katerih vrednosti elastičnega

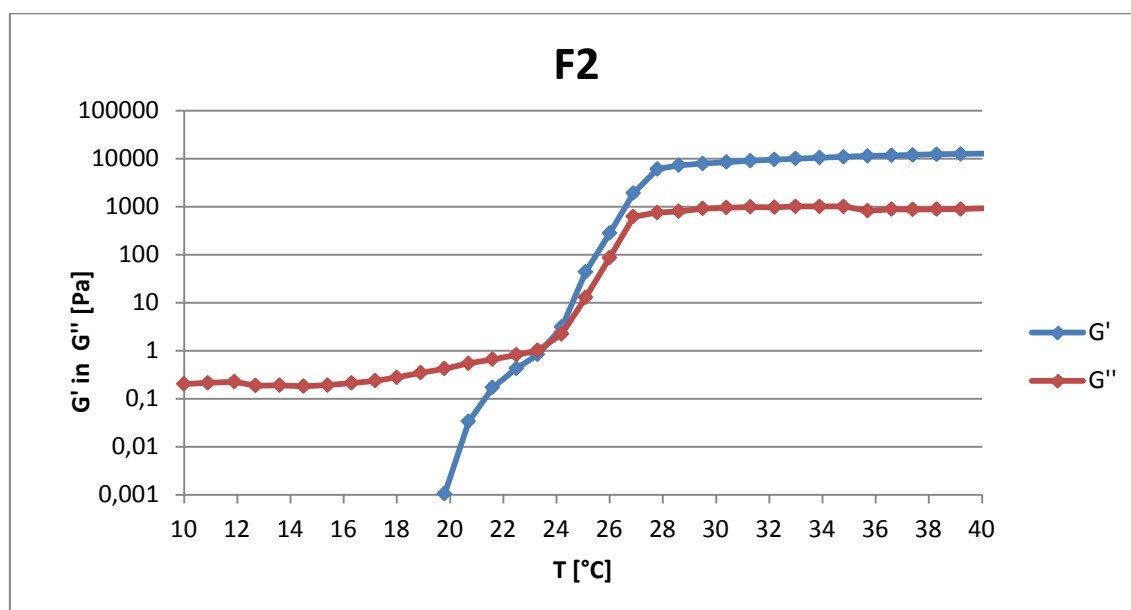
modula niso bile določene. Nad to temperaturo je interval, znotraj katerega se krivulji obeh modulov prekrivata, prevladuje viskozni modul. Pri tej frekvenci se interval prekrivanja obeh modululov, znotraj katerega se nahaja temperatura geliranja, pojavi pri najvišji temperaturi. Obenem je interval tudi najožji, saj sta njegovi mejni vrednosti 26,0 in 27,8 °C. Nad tem temperaturnim intervalom do konca meritve prevladujejo vrednosti elastičnega modula. Pri vseh treh frekvencah so se torej pojavili širši temperaturni intervali, v katerih so se vrednosti viskoznega in elastičnega modula prekrivale, kar ne omogoča točne določitve temperature geliranja. Ker se je z višanjem frekvence interval prekrivanja krivulj obeh modulov ožal, smo se odločili, da bomo meritev izvedli še pri frekvenci 1 Hz.



Slika 13: Elastični in viskozni modul formulacije F2 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvencah 0,05 Hz, 0,1 Hz in 0,2 Hz.

Frekvenca 1 Hz

Iz rezultatov meritve za formulacijo F2 pri frekvenci 1 Hz na sliki 14 je razvidno, da pri nižjih temperaturah vrednosti elastičnega modula niso merljive in so manjše od 0,001 Pa. Do presečišča krivulj prevladuje viskozni modul, torej ima formulacija v tem območju lastnosti tekočine. Pri tej frekvenci se ne pojavi interval, v katerem bi se krivulji prekrivali, prav tako je prisotno samo eno presečišče pri temperaturi 23,5 °C. Ta temperatura je nižja od pričakovane temperature geliranja. Za enako formulacijo znaša temperatura geliranja, določena po različnih metodah, 28,5 °C oziroma 28,2 °C (35). Nad temperaturo presečišča prične prevladovati elastični modul, ki narašča do temperature 28,6 °C. Nad to temperaturo je vrednost elastičnega modula konstantna, kar je značilno za gel stanje. Zato smo se odločili, da bomo pri frekvenci 1 Hz temperaturo geliranja odčitavali kot temperaturo, pri kateri se vrednost elastičnega modula ne spreminja več, saj pri tej temperaturi dosežemo gel stanje.

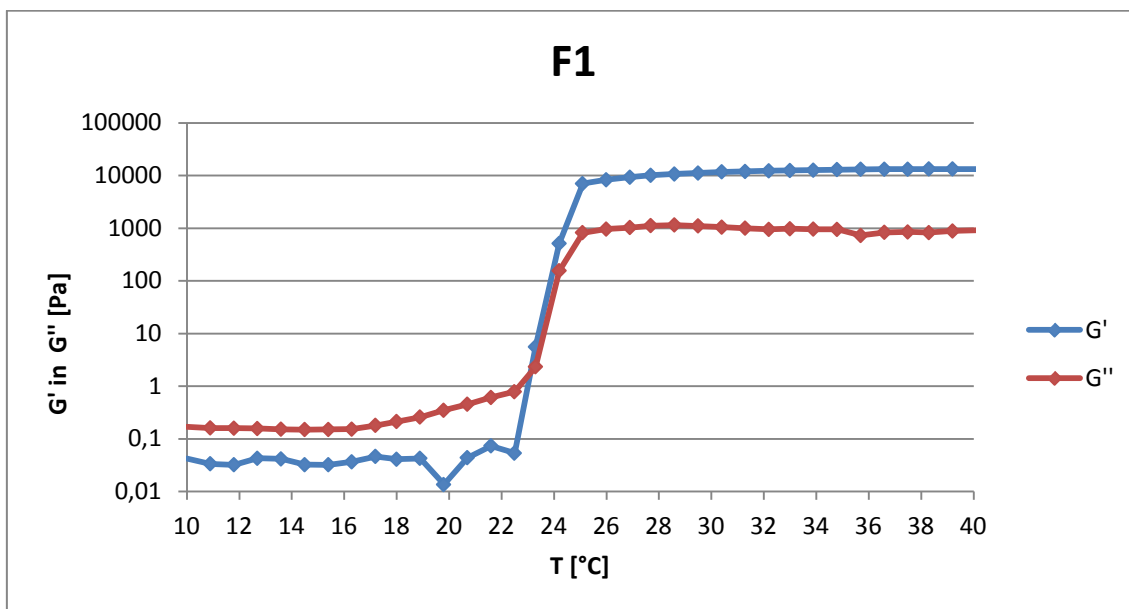


Slika 14: Elastični in viskozni modul formulacije F2 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

Formulacije z 18 % P 407

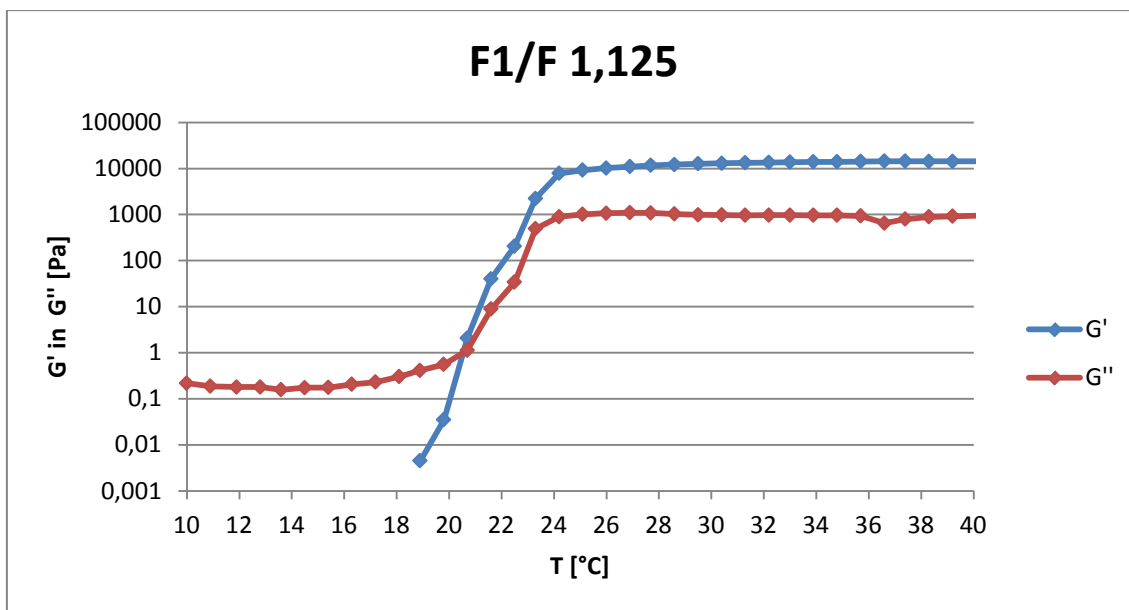
Pri formulaciji F1 pri nižjih temperaturah po pričakovanju prevladuje viskozni modul (slika 15). Vrednosti elastičnega modula so pri nižji temperaturi pri tej formulaciji merljive in znašajo med 0,01 Pa in 0,05 Pa. Krivulji obeh modulov pričneta naraščati pri nižjih temperaturah in z večjim naklonom kot pri formulaciji F2. Naraščanje elastičnega modula

sovpada z nastajanjem micelov (36). Presečišče se pojavi pri temperaturi 23,0 °C, vrednosti elastičnega modula pa dosežejo konstantno vrednost 10.000 Pa pri temperaturi 25,1 °C. Obe vrednosti sta nižji od primerljivih vrednosti pri formulaciji F2. Vrednosti viskoznega modula pa prenehajo naraščati pri 1000 Pa.



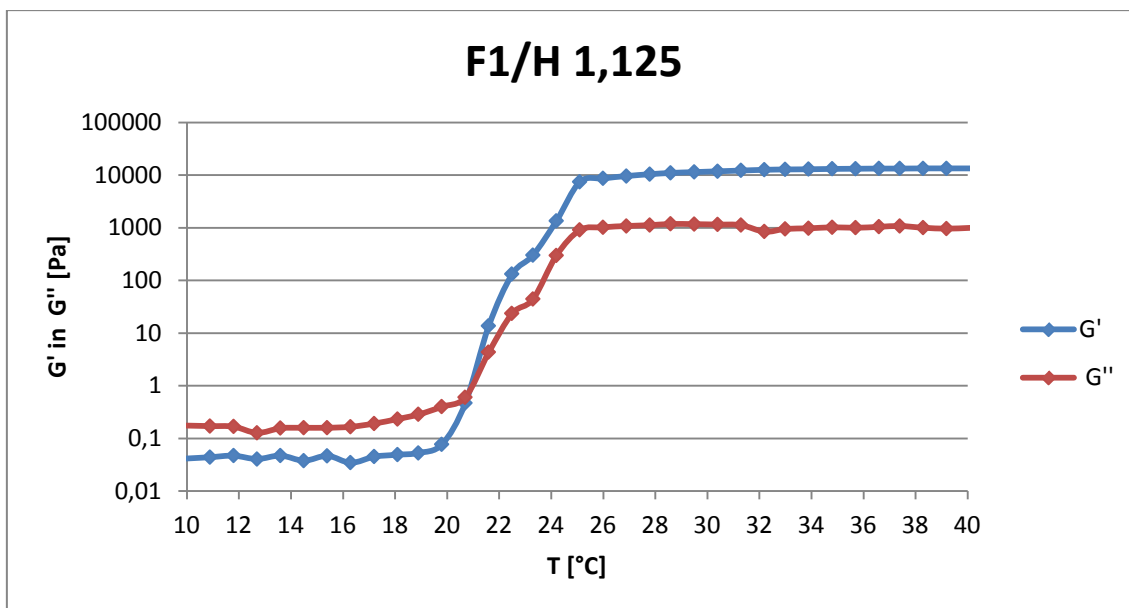
Slika 15: Elastični in viskozni modul formulacije F1 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

Presečišče krivulj elastičnega in viskoznega modula za formulacijo F1/F1,125 znaša 20,7 °C, medtem ko je temperatura geliranja 24,4 °C (slika 16). Obe temperaturi sta nižji od primerljivih temperatur za formulacijo F1, kar kaže, da se zaradi dodatka LMWH v koncentraciji 1,125 mg/mL proces geliranja začne pri nižji temperaturi. Pri temperaturi geliranja se vrednosti elastičnega modula ustalijo v območju 10.000 Pa, medtem ko vrednosti viskoznega modula dosežejo 1000 Pa. Pri tej formulaciji reometer pri nižjih temperaturah zopet ni določil vrednosti elastičnega modula, vendar je vseeno razvidno, da do presečišča prevladuje viskozni modul in s tem lastnosti tekočine. Vrednosti elastičnega modula smo lahko določili v drugem območju krivulje, ko prične elastični modul strmo naraščati.



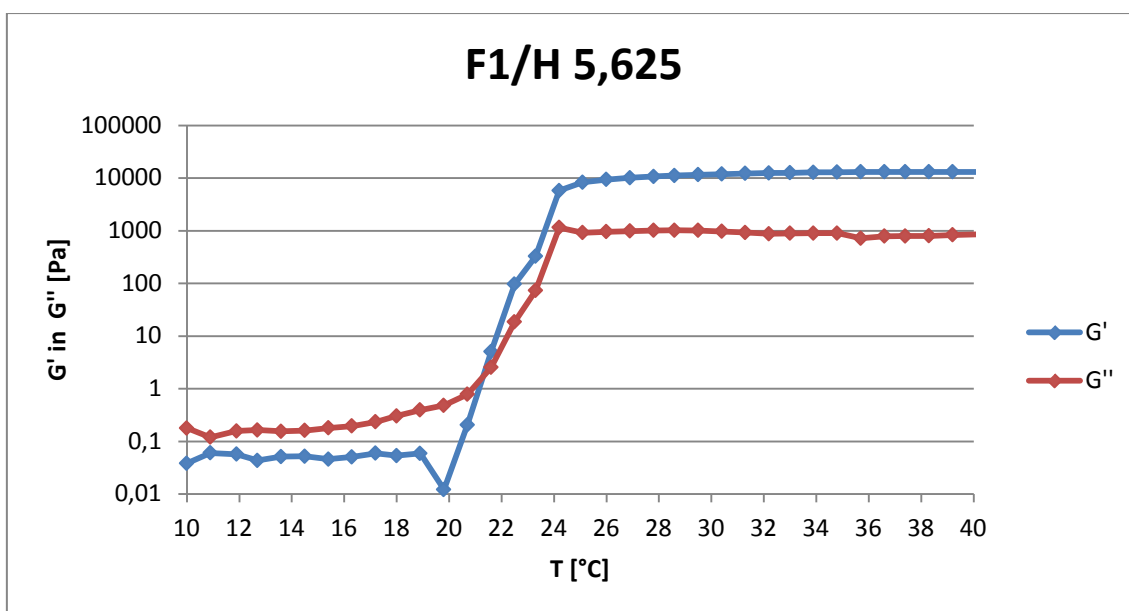
Slika 16: Elastični in viskozni modul formulacije F1/F 1,125 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

Tudi pri formulaciji F1/H 1,125 po pričakovanjih pri nižjih temperaturah prevladuje viskozni modul (slika 17). Razlika med vrednostmi elastičnega in viskoznega modula se v začetnem delu meritve zmanjša, saj so vrednosti elastičnega modula nekoliko večje kot pri prejšnjih formulacijah in se gibljejo med 0,03 Pa in 0,05 Pa. Krivulji obeh modulov pričneta naraščati pri nižjih temperaturah kot pri formulacij F1. Tudi presečišče je pri nekoliko nižji temperaturi, ki znaša 20,7 °C. Temperatura geliranja znaša 25,1 °C, iz česar lahko sklepamo, da dodatek heparina v koncentraciji 1,125 mg/mL ne vpliva na znižanje temperature geliranja 18-odstotne raztopine P 407. Po doseženi temperaturi geliranja se vrednosti obeh modulov ne spreminjajo do konca temperaturnega intervala in dosežejo konstantne vrednosti, ki so v območju konstantnih vrednosti predhodnih formulacij. Po pričakovanjih prevladuje elastični modul.



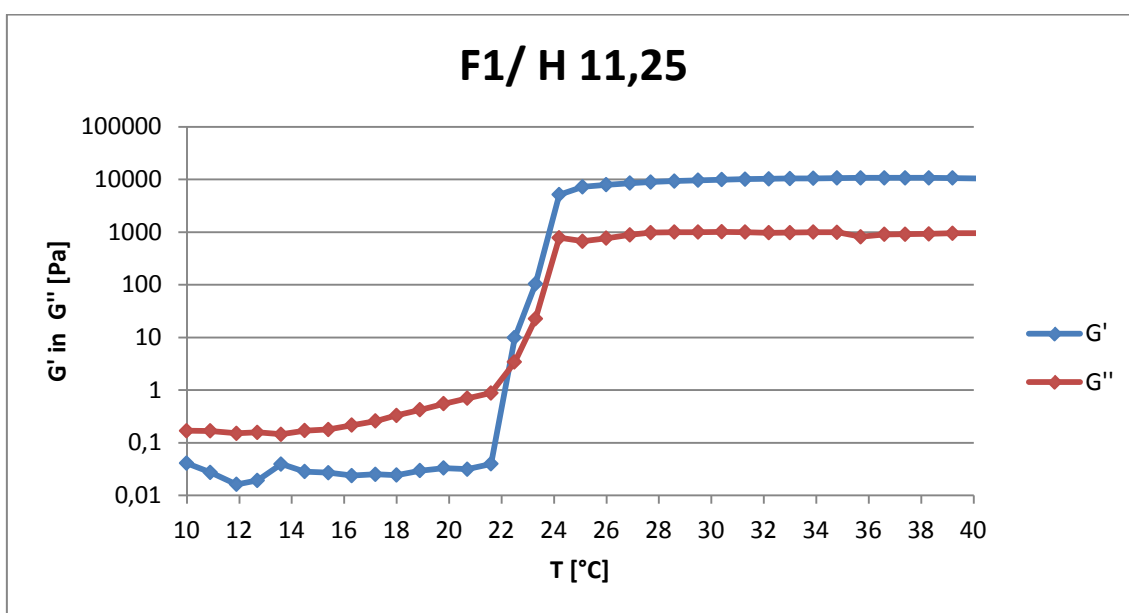
Slika 17: Elastični in viskozni modul formulacije F1/ H 1,125 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

Potek krivulj pri formulaciji F1/H 5,625 je podoben kot pri formulaciji F1/H 1,125, saj so vrednosti obeh modulov pri nižjih temperaturah podobne in začnejo naraščati pri isti temperaturi, ki znaša 19,8 °C (slika 18). Krivulji se sekata pri temperaturi 21,0 °C. Nad to temperaturo prevladuje elastični modul. Vrednost elastičnega modula preneha naraščati pri temperaturi 24,2 °C. Zvečanje koncentracije heparina na 5,625 mg/mL torej vpliva na znižanje temperature geliranja formulacije, ki vsebuje 18 % P 407.



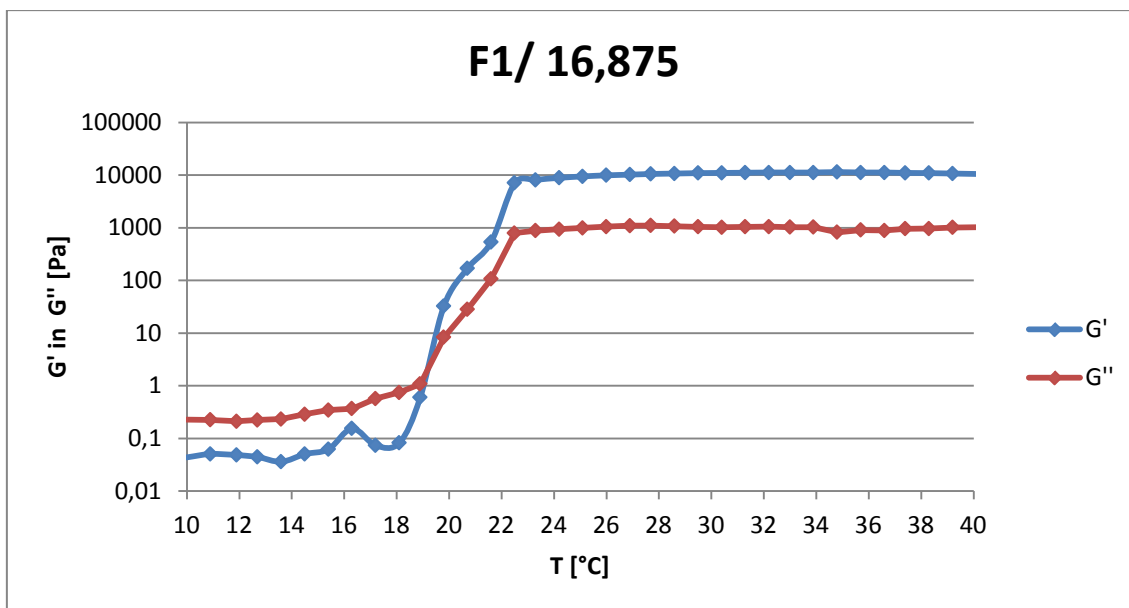
Slika 18: Elastični in viskozni modul formulacije F1/ H 5,625 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

Vpliv povečanja koncentracije raztopine heparina na 11,25 mg/mL je razviden iz rezultatov meritev za formulacijo F1/11,25 (slika 19). Vrednosti elastičnega modula v temperaturnem intervalu od 10,0 do 22,0 °C so manjše kot pri ostalih formulacijah, medtem ko pričnejo vrednosti viskoznega modula počasi naraščati že pri 16,3 °C. To kaže na prevladujoče tekočinske lastnosti formulacije. Pri temperaturi 22,0 °C prične krivulja elastičnega modula strmo naraščati in doseže konstantno vrednost in s tem temperaturo geliranja pri 24,2 °C. Temperatura geliranja te formulacije se ne razlikuje od temperature geliranja formulacije s koncentracijo 5,625 mg/mL.



Slika 19: Elastični in viskozni modul formulacije F1/H 11,25 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

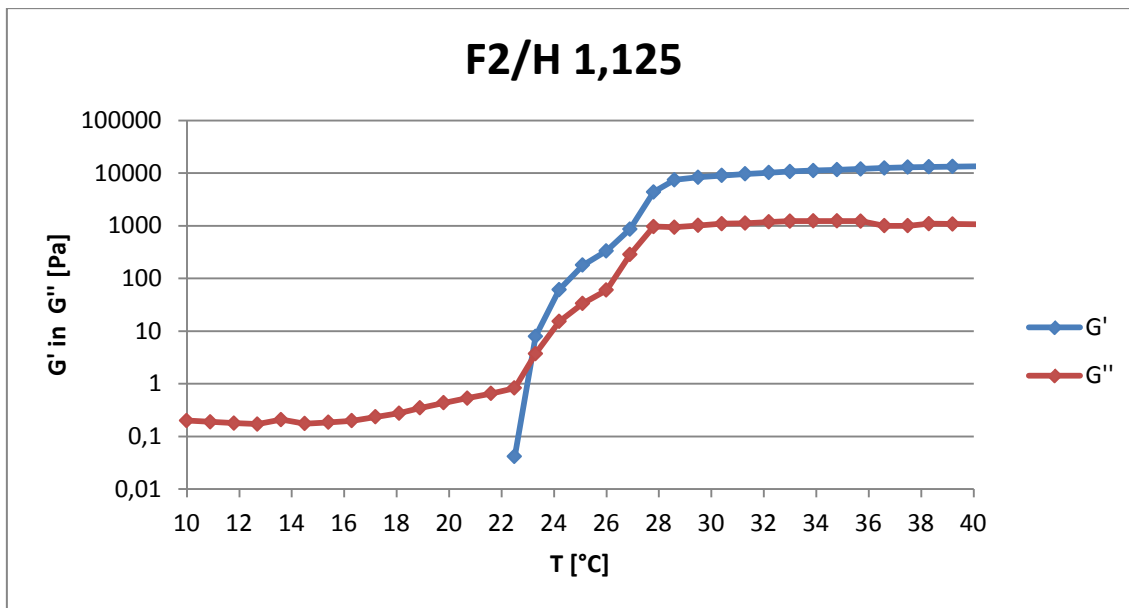
Pri formulaciji F1/16,875, ki vsebuje največjo koncentracijo heparina, pričnejo vrednosti viskoznega modula naraščati pri nižji temperaturi kot vrednosti elastičnega modula, vendar z manjšim naklonom (slika 20). Do presečišča pri temperaturi 19,5 °C prevladuje viskozni modul in s tem lastnosti tekočine. Po presečišču prične prevladovati elastični modul, ki tudi hitreje narašča. Temperatura geliranja je dosežena pri 22,5 °C. Nad to temperaturo ostajajo vrednosti obeh modulov do konca merilnega območja konstantne.



Slika 20: Elastični in viskozni modul formulacije F1/H 16,875 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

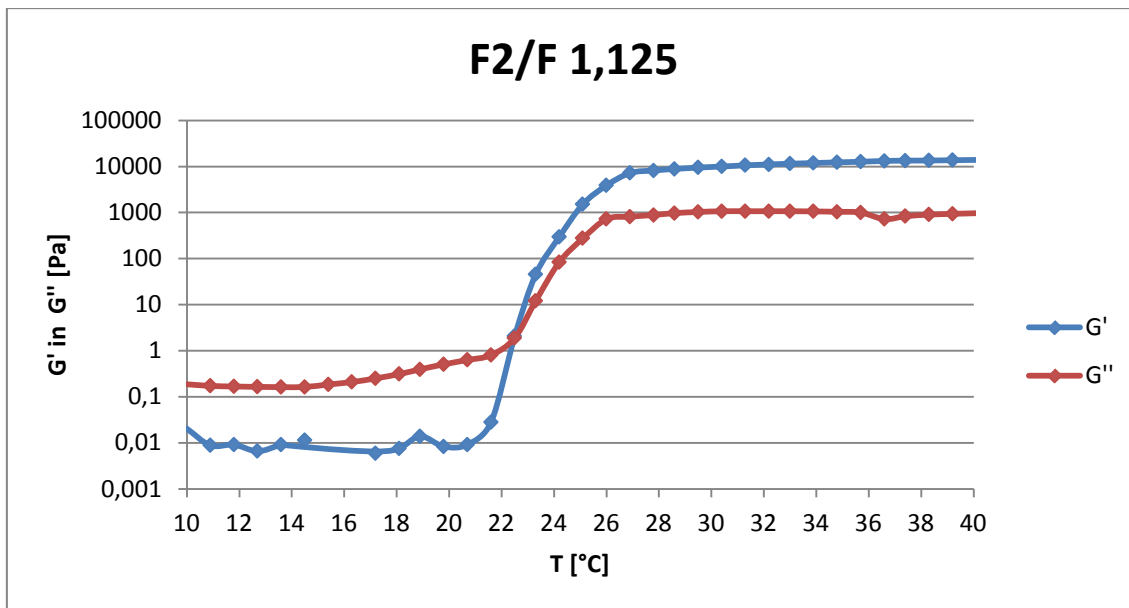
Formulacije z 18 % P 407 in 1 % P 188

Pri formulaciji F2/H 1,125 se pri nižjih temperaturah zopet pojavi interval, v katerem reometer ne more določiti vrednosti elastičnega modula (slika 21). Vrednosti elastičnega modula pričnejo naraščati nad 22,0 °C, kakor pri formulaciji F2. Vendar pa je ta temperatura višja kot pri ostalih formulacijah, ki vsebujejo le 18 % P 407 brez dodatka 1 % P 188. Viskozni modul prevladuje nad elastičnim modulom do presečišča in prične naraščati že pri 16,3 °C. Krivulji elastičnega in viskoznega modula se sekata pri temperaturi 23,3 °C. Nad to temperaturo prevladuje elastični modul. Njegova vrednost se ustali pri temperaturi geliranja, ki znaša 28,6 °C. Vrednost temperature geliranja je enaka kot pri formulaciji F2, ki ne vsebuje heparina. Nad to temperaturo vrednosti elastičnega modula minimalno naraščajo do konca merilnega območja. Viskozni modul doseže konstantno vrednost pri nižji temperaturi.



Slika 21: Elastični in viskozni modul formulacije F2/H 1,125 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

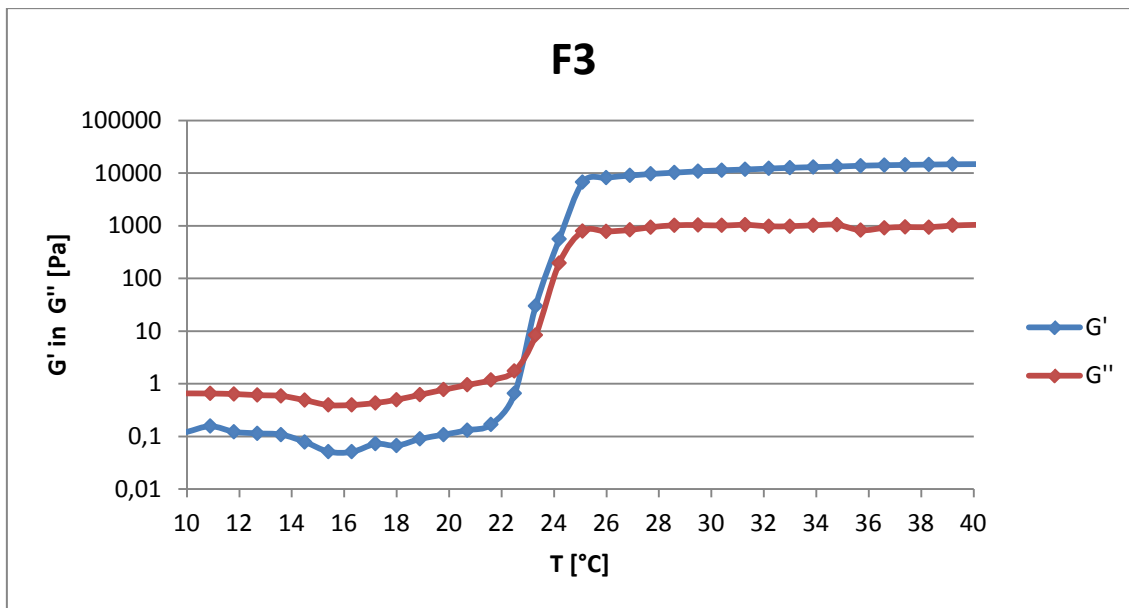
Pri formulaciji F2/ F 1,125 opazimo pri temperaturah do presečišča največjo razliko med vrednostmi viskoznega in elastičnega modula v primerjavi s formulacijami z vsebnostjo 18 % P 407. Vrednosti elastičnega modula so namreč do temperature 20,7 °C večinoma manjše od 0,01 Pa. Primerjave z ostalimi formulacijami, ki vsebujejo 18 % P 407 in 1 % P 188 ne moremo narediti, saj v teh primerih vrednosti obeh modulov pri nižjih temperaturah nismo mogli določiti. Do presečišča pri 22,5 °C prevladuje viskozni modul (slika 22). Temperatura geliranja znaša 26,9 °C, kar je nižje kot pri formulacijah F2 in F2/H 1,125, ki vsebujeta enak masni delež poloksamerov.



Slika 22: Elastični in viskozni modul formulacije F2/F 1,125 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

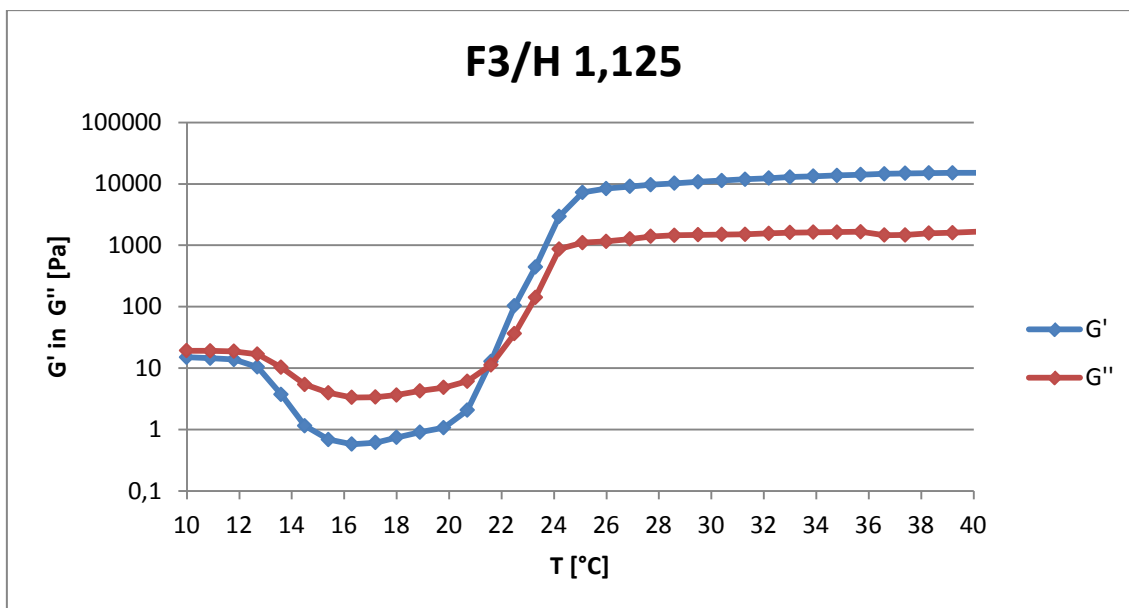
Formulacije z 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC

Vrednosti obeh modulov pri formulaciji F3 pričnejo pri temperaturi 13,6 °C upadati in nato od temperature 15,4 °C zopet naraščajo (slika 23). Vrednosti obeh modulov so do temperature presečišča večje kot pri predhodnih formulacijah. Do presečišča krivulj pri 22,8 °C prevladuje viskozni modul. Nad to temperaturo krivulji obeh modulov strmo naraščata, vendar so razlike med vrednostmi v posameznih merilnih točkah majhne. Od temperature geliranja, ki znaša 25,1 °C, in do konca merilnega območja opazno prevladuje elastični modul.



Slika 23: Elastični in viskozni modul formulacije F3 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

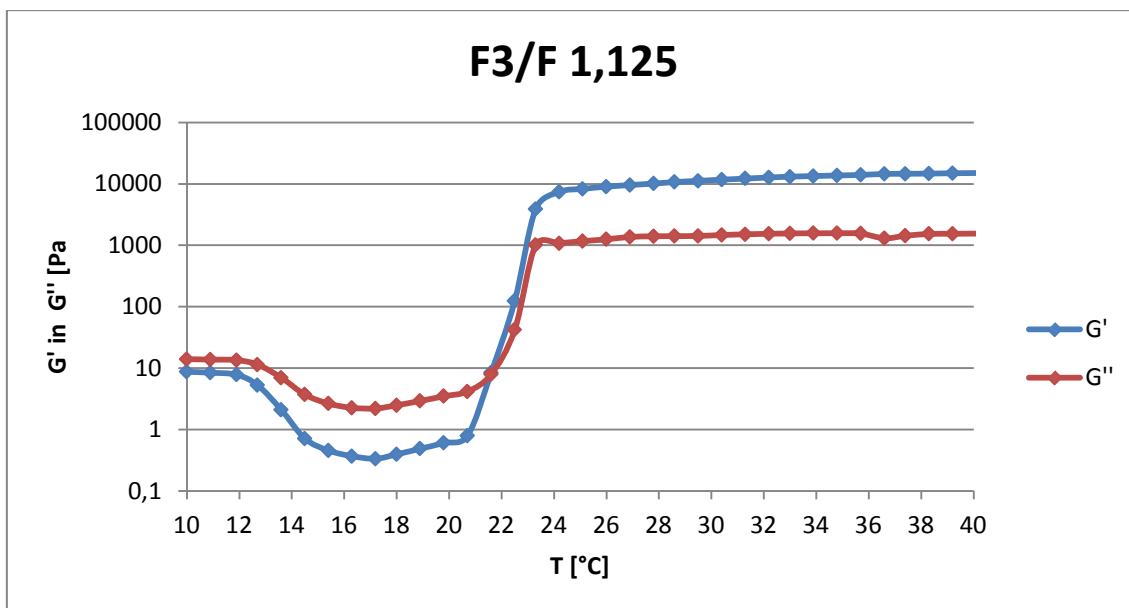
Vrednosti obeh modulov pri formulaciji F3/H 1,125 se na začetku meritve razlikujejo le za 5,2 Pa, nekoliko prevladuje viskozni modul (slika 24). Pri temperaturi 12,7 °C pričnejo vrednosti obeh modulov upadati, obenem pa se prične povečevati razlika med obema moduloma, pri čemer viskozni modul prevladuje nad elastičnim modulom. Najmanjšo vrednost dosežeta oba modula pri temperaturi 16,3 °C, nato pa pričnejo vrednosti naraščati. Presečišče obeh krivulj je pri temperaturi 21,6 °C. Po presečišču hitreje narašča elastični modul. Temperatura geliranja znaša 25,1 °C, kar je enako kot pri formulaciji F3, ki ne vsebuje heparina.



Slika 24: Elastični in viskozni modul formulacije F3/H 1,125 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

Pri formulaciji F3/F 1,125 na začetku meritve razlike med vrednostmi viskoznega in elastičnega modula, ki prevladuje, niso velike (slika 25). Pri temperaturi 11,9 °C pričnejo vrednosti obeh modulov upadati, hkrati pa se prične povečevati razlika med njunimi vrednostmi. Najmanjšo vrednost dosežeta viskozni in elastični modul pri temperaturi 17,2 °C. Nad to temperaturo pričnejo vrednosti obeh modulov naraščati. Nad presečiščem pri 21,6 °C prične prevladovati elastični modul. Temperaturo geliranja dosežemo pri 24,2 °C.

Ker je potek krivulj pri vseh treh formulacijah, ki vsebujejo 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC, na začetku meritve enak, lahko predvidevamo, da potrebuje vzorec s takšno sestavo daljši čas termostiranja, da se preuredi notranja struktura in preide v sol stanje.



Slika 25: Elastični in viskozni modul formulacije F3/F 1,125 v odvisnosti od temperature v intervalu od 10 do 40 °C pri frekvenci 1 Hz.

PRIMERJAVA REZULTATOV TEMPERATURE GELIRANJA DOLOČENE PO RAZLIČNIH METODAH

Primerjava temperatur geliranja, določenih z oscilacijsko viskometrijo pri frekvencah 0,01 Hz in 1 Hz in z rotacijsko viskometrijo kaže, da se rezultati pri posameznih formulacijah dokaj ujemajo (preglednica III). Temperature geliranja, določene s pomočjo rotacijske viskometrije, so v večini nekoliko višje kot pri metodah oscilacijske viskometrije.

Temperaturne intervale geliranja, določene z oscilacijsko viskometrijo pri frekvenci 0,01 Hz za osnovni formulaciji F1 in F3, se precej dobro ujemata z vrednostmi, ki jih najdemo v diplomu Polone Drobnič (32). Avtorica je za formulacijo z vsebnostjo 18 % P 407 določila temperaturni interval geliranja 26 do 26,9 °C, medtem ko v našem primeru znaša 25,5 do 26,8 °C. Za formulacijo z 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC pa je določila temperaturni interval geliranja 25,1 do 26 °C. Mi smo odčitali interval 24,2 do 25,6 °C.

Tudi temperature geliranja, določene iz meritev rotacijske viskometrije za osnovne formulacije, so primerljive z rezultati meritev v literaturi, ki so jih določili po enaki metodi. Literaturni podatki tako znašajo za formulacijo F1 26,5 °C, za F2 28,2 °C in za F3 25,8 °C in se dokaj ujemajo z našimi rezultati v preglednici III (35).

Preglednica III: Primerjava temperatur geliranja (T_{gel}) posameznih formulacij, določenih po različnih metodah.

Formulacija	T_{gel} , določena z oscilacijsko viskometrijo ($\nu= 1 \text{ Hz}$) [°C]	T_{gel} , določena z oscilacijsko viskometrijo ($\nu= 0,01 \text{ Hz}$) [°C]	T_{gel} , določena z rotacijsko viskometrijo [°C]
F1	25,1	25,5–26,8	26,0
F1/H 1,125	25,1	25,1–26,0	25,5
F1/H 5,625	24,2	24,2–25,5	25,5
F1/H 11,25	24,2	24,0–25,1	25,1
F1/H 16,875	22,5	21,6–23,3	24,1
F1/F 1,125	24,4	21,6–22,5	24,8
F2	28,6	/	27,5
F2/ H 1,125	28,6	25,5–26,5	26,8
F2/F 1,125	26,9	25,4–26,3	27,1
F3	25,1	24,2–25,6	25,5
F3/H 1,125	25,1	21,6–22,5	24,8
F3/F 1,125	24,2	20,7–23,3	24,4

Vpliv dodatka P 188 na temperaturo geliranja

Dodatek P 188 k formulacijam, ki so vsebovale P 407, P 407 in heparin ali P 407 in LMWH, je v vseh primerih zvišal temperaturo geliranja. P 188 v primerjavi s P 407 vsebuje večji delež hidrofilnega polietilenoksida v primerjavi s hidrofobnim polipropilenoksidom. Prisotnost P 188 tako lahko moti tvorbo vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami P 407 med miceli, kar zviša temperaturo geliranja (13, 34).

Vpliv dodatka P 188 in HPMC na temperaturo geliranja

Formulacije z dodatkom P 188 in HPMC so imele ne glede na medij, v katerem so bile izdelane, temperaturo geliranja, ki je bila enaka oziroma nekoliko nižja od temperature geliranja formulacij brez dodatka teh dveh polimerov. HPMC torej izniči vpliv dodanega P 188.

Vpliv koncentracije heparina na temperaturo geliranja

Iz primerjave temperatur geliranja formulacij F1/H 1,125, F2/H1,125 in F3/H 1,125 z osnovnimi formulacijami F1, F2 in F3 je razvidno, da z metodo rotacijske viskometrije v vseh treh primerih lahko zaznamo vpliv koncentracije heparina 1,125 mg/mL na znižanje temperature geliranja. Z oscilacijsko viskometrijo pri frekvenci 1 Hz vpliva heparina na znižanje temperature geliranja pri tej koncentraciji nismo zaznali. Z oscilacijsko viskometrijo pri frekvenci 0,01 Hz smo določili nižjo temperaturo geliranja za formulaciji F1/H 1,125 in F3/H 1,125 v primerjavi s formulacijama F1 in F3. Vpliva sestave formulacij F2 in F2/H 1,125 na temperaturo geliranja pri frekvenci 0,01 Hz ne moremo primerjati. Temperature geliranja po tej metodi pri formulaciji F2 namreč nismo mogli določiti.

Z povečanjem koncentracije heparina smo z uporabo vseh metod zaznali zniževanje temperature geliranja. Z oscilacijsko viskometrijo smo pri koncentraciji heparina 5,625 mg/mL pri obeh frekvencah določili dodatno znižanje temperature geliranja. Z metodo rotacijske viskometrije smo dodaten vpliv na znižanje temperature geliranja zaznali šele pri koncentraciji heparina 11,25 mg/mL. Pri formulaciji F1/H 16,875, ki vsebuje največjo koncentracijo heparina, smo z vsemi metodami določili najnižjo temperaturo geliranja. Najnižjo temperaturo geliranja smo določili z oscilacijsko viskometrijo pri frekvenci 1 Hz za formulacijo F1/H 16,875.

V literaturi lahko najdemo podatke o vplivu koncentracij heparina, ki so večje kot v našem primeru (2,9 m/m % in 4,9 m/m %) na znižanje temperature geliranja hidrogelov, ki vsebujejo P 407. Predvidevajo, da heparin zniža temperaturo geliranja zaradi tvorbe vodikovih vezi s polietilenoksidom v poloksameru s sulfatnimi in karboksilnimi skupinami in posledičnega povezovanja sosednjih micelov (37).

Vpliv LMWH na temperaturo geliranja

Formulacije F1/F 1,125, F2/F 1,125 in F3/F 1,125, ki vsebujejo raztopino fragmina koncentracije 1,125 mg/mL, imajo v primerjavi s formulacijami F3, F2 in F2 po vseh metodah določeno nižjo temperaturo geliranja. Prav tako smo razen pri uporabi rotacijske viskometrije za formulacijo F2/F 1,125 pri vseh teh formulacijah določili nižje temperature geliranja kot pri formulacijah z enako koncentracijo heparina. Večji vpliv LMWH na znižanje temperature geliranja lahko razložimo z manjšo molekulsko maso LMWH. Tako

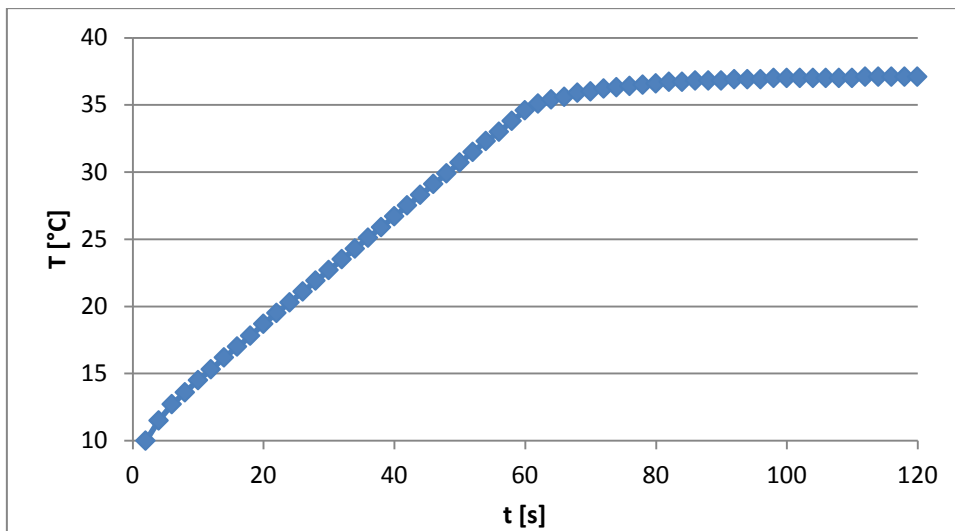
je v raztopini LMWH prisotnih več molekul kot v raztopini heparina iste koncentracije. Večje število molekul lahko posledično interagira z več polietilenoksidnimi verigami.

4.2.2 ČASOVNA ODVISNOST ELASTIČNEGA IN VISKOZNEGA MODULA

Kratek čas, v katerem termoreverzibilni hidrogel po aplikaciji gelira, je pomemben zaradi preprečevanja sprememb v hitrosti sproščanja učinkovine z mesta aplikacije in podaljšanega sproščanja učinkovine. Formulacijo namreč apliciramo, ko je v tekočem stanju, zato lahko pred njenim geliranjem pride do redčenja s fiziološkimi tekočinami (9, 33).

Meritve smo pričeli z aplikacijo vzorca osnovne formulacije F1 na ploščico reometra, segreto na 37 °C, saj nas je zanimal čas geliranja pri fiziološki temperaturi. Čas meritve smo omejili na 300 s, pri čemer je med zaporednima merilnima točkama minilo 15 s. Vzorec je geliral, še preden se je meritev začela, zato so bile vrednosti obeh modulov med meritvijo ves čas konstantne. Po aplikaciji vzorca namreč ne moremo takoj začeti z meritvijo, saj mora reometer stožec spustiti do merilne pozicije, nato pa je potrebno odstraniti odvečen vzorec.

Pogoje meritve smo zato prilagodili, tako da smo vzorec nanegli na ploščico, uravnano na temperaturo 10 °C. Ko smo stožec spustili na merilno pozicijo in očistili odvečen vzorec, smo temperaturo ploščice nastavili na 37 °C in začeli z meritvijo. Zaradi kratkega časa geliranja smo čas meritve skrajšali na 240 s in nato še na 120 s. Skrajšali smo tudi časovni interval med merilnimi točkami najprej na 6 s in nato še na 2 s, saj so bile razlike v časih geliranja za posamezne formulacije zelo majhne in so se časi geliranja za večino formulacij razlikovali za manj kot 15 s. Reometer je ploščico segreval linearno prvih 60 s meritve (slika 26). Vse formulacije so gelirale znotraj tega časovnega intervala.



Slika 26: Segrevanje ploščice reometra v odvisnosti od časa pri meritvah viskoznega in elastičnega modula v odvisnosti od časa.

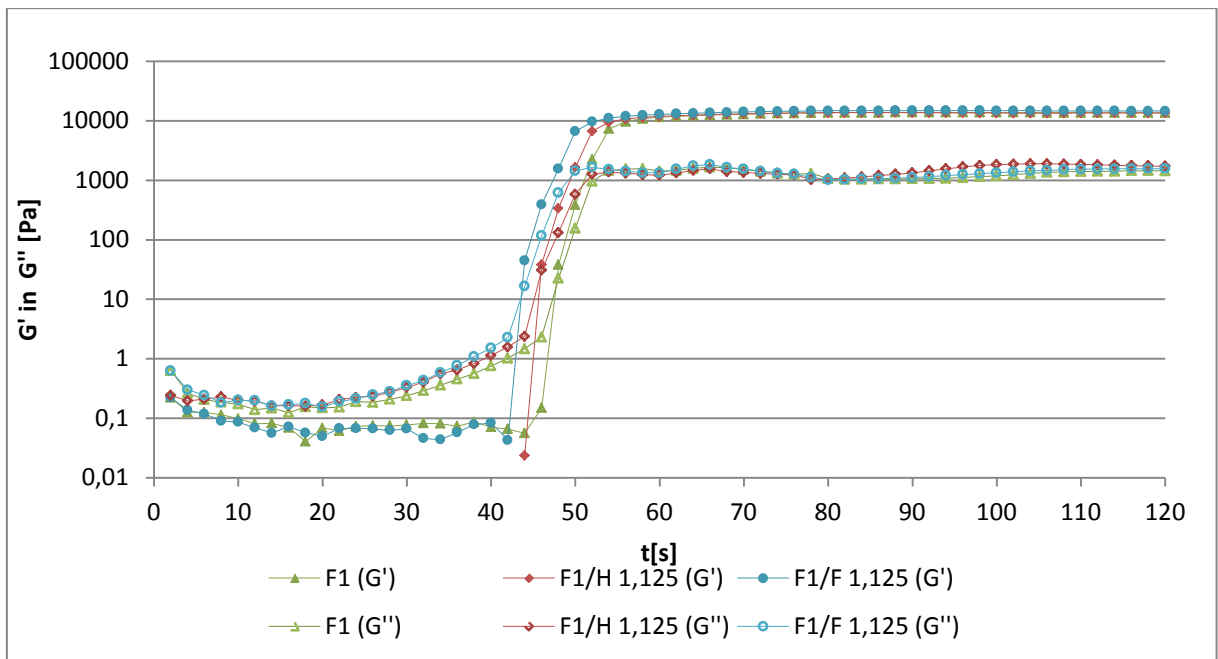
V preglednici IV so zbrani časi geliranja in temperature geliranja posameznih formulacij. Temperature, ki smo jih odčitali ob času geliranja posameznih formulacij, so pri vseh formulacijah višje od temperatur geliranja, določenih z metodo spremljanja temperature odvisnosti elastičnega in viskoznega modula ter viskoznosti v odvisnosti od temperature (preglednica III). Iz tega lahko sklepamo, da združevanje prostih polimernih molekul v micelle in urejanje micelov zahteva več časa, kot ga je minilo od začetka meritve do dosežene temperature geliranja, ki smo jo določili po prej omenjenih metodah. Pri spremljanju temperature odvisnosti elastičnega in viskoznega modula v intervalu od 10 do 40 °C je znašala hitrost segrevanja namreč 0,015 °C/s, medtem ko je bila hitrost segrevanja pri meritvah časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula v linearnem območju 0,41 °C/s.

Preglednica IV: Primerjava časov geliranja in temperatur geliranja posameznih formulacij, določenih pri spremljanju časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula.

Formulacija	Čas geliranja [s]	Temperatura geliranja [°C]
F1	48	29,9
F1/F 1,125	44	28,6
F1/H 1,125	48	30,2
F1/H 5,625	48	30,2
F1/H 11,25	44	28,5
F1/H 16,875	36	25,6
F2	50	31,0
F2/F 1,125	46	29,3
F2/H 1,125	50	31,0
F3	44	28,7
F3/F 1,125	38	26,2
F3/H 1,125	38	26,5

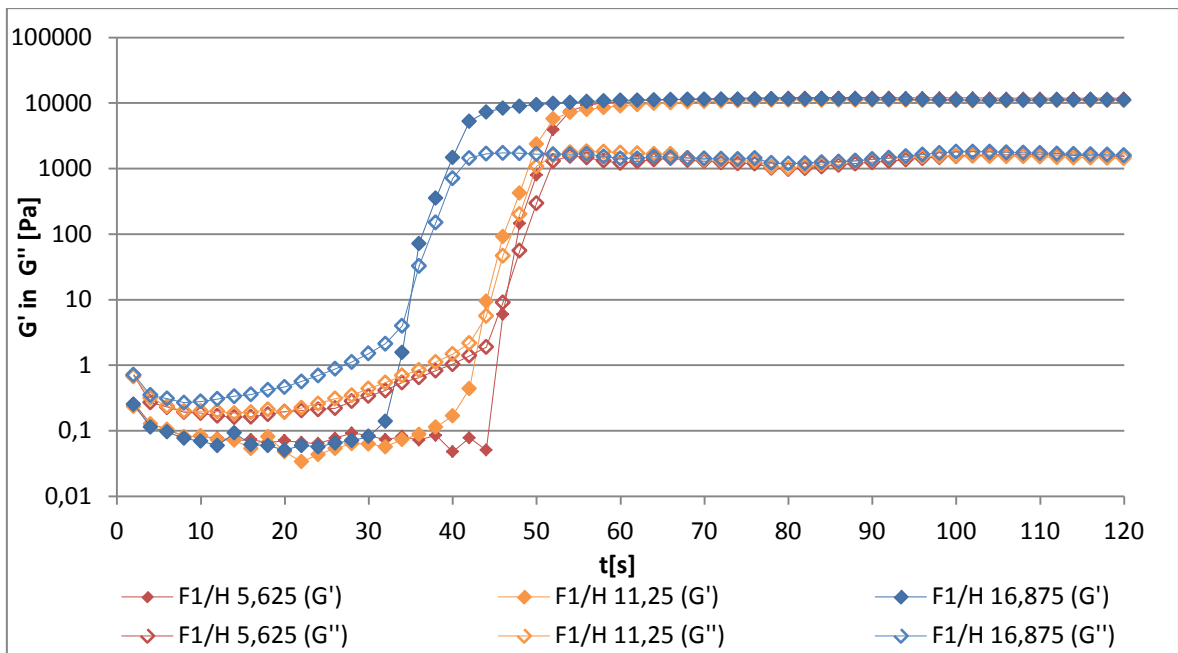
Potek krivulj obeh modulov je pri vseh formulacijah podoben kot pri meritvah elastičnega in viskoznega modula v odvisnosti od temperature. Krivulji lahko namreč tudi tukaj razdelimo na začetni del pri nižjih temperaturah, kjer so vrednosti obeh modulov dokaj konstantne in so formulacije v tekočem stanju. Sledi območje strmega naraščanja vrednosti, kar nakazuje na spremembe v notranji strukturi formulacij. Nato sledi območje konstantnih vrednosti do konca merilnega območja, kjer prevladuje elastični modul in so formulacije v gel stanju.

Iz primerjave rezultatov meritev za formulacije F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125 vidimo, da prisotnost LMWH skrajša čas geliranja iz 48 s na 44 s, medtem, ko raztopina heparina enake koncentracije nima vpliva na spremembo časa geliranja (slika 27). Vrednosti elastičnega in viskoznega modula v gel stanju so v enakem velikostnem razredu kot pri temperaturni odvisnosti obeh modulov (poglavje 4.2.1). Elastični modul vseh treh formulacij tako doseže največjo vrednost 10.000 Pa, medtem ko vrednosti viskoznega modula dosežejo maksimum pri 1000 Pa.



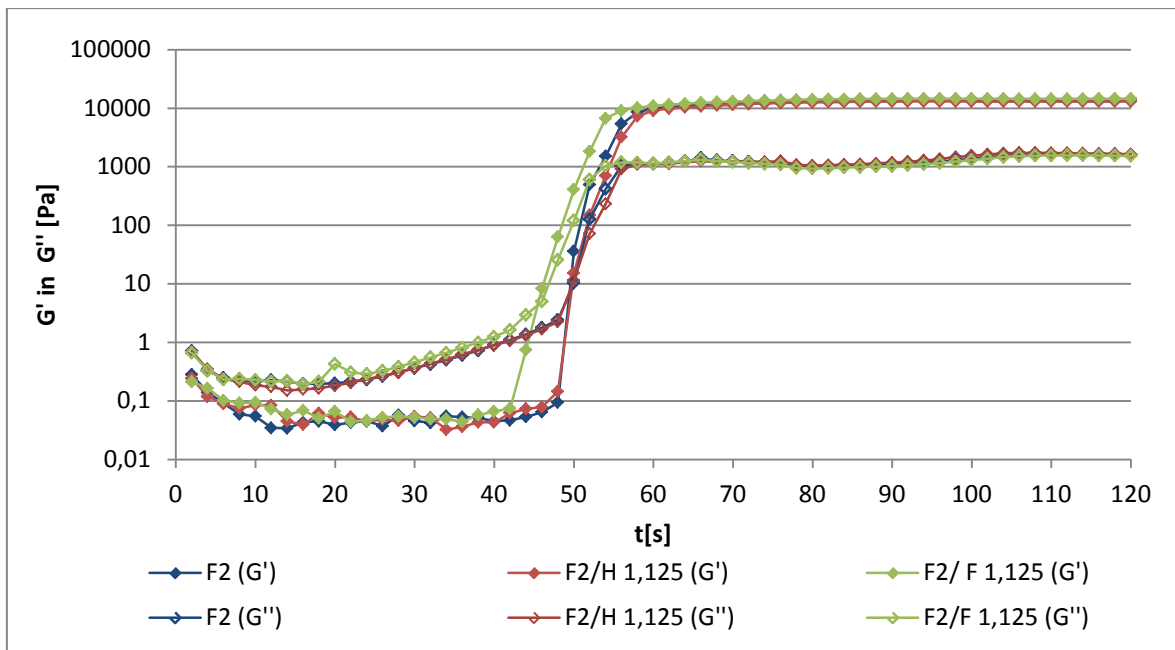
Slika 27: Primerjava časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za formulacije F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125.

Zvečanje koncentracije heparina na 11,25 mg/mL pri formulaciji F1/H 11,25 skrajša čas geliranja v primerjavi s formulacijo F1/H 5,625 za 2 s (slika 28). Najkrajši čas geliranja ima formulacija F1/H 16,875, ki vsebuje največjo koncentracijo heparina. Vrednosti viskoznega modula te formulacije so tako v začetnem delu v primerjavi s preostalima formulacijama največje in pričnejo naraščati že pri temperaturi 10 °C, medtem ko so vrednosti elastičnega modula pri vseh treh formulacijah do časa 30 s enake.



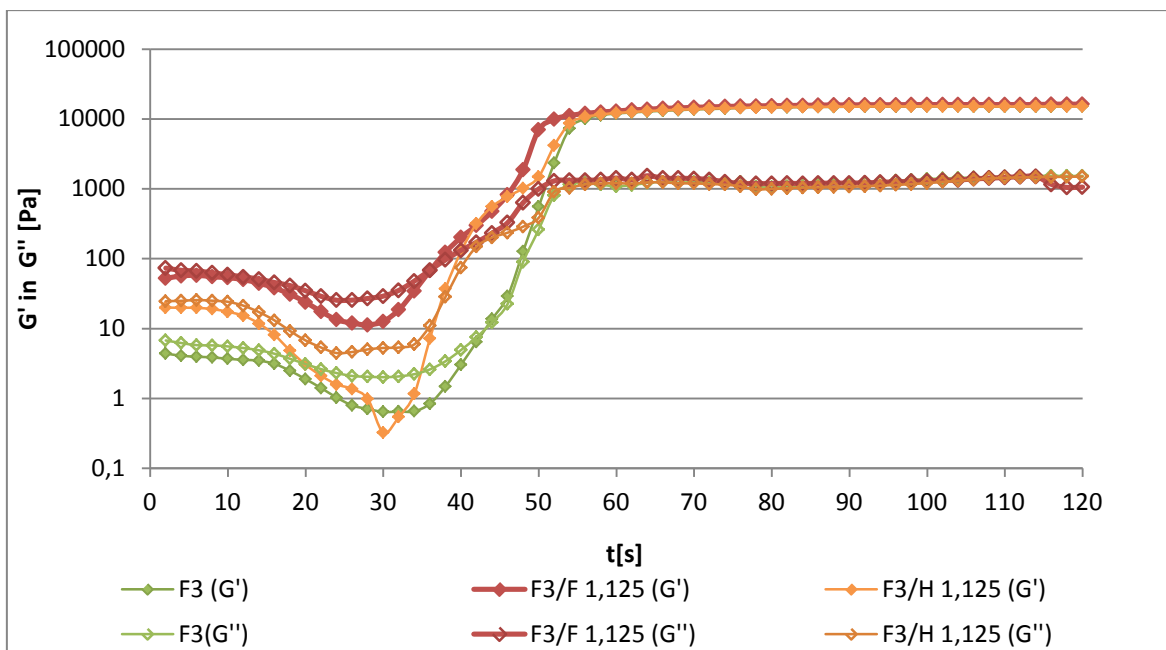
Slika 28: Primerjava časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za formulacije F1/H 5,625, F1/H 11,25 in F1/H 16,875.

Iz primerjave časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula formulacij F2, F2/H 1,125 in F2/F 1,125 vidimo, da se potek krivulj posameznih formulacij razlikuje le v območju strmega naraščanja vrednosti obeh modulov (slika 29). Formulacija F2/F 1,125 ima tako krajši čas geliranja, v nasprotju s formulacijama F2 in F2/H 1,125, ki gelirata istočasno. Vrednosti elastičnega modula vseh treh formulacij so v začetnem delu meritve manjše v primerjavi z vrednostmi formulacij, ki vsebujejo le 18 % P 407 brez dodatka P 188.



Slika 29: Primerjava časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za formulacije F2, F2/H 1,125 in F2/F 1,125.

Vrednosti elastičnega in viskoznega modula formulacij F3, F3/H 1,125 in F3/F 1,125 se med formulacijami razlikujejo, dokler ne dosežejo platoja, značilnega za gel stanje (slika 30). Na začetku meritve sta krivulji obeh modulov pri posamezni formulaciji praktično izenačeni in se začneta ločevati šele, ko pričnejo vrednosti obeh modulov upadati. Takšen potek smo opazili tudi pri spremljanju temperaturne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula (poglavje 4.2.1). Formulacije, ki vsebujejo HPMC, na začetku meritve očitno niso v sol stanju in bi potrebovale daljši čas termostatiranja kot preostali vzorci. Največje začetne vrednosti obeh modulov, ki znašajo 70 Pa, ima formulacija F3/F 1,125, sledi formulacija F3/H 1,125 s 25 Pa in formulacija F3 z vrednostmi okrog 7 Pa. Najkrajši čas geliranja ima formulacija F3/F 1,125.



Slika 30: Primerjava časovne odvisnosti elastičnega in viskoznega modula za formulacije F3, F3/H 1,125 in F3/F 1,125.

Formulacije z daljšim časom geliranja imajo višjo temperaturo geliranja in obratno. Ker so spremembe časa geliranja v skladu s spremembami temperatur geliranja, opisanimi v poglavju 4.2.1, lahko zaključimo, da imajo dodatek P 188, dodatek HPMC, raztopina heparina ter raztopina LMWH enak vpliv na temperaturo geliranja kot na čas geliranja. Glede na čas geliranja je najprimernejša formulacija za aplikacijo formulacija F1/H 16,875, saj ima najkrajši čas geliranja, kar pomeni tudi manj prehajanja učinkovine iz gela, dokler formulacija zaradi telesne temperature ne gelira.

4.3 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

4.3.1 MICELIZACIJA

Micelizacija je prva stopnja v procesu geliranja. Iz meritev vidimo, da je micelizacija endotermen proces, saj termodinamsko stabilni miceli nastajajo spontano. Proces micelizacije je na termogramu prikazan kot širok endotermni vrh. Odčitali smo T_{onset} , T_{peak} in T_{endset} (preglednica V). T_{onset} označuje temperaturo micelizacije, medtem ko je T_{endset} temperatura, pri kateri se proces micelizacije zaključi. V vmesnih točkah površina pod

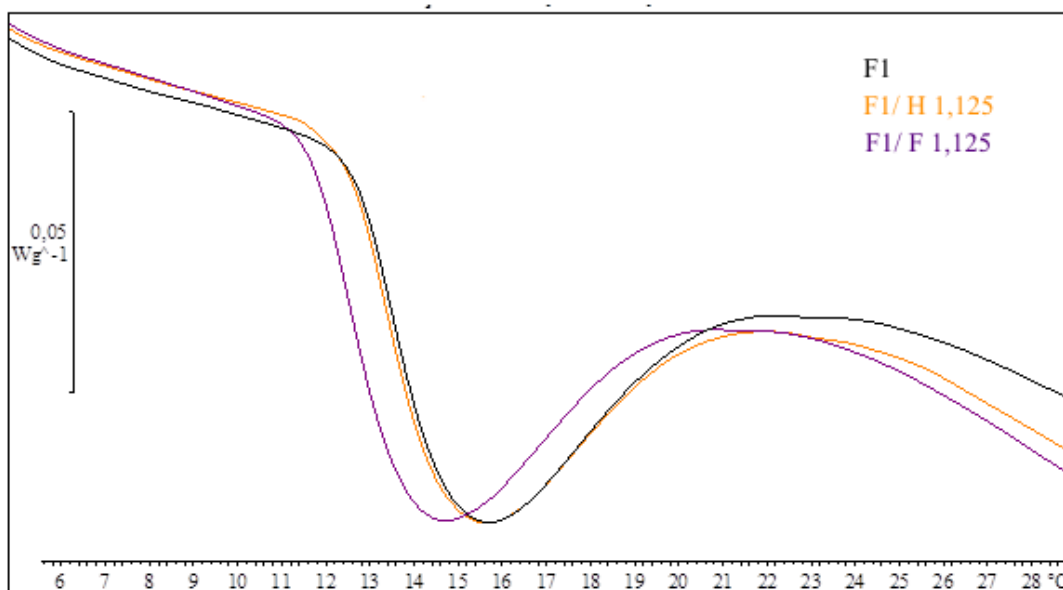
krivuljo narašča sorazmerno s količino nastalih micelov (34, 36). Pri vseh formulacijah je bil temperaturni interval širok $8,2 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica V: Vrednosti T_{onset} , T_{peak} in T_{endset} za vrednotene formulacije.

Formulacija	$T_{\text{onset}} [^{\circ}\text{C}]$	$T_{\text{peak}} [^{\circ}\text{C}]$	$T_{\text{endset}} [^{\circ}\text{C}]$
F1	12,3	15,1	20,7
F1/H 1,125	12,2	15,0	20,4
F1/H 5,625	11,7	14,1	20,0
F1/H 11,25	10,5	13,3	18,8
F1/H 16,875	7,6	10,6	16,3
F1/F 1,125	11,4	14,1	19,7
F2	10,7	13,4	18,7
F2/H 1,125	10,8	13,3	18,7
F2/F 1,125	10,6	13,3	18,7
F3	11,1	13,8	18,9
F3/H 1,125	10,0	12,8	18,0
F3/F 1,125	11,0	13,7	19,1

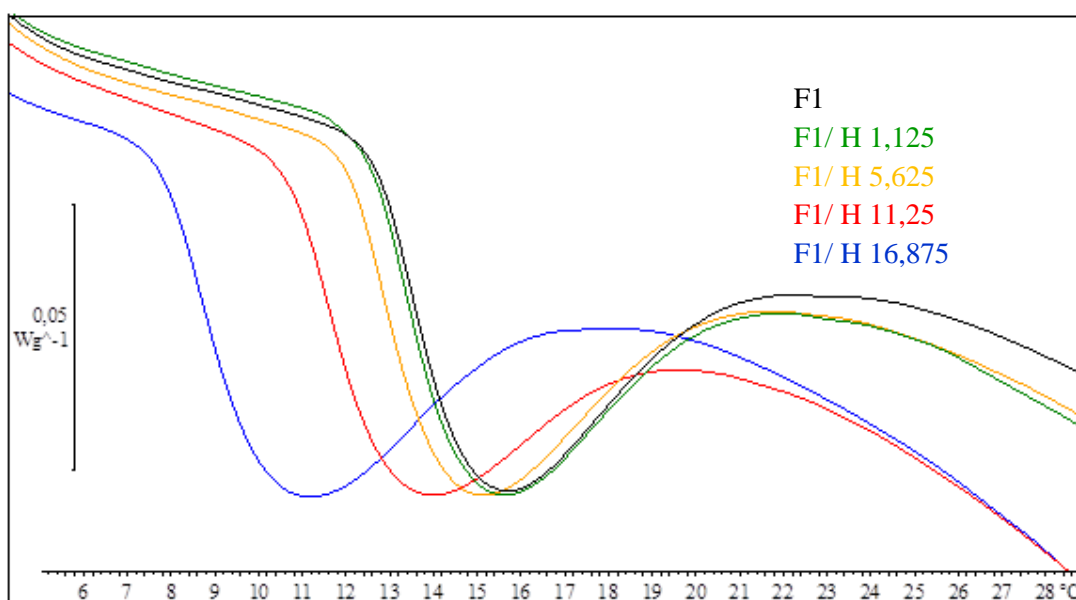
Formulacije z 18 % P 407

Iz primerjave termogramov, ki prikazujejo proces micelizacije formulacij F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125 vidimo, da ima najmanjšo kritično micelarno koncentracijo formulacija F1/F 1,125 in največjo F1 (slika 31).



Slika 31: Primerjava termogramov micelizacije formulacij F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125.

Povečanje koncentracije heparina vpliva na znižanje temperature micelizacije (slika 32). Temperatura micelizacije s povečevanjem koncentracije heparina pada. To je pričakovano glede na zniževanje temperature geliranja formulacij s povečevanjem koncentracije heparina. Kot pri temperaturi geliranja so tudi pri temperaturi micelizacije razlike opazne pri zvečanju koncentracije raztopine heparina na 5,625 mg/mL ali več.

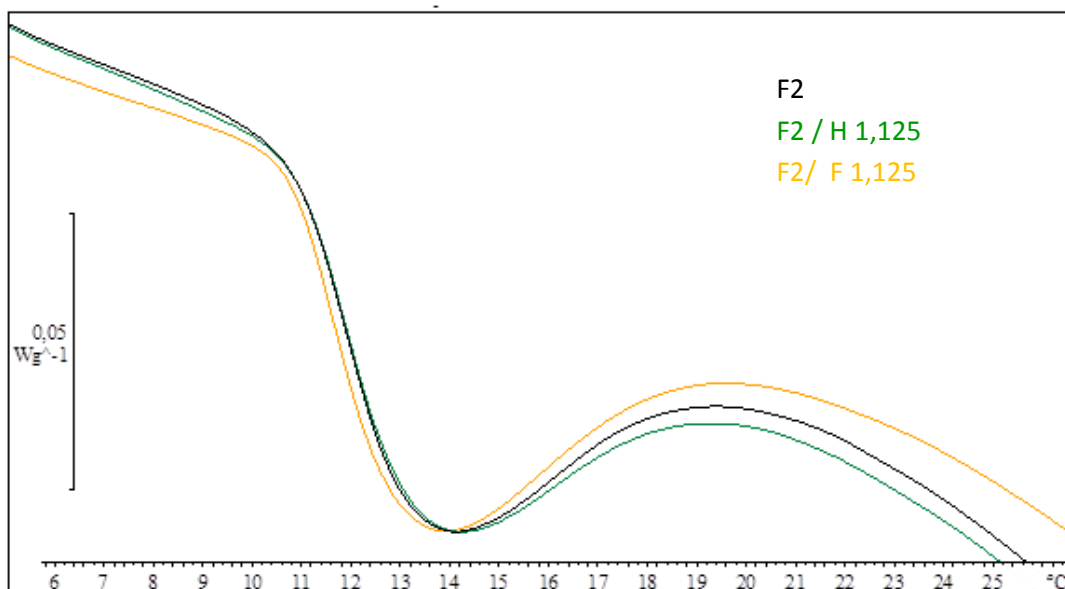


Slika 32: Primerjava termogramov micelizacije formulacij F1, F1/H 1,125, F1/H 5,625, F1/H 11,25 in F1/H 16,875.

Formulacije z 18 % P 407 in 1 % P 188

Pri formulacijah z 18 % P 407 in 1 % P 188 ima koncentracija raztopine heparina in LMWH 1,125 mg/mL zanemarljiv vpliv na znižanje temperature geliranja (slika 33). Proces micelizacije se pri vseh treh formulacijah prične in zaključi pri nižji temperaturi kot pri primerljivih formulacijah F1, F1/H 1,125 oziroma F1/F 1,125. Ker se primerljive formulacije razlikujejo samo po dodatku P 188, lahko sklepamo, da je nižja temperatura micelizacije posledica vpliva P 188. To je v nasprotju z rezultati vpliva na temperaturo geliranja, kjer je dodatek P 188 zvišal temperaturo geliranja.

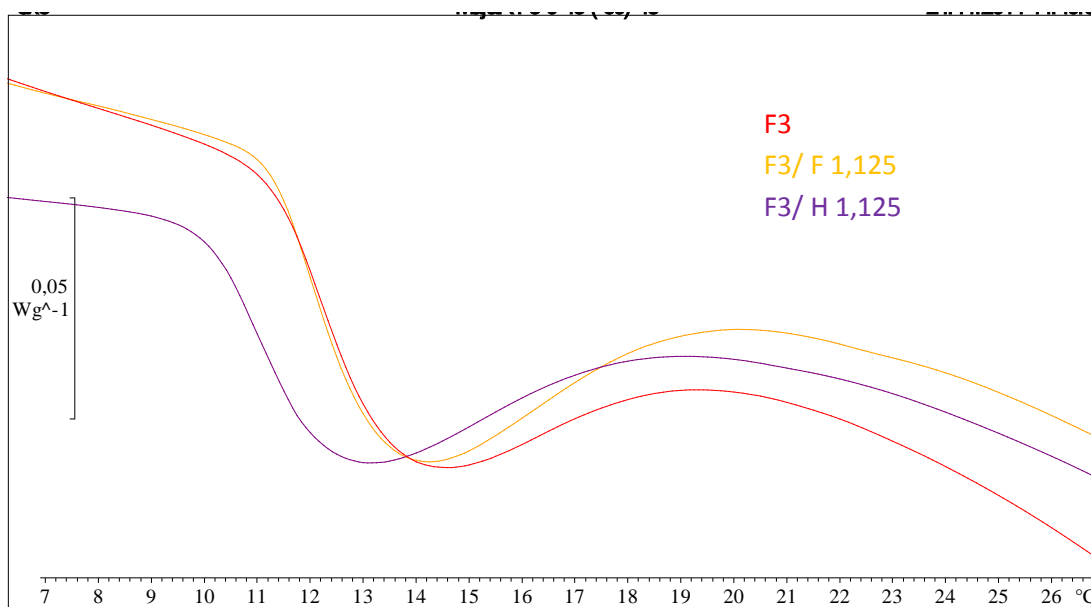
Vpliv P 188 je bil večji na temperaturo geliranja kot na temperaturo micelizacije, kar je verjetno posledica dejstva, da je njegov učinek na polietilenoksidne verige večji kot na osrednji polipropilenoksidni del. P 188 ima večje razmerje med etilenoksidnim in propilenoksidnim delom v molekuli v primerjavi s P 407. Splošno je sprejeto, da je micelizacija proces dehidracije polipropilenoksidnih blokov in, da je po tem, ko so miceli formirani, njihovo preurejanje odvisno od interakcij med hidroksilnimi skupinami. Prisotnost P 188 tako lahko moti tvorbo vodikovih vezi med miceli P 407, kar zviša temperaturo geliranja (13, 34).



Slika 33: Primerjava termogramov micelizacije formulacij F2, F2/H 1,125 in F2/F 1,125.

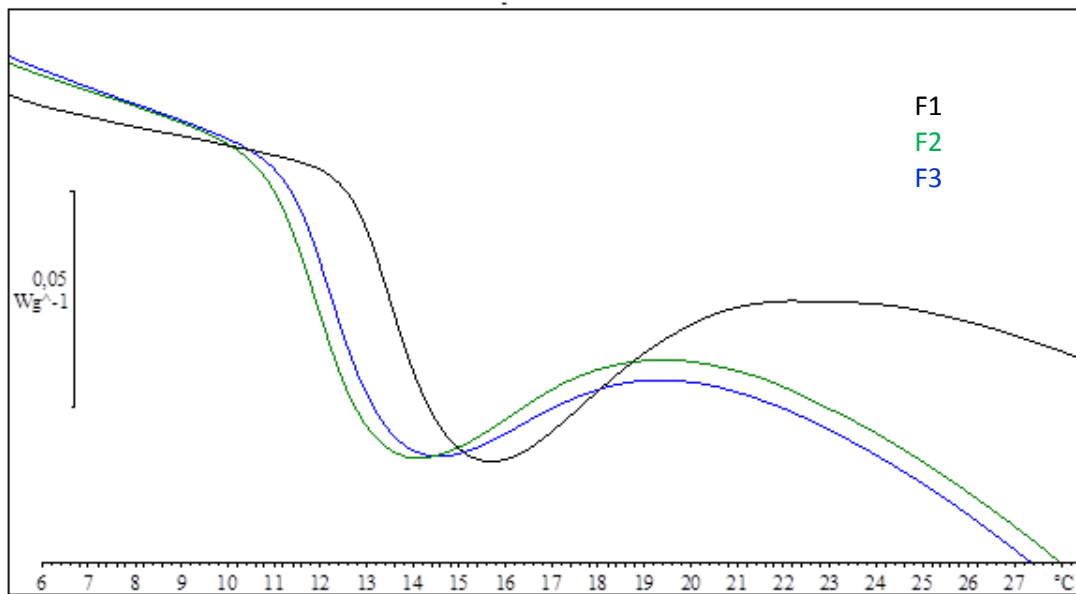
Formulacije z 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC

Pri formulacijah, ki vsebujejo 18 % P 407, 1 % P 188 in 1 % HPMC micelizacija v vseh treh primerih nastopi pri nižjih temperaturah kot pri primerljivih formulacijah z 18 % P 407 ter 18 % P 407 ali 1 % P 188 (slika 34). Micelizacija formulacij F3 in F3/H 1,125 poteče tudi pri nekoliko nižjih temperaturah kot pri formulacijah F2 in F2/H 1,125, vendar razlike niso tako velike. Najprej micelizacija nepričakovano poteče pri formulaciji F3/H 1,125.



Slika 34: Primerjava termogramov micelizacije formulacij F3, F3/H 1,125 in F3/F 1,125.

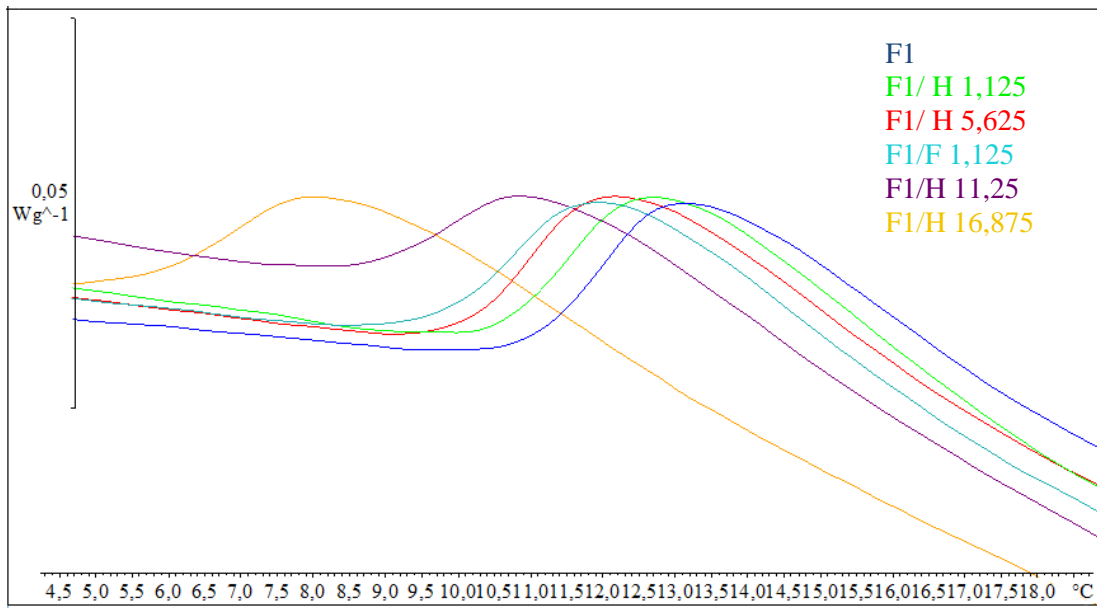
Iz primerjave krivulj osnovnih formulacij vidimo, da ima v nasprotju z rezultati za temperaturo geliranja formulacija F2 najnižjo temperaturo micelizacije (slika 35). Tudi kombinacija dodatkov P 188 in HPMC v formulaciji F3 zniža temperaturo micelizacije v primerjavi s formulacijo F1, kar se ujema z znižanjem temperature geliranja pri tej formulaciji. Vpliv dodatka P 188 na znižanje temperature geliranja je očitno večji kot vpliv dodatka HPMC.



Slika 35: Primerjava termogramov micelizacije formulacij F1, F2 in F3.

4.3.2 DEMICELIZACIJA

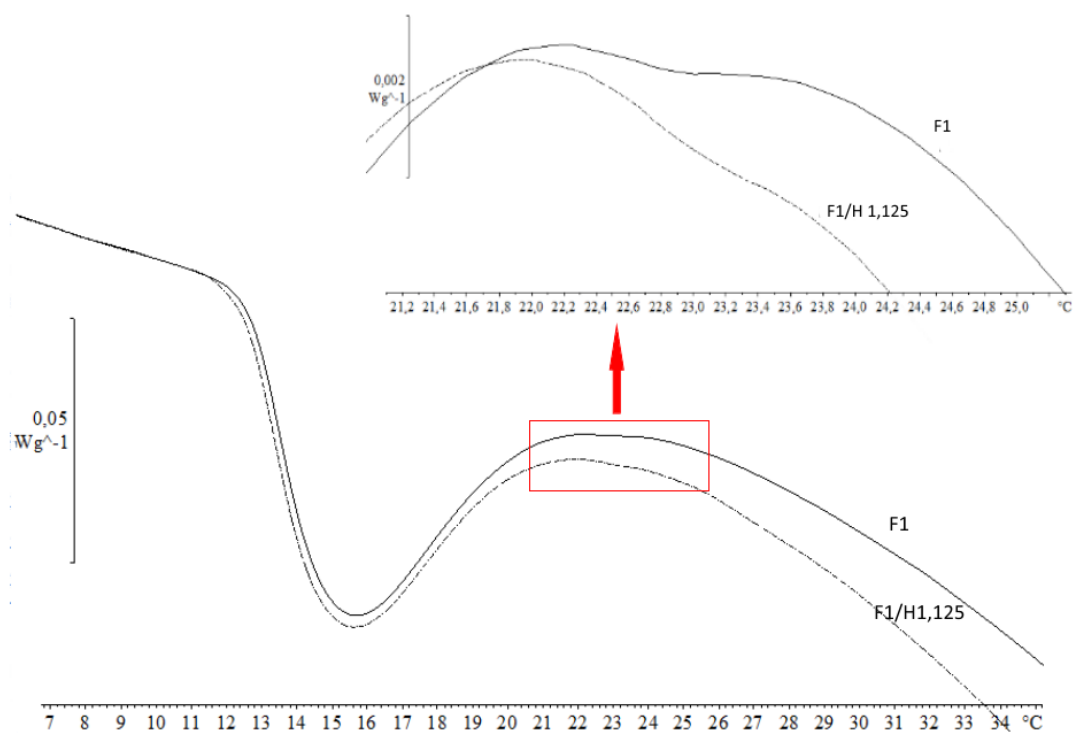
V drugem delu meritve, ko smo vzorce ohlajali, so se v temperaturnem intervalu od 8,0 do 20 °C pri vseh formulacijah pojavili eksotermni vrhovi. Zaradi enakega temperaturnega območja, a obratnega procesa lahko sklepamo, da je potekla demicelizacija. To je dokaz, da so naši geli res termoreverzibilni. Proces je pri formulacijah pričakovano potekel v obratnem vrstnem redu kot proces micelizacije: najprej je demicelizirala formulacija z najvišjo temperaturo micelizacije in obratno (slika 36). Potek demicelizacije poloksamerov v literaturi pojasnjujejo kot prekinitev vodikovih vezi med molekulami vode in med molekulami poloksamera in začetek tvorbe vodikovih vezi med polietilenoksidnimi verigami (38).



Slika 36: Primerjava termogramov demicelizacije formulacij F1, F1/H 1,125 F1/H 5,625, F1/F 1,125, F1/F 5,625, F1/H 11,25 in F1/H 16,875.

4.3.3 GELIRANJE

V območju pričakovanih temperatur geliranja smo zaznali endotermni vrh pri formulacijah F1 in F1/H 1,125 (slika 37). Površina pod krivuljo obeh vrhov je bila zelo majhna. Iz termogramov ostalih formulacij temperature geliranja nismo mogli določiti. Odsotnost vrhov si lahko razložimo s samim procesom geliranja. Medtem ko se pri micelizaciji posamezne molekule polimerov združujejo v micele, se pri temperaturi geliranja že nastali miceli prostorsko preuredijo, kar je energetsko manj potraten proces.



Slika 37: Termogram geliranja formulacij F1 in F1/H 1,125.

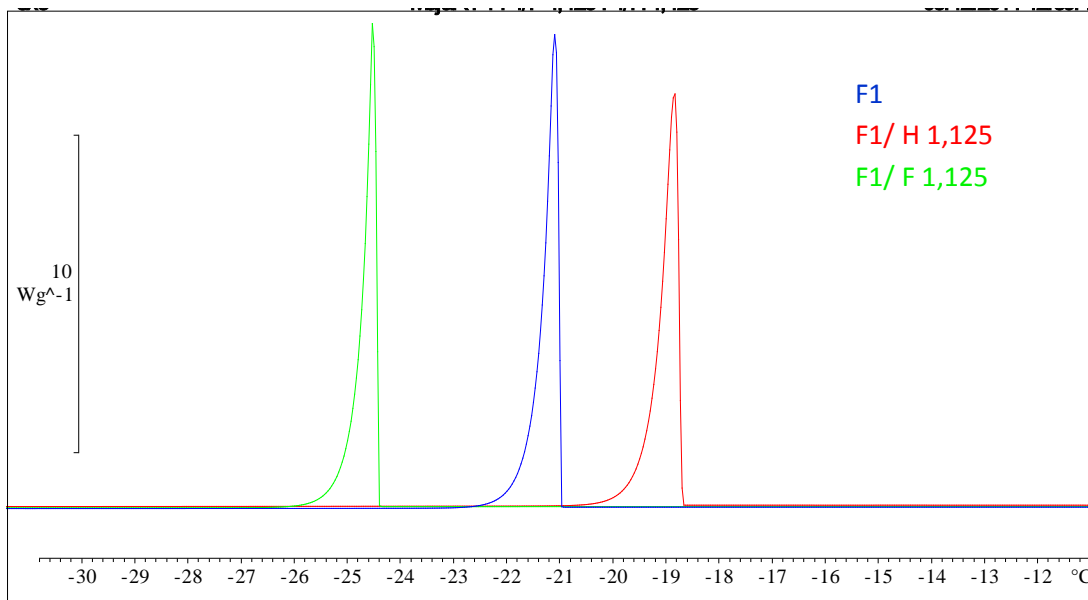
4.3.4 DETEKCIJA STANJA VODE V HIDROGELIH

S pomočjo DSC-analize lahko vodo v hidrogelih razdelimo na več skupin glede na interakcije s polimeri. Voda, ki zmrzuje, ne interagira s polimeri in se pri segrevanju in ohlajanju obnaša kot prosta voda. Voda, ki se strukturira okrog hidrofobnih skupin, je šibko vezana voda in zmrzuje pri nižji temperaturi kot prosta voda. Imenujemo jo vezana voda, ki zmrzuje, oziroma medfazna voda. Voda, ki se orientira okrog ioniziranih skupin ter dipolov polimera ali s funkcionalnimi skupinami polimera tvori vodikove vezi, je močno vezana voda, ki ne zmrzuje (39, 40).

ZMRZOVANJE PROSTE VODE

Zmrzišče proste vode v vzorcu je lahko nižje od 0 °C zaradi koligativnega učinka polimerov v raztopini, prisotnosti vezane vode, ki zmrzuje, in spremembe velikosti vodnih domen, ko je koncentracija površinsko aktivne snovi dovolj velika. Površinsko aktivne snovi in nizkomolekularni polietilenoksidi lahko znižajo zmrzišče vode na –16 do –22 °C (40, 41).

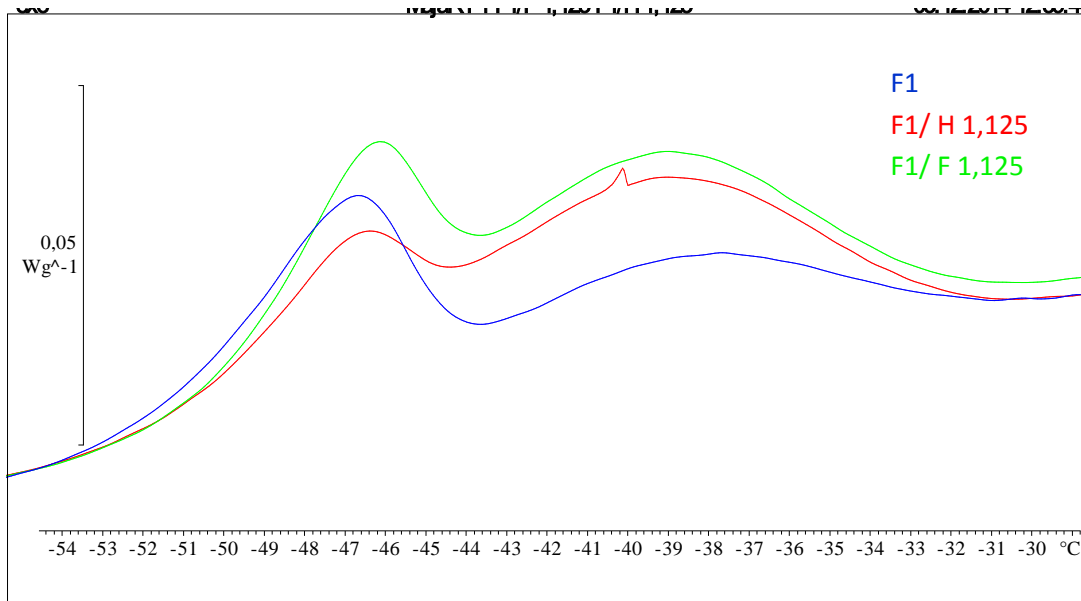
Zmrzovanje proste vode je endotermen proces. Zaradi manjše molekulske mase LMWH v primerjavi s heparinom je v raztopini pri koncentraciji 1,125 mg/mL več molekul kot v raztopini heparina iste koncentracije (slika 38). Tako ima formulacija F1/F 1,125 nižje zmrzišče kot formulacija F1/H 1,125. Hkrati ima formulacija F1 nepričakovano nižjo temperaturo zmrzišča proste vode v primerjavi s formulacijo F1/H 1,125.



Slika 38: Primerjava zmrzovanja proste vode formulacij F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125.

ZMRZOVANJE VEZANE VODE

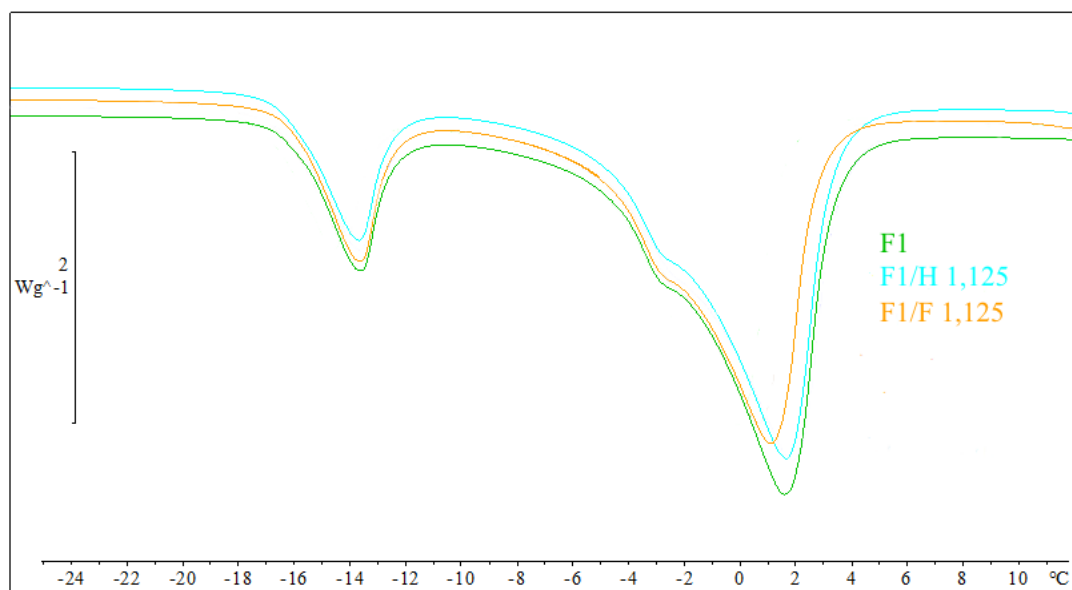
Endotermni vrhovi v temperaturnem intervalu med -30 in -53 °C prikazujejo zmrzovanje vezane vode formulacij F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125 (slika 39). Iz grafa je razvidno, da zmrzovanje vezane vode pri vseh treh formulacijah poteka hkrati, v istem temperaturnem intervalu. Pri posamezni formulaciji se v tem območju pojavita dva vrhova, ki se prekrivata. To lahko povežemo z literaturnimi podatki o dveh različnih skupinah medfazne vode v biopolimerih. Voda, ki je najbližje hidrofobnim površinam, ima manjši parcialni molski volumen. Preostali vodi se parcialni molski volumen poveča. Obe skupini imata različno gostoto in tako tudi različno močne vodikove vezi med molekulami vode. Zaradi tega imata tudi različne kemijske in fizikalne lastnosti (41). Predpostavljamo lahko, da prekrivajoča se vrhova prikazujeta zmrzovanje dveh skupin medfazne vode.



Slika 39: Zmrzovanje vezane vode formulacij F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125.

TALJENJE VODE

Pri segrevanju formulacij od -60 do 45 °C smo za posamezno formulacijo v temperaturnem intervalu od -20 do 5 °C opazili dva eksotermna vrhova (slika 40). Ker gre za obraten proces kot pri ohlajanju, lahko sklepamo, da vrh pri nižji temperaturi predstavlja taljenje vezane vode. Pri višji temperaturi, pri približno 0 °C, se prične taliti prosta voda. Iz primerjave termogramov formulacij F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125 vidimo, da so razlike temperatur tališča vezane vode manjše, kot so bile pri zmrzovanju proste vode. Na taljenje vezane vode heparin in nizkomolekularni heparin v koncentraciji $1,125$ mg/mL nimata opaznega vpliva.



Slika 40: Taljenje vezane vode, ki zmrzuje, in proste vode pri formulacijah F1, F1/H 1,125 in F1/F 1,125.

5. SKLEP

Izdelali smo hidrogelne na osnovi P 407, nekaterim smo dodali P 188 ali P 188 in HPMC. Kot medij smo uporabili prečiščeno vodo oziroma raztopino heparina ali LMWH. Pri reološkem vrednotenju izdelanih hidrogelov smo ugotovili:

- Heparin v temperaturnem območju od 21,0 do 24,0 °C zveča viskoznost hidrogelov. Večja koncentracija heparina povzroči večje zvišanje viskoznosti.
- LMWH ima večji vpliv na zvečanje viskoznosti hidrogela in povzroči zvečanje viskoznosti pri nižji temperaturi kot heparin iste koncentracije.
- Heparin zniža temperaturo geliranja hidrogelov, ki vsebujejo P 407 ali P 407 z dodatkom P 188 in HPMC. Večja koncentracija heparina povzroči večje znižanje temperature geliranja.
- LMWH ima večji vpliv na znižanje temperature geliranja kot heparin iste koncentracije.
- Meritve temperaturne odvisnosti viskoznega in elastičnega modula pri frekvenci 1 Hz dajejo bolj ponovljive rezultate v primerjavi s frekvencami 0,01 Hz, 0,05 Hz, 0,1 Hz in 0,2 Hz ter omogočajo določitev temperature geliranja za vse preiskovane formulacije.
- Hidrogeli z višjo temperaturo geliranja imajo tudi daljši čas geliranja.
- Dodatek P 188 zviša temperaturo geliranja in podaljša čas geliranja.
- Dodatek HPMC zniža temperaturo geliranja in skrajša čas geliranja.
- Heparin skrajša čas geliranja hidrogela. Večja koncentracija heparina ima večji vpliv na skrajšanje časa geliranja hidrogela.
- LMWH skrajša čas geliranja hidrogela. LMWH skrajša čas geliranja bolj kot heparin iste koncentracije.

Izdelane hidrogelne smo ovrednotili tudi s pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije. Pri tem smo prišli do sledečih zaključkov:

- Micelizacija in geliranje sta endotermna procesa, pri čemer je za potek micelizacije potrebno več energije. Pri hidrogelih z nižjo temperaturo geliranja tudi micelizacija poteče pri nižji temperaturi.

- V izdelanih hidrogelih je prisotna voda, ki zmrzuje v dveh različnih stanjih.
- Izdelani hidrogeli so termoreverzibilni, saj po segrevanju, ohlajanju in ponovnem segrevanju zopet gelirajo.

6.VIRI

1. Van Tomme SR, Storm G, Hennink WE: In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2008; 355: 1-17.
2. Qiu Y, Park K: Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 53: 321–339.
3. Hoffman AS: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64: 18-23.
4. Hoare TR, Kohane DS: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008; 49: 1993-2007.
5. Hennink WE, van Nostrum CF: Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64: 223-236.
6. Klouda L, Mikos AG: Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008; 68: 34–45.
7. Qiu Y, Park K: Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 53: 321–339.
8. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn M E: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, London, 2009:326-329, 506-509.
9. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC: A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research* 2006; 23: 2709-2728.
10. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY: Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release* 2002: 82 189–212.
11. Ruel-Gariépy E, Leroux JC: In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 58: 409–426.

12. Radivojša Matanović M, Kristl J, Ahlin Grabnar P: Thermo-responsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 472: 262-275.
13. Zeng N, Dumortier G, Maury M, Mignet N, Boudy V: Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 467: 70-83.
14. Mayol L, Quaglia F, Borzacchiello A, Ambrosio L, La Rotonda MI: A novel poloxamers/hyaluronic acid *in situ* forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and *in vitro* release properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008; 70: 199- 206.
15. Chiappetta DA, Sosnik A: Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 66: 303–317.
16. Singh NK, Lee DS: In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2014; 193: 214–227.
17. Ricci EJ, Bentley MVLB, Farah M, Bretas RES, Marchetti JM: Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002; 17: 161-167.
18. Lutrol L and Lutrol F-grades. Technical information. BASF 2010.
19. Koffi AA, Agnely F, Ponchel G, Grossiord J L: Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 27: 328–335.
20. Winfield AJ, Richards MRE: *Pharmaceutical Practice* 3rd ed. Churchill Livingstone Edinburgh, New York, 2003, 248-251.

21. Richter WF, Bhansali SG, Morris M E: Mechanistic Determinants of Biotherapeutics Absorption Following SC administration. *The AAPS Journal* 2012; 14: 559-570.
22. Vaje iz fizikalne farmacije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011, 44-58.
23. Mezger TG: *The Rheology Handbook For users of rotational and oscillatory rheometers* 3rd revised ed. Vincentz Network, Hanover 2011, 17-22, 135-140, 233-248.
24. Zupančič Valant A: Uvod v reologijo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2007, 17-40.
25. Clas S-D, Dalton CR, Hancock BC: Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 1999; 2: 311-320.
26. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: *Principles of Instrumental Analysis* 6th ed., international student ed. Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007: 900-904.
27. Craig DQM, Reading M: *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*. CRC Press, Boca Raton, 2007: 1-20.
28. Walenga JM, Lyman GH: Evolution of heparin anticoagulants to ultra-low-molecular-weight heparins: A review of pharmacologic and clinical differences and applications in patients with cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2013; 88:1-18.
29. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE: Heparin and Low-Molecular Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *CHEST* 2001; 119:64S–94S.
30. Linhardt R, Gunay NS: Production and Chemical Processing of Low Molecular Weight Heparins. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1999; 25:5-16.
31. Spinelli FJ, Kiick KL, Furst EM: The role of heparin self-association in the gelation of heparin-functionalized polymers. *Biomaterials* 2008; 29:1299-1306.
32. Drobnič P: Reološko ovrednotenje termoreverzibilnih hidrogelov za podkožno aplikacijo. *Diplomska naloga*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.

33. Chang JY, Oh Y-K, Choi H, Kim YB, Kim C-K: Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 214: 155-163.
34. Balažek S: Izdelava in vrednotenje termoreverzibilnih hidrogelov za podkožno aplikacijo. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2013.
35. Trong LCP, Djabourov M, Ponton A: Mechanisms of micellization and rheology of PEO–PPO–PEO triblock copolymers with various architectures. *Journal of Colloid and Interface Science* 2008; 328: 278-287.
36. Artzner F, Geiger S, Olivier A, Allais C, Finet S, Agnely F: Interactions between Poloxamers in Aqueous Solutions: Micellization and Gelation Studied by Differential Scanning Calorimetry, Small Angle X-ray Scattering, and Rheology. *Langmuir* 2007; 23: 5085-5092.
37. Chung YI, Lee SY, Tae G: The effect of heparin on the gelation of Pluronic F- 127 hydrogel. *Colloid Surface Physicochem Eng Aspect* 2006; 284-285: 480-484.
38. Fernandez-Tarrio M, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A: Calorimetric approach to tetronic/water interactions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2007; 87: 171–178.
39. Wang T, Gunasekaran S: State of Water in Chitosan–PVA Hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science* 2006; 101: 3227–3232.
40. Ford JL: Thermal analysis of hydroxypropylmethylcellulose and methylcellulose: powders, gels and matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 179: 209–228.
41. Schulz PC: DSC analysis of the state of water in surfactant-based microstructures. *Journal of Thermal Analysis* 1998; 51:135-149.