

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nastja BAŠELJ

**RAZISKAVE MIGRACIJE VODE MED STRUKTURNIMI
POLISAHARIDI IN OSTALIMI KOMPONENTAMI TRDNIH
FARMACEVTSKIH OBLIK**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nastja BAŠELJ

**RAZISKAVE MIGRACIJE VODE MED STRUKTURNIMI
POLISAHARIDI IN OSTALIMI KOMPONENTAMI TRDNIH
FARMACEVTSKIH OBLIK**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

**WATER MIGRATION STUDIES BETWEEN STRUCTURAL
POLYSACCHARIDES AND OTHER COMPONENTS IN
PHARMACEUTICAL SOLID DOSAGE FORMS**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Živilstvo.

Praktični del je bil v celoti opravljen v Krki tovarni zdravil, d. d. v Novem mestu.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Tomaža Požrla, za somentorja dr. Boštjana Jermana, za recenzentko pa doc. dr. Natašo Šegatin.

Mentor: doc. dr. Tomaž Požrl

Somentor: dr. Boštjan Jerman

Recenzentka: doc. dr. Nataša Šegatin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nastja Bašelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 66.022:544.3:543.613.2(043)=163.6
KG	aditivi/humektanti/polisaharidi/škrob/farmacevtska učinkovina/voda/vodna aktivnost/migracija vode/fizikalnokemijske lastnosti/strukturne lastnosti
AV	BAŠELJ, Nastja, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	POŽRL, Tomaž (mentor)/ JERMAN, Boštjan (somentor)/ ŠEGATIN, Nataša (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	RAZISKAVE MIGRACIJE VODE MED STRUKTURNIMI POLISAHARIDI IN OSTALIMI KOMPONENTAMI TRDNIH FARMACEVTSKIH OBLIK
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo
OP	X, 66 str., 13 pregl., 40 sl., 1 pril., 49 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	V magistrski nalogi smo raziskovali migracijo vode med komponentami v več-komponentnem heterogenem sistemu. Študijo smo izvedli na polisaharidih, ki se uporabljajo v živilski in farmacevtski tehnologiji; koruzni škrob, natrijev karboksimetilškrob (NKMŠ), sukraloza in Krosopovidon. V predposkusu smo analizirali vsebnost vode in aktivnost vode v koruznem škrobu in natrijevem karboksimetilškrobu ter na ta način preučevali vpliv strukture na vodno aktivnost. Raziskali smo teorijo in prakso, ki jo opisuje pojem aktivnost vode in preučili delovanje aparata za merjenje vodne aktivnosti. V sklopu raziskave smo oblikovali komoro za opazovanje migracije vode med snovmi tako, da smo zagotovili kontrolirano atmosfero in omejili prehajanje vode izključno med zelenimi snovmi in atmosfero v komori. V prvem delu glavnega eksperimenta smo preučevali pristope, s katerimi lahko vplivamo na aktivnost vode. Izkazalo se je, da lahko z dodatkom $MgCl_2$ kot humektanta znižamo aktivnost vode in tako kontrolirano vplivamo na potencialno migracijo v zmesi, saj $MgCl_2$ veže razpoložljivo vodo pri čemer preide v hidratno obliko. Ugotovili smo še, da s spremembo velikosti delcev ne moremo vplivati na obseg vodne aktivnosti, ampak kvečjemu na hitrost sorpcije vode. V drugem delu eksperimenta smo s simulacijo binarnih zmesi dokazali, da voda migrira od snovi z višjo vodno aktivnostjo proti snovi z nižjo vodno aktivnostjo po principu zakona o termodinamiki, ne glede na vsebnost vode posamezne snovi. Do migracije vode je prišlo med koruznim škrobom in NKMŠ, saj je koruzni škrob z vodno aktivnostjo 0,47 oddal svojo nevezano vodo NKMŠ z vodno aktivnostjo 0,17, dokler nista dosegla ravnotežja. Simulacija zmesi sukraloze in koruznega škroba z enako vodno aktivnostjo 0,47 je pokazala, da sta bili obe komponenti že v ravnotežju in migracija vode zato ni potekla. Smer migracije in količino migrirane vode za vsako komponento smo napovedali na osnovi sorpcijskih izoterm (vsebnost vode v odvisnosti od vodne aktivnosti). Ta princip je dovolj natančno napovedal, koliko vode bo katera snov v več-komponentnem heterogenem sistemu sprejela oziroma oddala. S takimi študijami lahko napovemo stabilnost našega končnega izdelka z vidika prenosa vode in sprememb vodne aktivnosti že v začetnih idejnih fazah razvoja končnega izdelka.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
 DC UDC 66.022:544.3:543.613.2(043)=163.6
 CX food additives/humectants/polysaccharides/starch/pharmaceutical substance/water/water activity/water migration/ physicochemical properties /structural properties
 AU BAŠELJ, Nastja
 AA POŽRL, Tomaž (supervisor)/JERMAN, Boštjan (co-advisor)/ ŠEGATIN, Nataša (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2015
 TI WATER MIGRATION STUDIES BETWEEN STRUCTURAL POLYSACCHARIDES AND OTHER COMPONENTS IN PHARMACEUTICAL SOLID DOSAGE FORMS
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
 NO X, 66 p., 13 tab., 40 fig., 1 ann., 49 ref.
 LA Sl
 AL sl/en
 AB In present master's thesis we have studied water migration between substances in multi-component formulations. The study was conducted on organic polysaccharides which are commonly used in food technology and pharmaceuticals such as corn starch, sodium carboxymethyl starch, sucralose and crospovidone. During preliminary test, we studied water content and water activity of corn starch and sodium carboxymethyl starch and tried to determine what structural features influence the onset of absorption and adsorption of water. We also studied water activity and examined functionality of the instrument for water activity determination. We designed the chamber which enabled us to observe water migration between substances in airtight conditions and limitation of water transport solely between examined substances in the chamber. Main experiment was divided into several segments. We examined the technical procedures which can influence activity of water. It has been shown that the addition of humectant $MgCl_2$ reduces water activity and as such influences the potential water migration in formulation. It has also been shown that particle size reduction does not influence the scope of water activity, but at most increases the kinetics of water sorption. In second part of the experiment we demonstrated that water migrates from the substance with higher water activity to the substance with lower activity according to the law of thermodynamics, irrespective of the water content of individual substances. The water migration occurred between corn starch and NKMS as corn starch with a water activity of 0.47 submitted its unbound water to NKMS with a water activity of 0.17, until they reached equilibrium. Simulation of a mixture of sucralose and corn starch with a water activity of 0.47 showed that both components were in equilibrium, therefore, water migration has not occurred. In the last part of experiment we found that based on calibration curves of water sorption (mass change) as a function of water activity we can relatively accurately predict the amount of water that each substance can accept or release. This study will help us predict the stability of our final product in terms of water and its activities already in the early conceptual stages of development projects.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 VODA	3
2.1.1 Voda v monomolekulski plasti	3
2.1.2 Večplastni sloj vode.....	4
2.1.3 Kapilarna voda.....	4
2.1.4 Prosta voda	4
2.2 VODNA AKTIVNOST	4
2.3 SORPCIJA	7
2.3.1 Formiranje hidrata	9
2.3.2 Vezava vode amorfnega materiala	10
2.4 HIGROSKOPNOST	10
2.5 MIGRACIJA VODE.....	11
2.6 MOŽNOST ZNIŽEVANJA AKTIVNOSTI VODE V SNOVI	12
2.6.1 Humektanti	13
2.7 METODE ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE IN NJENE AKTIVNOSTI	13
2.7.1 Analizator dinamične sorpcije vode – DVS, SPS	13
2.7.2 Termogravimetrična analiza - TGA.....	14
2.7.3 Aparat za merjenje vodne aktivnosti	15
2.7.4 Svetlobni mikroskop	16
2.7.5 Vrstečni elektronski mikroskop – SEM.....	16
2.7.6 Laserska difrakcija – PSD.....	16
2.7.7 Rentgenska praškovna difrakcija - XRPD	17
2.7.8 Diferenčna dinamična kalorimetrija - DSC.....	17

2.7.9 Določanje vsebnosti vode s sušenjem – LOD	18
2.8 ZNAČILNOSTI PREUČEVANIH SNOVI	18
2.8.1 Farmacevtski koruzni škrob	18
2.8.2 Natrijev karboksimetilškrob, NKMS	19
2.8.3 Dodatki	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI	21
3.1.1 Osnovni vzorci	21
3.1.2 Dodatki	21
3.2 NAČRT DELA	21
3.3 METODE DELA	23
3.3.1 Analizator dinamične sorpcije vode, DVS, SPS	23
3.3.2 Termogravimetrična analiza, TGA	24
3.3.3 Aparat za merjenje vodne aktivnosti	24
3.3.4 Komora za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi	25
3.3.5 Svetlobni mikroskop	25
3.3.6 Vrstečni elektronski mikroskop, SEM	25
3.3.7 Laserska difrakcija, PSD	25
3.3.8 Rentgenska praškovna difrakcija, XRPD	26
3.3.9 Diferenčna dinamična kalorimetrija, DSC	26
3.3.10 Kroglični mlin Retch	26
3.3.11 Izguba vode pri sušenju, LOD	26
4 REZULTATI	27
4.1 KARAKTERIZACIJA KORUZNEGA ŠKROBA IN NKMS	27
4.1.1 Oblika in velikost delcev koruznega škroba in NKMS	27
4.1.2 Sorpcijske lastnosti delcev koruznega škroba in NKMS	29
4.1.3 Določitev vsebnosti vode delcev koruznega škroba in NKMS	34
4.2 KONSTRUIRANJE KOMORE ZA IZMENJAVO VODE MED VZORCI V ATMOSFERI Z ZNANO VSEBNOSTJO VODE	35
4.3 RAZISKAVA MERITVE VODNE AKTIVNOSTI PO PRINCIPU DOLOČANJA TOČKE ROSIŠČA Z APARATOM ZA MERJENJE VODNE AKTIVNOSTI	36
4.4 VPLIV RAZLIČNIH FIZIKALNO KEMIJSKIH LASTNOSTI MATERIALA NA MIGRACIJO VODE	38
4.4.1 Velikost delcev	38

4.4.2 Dodatek humektantov.....	39
4.5 SIMULACIJA BINARNIH ZMESI ZA NAPOVED SMERI IN KOLIČINE VODE, KI BO PREHAJALA V HETEROGENIH SISTEMIH	43
4.5.1 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 1	44
4.5.2 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 2	46
4.5.3 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 3	46
4.5.4 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 4	49
4.7 OVREDNOTENJE MIGRACIJE VODE V ZMESI MED KORUZNIM ŠKROBOM IN NATRIJEVIM KARBOKSIMETILŠKROBOM S SORPCIJSKIMI IZOTERMAMI. 51	
4.8 OVREDNOTENJE MIGRACIJE VODE V SIMULACIJI ZMESI MED KORUZNIM ŠKROBOM, NATRIJEVIM KARBOKSIMETILŠKROBOM IN SORBITOLOM S SORPCIJSKIMI IZOTERMAMI IN TERMOGRAVIMETRIČNO ANALIZO	53
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	55
5.1 SKLEPI	59
6 POVZETEK	61
7 VIRI.....	63

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Klasifikacija higroskopnosti po Callahanu in sod. (1982).....	11
Pregl. 2: Porazdelitev velikosti delcev koruznega škroba in NKMSŠ	29
Pregl. 3: Sprememba velikosti delcev koruznega škroba in NKMSŠ zaradi sorpcije vode med namakanjem v destilirani vode v 24-ih urah.....	30
Pregl. 4: Vsebnost in aktivnost vode koruznega škroba določena s TGA, LOD in aparatom za določanje vodne aktivnosti.....	35
Pregl. 5: Sprememba vsebnosti vode koruznega škroba in NKMSŠ na račun meritve vodne aktivnosti	37
Pregl. 6: Sprememba velikosti delcev koruznega škroba in NKMSŠ po mletju	39
Pregl. 7: Sprememba vodne aktivnosti koruznega škroba in natrijevega arboksimetilškroba na račun zmanjšanja velikosti delcev z mletjem na sobnih pogojih, ~ 25 °C, 55 % RV ...	39
Pregl. 8: Vodna aktivnost koruznega škroba, magnezijevega klorida in njunih zmesi	40
Pregl. 9: Pregled simulacij binarnih zmesi, njihove vodne aktivnosti v ravnovesju, vsebnost vode posameznih komponent zmesi v izhodnem stanju (TGA t=0) in vsebnost vode posameznih komponent po enem tednu (TGA t=1t) v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi	44
Pregl. 10: Podatki o pogojih meritve in rezultati vsebnosti vode za vsako točko umeritvene krivulje vsebnosti vode v odvisnosti od aktivnosti vode za koruzni škrob pri 25 °C	51
Pregl. 11: Podatki o pogojih meritve in rezultati vsebnosti vode za vsako točko umeritvene krivulje vsebnosti vode v odvisnosti od aktivnosti vode za NKMSŠ pri 25 °C	52
Pregl. 12: Podatki o pogojih meritve in rezultati vsebnosti vode za vsako točko umeritvene krivulje vsebnosti vode v odvisnosti od aktivnosti vode za Sorbitol pri 25 °C.....	53
Pregl. 13: Primerjava rezultatov napovedane vsebnosti vode posameznih komponent v zmesi po enem tednu in izmerjenih rezultatov s TGA	54

KAZALO SLIK

Sl. 1: Sorpcijska izoterma; odvisnost vsebnosti vode od vodne aktivnosti in način vezave vode pri različnih vrednostih vodne aktivnosti (AquaLab..., 2014).....	8
Sl. 2: Različne oblike sorpcijskih izoterm glede na različen način vezave vode (Guillarda in sod., 2013)	8
Sl. 3: Sorpcijski izotermalni krivulji snovi A in snovi B in razlaga migracije vode (Abramovič, 2006)	12
Sl. 4: Slika časovnega diagrama (A) in slika sorpcijske izoterme (B), obe v obliki, kot ju izriše analizator dinamične sorpcije vode (ProUmid 2014)	14
Sl. 5: Tipični termogram termogravimetrične analize (Mettler Toledo, 2001).....	15
Sl. 6: Tipični DSC termogram (Mettler Toledo, 2001)	18
Sl. 7: Oblike škrobnih zrn glede na položaj tvornega centra (Šircelj, 2005).....	19
Sl. 8: Strukturna formula natrijevega karoboksimetilškroba (Primojel Productsheet. 2011)	20
Sl. 9: Shema poskusa razdeljenega na predposkus, glavni in zaključni poskus.....	22
Sl. 10: Analizator dinamične sorpcije vode – med analizo z vidnim samodejnim vzorčevalnikom	23
Sl. 11: Priprava vzorca na TGA analizo: zapiranje aluminijastega lončka v stiskalnici	24
Sl. 12: Posnetek koruznega škroba (A) in NKMS (B) pod svetlobnih mikroskopom pod 40-kratno povečavo.....	27
Sl. 13: Posnetek koruznega škroba (A) in NKMS (B) pod svetlobnim mikroskopom s polizirajočo svetlobo, pod 40-kratno povečavo.....	28
Sl. 14: Posnetek koruznega škroba (A) in NKMS (B) pod elektronskim vrstičnim mikroskopom, 2000-kratna povečava.....	28
Sl. 15: Distribucija porazdelitve velikosti delcev koruznega škroba in NKMS določena z lasersko difrakcijo.....	29
Sl. 16: Posnetki koruznega škroba in NKMS pod svetlobnim mikroskopom v začetnem stanju (levo) in po 24-ih urah v destilirani vodi (desno)	30
Sl. 17: Relativna sprememba mase koruznega škroba v odvisnosti od relativne vlage pri 25 °C	31
Sl. 18: Časovni potek vzpostavljanja ravnotežja pri vezavi vode v koruznem škrobu pri različni relativni vlagi pri 25 °C	32
Sl.19: Krivulja relativne spremembe mase NKMS v odvisnosti od relativne vlage pri 25 °C	33
Sl. 20: Časovni potek vzpostavljanja ravnotežja pri vezavi vode v NKMS pri različni relativni vlagi pri 25 °C	33
Sl. 21: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS (TGA) pri temperaturi 85 °C	34

Sl. 22: Pokrov komore za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi	35
Sl. 23: Dno komore za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi.....	36
Sl. 24: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS pred ter po analizi aktivnosti vode z aparatom za merjenje vodne aktivnost določena s TGA pri 85 °C in NKMS pri 85 °C.....	37
Sl. 25: Distribucija porazdelitve velikosti delcev koruznega škroba in NKMS pred in po mletju.....	39
Sl. 26: Difraktogrami brezvodnega $MgCl_2$, heksahidratne oblike $MgCl_2$ in brezvodne oblike $MgCl_2$, ki smo ga 2 uri izpostavljali sobnim pogojem 25 °C, 55 % RV	41
Sl. 27: Difraktogrami zmesi $MgCl_2$, in koruznega škroba v začetnem stanju, v primerjavi z difraktogramom brezvodnega $MgCl_2$ in difraktogramom koruznega škroba	41
Sl. 28: Difraktogrami zmesi $MgCl_2$, in koruznega škroba po vzpostavitvi ravnotežja (zmes zaprta v neprodušni viali, 1 teden), v primerjavi z difraktogrami brezvodnega $MgCl_2$, heksahidratnega $MgCl_2$ in koruznega škroba	42
Sl. 29: Termogram vstopnih snovi in zmesi koruznega škroba ter magnezijevega klorida - DSC	43
Sl. 30: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS v izhodnem stanju ($t=0$) določena s TGA pri 85 °C	45
Sl. 31: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS po enem tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi ($t=1t$), določena s TGA pri 85 °C....	45
Sl. 32: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in sukraloze v izhodnem stanju ($t=0$) in po 1 tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi ($t=1t$) določeni s TGA pri 85 °C.....	46
Sl. 33: Termogram Krospovidona, ZU1 in njune zmesi.....	47
Sl. 34: Vsebnost nevezane vode Krospovidona in ZU1 v izhodnem stanju ($t=0$) določena s TGA pri 85 °C	48
Sl. 35: Vsebnost nevezane vode Krospovidona in ZU1 po enem tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi ($t=1t$), določena s TGA pri 85 °C....	48
Sl. 36: Krivulja relativne spremembe mase ZU2 v odvisnosti od relativne vlage ZU2, določena z metodo DVS (A), in časovni potek vzpostavljanja ravnotežja ZU2 pri različni relativni vlagi pri 25 °C na vsakem koraku meritve DVS analize (B)	49
Sl. 37: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in ZU2 v izhodnem stanju ($t=0$) določena s TGA pri 85 °C	50
Sl. 38: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in ZU2 po enem tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi določena s TGA pri 85 °C.....	50
Sl. 39: Sorpcijska izoterma koruznega škroba in NKMS pri 25 °C	52
Sl. 40: Sorpcijska izoterma koruznega škroba, NKMS in sorbitola pri 25 °C	53

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

μ – kemijski potencial sistema in pove termodinamsko aktivnost na mol snovi

μ_0 – kemijski potencial čiste snovi pri določeni temperaturi

API – aktivna farmacevtska učinkovina

a_w – aktivnost vode

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija

DVS – aparat za dinamično sorpcijo vode

ERV – ravnotežna relativna vlaga

MIK – svetlobni mikroskop

NKMŠ – natrijev karboksimetilškrob

p – parcialni tlak vode

p_0 – parcialni tlak čiste vode pri konstantni temperaturi

P_k – kapilarni tlak

PSD – laserska difrakcija

r – površinska napetost vode

R – plinska konstanta

RV – relativna vlaga

SEM – vrstični elektronski mikroskop

SPS – aparat za dinamično sorpcijo vode

TGA – termogravimetrična analiza

XRPD – rentgenska praškovna difrakcija

ZU1 – zdravilna učinkovina 1

ZU2 – zdravilna učinkovina

σ – polmer kapilare

1 UVOD

Voda predstavlja ključno spojino na vsaki stopnji tako farmacevtskega kot živilskega tehnološkega procesa izdelave končnega produkta. Poznavanje vsebnosti vode, mehanizma migracije vode med komponentami heterogenega sistema in njena izmenjava z okoljem je v živilski in farmacevtski industriji izjemnega pomena. Med proizvodnim procesom je zelo pomembno poznati obnašanje heterogenega sistema pri določeni relativni vlagi, temperaturi in tlaku, saj lahko z uravnavanjem teh parametrov vplivamo na izdelavo, kvaliteto, učinkovitost in stabilnost izdelka.

Pri razvoju novih izdelkov v farmaciji vse več časa, analiz in sredstev posvečamo raziskavam vloge vode v snoveh in zmesih, saj šele spoznavamo njen vpliv na tehnološki proces ter na končni izdelek. Vse bolj je jasno, da se voda v neki snovi, ki je lahko pomožna ali aktivna, vsakič obnaša specifično, zato so potrebne poglobljene raziskave na vsaki stopnji razvoja izdelka. Pomožna snov v formulaciji je nosilec fizikalno-kemijskih lastnosti zdravila, ki lahko podpira delovanje zdravila in prispeva k njegovemu boljšemu prenašanju v organizmu.

Posebej moramo biti pozorni na migracijo vode v končni sestavi izdelka, ki jo v farmaciji imenujemo formulacija. Vsebnost vode se v zmesih konstantno spreminja, v kolikor ne zagotovimo ustreznih pogojev hranjenja, ki preprečijo vpliv okolja na sprejemanje oziroma izhlapevanje vode iz zmesi. Na koncentracijo vode v snovi vplivajo številni zunanji pogoji kot so temperatura, vlaga in tlak ter notranji pogoji kot so sestava in tehnologija izdelave formulacije, zato je doseganje ponovljivosti rezultatov pri meritvah vsebnosti in aktivnosti vode močno oteženo. Prav tako je problematična tudi primerjava rezultatov vsebnosti in aktivnosti vode z literaturo. Pri raziskavah povezanih z migracijo vode v snoveh je zelo pomembno, da uporabimo več metod za analizo ter na podlagi vsebnosti in aktivnosti vode ter lastnosti materiala ustrezno interpretiramo svoje ugotovitve.

Zavedati se moramo, da spreminjanje koncentracije vode v snovi v veliki meri vpliva na senzorične, strukturne in fizikalno-kemijske lastnosti našega izdelka ter tudi na mikrobiološko stabilnost. Če spremembe vsebnosti vode v zmesih apliciramo na farmacevtsko panogo, bodo razlike v koncentraciji in aktivnosti vode vplivale na fizikalno-kemijske značilnosti trdne farmacevtske oblike – tablet, kapsul, pelet, pastil, zrnč idr. (pojav hidratov, polimorfni prehodi, obarvanje/razbarvanje, aglomeracija, mikrobiološka in kemijska nestabilnost, posledično slabša obstojnost oz. krajši rok trajanja, itd.).

1.1 NAMEN NALOGE

Glavni namen naloge je preučiti vpliv vsebnosti vode na vodno aktivnost polnil in pomožnih snovi v zdravilih in prehranskih dodatkih, kot so škrob in njegove modifikacije, različno obdelane celuloze, sladkorji in podobno, razumeti vplive različnih vsebnosti vode v pomožnih snoveh na migracijo vode med komponentami formulacije in preučiti možne pristope za učinkovito izbiro pomožnih snovi glede na občutljivost učinkovine na vodo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Velikost delcev in kompleksnost sestave vplivata na vodno aktivnost snovi.
- Migracija vode v formulaciji poteka od snovi z višjo proti snovi z nižjo vodno aktivnostjo neodvisno od vsebnosti vode.
- MgCl_2 v zmesi deluje kot humektant tako, da veže razpoložljivo vodo v zmesi dokler ne preide iz brezvodne v hidratno obliko.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VODA

Molekula vode sestoji iz atoma kisika kovalentno vezanega na dva atoma vodika. Zaradi neenakomerne porazdelitve elektronov oziroma tetraedrične oblike ima molekula dipolarno strukturo. Oba atoma vodika imata majhen pozitivni naboj, medtem ko ima atom kisika dva vezna elektronska para in negativni naboj. Zaradi velike razlike v elektronegativnosti vodika in kisika so molekule vode sposobne formiranja relativno močnih vodikovih vezi s sosednjimi molekulami. Sosednje molekule so lahko molekule vode ali molekule kakšne druge snovi z ustrezno strukturo. Jakost vodikove vezi je posledica fizikalno kemijskih lastnosti vode in fizikalno kemijskih lastnosti druge snovi (Sharp, 2001).

Vse več avtorjev (Butre in sod., 2014; Nyman in sod., 2013; Kaatze, 2011) raziskuje možnosti razlikovanja različno vezane vode v snoveh. Ugotovili so, da se glede na način vezave vode v snoveh spremenijo naslednje lastnosti vode:

- vrelišče molekule,
- polarnost molekule,
- spekter absorbanca elektromagnetnega valovanja,
- karakteristične fizikalne lastnosti vode: gostota, stisljivost, električna prevodnost, lomni količnik.

Voda se v sistemu nahaja v različnih molekulskih nivojih, na primer monomolekulska ali multimolekulska plast, to pa je odvisno od interakcij voda - snov. Jones jih je že leta 1985 razvrstil glede na fizikalno-kemijske lastnosti, bolj podrobno pa jih razložita tudi McClements (2003) in Wathsala (2014). Vsak avtor način vezave vode v snoveh opiše nekoliko drugače, v nalogi pa bomo povzeli zvrsti vode v živilih kot jih opisuje Abramovič (2006).

2.1.1 Voda v monomolekulski plasti

Voda v monomolekulski plasti je plast molekul vode, ki so vezane neposredno na polarne skupine oziroma na ionske skupine in ione. Molekule so strukturno urejene in blizu ena drugi zato je gostota vode v monomolekulski plasti višja kot gostota vode v naslednjih plasteh. Molekule so skoraj popolnoma imobilizirane, zato taka voda ni dostopna mikroorganizmom, ne more delovati kot topilo in je ne moremo popolnoma odstraniti iz snovi. Sloj vode v monomolekulski plasti neke snovi je običajno zapolnjen takrat, ko snov doseže vodno aktivnost približno 0,25 (Abramovič, 2006).

2.1.2 Večplastni sloj vode

Voda v večplastnem sloju tvori nekaj naslednjih plasti okoli hidrofilnih skupin molekul v snovi. Ta voda ima omejeno funkcijo topila, vendar jo je iz snovi možno odstraniti. Gibljivost molekul v večplastnem sloju narašča z oddaljenostjo od monomolekulske plasti, kar pomeni, da lahko spremembe merimo s spektroskopskimi metodami kot na primer nuklearna magnetna resonanca, infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo, ramanska spektroskopija in druge (Abramovič, 2006).

2.1.3 Kapilarna voda

Kapilarna voda se nahaja v ozkih kanalih materiala, kjer delujejo kapilarne sile. Ti kanali predstavljajo fizično bariero, ki otežuje prosto gibanje vode v snovi. Kapilarna voda obdrži fizikalno-kemijske lastnosti proste vode, vendar je omejena v pretakanju (Wathsala, 2014).

Ko z višanjem vsebnost vode v snovi naraste a_w kot posledica kondenzacije vode v kapilarah le-tega, to opazimo na sorpcijski izotermi kot linearno naraščanje krivulje. Za vodo v kapilarah je značilen kapilarni tlak, ki je odvisen od polmera kapilare (r) in od površinske napetosti vode (2σ) (Abramovič, 2006)

$$P_k = \frac{2\sigma}{r} \quad \dots (1)$$

Izračun nam pove koliko tlaka je potrebno, da odstranimo vodo iz kapilare, ki je tem večji, čim ožja je kapilara.

2.1.4 Prosta voda

Prosta voda je prosta vseh kemijskih snovi, kar pomeni, da je vsaka molekula obdana samo z drugimi molekulami vode. Poznamo njeno gostoto, tališče, vrelišče, stisljivost, temperaturo izparevanja in spekter absorpcije elektromagnetnega valovanja (Wathsala, 2014).

Prosta voda v snoveh se po lastnostih približa čisti vodi in se nahaja na površini, med plastmi in v površinskih porah materiala. Glavna lastnost take vode je, da jo lahko brez težav odstranimo iz materiala in, da deluje kot topilo (Abramovič, 2006).

2.2 VODNA AKTIVNOST

Najbolj pogosto uporabljena mera za količino proste oziroma nevezane vode v snovi je termodinamska aktivnost vode ali kar vodna aktivnost (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Termodinamika je veda, ki se ukvarja s kemijskim ravnotežjem in s spremembami

energije, ki spremljajo kemijske in fizikalne procese. Termodinamika je vodilo migracije vode med snovmi (Decagon Devices, 2007).

Termodinamska aktivnost vode vpliva na stabilnost in varnost izdelka, saj pogojuje stopnjo kemijskih in biokemijskih reakcij v izdelku. (AquaLab..., 2014). Količino vodne pare v atmosferi lahko merimo s koncentracijo ali s parcialnim tlakom vodne pare p_1 , ki je definiran z relacijo (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007):

$$p_1 = X_1 P \quad \dots (2)$$

X_1 je molski delež vode v plinastem agregatnem stanju, P pa je celotni tlak plinske zmesi vodne pare in zraka. Množina vode, ki jo nek material odda oziroma sprejme je odvisna od narave in koncentracije vodotopnih snovi v materialu (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Za realno vodno raztopino je parcialna Gibbsova prosta energija vode oziroma kemijski potencial vode, μ_1 pri temperaturi T in celotnemu tlaku P enaka (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007):

$$\mu_1 = \mu_1^0 + RT \ln \left(\frac{p_1}{p_1^0} \right) \quad \dots (3)$$

μ_1^0 je kemijski potencial čiste vode, p_1 je ravnotežni tlak, p_1^0 je parni tlak čiste vode in R je splošna plinska konstanta (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Aktivnost vode a_w je definirana z razmerjem:

$$a_w = \frac{p_1}{p_1^0} \quad \dots (4)$$

Aktivnost vode je pri termodinamskem ravnotežju in konstantnem tlaku enaka relativni vlagi (RV) (Schmidt, 2004).

$$RV = 100 \times a_w \quad \dots (5)$$

V realnih sistemih in zmesih težko dosežemo termodinamsko ravnotežje pri konstantnem tlaku, temperaturi in relativni vlagi. Zmesem, ki vsebujejo različne komponente, se s časom in zaradi spreminjanja pogojev v okolju spremenijo fizikalne, kemijske in mikrobiološke lastnosti, zato govorimo o neuravnoteženih sistemih (Schmidt, 2004).

Meritev celotne vsebnosti vode ne pove ničesar o dejstvu, ali bo ta voda v celoti vstopala v reakcije in vplivala na stabilnost produkta. Za optimalno karakterizacijo sposobnosti sprejemanja in oddajanja vode materiala, je potrebno hkrati poznati vsebnost vode, vodno aktivnost in način vezave vode snovi (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Na aktivnost vode neposredno vplivajo:

- površinske interakcije: voda reagira direktno s prostimi skupinami na neraztopljenih sestavinah, kot so škrob in proteini preko dipol – dipol, ionskimi (H_3O^+ in OH^-), van der Waalsovimi hidrofobnimi vezmi in vodikovimi vezmi,
- koligativni vpliv topljencev (sol, sladkor ...), ki reagirajo z vodo v snovi preko dipol – dipol, ionskih in vodikovih vezi,
- kapilarni efekt: parni tlak vode nad meniskusom vode v strukturi je nižji kot tlak čiste vode, kar omejuje vodno aktivnost (Abramovič, 2006).

Analiza vodne aktivnosti končnega izdelka pri različnih pogojih (različna RV, temperatura itd.), nam omogoči razumevanje in napovedovanje morebitnih fizikalnih in kemijskih sprememb izdelka, ki so pogojeni z vsebnostjo proste vode v snovi. Napovemo lahko naslednje fizikalno-kemijske spremembe in morebitne posledice previsoke vodne aktivnosti izdelka:

- vrste aktivnih mikroorganizmov, ki jih lahko razdelimo v posamezne razrede glede na sposobnost izkoriščanja vode za rast in razmnoževanje pri določeni vodni aktivnosti snovi,
- kemijsko in biokemijsko reaktivnost materiala: voda se v snovi obnaša kot topilo, kot reaktant ali pa spremeni viskoznost sistema in s tem mobilnost reaktanta. Previsoka aktivnost vode komponent končnega izdelka vpliva tudi na pojav ne-encimskega porjavenja, oksidacijo lipidov, degradacijo vitaminov, na encimske reakcije, denaturacijo proteinov in tudi na geliranje oziroma želiranje ter retrogradacijo škroba v končnem izdelku. V procesu hidrolize oziroma oksidacije, voda vpliva na pretočnost, aglomeracijo in strjevanje celotnega izdelka ali njegovim komponent (AquaLab..., 2014),
- migracijo vode: Enačbi 3 in 4 povezujeta aktivnost vode in kemijski potencial, je Kemijski potencial vode različnih komponent izdelka je, med tem ko sistem oziroma zmes dosega ravnotežje, gonilna sila migracije vode. Vidimo, da po definiciji, vodna aktivnost določa migracijo vode s področja višje aktivnosti vode proti področju z nižjo aktivnostjo (AquaLab..., 2014)

2.3 SORPCIJA

Izraz sorpcija je skupen za adsorpcijo in absorpcijo. Adsorpcija je proces, pri katerem se komponente ene faze akumulirajo na mejno ploskev druge faze oziroma snovi. Procesu adsorpcije lahko sledi tudi absorpcija oz. penetracija adsorbata v trdno fazo (El Sabaawi in Pei, 1977).

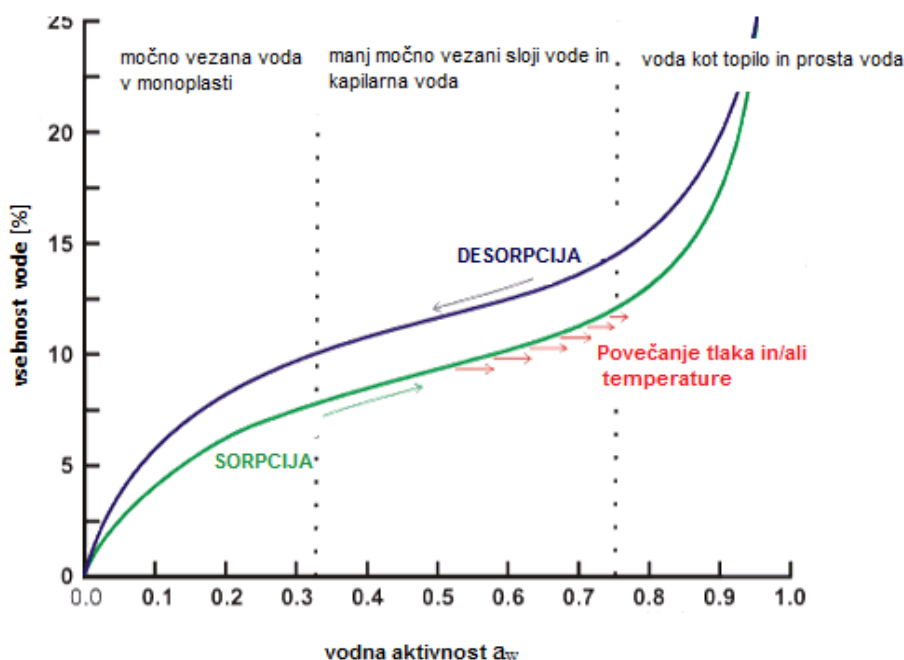
Adsorpcija je fizikalno-kemijski proces, pri katerem se molekule plina oziroma molekule topjenca v raztopini vežejo na površino trdnih snovi. Adsorbat je snov, ki se adsorbira, adsorbent pa je snov, na kateri se adsorbira adsorbat. Adsorpcija je odvisna od aktivne površine adsorbenta in je posledica privlaka med molekulami adsorbata in adsorbetna. Adsorpcija bo tem večja, čim večja bo aktivna površina adsorbenta in čim močnejše bodo privlačne sile (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Sorpcija vlage na trdno snov je odvisna od parnega tlaka vode v omenjeni trdni snovi, temperature in jakosti vezave vode na trdno snov. Sorpcija nastopi, ko se ravnotežje med parnim tlakom vode snovi in parnim tlakom vode v okolici okolice poruši. Takrat se začne vezava vode preko vodikovih vezi s polarnimi funkcionalnimi skupinami sorbenta. S sorpcijo se po principu difuzije ustvari monoplast vode, ob nadaljnji sorpciji pa monoplast s kondenzacijo preide v multimolekularno plast (Saripella in sod., 2014).

Adsorpcija vode je eksotermen proces, pri katerem se največ toplote sprosti pri vezavi molekul vode v monomolekulsko plast. Desorpcija je adsorpciji obraten endotermen proces, ki lahko odstrani vso vodo, tudi tisto vezano v monomolekulski plasti (Abramovič, 2006).

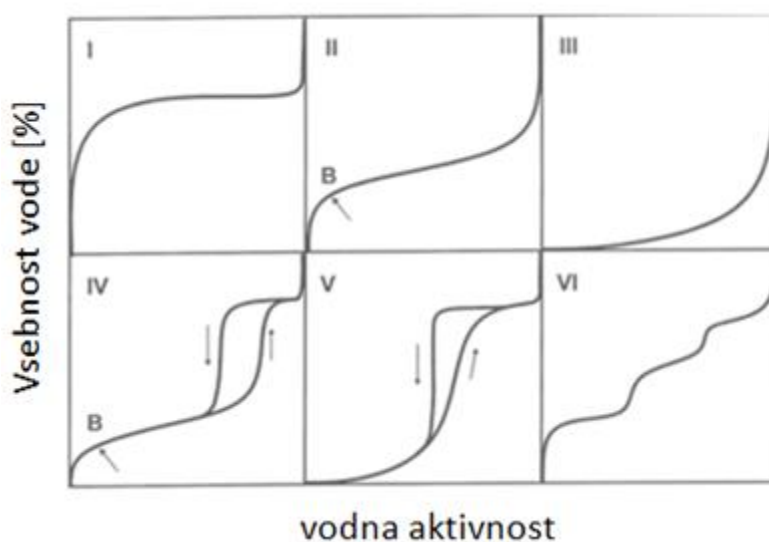
Več avtorjev (Kontny in Zografi, 1995; Saripella in sod., 2014) trdi, da imata adsorpcija in adsorpcija vode pomožnih farmacevtskih snovi velik vpliv na tehnološki proces, razvoj izdelka, zasnovu in razvoj formulacije, proizvodnjo in skladiščenje. Že sama prosta voda pomožnih snovi lahko vpliva na fizikalno kemijske lastnosti aktivne komponente kot na primer na temperaturo steklastega prehoda, stabilnost, pretočnost, kompaktnost in raztapljanje.

Sorpcijo in desorpcijo vode pri različnih vrednostih a_w lahko opišemo s sorpcijsko izotermo; to je krivulja vsebnosti vode snovi v odvisnosti od vodne aktivnosti pri konstantni temperaturi. Na sliki 1 je prikazana značilna sorpcijska izoterma neke snovi. Iz naklona krivulje lahko razberemo tudi način vezave vode (AquaLab..., 2014).



Slika 1: Sorpcijska izoterma; odvisnost vsebnosti vode od vodne aktivnosti in način vezave vode pri različnih vrednostih vodne aktivnosti (AquaLab..., 2014)

Večino sorpcijskih izoterm lahko razdelimo v razrede opisane v raziskavi El Sabaawi in Pei, (1977), ki so podrobno opisane in podprte z eksperimentalnimi primeri tudi v raziskavi Guillarda s sodelavci (2013). Na sliki 2 so prikazane različne oblike sorpcijskih izoterm.



Slika 2: Različne oblike sorpcijskih izoterm glede na različen način vezave vode (Guillarda in sod., 2013)

Oblika I: značilna je predvsem za mikroporozne materiale. Sorpcijska izoterma je konkavna glede na x os – vodna aktivnost. Količina absorbirane vlage se pri nizkih a_w

vrednostih povečuje zelo hitro in doseže plato, ko se ta približuje vrednosti 1. Ker je potrebna nizka a_w vrednost za dosego platoja, ravnotežja, lahko predvidevamo, da je trden material ali zelo porozen ali pa obstaja močna fizikalna povezava vodna para-trdno. Na krivulji opazimo torej hitro adsorpcijo (zapolnitev por) in nato zanemarljivo nadaljnjo adsorpcijo na površino.

Oblika II: sorpcijska izoterma je sigmoidne oblike (kar pomeni, da količina adsorbirane vlage hitro narašča pri nizki a_w vrednosti) in zavzame konkavno obliko s prevojem v konveksno obliko, ko se a_w vrednost približa vrednosti 1. Prevoj ponavadi pomeni, da se je monoplast adsorbenta zapolnila in se začneja formacija multi-molekulske plasti adsorbenta na površini trdne snovi.

Oblika III: sorpcijska izoterma je konveksne oblike po celotni dolžini glede na x os in pomeni majhno vezavo vlage pri nizki a_w vrednosti. Ta model krivulje nakazuje šibko povezavo med adsorbentom in snovjo, privlak med njima pa se viša z višjo a_w vrednostjo. Začne se tvoriti monoplast vodnih molekul na površini, vendar pri višji a_w vrednosti nastopi kondenzacija okoljske vlage in tvorba multi-molekularne plasti, še preden je vsa površina prekrita z mono-molekularno plastjo.

Oblika IV: pri nizkih a_w vrednostih je krivulja konkavna, kar pomeni hitro vezavo vode pri nizkih parnih tlakih. Pri višjih a_w vrednostih pa opazimo histerezo, to je razlika med absorpcijo in oddajanjem vode zaradi kapilarno vezane vode.

Oblika V: krivulja je pri nizkih a_w vrednostih konveksna, kar pomeni počasno vezavo vode pri nizkih parnih tlakih in pa šibko povezavo med adsorbatom in adsorbentom. Pri višjih parnih tlakih opazimo histerezo na račun vezave in oddajanja vlage skozi pore materiala.

Oblika VI: je relativno neobičajna oblika krivulje. Gre za vezavo adsorbenta plast za plastjo na zelo neuniformirano površino. Ostrina stopnic je odvisna od temperature.

2.3.1 Formiranje hidrata

Izraz hidrat uporabljamo v organski in anorganski kemiji, s katerim povemo, da snov vsebuje strukturno vezano vodo, kemijsko stanje vode v hidratu pa variira glede na vrsto hidrata. V organski kemiji je hidrat spojina, ki nastane z adicijo vode na molekulo, v anorganski kemiji pa so hidrati anorganske soli, ki imajo molekule vode inkorporirane v svojo kristalno mrežo (Vippagunta in sod., 2001).

Formiranje hidrata je zelo pogost pojav pri kristaliničnih snoveh zaradi hidrofilne in ionske narave materiala. Voda nastopa kot ena izmed enot kristalne celice in je v stehiometrijskem razmerju z osnovno molekulo, kjer lahko reducira elektrostatske sile med ioni, formira

vodikove vezi med funkcionalnimi skupinami in molekulo vode ter vpliva na katione (Gift in sod., 2008).

2.3.2 Vezava vode amorfne materiala

Amorfni materiali nimajo urejene periodične molekulske strukture kot kristali. Večina farmacevtskih polimernih pomožnih snovi, kot na primer škrob, celulozni derivati, proteini in sintetični hidrogeli, so amorfni. Količina vode, ki jo vežejo, je ponavadi proporcionalna prostornini/teži amorfne trdne snovi in je odvisna od specifične površine le-te. Amorfne snovi v primerjavi s kristaliničnimi praviloma vežejo veliko večjo količino vode zato so, kadar jih uporabimo v različnih zmesih, pogosto glavni razlog za migracijo vode (Yu, 2001).

Interakcije molekul vode in amorfne snovi povzročijo znižanje temperature steklastega prehoda (T_g) amorfne snovi. Pod to temperaturo je amorfna snov v steklastem stanju, kar pomeni rigidnost molekul, tu je omogočena samo vibracija molekul. Ko snov preide preko temperature steklastega prehoda, so omogočena večja gibanja molekul; rečemo, da snov preide iz steklaste v plastično obliko. V tej fazi je snov bolj tekoča, vendar še vedno visoko viskozna. Razlog za spremembo strukture je vezava molekul vode na polarne skupine amorfne snovi. V plastični obliki šibke vezi med verigami oslabijo, volumen snovi se poveča, zato je tako na voljo še več prostora za vezavo vode (Szakonyi in Zelko, 2012).

2.4 HIGROSKOPNOST

Izraz higroskopnost opisuje sposobnost trdnih materialov, da vežejo vodo. Sam izraz opisuje obseg vezave vodne pare pri določeni relativni vlagi. Vsebnost vode v trdnih snoveh variira z vodno aktivnostjo in temperaturo. Različne fizikalno-kemijske lastnosti materiala, kot so struktura, morfologija, kristaliničnost, specifična površina, stanje hidracije (hidrat ali brezvodna snov) in različne polimorfne oblike snovi vplivajo na higroskopnost snovi. Snovi so bolj higroskopske kadar imajo pri neki a_w večjo vsebnost vode (Labuza in Altunakar, 2007).

Trdne farmacevtske snovi zato razdelimo glede na higroskopnost v štiri razrede glede na rezultate, ki jih je Callahan s sodelavci (1982) pridobil eksperimentalno z izpostavljanjem materiala različnim vrednostim relativne vlage. Klasifikacijo higroskopnosti smo predstavili v preglednici 1, v kateri je prikazana tudi primerjava s kriteriji po Evropski farmakopeji. Evropska farmakopeja je sistem predpisov, ki narekujejo postopke priprave zdravil, ugotavljanje čistote zdravil in pomožnih učinkovin, potrjevanje istovetnosti in podobno. Njen cilj je zagotavljanje enake kakovosti zdravil za vse državljane Evropske Unije (JAZMP, 2015).

Preglednica 1: Klasifikacija higroskopnosti po Callahanu in sod. (1982)

Klasifikacija materialov	Kriterij po Callahan in sod. (1982)	Kriterij po Evropski farmakopeji ^a
Nehigroskopni	Razred I: načeloma ni sorpcije vode pod 90 % RV, manj kot 20 % povišana vsebnost vode v enem tednu pri RH > 90 %	0-0,12 %
Nizko higroskopni	Razred II: načeloma ni sorpcije vode pod 80 % RV, manj kot 40 % povišana vsebnost vode v enem tednu pri RH > 80 %	0,2-2 %
Zmerno higroskopni	Razred III: vsebnost vlage se ne poveča za več kot 5 ut. % pod 60 % RV, povišana vsebnost vode za manj kot 50 % v enem tednu pri RH >80 %	2-15 %
Zelo higroskopni	Vsebnost vlage se poviša že pri 40-50 %; povišana vsebnost vode za več kot 20 % v enem tednu pri RV >90 %	> 15 %

a: masni delež vezane vode materiala pri 25 °C/80 % RV

V kolikšni meri bo material vezal vodo, je odvisno od mehanizma interakcije voda-trdna snov. Lahko pride do različnih pojavov:

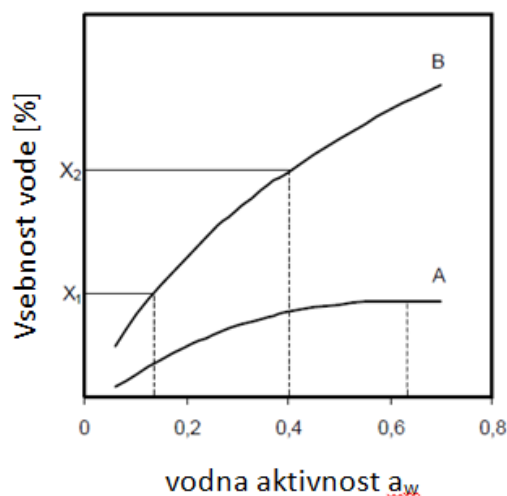
- formiranje hidrata, pri čemer se voda veže v kristalno mrežo, kar lahko privede do povečanja velikosti delcev zaradi povečanja prostornine kristalne mreže (Szakonyi in Zelko, 2012),
- delikvescenca je pojav, ko material toliko časa absorbira vlago, da se v absorbirani vodi raztopi in tvori raztopino. Pojav nastopi, ko je parni tlak raztopine, ki se tvori manjši kot parcialni tlak vodne pare v zraku. (Encyclopaedia Britannica, 2014),
- amorfni material lahko zaradi večjega prostega volumna v svoji prostornini sorbira večje količine vode,
- voda se na/v trdno snov veže z vodikovimi vezmi in tvori Van der Waalsove vezi. Če je material ionski, se lahko poveže tudi s kation-voda in anion-voda vezmi (Szakonyi in Zelko, 2012).

2.5 MIGRACIJA VODE

Več avtorjev (Roca in sod., 2006; Roudaur in Debeaufort, 2011; Zhu in sod., 2014) se strinja, da voda močno vpliva na lastnosti končnega izdelka oziroma živila. Da bi v celoti razumeli obnašanje vode, moramo poznati vsebnost vode, način vezave vode v snovi in njen kemijski potencial. Sorpcijska izoterma opisuje razmerje med a_w in vsebnostjo vlage pri konstantni temperaturi. To razmerje je pogojeno z interakcijami med vodo in ostalimi komponentami zmesi. Količina vodne pare, ki jo lahko snov absorbira pri določenih zunanjih pogojih, je odvisna od kemijske sestave, fizikalno-kemijskih lastnosti in fizikalne strukture snovi, na primer od velikosti delcev. Ravno zaradi tega in zaradi razlik v kapilarni strukturi, površini materiala in koligativnih učinkih (znižanje parnega tlaka topila zaradi prisotnosti topljenca; zvišanje vrelišča; znižanje zmrzišča, osmozni tlak) je izoterma sorpcije vode za vsako zmes drugačna (Wathsala, 2014).

Sorpcijska izoterma nam pove, kolikšna bo vsebnost vode v neki snovi pri različnih pogojih skladiščenja. Če hočemo razumeti, kako se bo neka snov obnašala v končnem izdelku, moramo poznati tako njegovo vsebnost vlage kot aktivnost vode.

Pojav najbolje razloži Abramovič (2006) na primeru mešanice dveh snovi v masnem razmerju 1:1, v zaprtem prostoru z neko začetno a_w vrednostjo.



Slika 3: Sorpcijske izotermalne krivulje snovi A in snovi B in razlaga migracije vode (Abramovič, 2006)

Snov A in snov B imamo v zaprtem sistemu. Snov A ima vodno aktivnost a_w 0,65, snov B pa 0,15. Na sliki 3 X_1 predstavlja vsebnost vode snovi B, X_2 pa vsebnost vode snovi B po vzpostavitvi ravnovesja s snovjo A. Snov B je bolj higroskopna, ker ima pri enaki a_w vrednosti višjo vsebnost vode kot snov A. Zaradi kemijskega potenciala vode se bosta vodni aktivnosti izenačili, vsebnost vode obeh snovi v tem ravnotežnem stanju pa bomo odčitali iz sorpcijske izoterme. Tako bomo vedeli, katera snov bo po izenačitvi imela večjo vsebnost nevezane vode.

2.6 MOŽNOST ZNIŽEVANJA AKTIVNOSTI VODE V SNOVI

Obstaja več postopkov za možnost zniževanja vodne aktivnosti oziroma omejevanja migracije vode. Eden najbolj uporabnih tehnoloških postopkov za zniževanje vodne aktivnosti je sušenje oziroma odstranjevanje vode iz živila s postopki sušenja, liofilizacije in dehidracije. Druga možnost je dodatek snovi, ki vežejo vodo in jih imenujemo humektanti.

2.6.1 Humektanti

Humektanti so aditivi, ki jih v živilski tehnologiji dodajamo živilom z namenom stabilizacije in konzerviranja, saj tako znižamo dostopnost vode, ki vstopa v kemijske reakcije oz. omogoča mikrobiološko aktivnost (Abramovič, 2006). So snovi z veliko sposobnostjo vezave vode, zato lahko z njimi uravnavamo aktivnost vode v zmesih (Šegatin, Rudan-Tasič, Poklar Urlih, 2011).

Večini snovem, ki jih imenujemo humektanti, je skupno veliko število hidroksilnih skupin, ki sodelujejo v procesu vezave vode. Humektanti so tudi različne soli, ki vodo vežejo v svojo kristalno mrežo. Najbolj pogosti humektanti v farmaciji so $MgCl_2$, sorbitol, glicerol, propilen glikol in drugi (Ramsey in sod., 2005). V živilstvu pa poleg že omenjenih humektantov uporabljamo še mlečno kislino, fruktozo in saharozo, modificiran škrob in druge (Abramovič, 2006).

2.7 METODE ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE IN NJENE AKTIVNOSTI

Poznamo več vrst metod, s katerimi lahko določimo vsebnost in aktivnost vode v snovi, način vezave vode in sposobnost sprejemanja ali oddajanja vode.

V nalogi smo uporabili več različnih metod in aparaturo, saj smo v pregledu literature ugotovili, da je za ugotavljanje lastnosti vode v snovi potrebno več različnih analiz. Tako smo analizirali vodno aktivnost, vsebnosti vode ter sorpcijske lastnosti izbranih snovi.

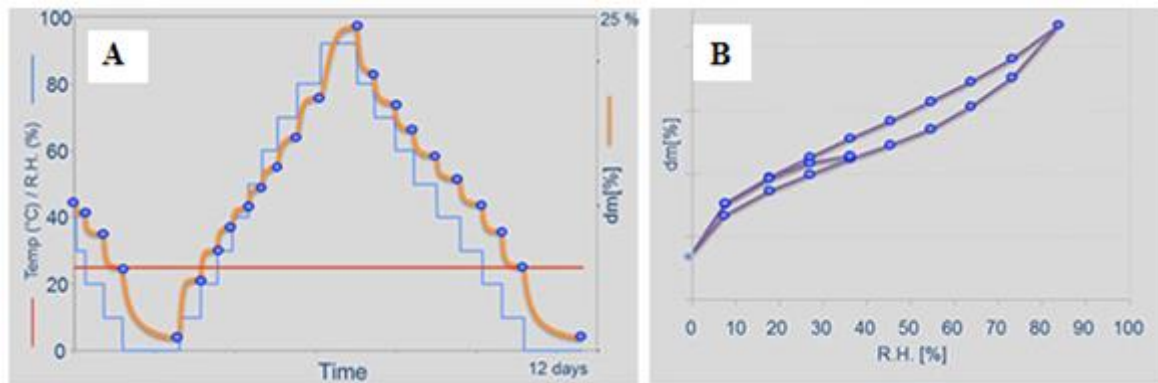
2.7.1 Analizator dinamične sorpcije vode – DVS, SPS

Analizator dinamične sorpcije (Dynamic Water vapour sorption - DVS, Sorption System - SPS) vode je aparat, v katerem vzorec izpostavimo različni relativni vlagi (RV) in temperaturi, ki jih ustvarimo tekom analize, vezavo ali oddajanje vode vzorca pri danih pogojih pa merimo gravimetrično (Mackin in sod., 2002).

Inštrument podatke obdela z ustrezno programsko opremo in jih poda v dveh oblikah:

- v obliki sorpcijske izoterme (slika 4B). Ta krivulja se lahko od prave sorpcijske izoterme nekoliko razlikuje, ker je na abscisi relativna vlaga in ne vodna aktivnost.
- v obliki časovnega diagrama. To je krivulja kinetike sorpcije vode kot funkcije časa (slika 4A) (Kachrimanis in sod., 2006).

DVS in SPS sta analizatorja dinamične sorpcije vode dveh različnih proizvajalcev. Delujeta po enakem principu, nekoliko se razlikujeta le v programski opremi.



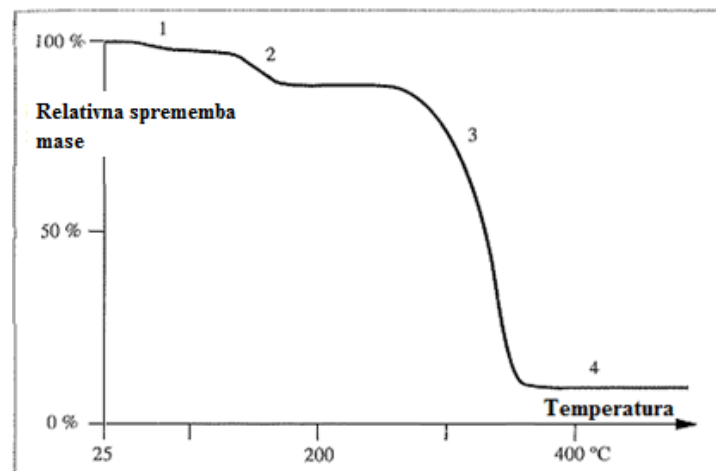
Slika 4: Slika časovnega diagrama (A) in slika sorpcijske izoterme (B), obe v obliki, kot ju izriše analizator dinamične sorpcije vode (ProUmid 2014)

Na sliki 4 sta izrisana časovni diagram (slika A) in sorpcijska izoterma (slika B). Na časovnem diagramu vidimo, koliko časa je potrebno, da vzorec doseže ravnovesje pri določenih pogojih. Ravnovesje doseže takrat, ko se vezava ali oddajanje vode ustavi, kar pomeni, da vzorec več ne sprejema oziroma oddaja vode pri pogojih, ki smo jih določili pri analizi. To na diagramu vidimo tako, da krivulja vezave oziroma oddajanja doseže plato na vsaki stopnji RV. Termični diagram nam podaja časovni potek vezave vode, pri določenih pogojih iz krivulje pa lahko določimo podatke o načinu oziroma hitrosti vezave in oddajanja vode.

Sorpcijska izoterma pridobljena z analizatorjem dinamične sorpcije vode, je krivulja, pri kateri spremljamo spremembo mase snovi v odvisnosti od spremembe relativne vlage pri konstantni temperaturi. Ko vzorec na vsaki stopnji doseže ravnovesje in ne sprejema ali oddaja več vode, program preračuna spremembo mase vzorca na račun sprejete ali oddane vode glede na začetno natehto vzorca. Spremembe mase nato združimo v graf sorpcijske izoterme (ProUmid, 2014).

2.7.2 Termogravimetrična analiza - TGA

Pri termogravimetrični analizi (Thermogravimetric analysis, TGA) ugotavljamo spreminjanje mase vzorca, medtem ko ga segrevamo in ohlajamo z različno hitrostjo in po naprej izbranih temperaturnih korakih. V računalniškem programu aparata lahko nastavimo stopenjsko segrevanje ali ohlajanje vzorca, pri čemer hitrost segrevanja ali ohlajanja in temperaturne stopnje določimo znotraj metode, kar imenujemo dinamična analiza. Lahko pa vzorec vzdržujemo določen čas pri isti temperaturi, kar imenujemo izotermalna analiza.



Slika 5: Tipični termogram termogravimetrične analize (Mettler Toledo, 2001)

S TGA-analizo lahko spremljamo spremembo mase vzorca zaradi razpada snovi, izgube hlapnih snovi, desorpcije vode, določimo lahko odstotek pepela, oksidacijo, dekarboksilacijo in podobno. Na sliki 5 je prikazan termogram, ki velja za teoretični vzorec, ki ga segrevamo ali ohlajamo z različno hitrostjo po različnih temperaturnih korakih. Na krivulji pri oznaki 1 opazujemo izhajanje hlapnih komponent, pri oznaki 2 izhaja kristalno vezana voda, pri oznaki 3 pa že pride do razpada snovi. Na območju, označenem s številko 4, opazujemo ostanek (pepel, polnila, saje), ki nastanejo pri razgradnji ali razpadu (Mettler Toledo, 2001). V našem delu smo se osredotočili na opazovanje desorpcije vode, določili smo tudi delež proste in vezane vode.

2.7.3 Aparat za merjenje vodne aktivnosti

Vodno aktivnost merimo na osnovi določitve temperature rosišča s pomočjo ohlajanja zrcala. Med analizo iz vzorca zaprtega v zatesnjeni komori, izpareva vodna para, dokler se ne vzpostavi ravnotežje. Ko je vzpostavljeno ravnotežje, je relativna vlaga v komori enaka vodni aktivnosti v vzorcu. V komori je nameščeno ogledalo, ki se ohlaja in detektor, ki zazna začetek kondenzacije vodne pare na ogledalu.

V aparatu se temperatura zrcala natančno kontrolira s termoelektričnim (Peltier) elementom za hlajenje. Žarek svetlobe je usmerjen na zrcalo in se odbija na fotodetektor, ki zazna spremembo v odboju, ko se začne na zrcalu kondenzirati vlaga; termočlen, povezan z zrcalom zabeleži temperaturo, pri kateri pride do kondenzacije. Aparat nato odda zvočni signal in na zaslonu se prikaže končna aktivnost vode vzorca (AquaLab..., 2014).

2.7.4 Svetlobni mikroskop

Svetlobni mikroskop je optični instrument, ki nam s pomočjo sistema leč nameščenih v isto optično os in v točno določeni medsebojni razdalji poveča zorni kot vzorca.

2.7.5 Vrstični elektronski mikroskop – SEM

Elektronski mikroskop (Scanning electron microscop, SEM) je mikroskop, ki za »osvetlitev« vzorca uporablja fokusiran elektronski curek. Valovna dolžina elektronov je precej manjša od valovne dolžine bele svetlobe, zato ima tak mikroskop boljšo resolucijo kot optični mikroskop in tako lahko opazujemo topografijo/morfologijo submikronskih delcev. Elektroni se iz vira elektronov (katoda) zaradi velike razlike v napetosti med katodo in anodo pospešijo proti vzorcu, curek elektronov pa oblikujemo z uporabo magnetnih leč in zaslonk. Med vpadnim elektronskim snopom in površino vzorca pride do številnih fizikalnih pojavov (emitirajo se nizkoenergijski sekundarni elektroni, visokoenergijski odbiti elektroni, fotoni, rentgenski žarki), ki jih detektiramo in prevedemo v sliko. Interakcije elektronov z atomi vzorca nam tako podajo informacije o topografiji, morfologiji in deležu posameznega elementa v vzorcu (Goldstein in sod., 2007).

2.7.6 Laserska difrakcija – PSD

Z instrumentom (particle size distribution, PSD) merimo velikost delcev na osnovi difrakcije laserskega žarka. Vzorec dispergirani v primernem mediju ali toku zraka, teče skozi celico in prečka žarek monokromatske svetlobe, ki izvira iz laserja. Delci sipajo svetlobo pod različnimi koti. Kot, pod katerim delci sipajo svetlobo je obratno sorazmeren z velikostjo delca. Sistem detektorjev zaznava vzorce sipane svetlobe, ki jih pripadajoči programi pretvorijo v volumsko porazdelitev velikosti delcev.

Sistem izmerjene vrednosti aplicira na obliko krogle. Velikost delcev je v tem primeru določena s premerom ekvivalentne krogle, ki ima enake lastnosti (volumen, maso, površino,...) kot merjeni delec. Sistem poda rezultate v obliki histograma, numerično pa rezultate opiše z naslednjimi parametri:

- D [4, 3] – volumsko povprečje izmerjenih vrednosti,
- d(0.1) – 10 % delcem ima manjši premer od tega [μm],
- d(0.5) – 50 % delcev ima večji/manjši premer od tega [μm],
- d(0.9) – 90 % delcev ima manjši premer od tega [μm] (Brittain, 2001).

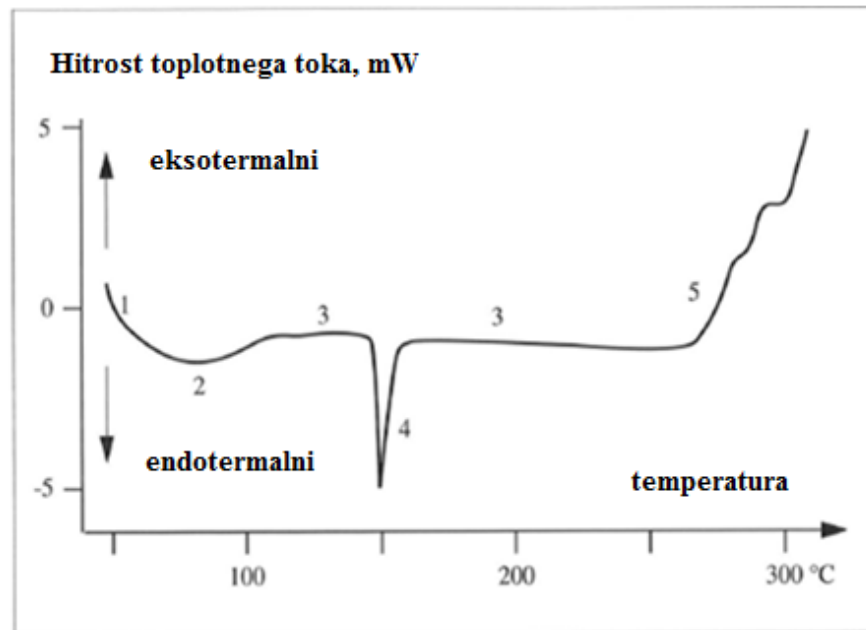
2.7.7 Rentgenska praškovna difrakcija - XRPD

Rentgenska praškovna difrakcija (X-ray Powder Diffraction, XRPD) je temeljna metoda za strukturno karakterizacijo trdnih vzorcev, ki so lahko homogeni (pomožne snovi, učinkovine) ali heterogeni (tablete, pelete ...). Metoda temelji na zaznavanju periodične urejenosti kristalov na osnovi sipanja in interference rentgenski žarkov. Rentgensko praškovno difrakcijo uporabljamo za določevanje strukture (omogoča identifikacijo različnih polimorfnih oblik, amorfnе faze, solvatov in hidratov v trdnem stanju in karakterizacijo polimerov), kvantitativno analizo (vsebnost posamezne kristalne ali amorfnе faze v vzorcu), določevanje mikrostrukturnih lastnosti vzorca (oblika, velikost in distribucija velikosti osnovnih kristalitov, mikrodeformacije, dislokacije in druge oblike kristalnih napak), za določevanje sprememb v kristalni strukturi in študije polimorfizma (spremljanje sprememb v obliki ob spremembi temperature in RV, spremljanje sprememb oblike v suspenziji oz. pri raztapljanju) ter za 3D-analizo vzorcev na osnovi CT-tehnike (X-ray tomografija) (Goldstein in sod., 2007).

2.7.8 Diferenčna dinamična kalorimetrija - DSC

Diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential scanning calorimetry, DSC) je metoda, pri kateri merimo toploto (energijo), ki je potrebna, da se vzpostavi ničelna temperaturna razlika med preiskovanim vzorcem in inertno referenco, pri čemer sta tako vzorec kot referenca izpostavljena identičnemu temperaturnemu režimu v kontrolirani atmosferi, ki jo kontrolirano segrevamo ali ohlajamo (Mettler Toledo, 2001).

Na sliki 6 je DSC termogram s temperaturo na abscisi in hitrostjo toplotnega toka ($mW = mJ/sec$) na ordinati. Toplotni tok nam pove, ali gre za eksotermni (krivulja se pomakne proti pozitivnim vrednostim) ali endotermni (krivulja se pomakne proti negativnim vrednostim) proces. Na točki označeni s številko 1 vidimo začetno deformacijo krivulje, ki je proporcionalna toplotni kapaciteti vzorca. Točka 2 predstavlja izhajanje vode iz vzorca, v točki 3 ni termalnih efektov (bazna krivulja), v točki 4 pa nastopi talilni vrh (snovi določimo temperaturo tališča). V točki 5 opazujemo začetek oksidacije v atmosferi.



Slika 6: Tipični DSC termogram (Mettler Toledo, 2001)

2.7.9 Določanje vsebnosti vode s sušenjem – LOD

Aparat (Loss on drying, LOD) meri spremembo mase vzorca po sušenju s pomočjo halogenskih svetil pri izbrani temperaturi. Med sušenjem s tehtanjem opazujemo zmanjševanje mase vzorca zaradi oddajanja vode ali drugih hlapnih komponent (Mettler Toledo, 2009).

2.8 ZNAČILNOSTI PREUČEVANIH SNOVI

2.8.1 Farmacevtski koruzni škrob

Škrob je polisaharid rastlinskega izvora, nahaja se predvsem v gomoljih rastlin (krompir) in v endospermu semen (koruza) ter žit. Rastline izrabljajo škrob kot rezervni material, saj se del škroba s pomočjo encimov razgradi v glukozo, ki jo celica potrebuje za lastno presnovo, pridobivanje energije in sintezo drugih snovi, ostanek pa se shranjuje in je v nativni obliki shranjen v škrobnih granulah. Shranjeni škrob se porabi pri razvoju novih rastlin. Škrob je na splošno sestavljen iz dveh podenot, visoko razvejanega amilopektina (70-80 %) in lineranih molekul amiloze (20-30 %) (Baldwin, 2001).

Sestava, lastnosti in funkcionalnost škroba je odvisna od različnih botaničnih virov. Izbira primerne vira škroba zato temelji na fizikalni karakterizaciji, sposobnosti vezave, lastnosti granulacije in dizintegracije (Heinemann in sod., 2004). Škrobno zrno je sestavljeno iz tvornega centra v obliki kroglice na sredini zrna, okrog njega pa se nalagajo škrobni sloji, ki jih opazimo kot svetlejša in redkejša plastja z več vode in temnejša, bolj

goste plasti z manj vode (Šircelj, 2004). Škrobna zrna so v vsaki rastlini tako specifična, da njihova oblika lahko služi za identifikacijo nativnega škroba (Škrabanja, 2005). Zrna se razlikujejo po obliki in velikosti in so lahko velika od 2 μm do 170 μm . Ločimo jih tudi glede na položaj tvornega centra in so lahko koncentrična (metuljnice in trave) ali ekscentrična (krompir) lahko pa imajo tudi več tvornih centrov, pri čemer govorimo o sestavljenih škrobnih zrnih (oves) (Šircelj, 2005).

Enostavno koncentrično škrobno zrno	Enostavno ekscentrično škrobno zrno	Sestavljeno škrobno zrno	Polsestavljeno škrobno zrno
			
pšenica	krompir	oves	krompir

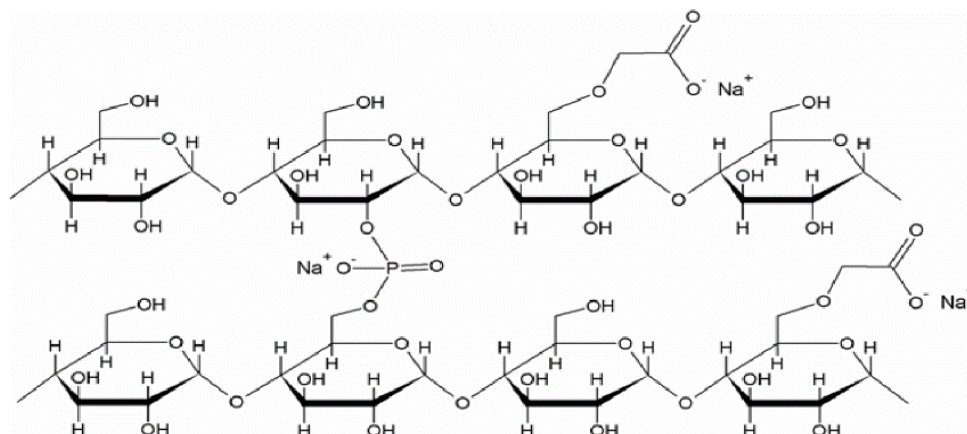
Slika 7: Oblike škrobnih zrn glede na položaj tvornega centra (Šircelj, 2005)

Škrob pod vplivom vode in visoke temperature izgubi svojo semi-kristalinično strukturo, kar imenujemo želiranje oziroma nabrekanje škroba. S tem se poveča prebavljivost škroba, med samim procesom pa veže večjo količino vode, pri čemer se poveča tudi njegova prostornina in posledično nabrekne. Geliranje poteče v več stopnjah. Med segrevanjem amorfnih del molekule veže vodo, pod vplivom temperature pa voda vstopi v kristalinične regije molekule, zaradi česar se kristalinična struktura poruši in preide v amorfno. Pri ohlajanju želatinastega škroba ta preide iz amorfne ponovno v bolj kristalinično obliko, pri čemer pride do ponovnega združevanja dvojne vijačnice amiloze in amilopektina, kar imenujemo retrogradacija škroba (Coral in sod., 2009).

Koruzni škrob je eden izmed prvih pomožnih snovi, ki jih pogosto uporabljamo v farmacevtski in živilski industriji. Uporablja se kot zgoščevalec, stabilizator, gelirno sredstvo in polnilo v živilski industriji ter kot polnilo, vezivo, razgrajevalo v farmaciji (Heinemann in sod., 2004).

2.8.2 Natrijev karboksimetilškrob, NKMS

Primojel je komercialno ime za modificiran škrob, ki je izdelan s karboksi-metilacijo krompirjevega škroba. Produkt je prašnat in sipek prah bele barve. Tako obdelan škrob, lahko veže tudi do 20-kratno količino vode. V farmaciji se uporablja kot pomožna snov zaradi hitre penetracije vode v trdne farmacevtske oblike, dobre zmožnosti geliranja in hitre dezintegracije. Vse te lastnosti so pogojene z botaničnim virom škroba (različne sorte krompirja), stopnjo zamreženosti in s stopnjo substitucije – metilacije) (Primojel Productsheet. 2011).



Slika 8: Strukturna formula natrijevega karoboksimetilškroba (Primojel Productsheet. 2011)

2.8.3 Dodatki

V nalogi smo uporabili še različne pomožne snovi, ki smo jih uporabili za študij migracije vode in jih v živilski in farmacevtski industriji uporabljamo v različne namene.

Sukraloza je nekalorično umetno sladilo, kemijsko pa je klorirana saharoza, ki je kar 600-krat slajša. V živilski industriji se uporablja kot sladilo, v farmacevtski industriji pa kot termostabilno polnilo (Al Deeb in sod., 2013).

Krospovidon je zamrežen polivinil N-pirolidon (PVP) in se zaradi dobre higroskopnosti uporablja v tabletah kot dezintegracijsko sredstvo, kar pomaga pri topnosti le-te in tudi boljše razpoložljivosti aktivne farmacevtske učinkovine v tableti (Nakanishi in sod., 2011).

Sorbitol je sladkorni alkohol, ki je okoli 40 % manj sladek kot sukraloza. V živilski industriji se uporablja kot nadomestek sladkorja, v farmacevtski industriji pa se zaradi dobrih higroskopskih lastnosti uporablja kot humektant in zgoščevalo (Kearsley in Deis, 2007).

3 MATERIALI IN METODE

Magistrsko delo smo opravljali v Krki, tovarni zdravil d. d. Novo mesto, v sektorju za Razvoj in Raziskave, na Oddelku za strukturne analize.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Osnovni vzorci

V eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje vzorce:

- koruzni škrob (Grain Processing Corporation);
- NKMS (DFE pharma).

3.1.2 Dodatki

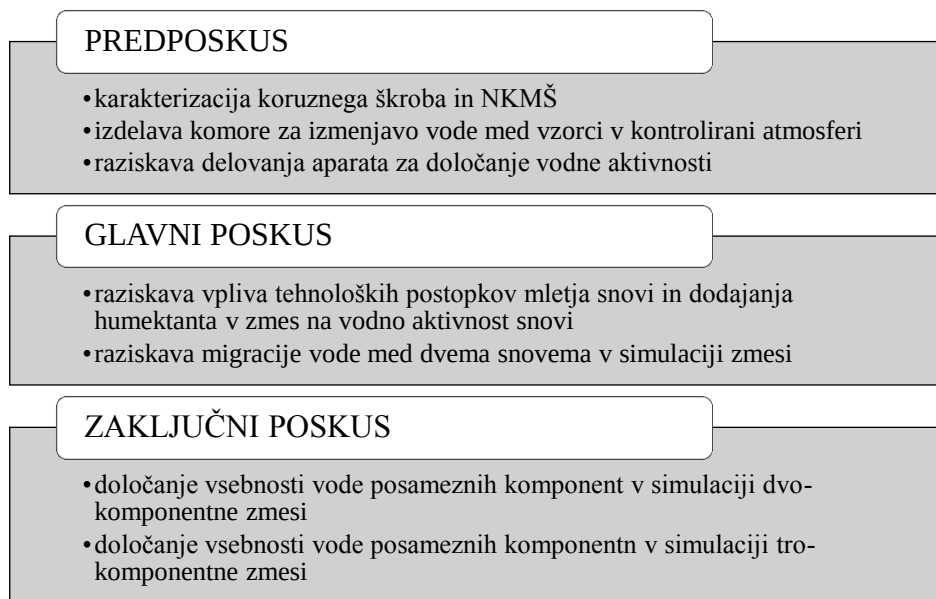
V eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje dodatne snovi:

- sukraloza (Grain Processing Corporation),
- Krospovidon (Ashland),
- sorbitol (PharmSorbitol P 16656),
- zdravilno učinkovino 1, ki ob stiku z vodo prehaja iz kristalinične v amorfno obliko,
- zdravilno učinkovino 2, ki velja za zelo higroskopsko učinkovino.

3.2 NAČRT DELA

V poskusu smo uporabljali predvsem komercialne vzorce polimernih snovi, analizirali pa smo jih s širokim izborom metod, dostopnih na Oddelku za strukturne analize v Krki d. d. Želeli smo izbrati najbolj optimalen način določanja vsebnosti vode v snoveh in njeno migracijo med različnimi snovmi.

V okviru eksperimentalnega dela naloge smo želeli kvalificirati in kvantificirati migracijo vode v različnih zmesih, zato smo v prvi fazi eksperimenta raziskali področje vsebnosti in aktivnosti vode. Eksperimentalni del smo ločili na predposkus, glavni in zaključni poskus. Shema eksperimenta je prikazana na sliki 9.



Slika 9: Shema poskusa razdeljenega na predposkus, glavni in zaključni poskus

Predposkus je zajemal karakterizacijo vzorcev, naštetih na sliki 9, s čimer smo spoznali vpliv kemijskih, predvsem pa fizikalnih lastnosti na interakcijo snovi z vodo. Analizirali smo velikost in morfologijo delcev vzorcev koruznega škroba in NKMS, njihove sorpcijske lastnosti, vsebnost vode in vodno aktivnost.

V drugem delu predposkusa smo oblikovali in izdelali komoro za opazovanje prehoda vode med snovmi, ki smo jo konstruirali tako, da zagotavlja nepredušne pogoje za izmenjavo vlage med vzorci. Raziskali smo princip delovanja aparata za določanje aktivnosti vode, ki je bil osnovni aparat za določanje migracije vode med snovmi.

Glavni poskus smo ločili na raziskavo vpliva tehnoloških postopkov na vodno aktivnost snovi. Preveril smo vpliv velikosti delcev na vodno aktivnost tako, da smo vzorce mleli na krogličnem mlinu. Pripravili smo eksperiment, v katerem smo preverili vpliv magnezijevega klorida v vlogi humektanta, ki naj bi znižal vodno aktivnost zmesi, v katero vstopa (FAO/WHO, 2014).

V drugem delu smo po principu vodne aktivnosti raziskovali migracijo vode med dvema snovema tako, da smo vzorce z različnimi vodnimi aktivnostmi nepredušno zaprli v komoro za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi, pri čemer smo simulirali realno dvo-komponentno zmes. Komponentama, ki sta predstavljali zmes v komori smo sorpcijo oziroma oddajanje vode med njima določili s termogravimetrično analizo.

Migracijo vode med snovmi smo opazovali tudi s simulacijo različnih zmesi, pri čemer smo določali končne vsebnosti vode glede na sorpcijsko izotermo vsake snovi večkomponentne formulacije po tem, ko se je v formulaciji vzpostavilo ravnovesje zaradi

termodinamičnega principa vodne aktivnosti. Metodo smo preverili s termogravimetrično analizo in jo vpeljali v dvokomponenten in trikomponenten sistem.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Analizator dinamične sorpcije vode, DVS, SPS

Pred začetkom analize smo v operacijskem sistemu aparata nastavili želene pogoje analize. Nastavili smo temperaturo in stopnje relativne vlage katerim smo želeli izpostaviti vzorce. Vzorce smo natehtali v aluminijaste lončke, ki smo jih predhodno temeljito očistili z destilirano vodo in acetonom ter jih sušili pri temperaturi okoli 75 °C z namenom zagotavljanja čim bolj točnih rezultatov.

Prazne lončke smo postavili v samodejni vzorčevalnik aparata, zaprli pokrov in počakali, da so se vzpostavili delovni pogoji. Potem smo izničili mase lončkov s pritiskom na gumb Tara na tehtnici ter nanje nanesti vzorce. Po vzorčenju smo aparat zaprli, preverili nivo vode v rezervoarju aparata in pričeli z analizo.



Slika 10: Analizator dinamične sorpcije vode – med analizo z vidnim samodejnim vzorčevalnikom

Uporabili smo dve metodi. Osnovno metodo smo izvedli na koruznem škrobu tako:

- začetek analize: 50 % relativne vlage (RV), čas izpostavljenosti pogojem: do vzpostavitve ravnotežja oziroma maksimalno 12 ur,
- sorpcija vode do 85 % RV s po 5 % višanjem RV,
- desorpcija do 0 % RV s po 5 % nižanjem RV,
- sorpcija do 50 % RV s po 5 % višanjem V.

Opis hitrejše metode za vzorce NKMS, ZU2 s počasno sorpcijo:

- začetek analize: 50 % RV, čas izpostavljenosti pogojem: do vzpostavitve ravnotežja oziroma maksimalno 12 ur,
- desorpcija vode do 0 % RV s po 10 % nižanjem vlage,
- sorpcija do 80 % RV s po 10 % nižanjem vlage,
- desorpcija do 50 % RV s po 10 % višanjem vlage.

3.3.2 Termogravimetrična analiza, TGA

Vzorec smo natehtali v aluminijasti lonček in ga v stiskalnici nepredušno zaprli zato, da vzorec ni bil izpostavljen laboratorijskim pogojem zračne vlage in temperature, med tem ko je čakal na vzorčevalniku na analizo. Postopek zapiranja lončka smo prikazali na sliki 11. Robotska roka je tik pred začetkom analize lonček preluknjala z iglo.

Lonček smo položili na izbrano mesto na avtomatskem vzorčevalniku ter nadaljevali s programom aparata. Vzorce smo analizirali pri začetni temperaturi 25 °C in jih segrevali do največ 250 °C.

Vzorce smo analizirali z dinamično metodo pri temperaturah od 25 °C do 220 °C in izotermalno metodo pri 85 °C.



Slika 11: Priprava vzorca na TGA analizo: zapiranje aluminijastega lončka v stiskalnici

3.3.3 Aparat za merjenje vodne aktivnosti

Vzorec smo natresli v plastične analitske lončke za enkratno uporabo. Vzorčili smo v takšni količini, da je vzorec zasedel tri četrtine prostornine lončka. Vzorec smo postavili v merilo komoro aparata in zaprli pokrov. Izbrali smo metodo konstantnega merjenja, ki je merila vodno aktivnost vzorca toliko časa, dokler se v komori ni vzpostavilo ravnotežje z natančnostjo $\pm 0,001 a_w$ v petih ponovitvah, aparat je nato shranil zadnji izmerjeni rezultat.

Določitev vodne aktivnosti koruznega škroba smo ponovili 15krat pri enaki temperaturi in relativni vlagi okolja. Koruznemu škrobu smo tako določili povprečno vrednost vodne aktivnosti na 0,471 z absolutno napako 0,01 na podlagi, katere smo zaključili, da lahko

rezultate vodne aktivnosti določamo na dve decimalni mesti natančno. Podobno natančno navajanje rezultatov smo zasledili tudi pri pregledu literaturnih podatkov, ki smo jih navajali v tem delu.

3.3.4 Komora za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi

Neprodušno zaprta komora je omogočala kontrolirano izmenjavo vode med različnimi vzorci po principu zakona o termodinamiki. Izmenjava vode med vzorci je v komori potekala toliko časa, dokler se ni vzpostavilo ravnotežje, kar smo potrdili na podlagi preliminarne eksperimentov pri katerih smo spremljali vsebnost vode posameznih vzorcev v določenih časovnih točkah. Vzorcem smo izmerili vodno aktivnost, s termogravimetrično analizo pa smo jim določili odstotek nevezane vode. V aluminijaste analitske lončke TGA analize smo natehtali oba analizirana vzorca in ju za teden dni združili v neprodušni komori, ki je omogočala migracijo vode. Po enem tednu smo vzorcem ponovno določili vsebnost vode in opazovali spremembo zaradi vzpostavitve ravnotežja v komori.

3.3.5 Svetlobni mikroskop

Kapljico vzorca v silikonskem olju smo nanesti na objektno steklo in pokrili s krovnim steklom. Tako pripravljene vzorce smo opazovali pod različnimi povečavami. Sliko smo s pomočjo kamere mikroskopa opazovali na ekranu, podatke pa statistično obdelali s pripadajočo programsko opremo AnalySIS, s katero smo določili velikost delcev z različnimi metodami štetja in meritev. Na koncu je instrument podal rezultate v obliki Excelove tabele s povprečno velikostjo in standardnim odklonom. Vezavo vode koruznega škroba in NKMS smo ovrednotili po podobnem principu, le da smo za medij uporabili destilirano vodo.

3.3.6 Vrstični elektronski mikroskop, SEM

Vzorce smo pripravili tako, da smo na aluminijasti nosilec nalepili samolepilno prevodno karbonsko folijo ter nanjo nanesti vzorec. Vzorec smo nanesti v tanki plasti, čim bolj enakomerno, in na koncu še otresli odvečno količino vzorca iz nosilca. Vzorec smo vstavili v brezračni prostor instrumenta, analizo pa nadaljevali s programom ULTRA PLUS-45-01 NTS SmartSEM, s katerim smo kreirali sliko in prilagajali pogoje snemanja. Na slikah posnetih z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali morfologijo delcev.

3.3.7 Laserska difrakcija, PSD

Za določitev velikosti delcev smo ustrezno količino vzorca (2-8 g) stresli na pladenj celice, celico zaprli in nastavili ustrezne parametre metode (tlak, pretok, rezo). Vzorec smo merili

z metodo v toku zraka. Valovna dolžina rdeče svetlobe je 632,8 nm, valovna dolžina modre svetlobe pa 470 nm.

3.3.8 Rentgenska praškovna difrakcija, XRPD

Pri določanju kristalnih oblik vzorcev smo ustrezno količino vzorca natresli na železni nosilec in ga vstavili v vzorčevalnik difraktometra. V računalniškem programu X`Pert Highscore Plus smo določili pogoje analize in vzorec posneli z bakrovo svetlobo ($\text{CuK}\alpha$) valovne dolžine $\lambda=1,54174 \text{ \AA}$.

3.3.9 Diferenčna dinamična kalorimetrija, DSC

Majhno količino vzorca ($\sim 3 \text{ mg}$) smo natehtali v analitski aluminijasti lonček in ga postavili na avtomatski vzorčevalnik. Izbrali smo hitrost snemanja $50 \text{ }^\circ\text{C/min}$ v širokem temperaturnem območju $25 \text{ }^\circ\text{C} - 300 \text{ }^\circ\text{C}$ ter zagnali meritev.

3.3.10 Kroglični mlin Retch

Koruzni škrob in NKMŠ smo mleli na krogličnem mlinu s horizontalnim mešanjem mlevne posode, v katero smo skupaj z vzorcem zaprli kroglo. Krogla je med frekvenčnim vibriranjem mlina drobila delce mlete snovi. Vzorce smo mleli 10 minut pri frekvenci 20 Hz. Po mletju smo vzorce 6 ur izpostavljali sobnim pogojem ($23 \text{ }^\circ\text{C}$, 55 % RV) in še 3 dni na enakih pogojih ter opazovali spremembo vodne aktivnosti vzorcev.

3.3.11 Izguba vode pri sušenju, LOD

Vzorec smo natehtali v analitski aluminijasti lonček in ga postavili na nosilec aparata za določanje izgube vode pri sušenju. Nosilec smo skupaj z lončkom položili na tehtnico ter izničili njegovo maso s pritiskom na gumb Tara na tehtnici. Vzorec smo natehtali v lonček in spremljali ustreznost natehte na ekranu tehtnice. Izbrali smo metodo sušenja z ustrezno temperaturo, ki smo jo povzeli glede na rezultat sušenja, ki smo ga določili s TGA analizo, $85 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorec smo sušili do ravnotežne mase ($\pm 0,0005 \text{ g}$), instrument pa je rezultat izpisal kot odstotek vode v vzorcu.

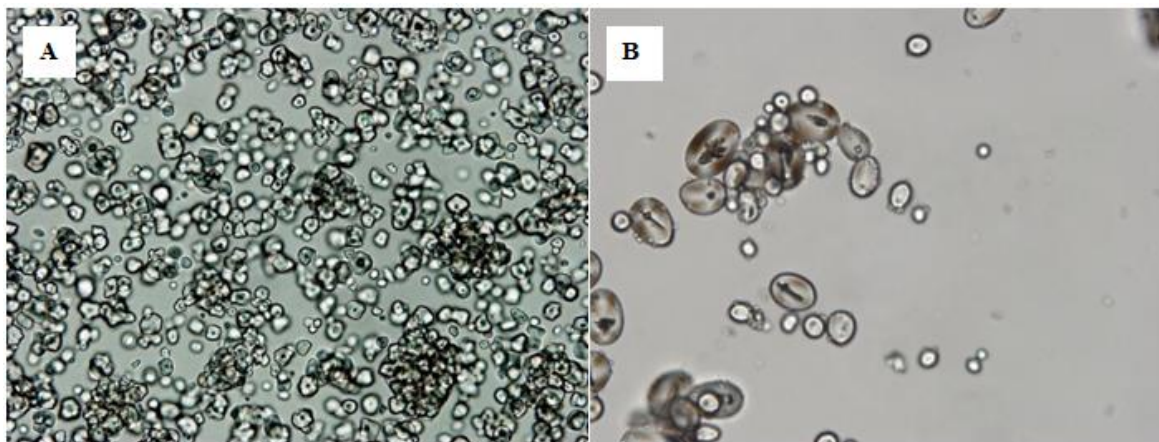
4 REZULTATI

4.1 KARAKTERIZACIJA KORUZNEGA ŠKROBA IN NKMS

Pred začetkom analize zmesi smo podrobno okarakterizirali lastnosti posameznih pomožnih snovi, ki vstopajo v zmes, da bi razumeli vpliv strukture snovi na vodno aktivnost in vsebnost vode.

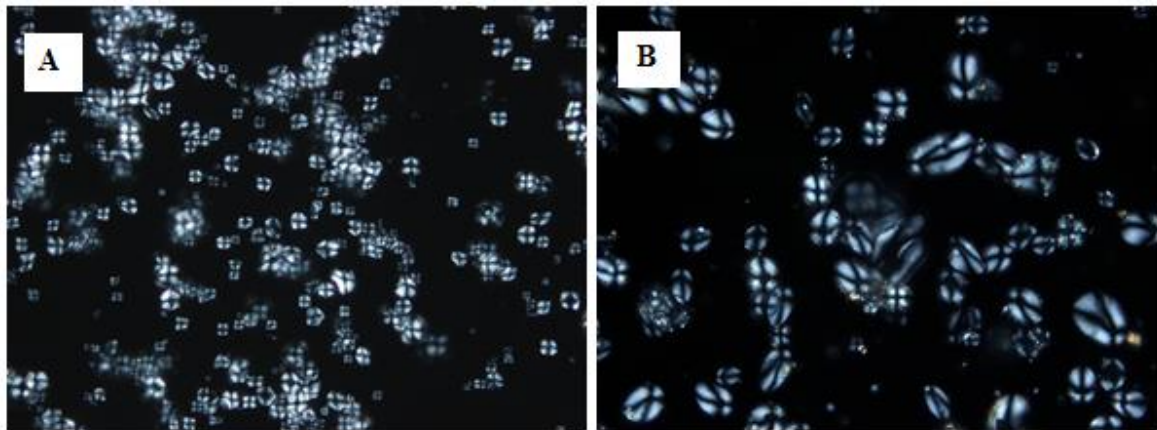
4.1.1 Oblika in velikost delcev koruznega škroba in NKMS

Iz posnetkov delcev koruznega škroba pod svetlobnim mikroskopom na sliki 12 smo razbrali obliko škrobne zrna tipa enostavne ekscentrične oblike z značilnim tvornim centrom v sredini. Na sliki pod 40-kratno povečavo je bilo videti način nastajanja škrobne zrna, ki raste z ekscentričnimi krogi plasti škroba iz tvornega centra na sredini proti zunanosti zrna. Plasti so bile relativno dobro opazne predvsem zaradi variiranja vode v škrobu med nalaganjem v zrno (Šircelj, 2005). Pri NKMS smo prav tako določili škrobno zrno tipa enostavne ekscentrične oblike z značilnim tvornim centrom pomaknjnim proti robu zrna (Šircelj, 2005).



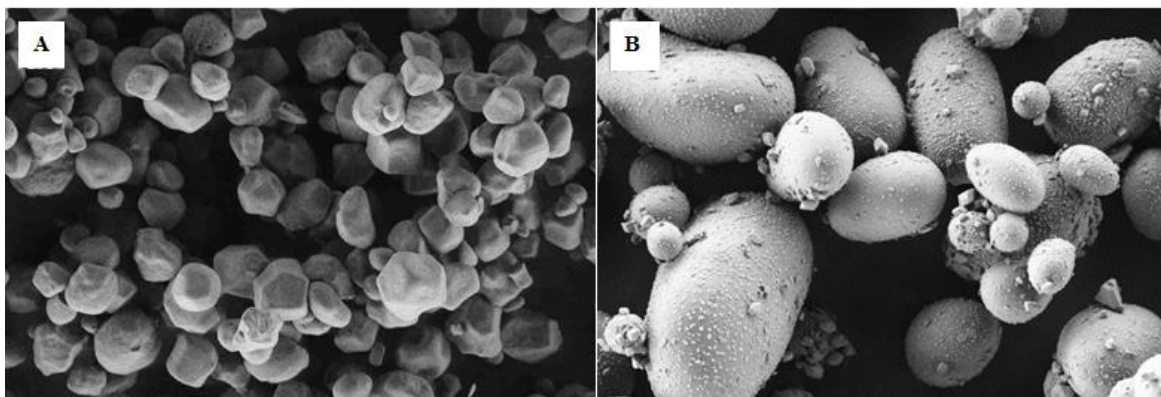
Slika 12: Posnetek koruznega škroba (A) in NKMS (B) pod svetlobnih mikroskopom pod 40-kratno povečavo

Ko smo prilagodili svetlobo na mikroskopu na polarizirajočo svetlobo, smo lahko na sliki 13 opazovali semi-kristalinično strukturo koruznega škroba in NKMS. Kristalinične regije so se svetlikale na črni podlagi.



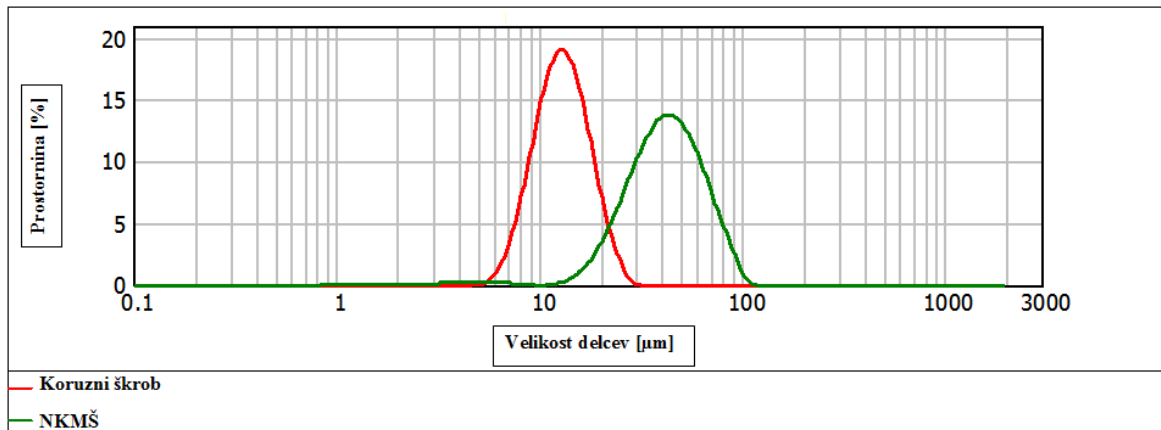
Slika 13: Posnetek koruznega škroba (A) in NKMS (B) pod svetlobnim mikroskopom s polizirajočo svetlobo, pod 40-kratno povečavo

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo na sliki 14 opazovali površino škrobnega zrna, ki je bila gladka brez površinsko vidnih por in anomalij. Delci NKMS so bili sferičnih oblik in večje velikosti v primerjavi s koruznim škrobom.



Slika 14: Posnetek koruznega škroba (A) in NKMS (B) pod elektronskim vrstičnim mikroskopom, 2000-kratna povečava

Velikost delcev smo določili na osnovi laserske difrakcije. Zaradi relativno ozke unimodalne krivulje koruznega škroba (krivulja rdeče barve), ki prikazuje volumsko porazdelitev velikosti delcev na sliki 15, smo sklepali na ozko distribucijo velikosti delcev, ki so bili velikosti od okoli 5 μm do 30 μm . V povprečju so bili delci velikosti premera 13 μm , 10 % delcev je bilo manjših od 9 μm , 50 % delcev je bilo večjih oziroma manjših od 13 μm in 90 % delcev je bilo manjših od 19 μm . NKMS smo določili nekoliko širšo distribucijo velikosti delcev v primerjavi s koruznim škrobom, kar vidimo na sliki 15 (krivulja zelene barve), delci pa so bili v povprečju večji in porazdeljeni med nekaj μm do približno 100 μm . Iz preglednice 2 razberemo, da so bili delci NKMS v povprečju velikosti premera 44 μm , 10 % delcev je bilo manjših od 23 μm , 50 % delcev je bilo večjih oziroma manjših od 42 μm in 90 % delcev je bilo manjših od 70 μm .



Slika 15: Distribucija porazdelitve velikosti delcev koruznega škroba in NKMS določena z lasersko difrakcijo

Preglednica 2: Porazdelitev velikosti delcev koruznega škroba in NKMS

	D [4, 3] µm	d (0.1) µm	d (0.5) µm	d (0.9) µm
Koruzni škrob	13	9	13	19
NKMS	44	23	42	70

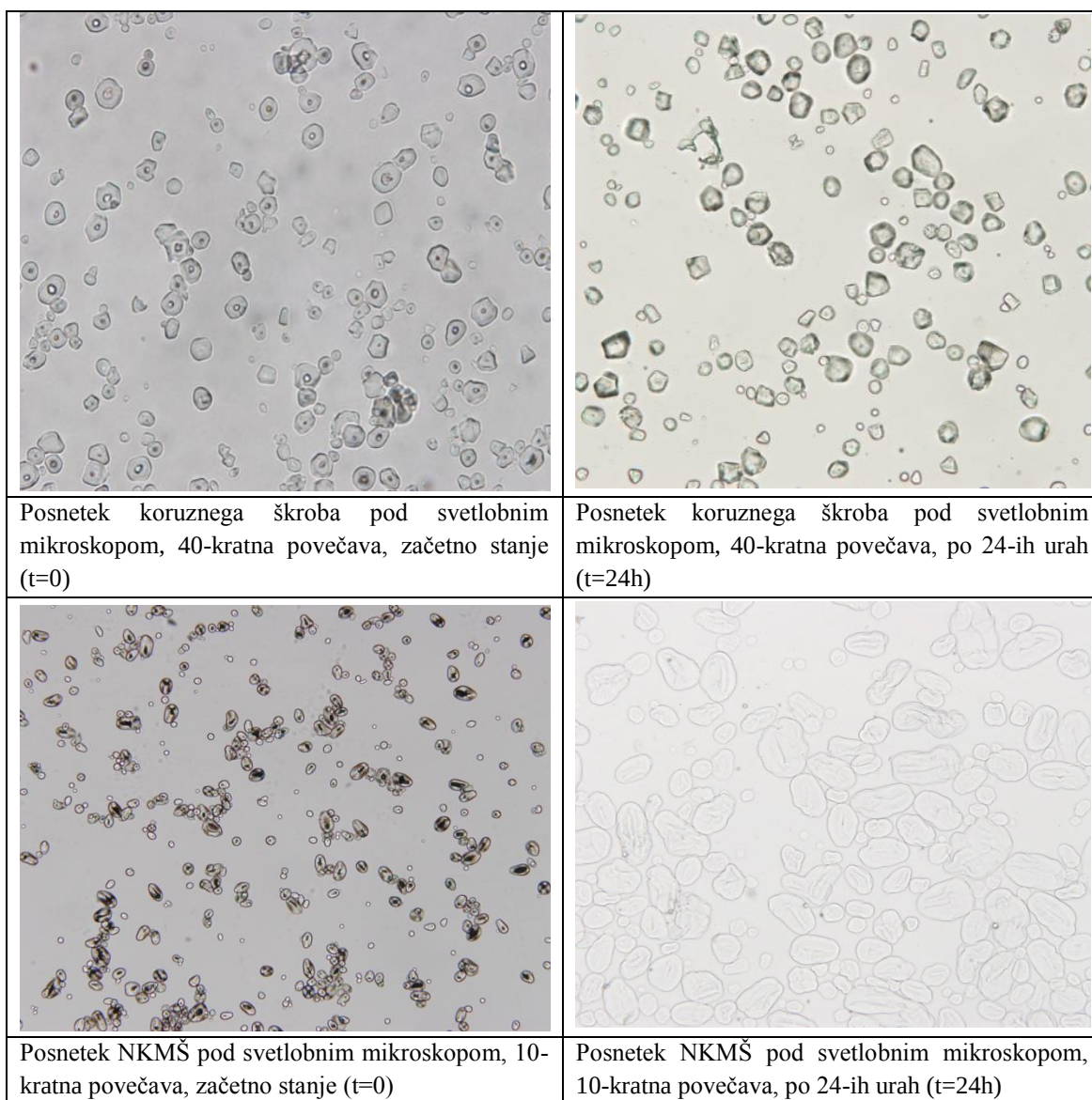
D [4, 3] – volumsko povprečje izmerjenih vrednosti; d (0.1) – 10 % delcem ima manjši premer od tega [µm]; d (0.5) – 50 % delcev ima večji/manjši premer od tega [µm]; d (0.9) – 90 % delcev ima manjši premer od tega [µm]

4.1.2 Sorpcijske lastnosti delcev koruznega škroba in NKMS

Opazovali smo, na kakšen način material veže vodo in poskušali ugotoviti, kakšen je način sorpcije - v strukturo snovi ali adsorpcija na površino snovi tako, da smo škrobna zrna 24 ur namakali v destilirani vodi.

Posnetki koruznega škroba v destilirani vodi so prikazani na sliki 16. Velikost delcev smo izmerili z računalniškim programom v sklopu svetlobnega mikroskopa, podatke smo zbrali v preglednici 3. Velikost delcev koruznega škroba je po 24-ih urah v destilirani vodi ostala enaka, kar pomeni, da delci niso nabrekli zaradi vezave vode v strukturo. Koruzni škrob torej pri sobnih pogojih ne sprejema vode v svojo strukturo, ampak se le-ta adsorbira na površino.

Na isti sliki je razvidno, da se je, za razliko od koruznega škroba, NKMS na račun vezane vode v 24-ih urah povečal za 4-krat. Povprečna velikost delcev je bila ob času nič 35 µm. Rezultati so se razlikovali od PSD analize zaradi drugačnega načina merjenja in podajanja rezultatov (druga analizna tehnika) in so zbrani v preglednici 3.



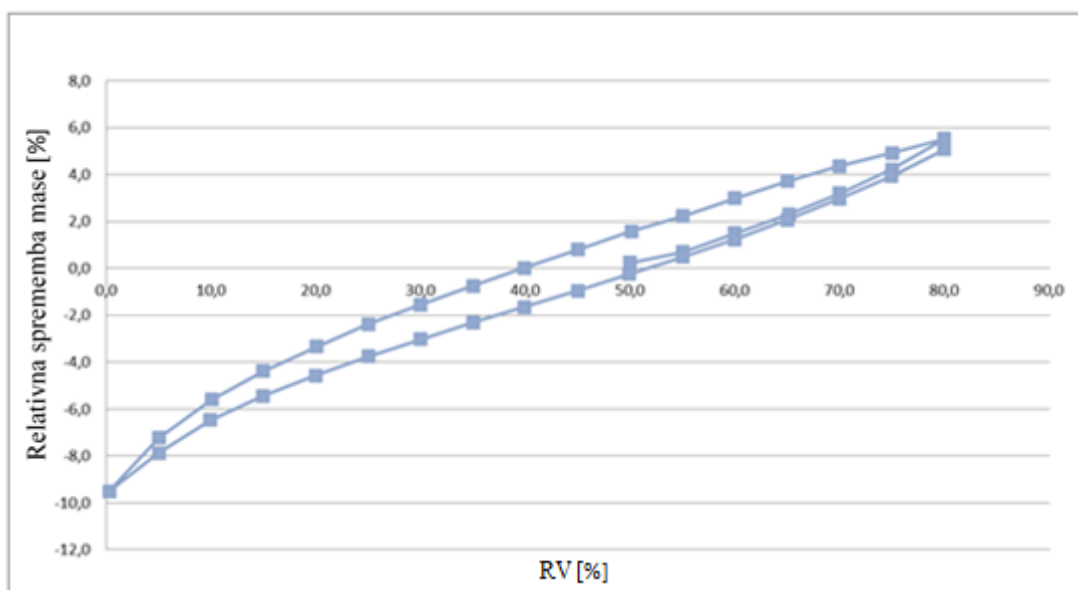
Slika 16: Posnetki koruznega škroba in NKMS pod svetlobnim mikroskopom v začetnem stanju (levo) in po 24-ih urah v destilirani vodi (desno)

Preglednica 3: Sprememba velikosti delcev koruznega škroba in NKMS zaradi sorpcije vode med namakanjem v destilirani vode v 24-ih urah.

	Začetno stanje koruzni škrob	Po 24 urah v destilirani vodi koruzni škrob	Začetno stanje NKMS	Po 24 urah v destilirani vodi NKMS
Število izmerjenih delcev	336	334	265	327
Min velikost v μm	5,1	3,8	9,8	35,4
Max velikost v μm	27,2	26,0	82,1	306,1
Povprečje v μm	13,4	13,8	34,7	140,7
Standardni odklon v μm	3,6	4,1	15,3	63,0

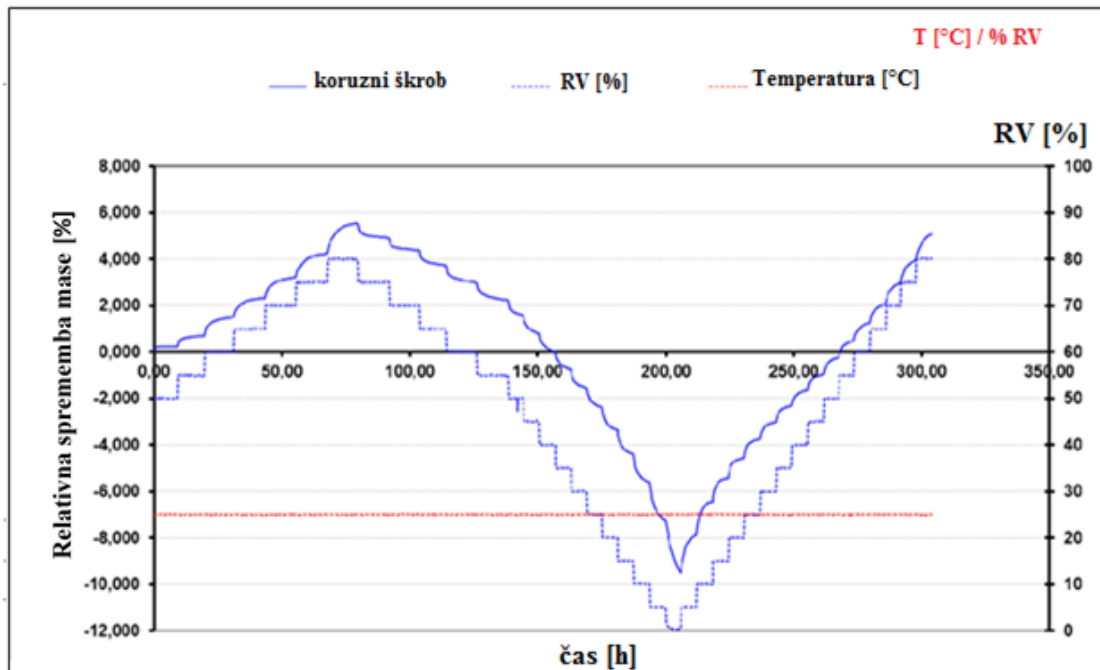
Način sorpcije vode koruznega škroba smo želeli potrditi tudi na osnovi sorpcijsko desorpcijskih izoterme z analizatorjem dinamične sorpcije vode SPS. Opazovali smo spremembo mase vzorca med vezavo in oddajanjem vlage na krivulji spremembe mase v odvisnosti od relativne vlage, kateri vzorec izpostavimo.

Na sliki 17 je opazna precej majhna histereza med sorpcijsko in desorpcijsko krivuljo koruznega škroba, kar je kazalo na šibko vezano vodo. Iz oblike krivulje smo videli skoraj linearno sorpcijo skozi vse stopnje relativne vlage. Sklepali smo, da koruzni škrob sorbira vodo linearno z relativno vlažnostjo, količina vezane vlage pa je omejena z lastnostmi materiala.



Slika 17: Relativna sprememba mase koruznega škroba v odvisnosti od relativne vlage pri 25 °C

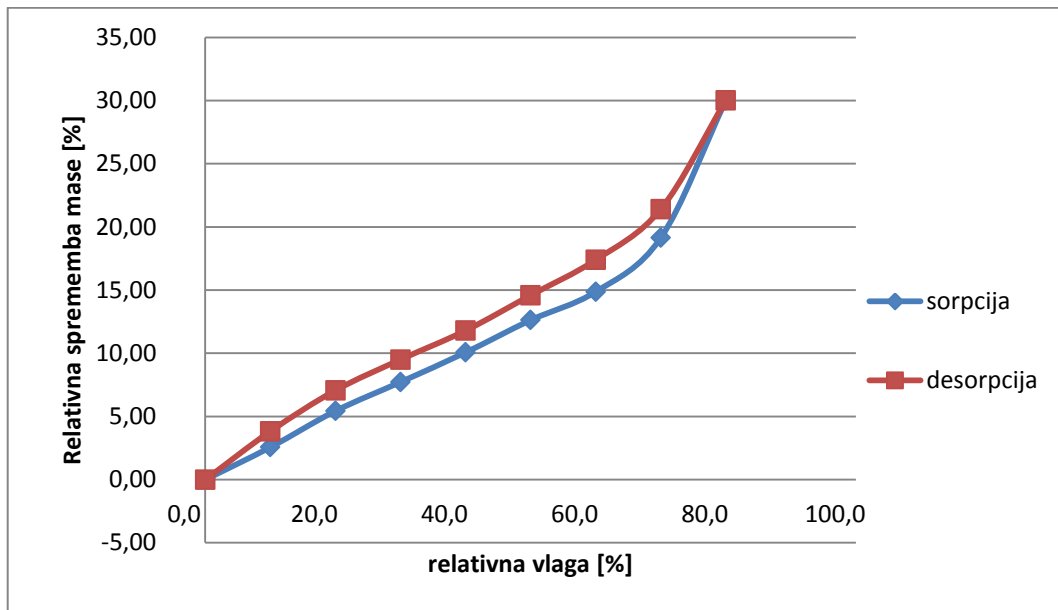
Na grafu na sliki 18 je prikazan časovni diagram sorpcije in desorpcije vode na vsaki stopnji RV. Rdeča črta na grafu označuje konstantno temperaturo sistema, ki je bila 25 °C. Modra prekinjena črta prikazuje čas, ki je bil potreben, da je vzorec dosegel ravnovesje na vsaki stopnji RV, z modro črto pa je prikazana sprememba mase v odvisnosti od časa, iz katere smo razbrali ali je vzorec dosegel ravnovesje v času, ki ga je imel na voljo med analizo, ko se masa vzorca s časom ni več spreminjala in je krivulja dosegla plato.



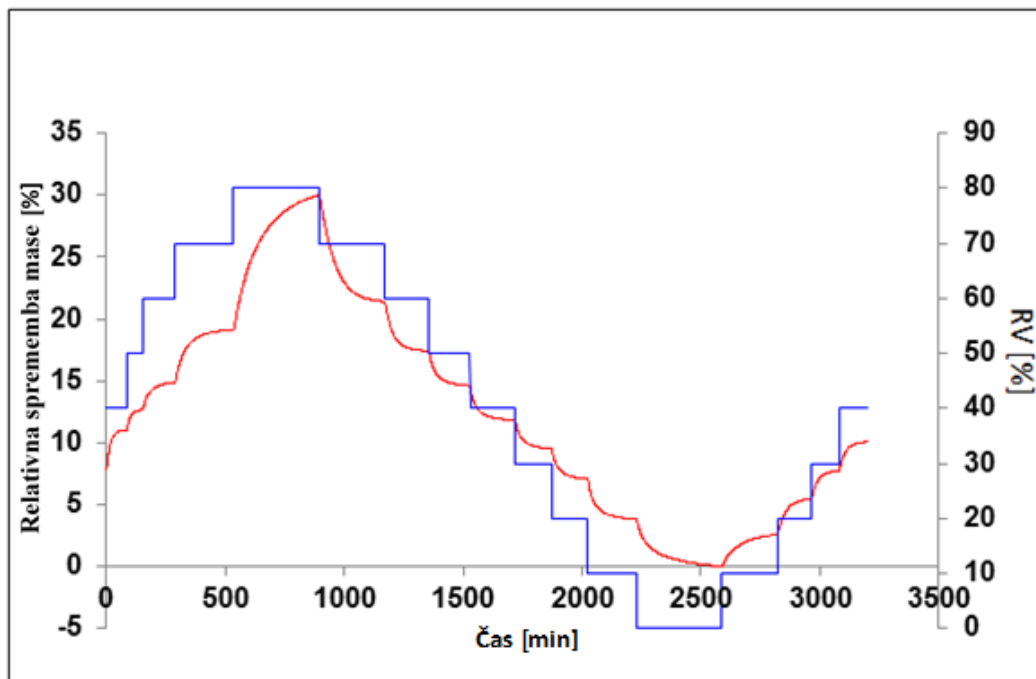
Slika 18: Časovni potek vzpostavljanja ravnotežja pri vezavi vode v koruznem škrobu pri različni relativni vlagi pri 25 °C

Koruzni škrob je dosegel ravnotežje na vseh stopnjah analize, kar pomeni, da je vezava vode potekla relativno hitro in se je ustavila, ko je material sorbiral maksimalno količino vode pri določeni RV.

Oblika sorpcijske/desorpcijske krivulje NKMS, prikazane na sliki 19, je nakazovala absorpcijo vode pri višjih vrednostih relativne vlage, konkretno nad 70 % RV, pred tem pa snov vodo adsorbira v mono-molekulsko plast. Histereza ni velika, kar pomeni, da je NKMS vezal in oddajal vodo na podoben način oziroma so bile strukturne spremembe NKMS po vezavi vode minimalne. NKMS je bil pri nekontaktni sorpciji vode, kar pomeni, da škrobna zrna niso prišla v stik s tekočo vodo, sposoben vezati kar 30 % vlage glede na lastno maso.



Slika 19: Krivulja relativne spremembe mase NKMS v odvisnosti od relativne vlage pri 25 °C



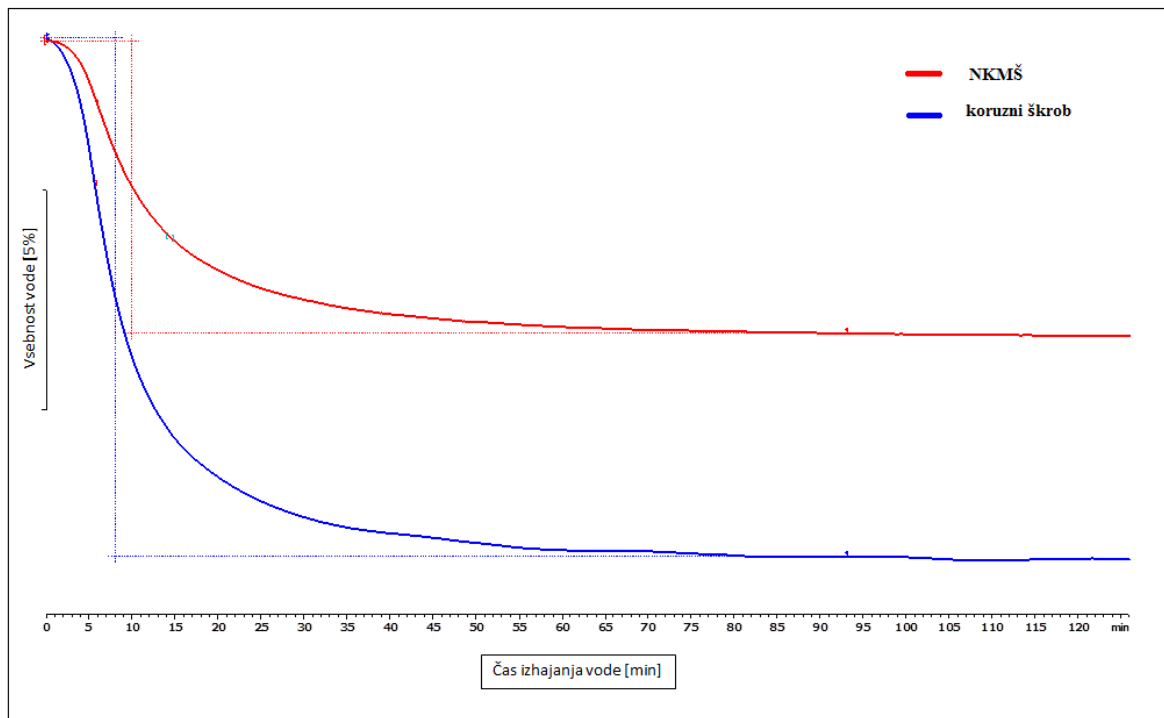
Slika 20: Časovni potek vzpostavljanja ravnotežja pri vezavi vode v NKMS pri različni relativni vlagi pri 25 °C

Na diagramu na sliki 20 vidimo, da je NKMS dosegel ravnotežje na vsaki stopnji RV, razen pri 80 % RV. To pomeni, da bi NKMS na 80 % RV lahko vezal še nekaj vode, vendar je bila sorpcija prepočasna in je aparat premaknil vzorec na naslednjo stopnjo meritve.

4.1.3 Določitev vsebnosti vode delcev koruznega škroba in NKMS

Vzorci koruznega škroba in NKMS smo na TGA analizatorju izpostavili temperaturam od 25 °C do 220 °C (dinamična analiza) in opazovali izhajanje vode. Vzorci smo segrevali do temperature 220 °C, med tem pa gravimetrično spremljali izhajanje vode iz vzorca. Z metodo dinamičnega segrevanja smo iz vzorca praviloma odstranili vso vodo, tako nevezano vodo, ki vstopa v proces migracije vode in tudi kristalno vezano, kar skupno imenujemo celokupna vsebnost vode vzorca. Ugotovili smo, da nevezana oziroma prosta voda, ki ji lahko določamo aktivnost vode izhaja iz škrobnega zrna v temperaturnem območju do 85 °C. Izotermalno analizo smo nato izvedli s sušenjem 2 uri na 85 °C. Rezultate za koruzni škrob in NKMS smo zbrali v preglednici 4. Diagram izgube vezane vode koruznega škroba in NKMS po dinamični metodi je v prilogah (Priloga A).

Pri izotermalnem poskusu pri 85 °C, smo na diagramu izgube vode koruznega škroba (krivulja modre barve), ki ga vidimo na sliki 21, določili hitro izgubo nevezane vode v prvih 30 minutah, ravnovesje pa je dosegel že po okoli 100 minutah segrevanja na 85 °C. Do ravnovesja je prišlo takrat, ko je masa vzorca postala konstantna oziroma se s časom ni spreminjala več. Instrument je kot rezultat podal masni delež oddane vode, rezultate smo zapisali v preglednici 4. Enako obliko izhajanja vode smo opazili tudi pri NKMS (krivulja rdeče barve), le da je bila vsebnost vode nižja v primerjavi s koruznim škrobom.



Slika 21: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS (TGA) pri temperaturi 85 °C (oznaka na y osi prikazuje 5 % vsebnost vode)

Za dodatno potrditev rezultatov vsebnosti nevezane vode določenih s TG analizo smo vzorce analizirali še z alternativno tehniko - analiza izgube vode pri sušenju (LOD), ki je omogočala analizo bolj reprezentativnega vzorca, ker je bila natehta vzorca veliko večja kot pri TG analizi. Temperaturo sušenja smo povzeli po izotermalni krivulji posneti s TG analizo, to je 85 °C. Aktivnost vode smo določili z aparatom za merjenje vodne aktivnosti, rezultati so prikazani v preglednici 4.

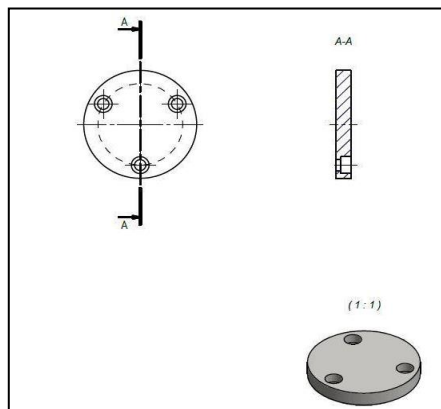
Preglednica 4: Vsebnost in aktivnost vode koruznega škroba določena s TGA, LOD in aparatom za določanje vodne aktivnosti

Vzorec	Celokupna vsebnost vode TGA	Vsebnost nevezane vode TGA	Vsebnost nevezane vode LOD	Aktivnost vode
Koruzni škrob	12,2 %	11,3 %	11,4 %	0,47
NKMŠ	7,5 %	5,9 %	5,7 %	0,17

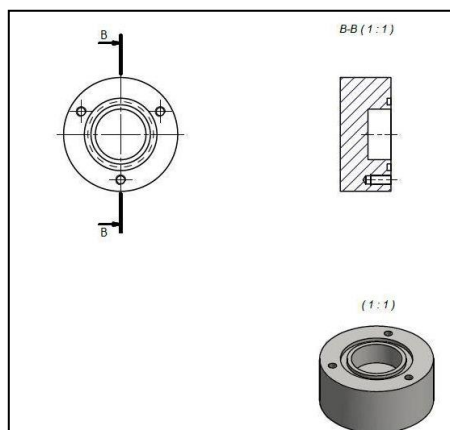
Koruzni škrob je vseboval relativno velik delež nevezane vode glede na celokupno vsebnost in tudi višjo aktivnost vode, saj voda ni bila vezana v strukturo. Z LOD metodo smo izmerili primerljivo vsebnost vode, vodna aktivnost pa je bila za snovi, uporabljene v farmacevtski tehnologiji, relativno visoka. NKMŠ je vseboval le ~ 6 % nevezane vode z nizko vodno aktivnostjo, kar je nakazovalo visoko sorpcijsko sposobnost vzorca.

4.2 KONSTRUIRANJE KOMORE ZA IZMENJAVO VODE MED VZORCI V ATMOSFERI Z ZNANO VSEBNOSTJO VODE

Komoro smo oblikovali tako, da je omogočala ustvarjanje kontroliranih pogojev in ni dopuščala prehajanje plinov, zraka in vlage. Zasnovana je bila tako, da je omogočala prehajanje vode v obliki vodne pare med vzorci pri sobnih pogojih. S popolnim tesnjenjem posode smo izključili zunanje vplive in opazovali prehod vlage, ki je v komori na razpolago (zračna vlaga + voda v vzorcih) med vzorcema.



Slika 22: Pokrov komore za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi



Slika 23: Dno komore za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi

Komora je bila narejena iz dveh kovinski delov, posodice in pokrova, ki sta prikazana na sliki 22 in 23. Spodnji del je imel okoli prostora za vzorce tesnilo, ki je omogočalo nepredušno tesnjenje, za dodatno tesnjenje pa smo okoli robov komore namestili tri vijake. S spremljanjem spremembe mase vzorcev, ki smo jih postavili v komoro, smo lahko kvantificirali prehajanje vode med vzorci zaradi različnega energijskega stanja tj. termodinamske aktivnosti vode. Prostor, v katerega smo položili vzorce v aluminijastih lončkih, je imel premer 2 cm in višino 0,9 cm.

4.3 RAZISKAVA MERITVE VODNE AKTIVNOSTI PO PRINCIPU DOLOČANJA TOČKE ROSIŠČA Z APARATOM ZA MERJENJE VODNE AKTIVNOSTI

Ker aparat aktivnost meri na osnovi uravnovešenja z atmosfersko vlago v komori, smo s teoretičnim izračunom preverili ali bi atmosfera v merilni komori oziroma odstotek vlage v njej lahko vplivala na rezultate. Aparat za merjenje aktivnosti vode naj bi namreč zanemaril vpliv atmosfere, ki je prisotna v merilni komori med analizo glede na količino vzorca, saj moramo zagotoviti ustrezno razmerje vzorec/atmosfera v merilni komori tako, da merilni lonček napolnimo do najmanj polovice (AquaLab..., 2014).

Glede na prostornino aparata in prostornine vzorca v lončku, ko je le-ta napolnjen do treh četrtin, smo izračunali, da je ~20 ml prostornine ostalo proste oz. je v njej ostal zrak pri sobnih/laboratorijskih pogojih. Ta je bil na voljo za izmenjavo vlage, dokler ni prišlo do termodinamskega ravnovesja, katerega je aparat izmeril preko točke rosišča.

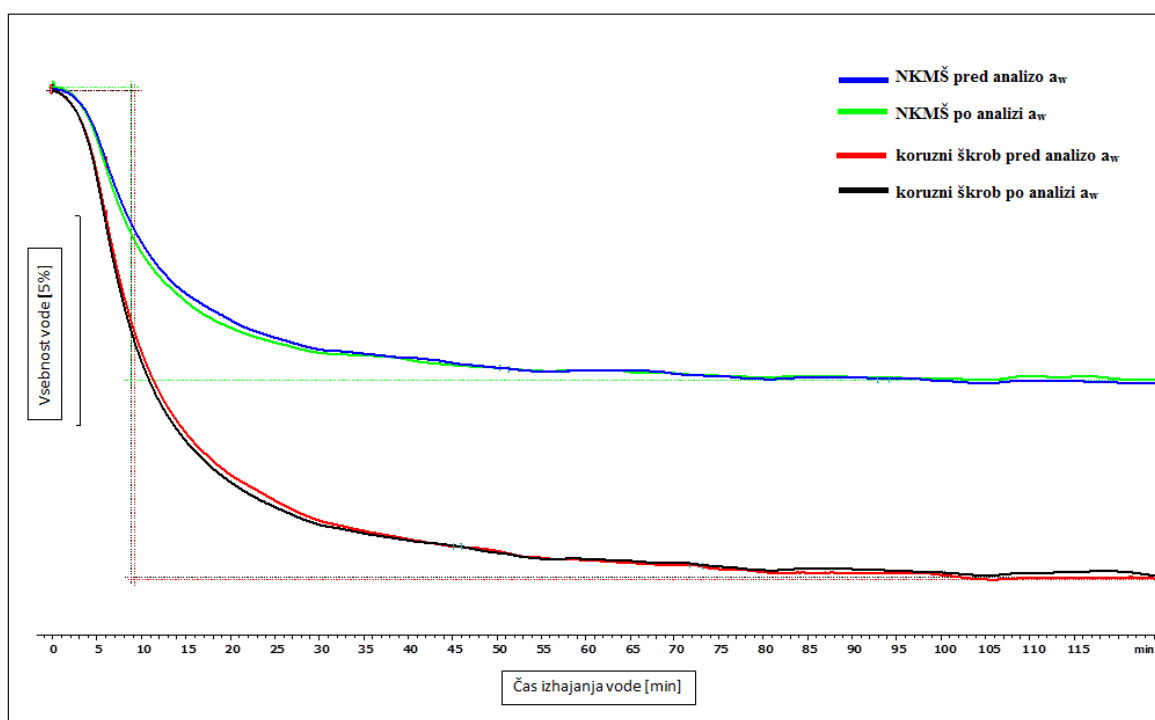
Iz splošne plinske enačbe smo izračunali maso vode v 20 ml atmosfere v komori, pri izmerjeni 53 % RV laboratorija, in pri delovni temperaturi aparata, 25 °C, in sicer je bilo v 20 ml prostornine komore aparata pri 25 °C in 53 % RV 0,24 mg vode.

Izmerili smo vodno aktivnost koruznega škroba, in sicer 0,47, natehtali pa smo 3 g vzorca v lonček. Glede na razmerje mase vod v atmosferi in mase vzorca smo lahko vpliv

atmosfere iz vidika masnega prenosa res zanemarili, saj je bil vpliv atmosferske vlage v primerjavi z maso vzorca v masnih odstotkih le $8 \cdot 10^{-5} \%$.

V podporo teoretičnemu izračunu smo vpliv atmosfere med analizo preverili tudi s TGA. Izmerili smo vsebnost nevezane vode dveh vzorcev, koruznega škroba in NKMS pred analizo vodne aktivnosti z aparatom za merjenje vodne aktivnosti. Potem smo natehtali vzorec v analitski lonček aparata in izvedli meritev vodne aktivnosti. Neposredno po opravljeni meritvi smo iz lončka izvzeli vzorec ter mu izmerili vsebnost vode s TGA. Rezultate smo zbrali v preglednici 5.

Modra krivulja prikazuje izgubo aktivne vode NKMS pred analizo, zelena predstavlja izgubo vode NKMS po opravljeni analizi vodne aktivnosti, rdeča izgubo vode koruznega škroba pred analizo, črna pa izgubo vode po analizi vodne aktivnosti.



Slika 24: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS pred ter po analizi aktivnosti vode z aparatom za merjenje vodne aktivnosti določena s TGA pri 85 °C in NKMS pri 85 °C (oznaka na y osi predstavlja 5 % vsebnost vode)

Preglednica 5: Sprememba vsebnosti vode koruznega škroba in NKMS na račun meritve vodne aktivnosti

	Vsebnost vode pred analizo a_w [%]	Vsebnost vode po analizi a_w [%]
Koruzni škrob	11,4	11,4
NKMS	6,9	6,9

Glede na rezultate analize vsebnosti vode pred in po opravljeni meritvi vodne aktivnosti lahko zaključimo, da atmosfera v komori aparata med meritvijo res ni vplivala na vsebnost vode v vzorcu ob predpostavki, da smo analitski lonček napolnili kot priporočeno in smo lahko na ta način zanemarili prispevek vlage v atmosferi.

4.4 VPLIV RAZLIČNIH FIZIKALNO KEMIJSKIH LASTNOSTI MATERIALA NA MIGRACIJO VODE

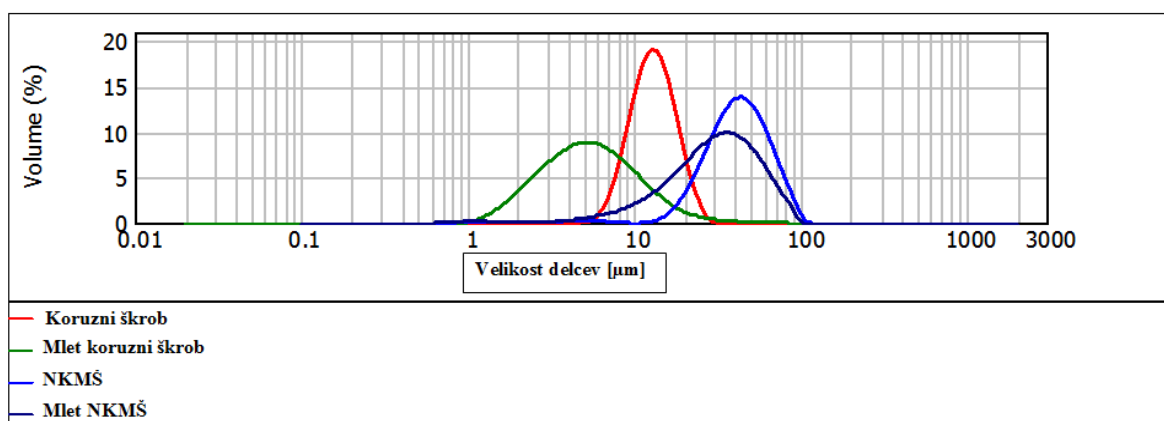
Na aktivnost vode lahko vplivamo s spreminjanjem lastnosti materiala, kot so sprememba velikosti delcev, specifična površina in poroznost, higroskopnost in sorpcijsko-desorpcijske lastnosti. Ko dobimo celotno sliko o lastnostih snovi, ki bi vstopale v zmes, lahko na podlagi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti poskušamo omejiti vodno aktivnost in s tem migracijo vode.

V nadaljevanju smo raziskali, ali velikost delcev snovi vpliva na aktivnost vode, saj lahko npr. z mletjem kontroliramo njeno velikost. Raziskali smo tudi, ali lahko na vodno aktivnost vplivamo z dodajanjem snovi, ki bi zaradi razlike v vodni aktivnosti znižale ali zvišale končno aktivnost formulacije. Tako bi z relativno preprostimi postopki dosegli bolj stabilen končni izdelek.

4.4.1 Velikost delcev

Z mletjem vzorcev smo preverili hipotezo o spremembi vodne aktivnosti na račun zmanjšanja velikosti delcev in s tem povečanja površine delcev. Pričakovali smo višanje vodne aktivnosti zaradi povečanja specifične površine z mletjem in s tem več prostih vezavnih mest za molekule vode. Mletim vzorcem smo izmerili velikost delcev z lasersko difrakcijo.

Iz preglednice 6 in slike 25 je razvidno, da smo z mletjem pridobili nekoliko manjše delce. Delci koruznega škroba so se v povprečju zmanjšali za 5 μm , delci NKMŠ pa za 10 μm . Vzorce smo izpostavili sobnim pogojem ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 55 % RV) in jim izmerili vodno aktivnost v začetnem stanju po 6 urah in po 3 dneh.



Slika 25: Distribucija porazdelitve velikosti delcev koruznega škroba in NKMS pred in po mletju

Preglednica 6: Sprememba velikosti decev koruznega škroba in NKMS po mletju

	D [4, 3] μm	d (0.1) μm	d (0.5) μm	d (0.9) μm
Koruzni škrob	13	9	13	19
Mleti koruzni škrob	8	2	5	14
NKMS	44	23	42	70
Mlet NKMS	34	11	31	61

D [4, 3] – volumsko povprečje izmerjenih vrednosti; d (0.1) – 10 % delcem ima manjši premer od tega [μm]; d (0.5) – 50 % delcev ima večji/manjši premer od tega [μm]; d (0.9) – 90 % delcev ima manjši premer od tega [μm]

Iz rezultatov (preglednica 7) razberemo, da mletje oziroma sprememba velikosti v tem primeru kvantitativno ni vplivala na aktivnost vode. Opazili smo, da smo z mletjem vzorcev končno aktivnost vode, pogojeno z lastnostmi materiala in odstotka relativne vlage v atmosferi, dosegli prej kakor pri nemletih vzorcih.

Preglednica 7: Sprememba vodne aktivnosti koruznega škroba in natrijevega karboksimetilškroba na račun zmanjšanja velikosti delcev z mletjem na sobnih pogojih, ~ 25 °C, 55 % RV

	a_w v začetnem stanju	a_w po 6h na sobnih pogojih	a_w po 3 dneh na sobnih pogojih
Koruzni škrob v izhodnem stanju	0,47	0,48	0,50
Mlet koruzni škrob	0,47	0,50	0,50
NKMS v izhodnem stanju	0,17	0,22	0,52
Mlet NKMS	0,17	0,25	0,52

4.4.2 Dodatek humektantov

Glede na literarne podatke smo predvidevali, da bi z dodatkom humektantov lahko učinkovito uravnavali aktivnost vode v formulacijah. Hipotezo smo preverili na

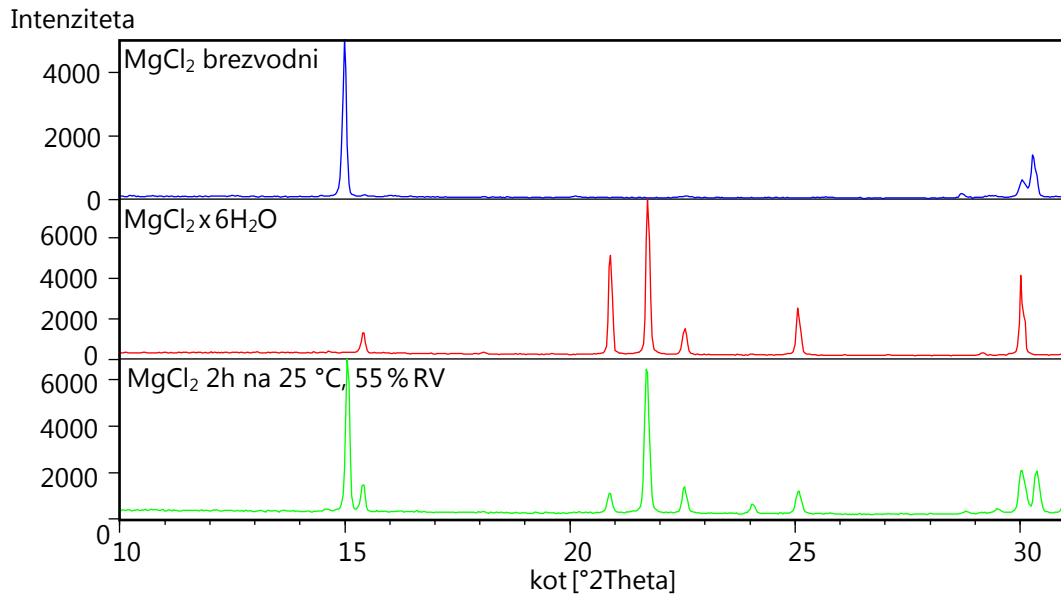
koruznemu škrobu z okoli 11 % nevezane vode in vodno aktivnostjo 0,47, ki smo mu dodali brezvodni MgCl_2 . Dovoljena koncentracija MgCl_2 v živilih in živilskih izdelkih je 0,5 % (FAO/WHO, 2014), zato smo prvo zmes pripravili z 0,5 % magnezijevega klorida. Ker ta količina ni dosegla praga zaznave metode rentgenske praškovne difrakcije, smo pripravili še eno zmes koruznega škroba s 5 % vsebnosti MgCl_2 .

Preglednica 8: Vodna aktivnost koruznega škroba, magnezijevega klorida in njunih zmesi

Vzorec	a_w
Koruzni škrob	0,47
MgCl_2	0,03
Koruzni škrob + 0,5 % MgCl_2	0,34
Koruzni škrob + 5 % MgCl_2	0,03

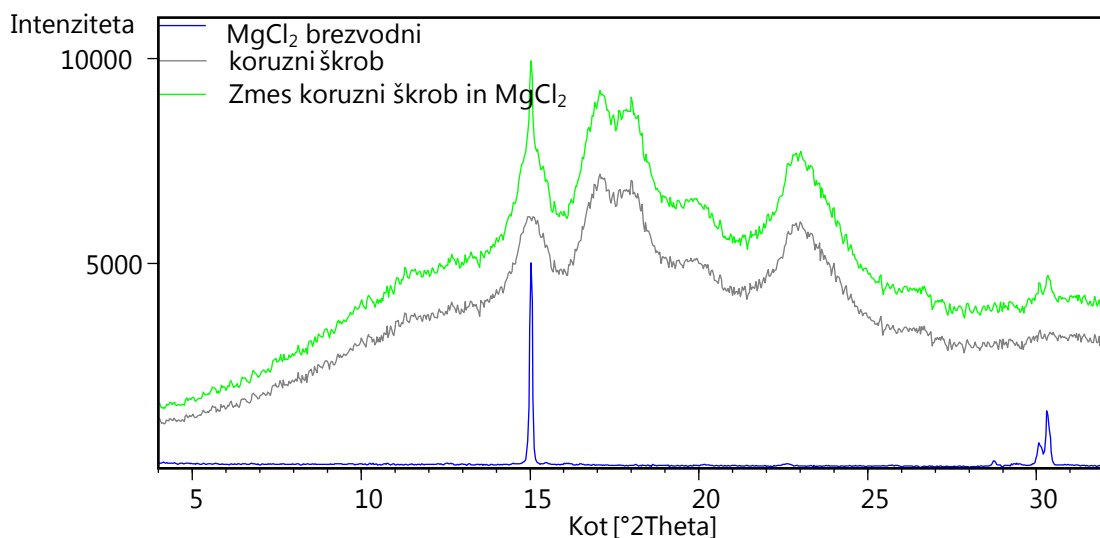
V preglednici 8 smo zbrali rezultate meritve vodne aktivnosti. Pri 0,5 % mešanici je prišlo do znižanja a_w iz 0,47 na 0,34, kar nam v realnem stanju že lahko pripomore k stabilizaciji končne formulacije. Vodna aktivnost binarne zmesi je bila veliko nižja, kot smo pričakovali, zato smo sklepali, da je MgCl_2 prešel v hidrat, kar je znižalo a_w na račun vezave vode v strukturo. Nastanek hidrata med meritvijo smo potrdili z metodo rentgenske praškovne difrakcije.

Na sliki 26 so primerjalno prikazani difraktogrami brezvodne in hidratne oblike MgCl_2 . Zeleni difraktogram prikazuje vzorec brezvodnega MgCl_2 , ki je bil ponovno analiziran po 2 urah iz pogoja 25 °C, 55 % RV (sobni pogoj). Iz difraktograma vidimo, da je brezvodna oblika delno že prešla v hidratno obliko MgCl_2 , saj so v difraktogramu prisotni tako ukloni brezvodne kot tudi ukloni heksahidratne oblike MgCl_2 . S tem smo dokazali, da je brezvodna oblika MgCl_2 izrazito nestabilna in že ob relativno nizki vlagi hitro prehaja v heksahidratno obliko MgCl_2 .



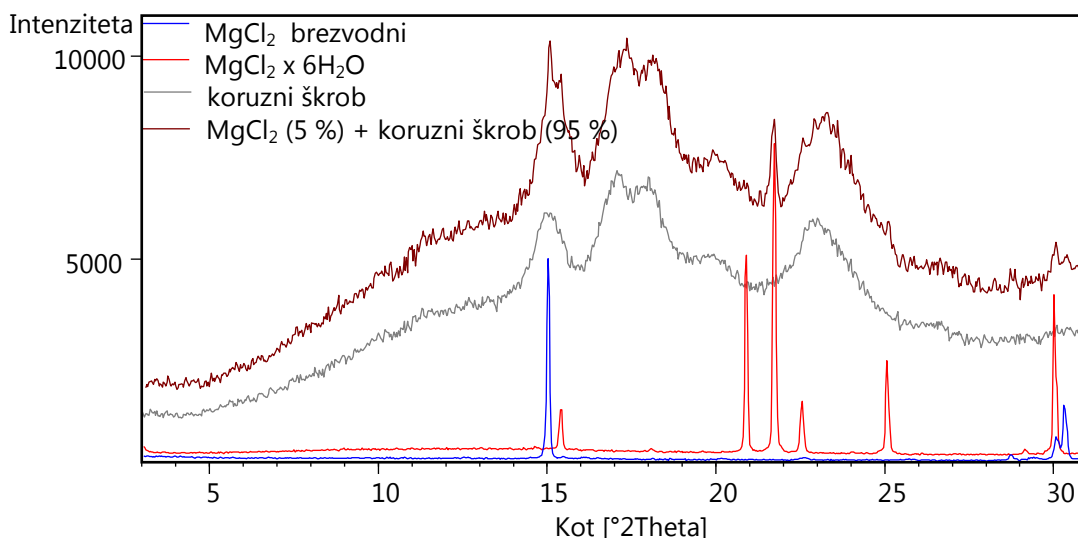
Slika 26: Difraktogrami brezvodnega MgCl_2 , heksahidratne oblike MgCl_2 in brezvodne oblike MgCl_2 , ki smo ga 2 uri izpostavljali sobnim pogojem 25°C , 55 % RV

Na sliki 27 sta prikazana difraktograma vstopajočega brezvodnega MgCl_2 (difraktogram modre barve) in koruznega škroba (difraktogram sive barve) ter difraktogram zmesi brezvodnega MgCl_2 in škroba. Iz zelenega difraktograma zmesi vidimo, da se je ves MgCl_2 v začetnem stanju nahajal v brezvodni obliki, saj je poleg difraktograma, značilnega za koruzni škrob, prisoten še dodaten uklon, ki je značilen za brezvodni MgCl_2 .



Slika 27: Difraktogrami zmesi MgCl_2 in koruznega škroba v začetnem stanju, v primerjavi z difraktogramom brezvodnega MgCl_2 in difraktogramom koruznega škroba

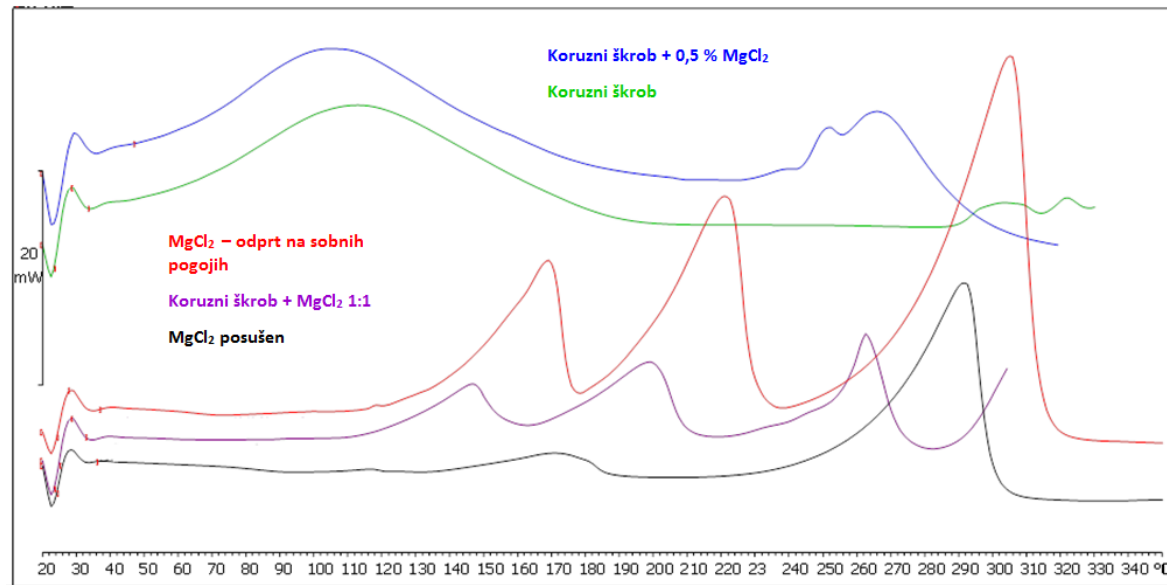
Po ponovni analizi vzorca zmesi, zaprte v neprodušni viali 1 teden (pogoja 25 °C, 45 % RV zaprto - sobni pogoj) v difraktogramu rjave barve poleg širokih uklonov, kateri pripadajo koruznemu škrobu in uklonov brezvodne oblike MgCl_2 na sliki 28, vidimo tudi uklone heksahidratne oblike MgCl_2 . Glede na to je bil vzorec zmesi zaprt pod inertno atmosfero, si lahko prehod brezvodne oblike MgCl_2 v heksahidratno obliko razlagamo s tem, da je bila voda potrebna za nastanek heksahidratne oblike MgCl_2 prej vezana na koruznem škrobu in je v binarnem sistemu migrirala do ravnotežnega stanja.



Slika 28: Difraktogrami zmesi MgCl_2 in koruznega škroba po vzpostavitvi ravnotežja (zmes zaprta v neprodušni viali, 1 teden), v primerjavi z difraktogrami brezvodnega MgCl_2 , heksahidratnega MgCl_2 in koruznega škroba

Spremembe smo spremljali tudi z DSC analizo. Na sliki 29 je prikazana krivulja izhodnega magnezijevega klorida, ki je glede na prevoj na termogramu v območju pri ~170 °C, vseeno vseboval nekaj hidratne vode ne glede na to, da naj bi bila snov glede na podatke rentgenske praškovne difrakcije v brezvodnem stanju. DSC ima za detekcijo hidratov v primerjavi z rentgensko praškovno difrakcijo nižjo mejo detekcije. Za primerjavo smo magnezijev klorid izpostavili sobnim pogojem in tako dokazali formacijo hidrata, ki se na termografu kaže kot dvostopenjska izguba vode preko dveh trebušastih vrhovih na termogramu. Izhodni koruzni škrob je glede na obliko krivulje v območju 40-200 °C vseboval veliko šibko vezane vode.

Pri meritvi realne mešanice koruznega škroba in magnezijevega klorida nismo dosegli meje detekcije aparata, zato smo dodatno pripravili mešanico koruznega škroba in magnezijevega klorida v razmerju 1:1. Opazili smo izostanek vrha v temperaturnem območju do 100 °C, kar je kazalo na izgubo šibko vezane vode, to pa je pomenilo, da je koruzni škrob velik del svoje nevezane vode oddal magnezijevemu kloridu, kjer se je vgradila v hidrat.



Slika 29: Termogram vstopnih snovi in zmesi koruznega škroba ter magnezijevega klorida - DSC

4.5 SIMULACIJA BINARNIH ZMESI ZA NAPOVED SMERI IN KOLIČINE VODE, KI BO PREHAJALA V HETEROGENIH SISTEMIH

Ena izmed naših hipotez je bila, da bo v binarni zmesi voda prehajala iz mesta višje aktivnosti vode na mesto nižje aktivnosti ne glede na vsebnost vode vzorca. Da bi hipotezo potrdili, smo za analizo ravnotežne vodne aktivnosti zmesi pripravili binarne zmesi, migracijo vode pa smo spremljali na simulaciji binarnih zmesi v komori za opazovanje prehajanja vode.

Na podlagi izmerjenih vrednosti a_w smo izbrali snovi, s katerimi smo pripravili binarne zmesi, ki so opisane v preglednici 9. Izbrali smo vzorce takih a_w vrednosti, ki naj bi povzročile ali preprečile prehod nevezane vode med snovmi na podlagi hipoteze o migraciji vode iz mesta višje vodne aktivnosti, proti mestu z nižjo vodno aktivnostjo. Na podlagi rezultatov ravnotežnih vodnih aktivnosti smo želeli kvalitativno spremljati migracijo vode v simulaciji zmesi in preveriti, ali lahko iz analiz posameznih komponent napovemo, kako se bodo taki sistemi obnašali v primeru, da iz njih pripravimo binarne zmesi ali več-komponentne sisteme.

Vsaki snovi, ki je vstopala v zmes, smo izmerili vodno aktivnost in vsebnost vode s TGA. Vzorce smo zmešali v binarne zmesi v razmerju 1:1, da smo zagotovili enako masno razmerje vzorcev v zmesi, jih zaprli v steklene lončke z nepredušnim pokrovom in zavarili v aluminijasto folijo. Kozarčke smo nepredušno zaprte pustili 7 dni ter jim nato zmerili vodno aktivnost, ki je predstavljala vodno aktivnost zmesi v ravnotežnem stanju.

Ker z razpoložljivimi metodami nismo mogli izmeriti vsebnost vode posameznih komponent zmešanih v zmesi, smo za analizo pripravili simulacije zmesi tako, da smo vzorce ločeno zaprli v komoro za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi in jim izmerili končno vsebnost vode s TGA analizo.

Vse rezultate simulacije binarnih zmesi in posameznih komponent zmesi smo zbrali v preglednici 9.

Preglednica 9: Pregled simulacij binarnih zmesi, njihove vodne aktivnosti v ravnovesju, vsebnost vode posameznih komponent zmesi v izhodnem stanju (TGA $t=0$) in vsebnost vode posameznih komponent po enem tednu (TGA $t=1t$) v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi

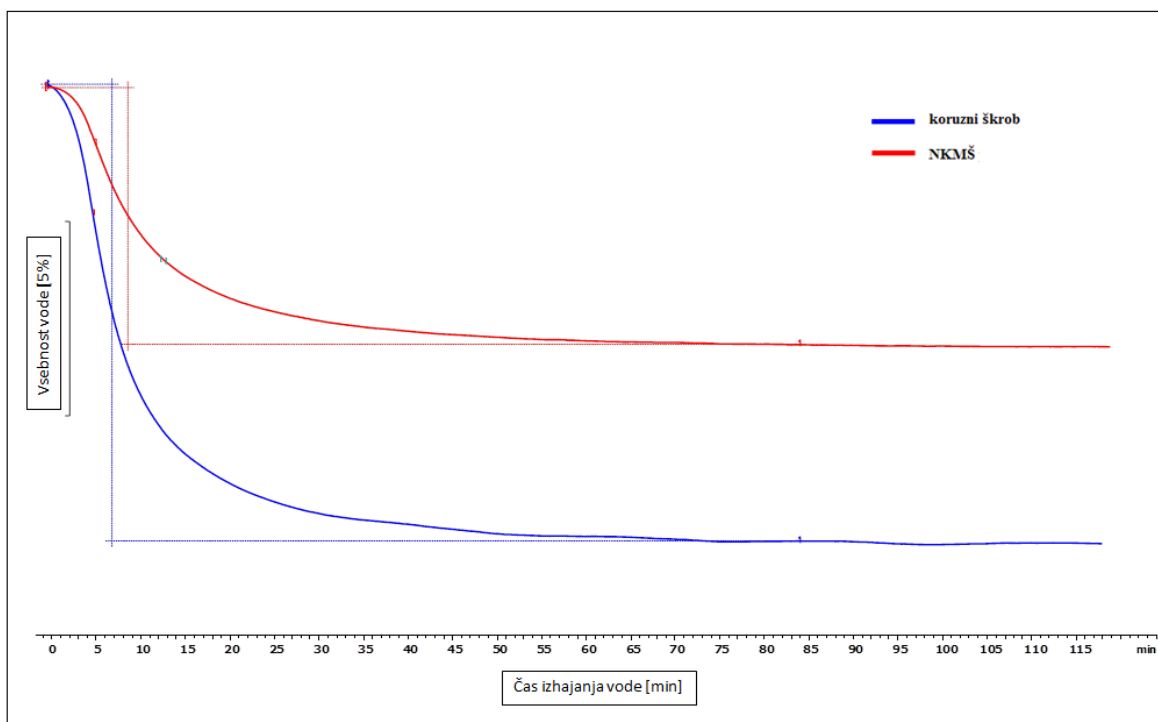
	Snov 1	a_w	TGA $t=0$ %	TGA $t=1t$ %	Snov 2	a_w	TGA $t=0$ %	TGA $t=1t$ %	a_w zmesi 1:1
Simulacija binarne zmesi 1	Koruzni škrob	0,47	11,7	10,8	NKMŠ	0,17	6,6	9,8	0,31
Simulacija binarne zmesi 2	Koruzni škrob	0,47	12,6	12,5	Sukraloza	0,47	0,1	0,1	0,47
Simulacija binarne zmesi 3	Zdravilna učinkovina 1	0,39	1,0	4,8	Krospovidon	0,50	14,9	11,3	0,44
Simulacija binarne zmesi 4	Zdravilna učinkovina 2	0,44	0,1	0,6	Koruzni škrob	0,47	11,5	11,9	0,46

Morebitne spremembe zdravilnih učinkovin smo preverili z nadaljnjimi analizami.

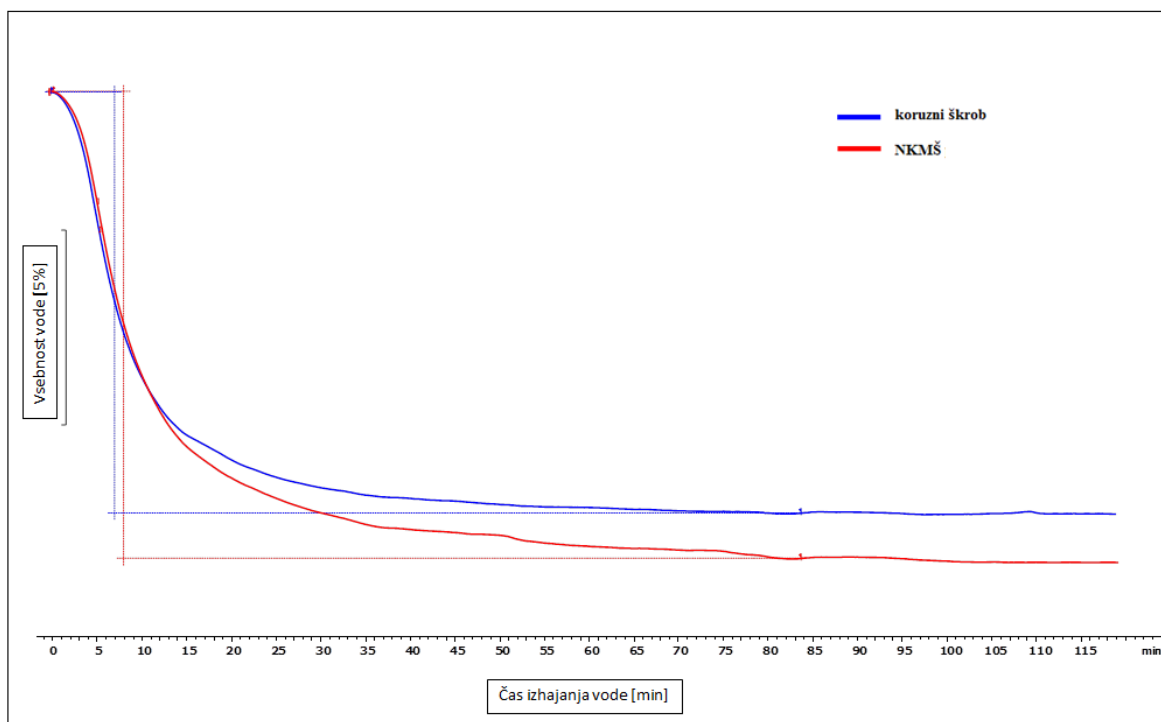
4.5.1 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 1

Koruzni škrob je imel višjo aktivnost vode kakor NKMŠ, zato smo pričakovali, da bo v mešanici NKMŠ sprejel del nevezane vode škroba, dokler ne bosta dosegla termodinamskega ravnovesja.

Zaradi razlike v vodni aktivnosti vzorcev je koruzni škrob z višjo vodno aktivnostjo oddal del nevezane vode NKMŠ z nižjo vodno aktivnostjo, kar vidimo na slikah 30 in 31. V preglednici 9 so zbrani rezultati vsebnosti vode koruznega škroba in NKMŠ. Koruzni škrob se je posušil, NKMŠ pa navlažil.



Slika 30: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS v izhodnem stanju ($t=0$) določena s TGA pri 85 °C (oznaka na y osi prikazuje 5 % vsebnost vode)

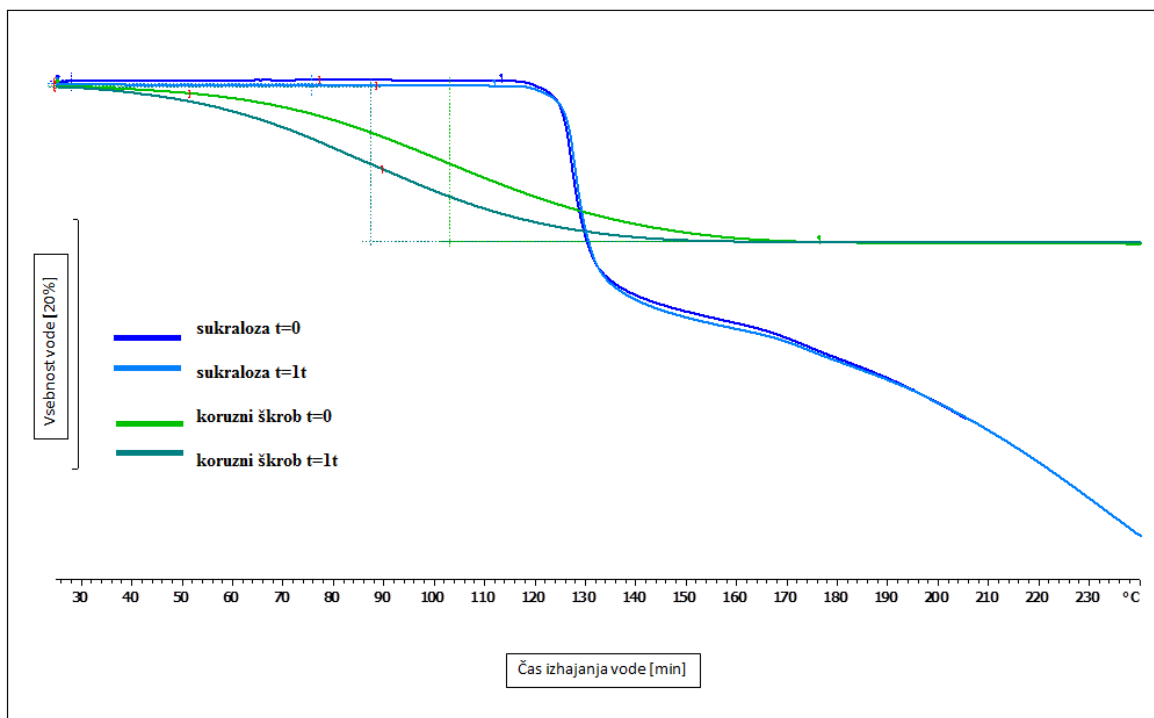


Slika 31: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in NKMS po enem tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi ($t=1t$), določena s TGA pri 85 °C (oznaka na y osi prikazuje 5 % vsebnost vode)

4.5.2 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 2

Sukraloza in koruzni škrob sta imela enako vodno aktivnost, vendar različno vsebnost vode. Tako binarno zmes smo formulirali zato, da bi prikazali, da vsebnost vode dejansko ni toliko pomembna s stališča migracije vode kakor je njena aktivnost. Pričakovali smo, da si vzorca v zmesi ne bosta izmenjala vode.

Kot smo predvidevali, zaradi enake aktivnosti vode si vzorca v komori nista izmenjala nevezane vode, čeprav je imel koruzni škrob veliko višji odstotek vode v primerjavi s sukralozo. Vzorca sta bila v termodinamskem ravnotežju že pred združitvijo v komori in zato migracija vode ni potekla, kot je razvidno iz rezultatov v preglednici 9.

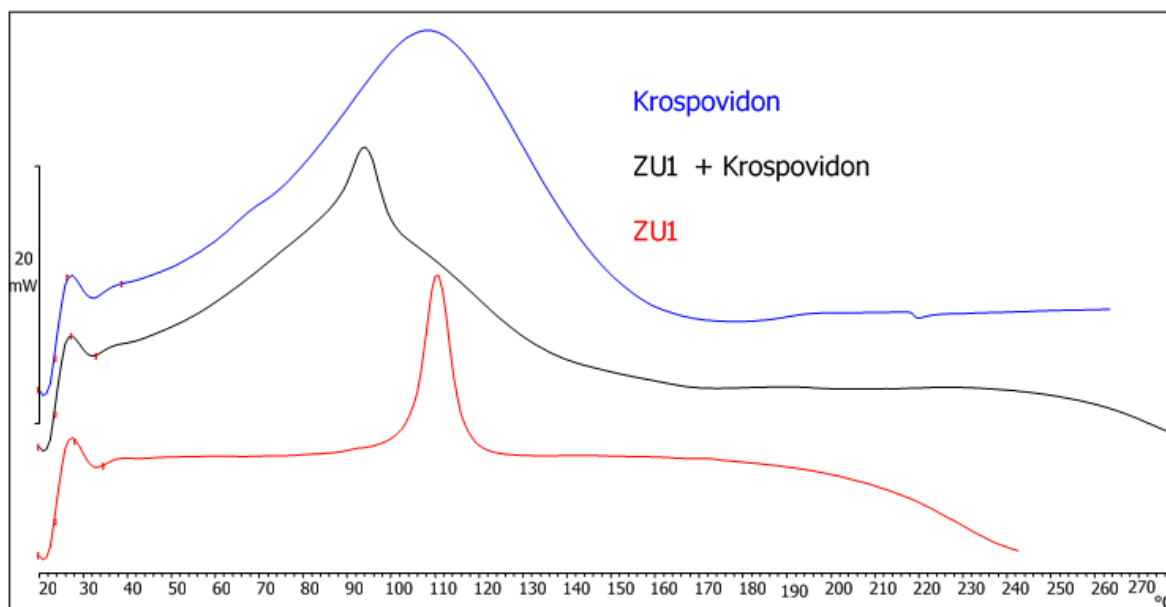


Slika 32: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in sukraloze v izhodnem stanju ($t=0$) in po 1 tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi ($t=1t$) določeni s TGA pri 85 °C (oznaka na y osi prikazuje 20 % vsebnost vode)

4.5.3 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 3

ZU1 smo izbrali kot eno izmed komponent v binarni zmesi s Krospovidonom zaradi njenih fizikalno kemijskih lastnosti, saj je znano, da učinkovina ob stiku z vodo preide iz kristalinične v amorfno obliko. Predstavljala je torej realen sistem, pri katerem bi migracija vode iz pomožne snovi imela neugoden vpliv na fizikalno stabilnost zdravilne učinkovine. Omogočala pa nam je tudi dokaz migracije vode preko spremljanja pojavnih oblik učinkovine. Pričakujemo, da bo Krospovidon oddal del svoje nevezane vode ZU1.

Za raziskavo migracije smo se v tem primeru odločili tudi za DSC tehniko, da bi preverili ali je možno tudi na podlagi termogramov priti do podobnih zaključkov kot preko spremljanja aktivnosti vode.



Slika 33: Termogram Krosppovidona, ZU1 in njune zmesi

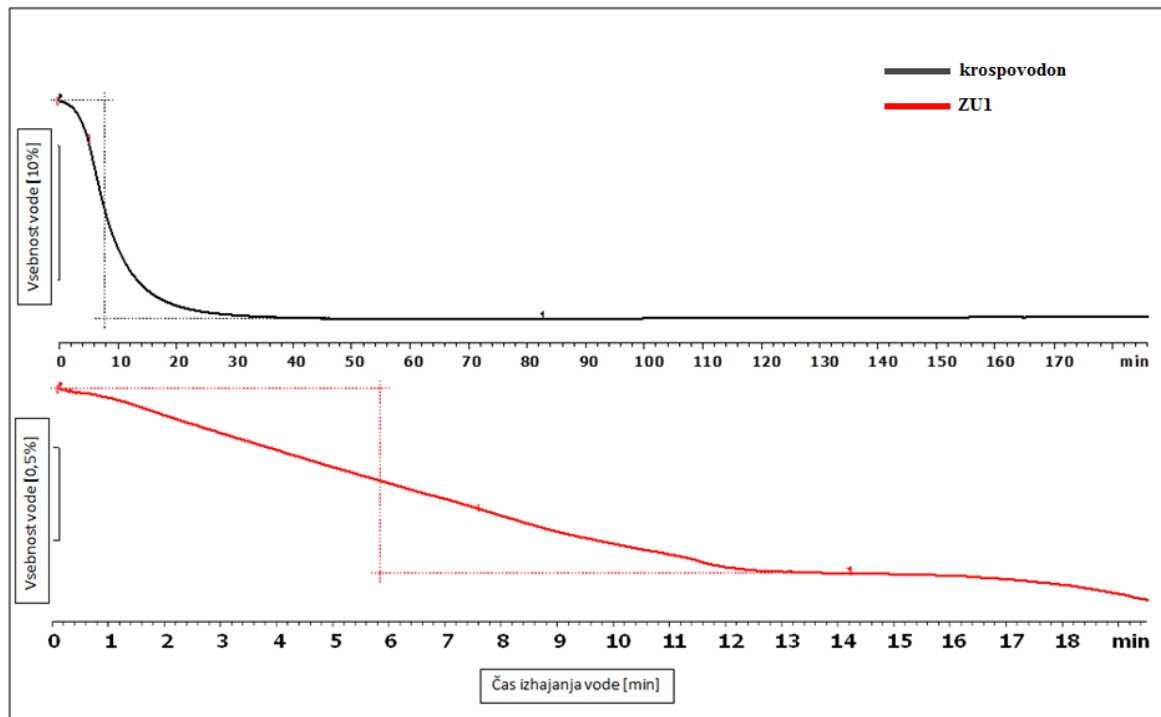
Na termogramu na sliki 33 pri Krosppovidonu pred analizo vidimo vrh v območju $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki nakazuje šibko vezano vodo.

Pri mešanici obeh komponent v razmerju 1:1 vidimo, da je Krosppovidon zadržal velik del svoje šibko vezane vode. Talilni vrh ZU1 se je premaknil k precej nižji temperaturi, kar je posledica višje vsebnosti vode v učinkovini, ki spremeni njeno strukturo (amorfizacija), kar smo dokazali z dodatnimi tehnikami, ki jih zaradi zaščite podatkov nismo vključili.

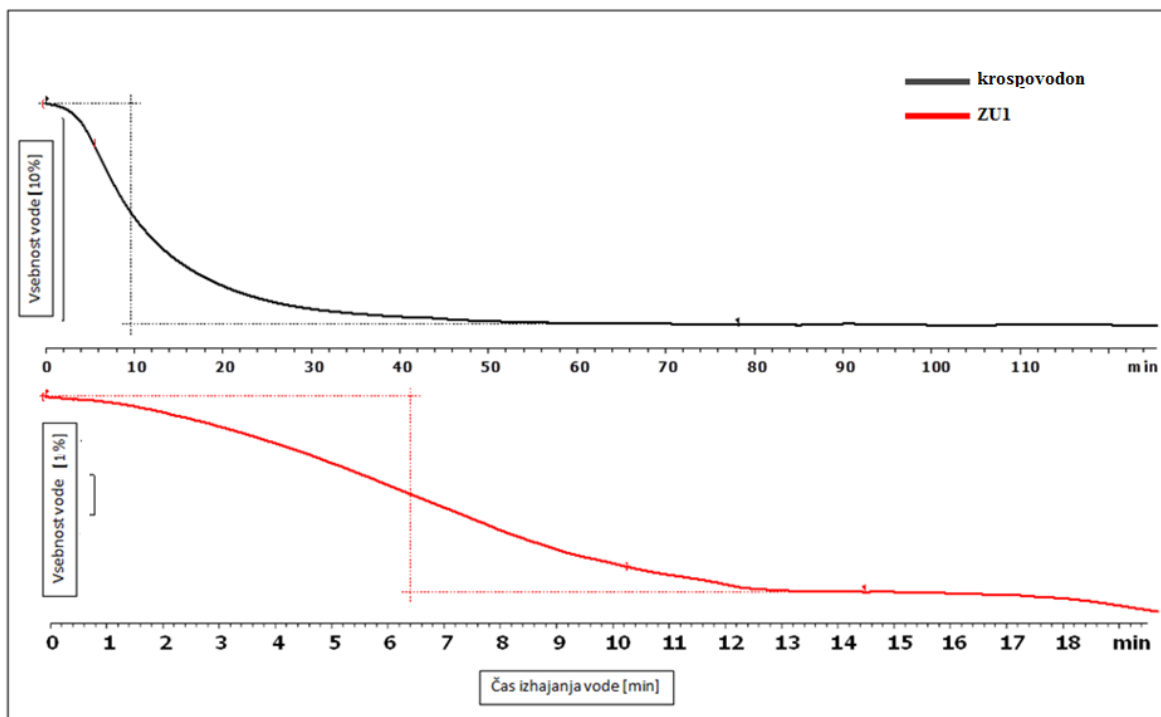
Z DSC analizo smo tako potrdili prehod nevezane vode iz Krosppovidona k ZU1, kot je napovedovala razlika v vodni aktivnosti komponent. V realnem sistemu bi bila kombinacija ZU1 in Krosppovidona rizična s stališča fizikalne stabilnosti sistema, kar bi lahko rešili z dodatkom drugih komponent, ki bi imele sposobnost odtegnitve vode.

Za kvantitativno ovrednotenje migracije vode smo izvedli tudi TGA po enakem principu kot ostale binarne zmesi in rezultate vnesli v preglednico 9.

Zaradi razlike v vodni aktivnosti vzorcev je Krosppovidon oddal del svoje nevezane vode ZU1, kot vidimo na slikah 34 in 35, ker je imel v izhodnem stanju višjo vodno aktivnost.



Slika 34: Vsebnost nevezane vode Krospongidona in ZU1 v izhodnem stanju ($t=0$) določena s TGA pri 85 °C (oznaki na y osi prikazujeta 0,5 % in 10 % vsebnost vode)



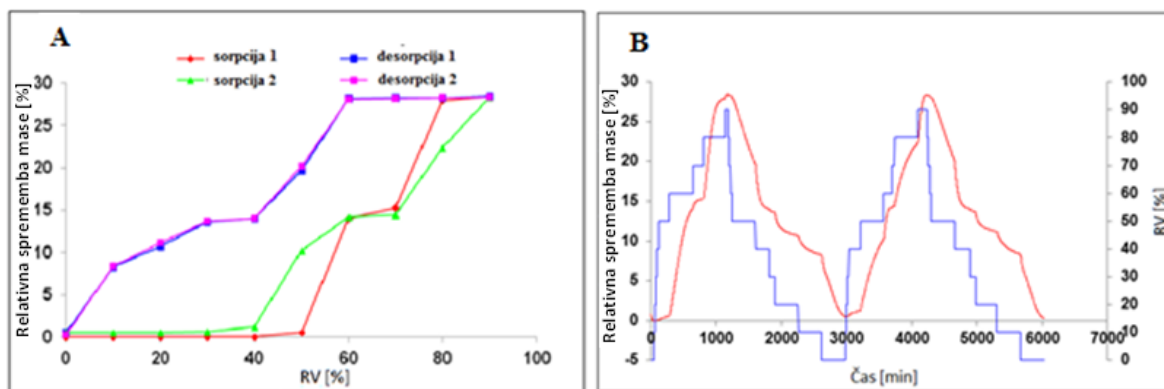
Slika 35: Vsebnost nevezane vode Krospongidona in ZU1 po enem tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi ($t=1t$), določena s TGA pri 85 °C (oznaki na y osi prikazujeta 1 % in 10 % vsebnost vode)

V primerjavi s spremljanjem prehajanja vode (komora) v kombinaciji s TGA analizo je DSC veliko hitrejša tehnika, ki se je v tem primeru izkazala za primerno kvalitativno ovrednotenje migracije vode.

4.5.4 Določanje vsebnosti vode komponent v simulaciji binarne zmesi 4

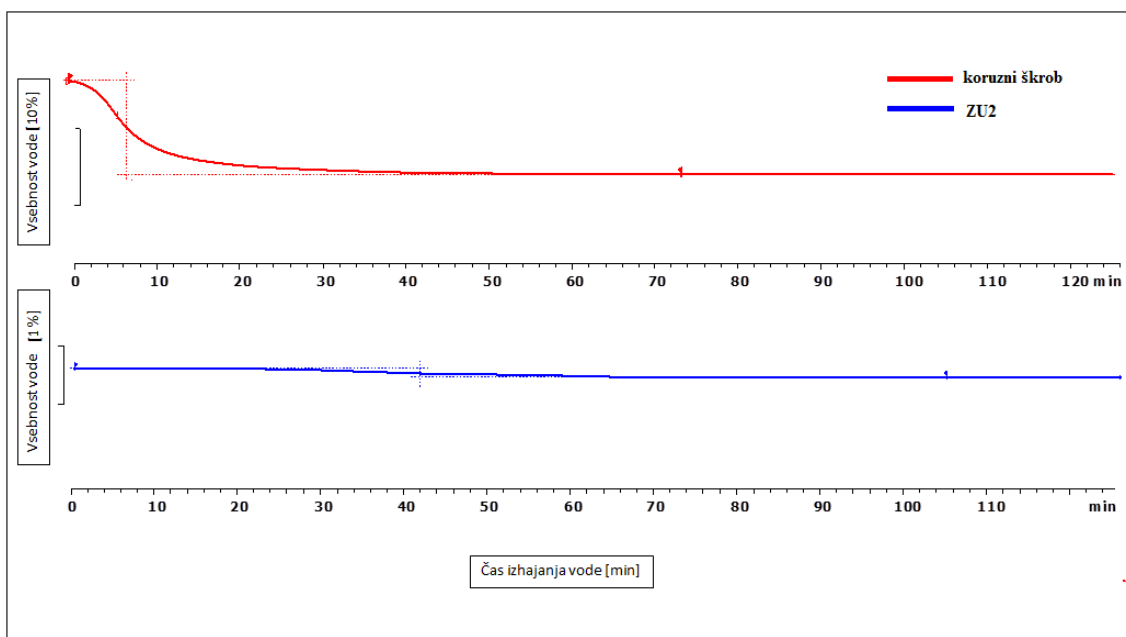
Modelno učinkovino ZU2 smo izbrali kot primer izrazito higroskopske učinkovine, ki bi morala po teoriji ostati stabilna v kombinaciji s koruznim škrobom, ki ima enako vodno aktivnost.

Izotermalna krivulja na sliki 36 kaže, da lahko pri sobnih pogojih relativne vlage (~ 55 % RV) ZU2 sorbira do ~ 15 % vlage, kar je za aktivno farmacevtsko učinkovino zelo veliko. Ravnovesje je dosegel na vsaki stopnji analize.

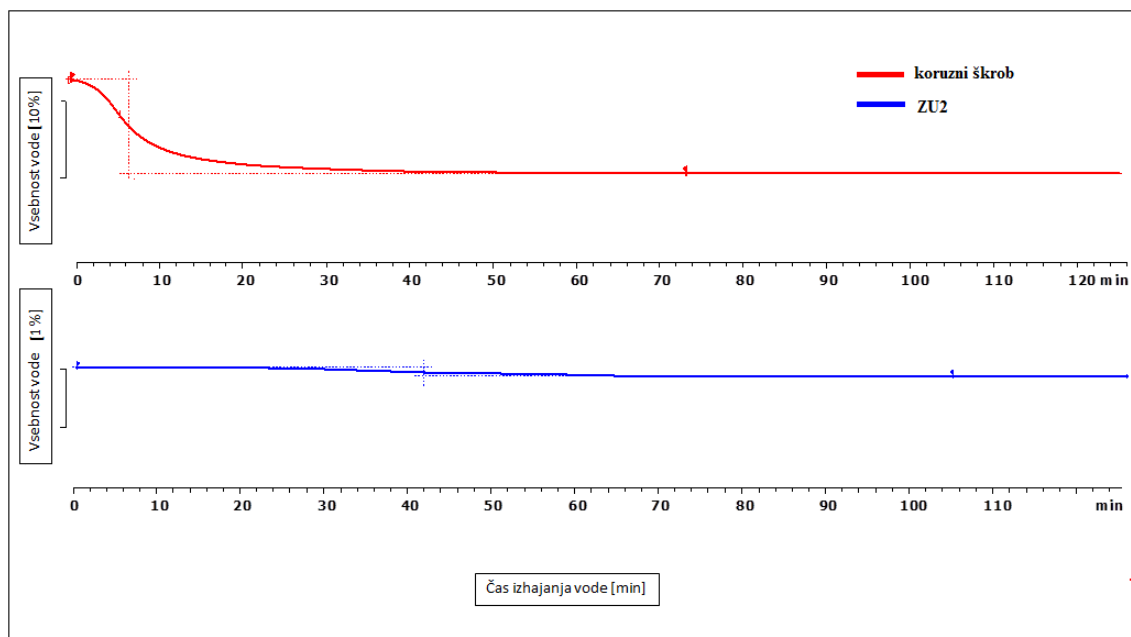


Slika 36: Krivulja relativne spremembe mase ZU2 v odvisnosti od relativne vlage ZU2, določena z metodo DVS (A), in časovni potek vzpostavljanja ravnotežja ZU2 pri različni relativni vlagi pri 25 °C na vsakem koraku meritve DVS analize (B)

ZU2 je močno higroskopska aktivna učinkovina in je kot taka nagnjena k sorpciji razpoložljive vode. Do migracije vode v komori med vzorcema pa kot so kazali rezultati vodne aktivnosti, izmerjeni na posameznih komponentah pred analizo (slika 37), vseeno ni prišlo zaradi termodinamskega ravnotežja, ki je preprečilo, da bi ZU2 sorbirala vodo iz koruznega škroba, čeprav jo je imel le-ta na voljo kar 11 % in to šibko vezane. Vzorca sta dosegla ravnotežje, zmes pa je ostala z vidika prenosa vode stabilna (slika 38), kar vidimo iz rezultatov vsebnosti vode v preglednici 9.



Slika 37: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in ZU2 v izhodnem stanju ($t=0$) določena s TGA pri 85 °C (oznaki na Y osi prikazujeta 1 % in 10 % vsebnost vode)



Slika 38: Vsebnost nevezane vode koruznega škroba in ZU2 po enem tednu v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi določena s TGA pri 85 °C (oznaki na Y osi prikazujeta 1 % in 10 % vsebnost vode)

4.7 OVREDNOTENJE MIGRACIJE VODE V ZMESI MED KORUZNIM ŠKROBOM IN NATRIJEVIM KARBOKSIMETILŠKROBOM S SORPCIJSKIMI IZOTERMAMI

Ko smo potrdili, da lahko z združevanjem vzorcev v komoro za izmenjavo vode med vzorci učinkovito posnemamo realno migracijo vode med vzorci v zmesih in da lahko migracijo tudi ovrednotimo s TGA analizo, smo na podlagi teoretičnih krivulj sorpcije vode poskušali oblikovati umeritvene krivulje spremembe mase vzorca v odvisnosti od vodne aktivnosti. Ideja je bila, da bi lahko na podlagi končne vodne aktivnosti zmesi v ravnovesju na sorpcijskih izotermalnih krivuljah odčitali vsebnost vode vsake snovi, ki vstopa v zmes. Tako bi lahko predvidevali kateri vzorci bi lahko z vidika vodne aktivnosti v končnem izdelku povzročali težave v smislu navlaževanja končnega izdelka in različnih fizikalno-kemijskih sprememb snovi v zmesi.

Določili smo, kakšna je vsebnost vode pri različnih vodnih aktivnostih vzorca. To smo dosegli tako, da smo koruzni škrob in NKMS izpostavili sobnim pogojem ter 60 % in 75 % RV pri 25 °C v komorah s kontroliranimi pogoji. Iz sorpcijskih krivulj in termičnega diagrama DVS smo sklepali, da bo 24 ur dovolj za vzpostavitev ravnotežja. Za nižje vrednosti vodne aktivnosti je bilo potrebno vzorec posušiti, za kar smo uporabili vakuumski sušilnik pri 25 °C (vakuum do 1 mb), tako da smo vzorec pomerili po različnih časovnih intervalih sušenja, 2 uri, 1 ura in 0,5 ure ali manj. Za doseganje višjih vodnih aktivnosti smo vzorce izpostavili še vodni pari. Vsebnost vode smo določali z metodo LOD, ki se je izkazala kot alternativna TGA analizi, vendar je bila veliko hitrejša in bolj reprezentativna, saj smo za analizo uporabili večje količine vzorca. Rezultate za koruzni škrob smo zbrali v preglednici 10, za NKMS pa v preglednici 11.

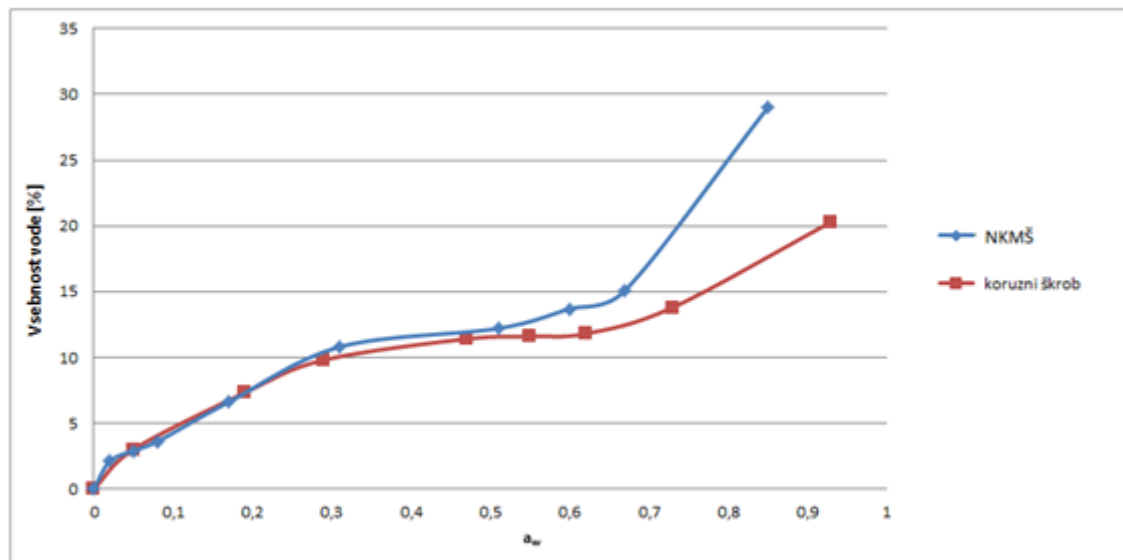
Preglednica 10: Podatki o pogojih meritve in rezultati vsebnosti vode za vsako točko umeritvene krivulje vsebnosti vode v odvisnosti od aktivnosti vode za koruzni škrob pri 25 °C

Aktivnost vode	Pogoji	Vsebnost vode LOD [%]
0,05	Vakuum 1h/1 mb	3,0
0,19	Vakuum 30 min/1 mb	7,3
0,31	Vakuum 15 min/1 mb	9,8
0,47	Analiza izhodnega stanja snovi	11,7
0,55	Sobni pogoji laboratorija: 25 °C, 55 % RV	11,6
0,62	Komora 60 %	11,8
0,73	Eksikator 75 % RV	13,8
0,93	Vodna para 100 % RV/1h	20,3

Preglednica 11: Podatki o pogojih meritve in rezultati vsebnosti vode za vsako točko umeritvene krivulje vsebnosti vode v odvisnosti od aktivnosti vode za NKMS pri 25 °C

Aktivnost vode	Pogoji	Vsebnost vode LOD [%]
0,02	Vakuum 2h/1 mb	2,1
0,05	Vakuum 1h/ mb	2,9
0,08	Vakuum 0,5h/1 mb	3,6
0,17	Analiza izhodnega stanja snovi	6,6
0,31	Vodna para 100 % RV/5 min	10,8
0,51	Sobni pogoji 25 °C, 50 % RV	12,2
0,60	Komora 60 %	13,7
0,67	Eksikator 75 % RV	15,1
0,85	Vodna para 100 % RV/1h	29,0

Izrisali smo sorpcijske izoterme v obliki vsebnosti vode v odvisnosti od aktivnosti vode pri 25 °C (slika 39).



Slika 39: Sorpcijska izoterma koruznega škroba in NKMS pri 25 °C

Glede na sliko 2 (poglavje Pregled objav), ki prikazuje krivulje različnih fizikalnih sorpcij, lahko opišemo način sorpcije koruznega škroba in NKMS. Oba, koruzni škrob in NKMS sta sorbirala vodo tipično za fizikalno sorpcijo tipa II, kar pomeni, da sta vzorca do prevoja pri $a_w \sim 0,50$ zapolnjevala mono-molekulsko plast vode, pri vrednostih višjih od 0,50 a_w pa se je začela formacija multi-molekulske plasti. Obe komponenti bi se v zmesi obnašali podobno do vodne aktivnosti $\sim 0,55$ (ali 55 % RV), nad to vrednostjo pa bi NKMS začel sorbirati več vode kakor koruzni škrob.

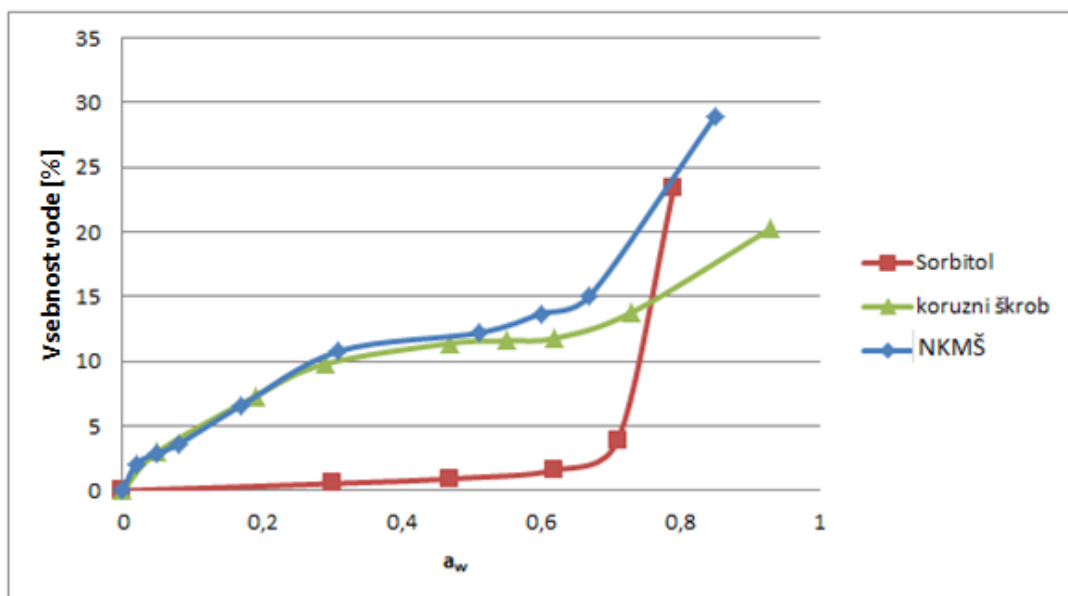
4.8 OVREDNOTENJE MIGRACIJE VODE V SIMULACIJI ZMESI MED KORUZNIM ŠKROBOM, NATRIJEVIM KARBOKSIMETILŠKROBOM IN SORBITOLOM S SORPCIJSKIMI IZOTERMAMI IN TERMOGRAVIMETRIČNO ANALIZO

Teorijo o karakterističnih sorpcijskih krivuljah snovi smo preverili na simulaciji tri-komponentnega sistema. V komoro za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi smo združili tri snovi; koruzni škrob, NKMS in pa sorbitol kot humektant. Sorbitol smo v formulacijo vključili zaradi sposobnosti vezave vode v svojo strukturo, v kateri jo tudi zadrži in s tem stabilizira formulacijo, ima vlogo humektanta.

Podatke za koruzni škrob in NKMS smo povzeli iz preglednic 10 in 11. Sorbitolu pa smo izmerili vsebnost vode pri različnih vodnih aktivnostih, tako da smo vzorec navlaževali oziroma sušili.

Preglednica 12: Podatki o pogojih meritve in rezultati vsebnosti vode za vsako točko umeritvene krivulje vsebnosti vode v odvisnosti od aktivnosti vode za Sorbitol pri 25 °C

Aktivnost vode	Pogoji	Vsebnost vode LOD [%]
0,28	Vakuum 30 min/1 mb	0,6
0,47	Sobni pogoji, 25 °C, 47 % RV	0,9
0,62	Komora 60 %	1,6
0,71	Eksikator 75 % RV	3,9
0,79	Eksikator 80 % RV	23,6



Slika 40: Sorpcijska izoterma koruznega škroba, NKMS in sorbitola pri 25 °C

Pri analizi rezultatov sorpcije sorbitola smo prišli do zanimive ugotovitve, saj je vlogo humektanta prevzel šele pri vodni aktivnosti $\sim 0,70$, kar pa je previsoka vrednost za farmacevtske formulacije, ki imajo ponavadi nižjo vodno aktivnost. Glede na njegove sorpcijske lastnosti bi bil primeren humektant oziroma aditiv za živilske formulacije, ki imajo veliko višje vsebnosti vode in posledično tudi višje vodne aktivnosti.

Sorbitol je vodo sorbiral glede na tip III po klasifikaciji fizikalne sorpcije. Krivulja je konveksne oblike po celotni dolžini, to pa pomeni, da snov pri nižjih aktivnosti skoraj ni sorbirala vode in se voda ni vezala v monomolekularno plast, dokler ni dosegla višje vodne aktivnosti. Pri višjih aktivnostih vode je prišlo do kondenzacije vode, ki je bila na voljo, ta pa se je začela pospešeno nalagati v mono- in multi-molekularno plast hkrati.

Končno ravnotežno aktivnost zmesi smo izmerili z aparatom za merjenje aktivnosti vode, in sicer 0,34, iz preglednice na sliki 40 pa smo odčitali vsebnost vode pri vodni aktivnosti 0,34. Odčitano vrednost vsebnosti vode smo preverili s TGA analizo, potem ko so bili vsi vzorci skupaj zaprti v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi. Sistem v komori je predstavljal simulacijo realne zmesi vseh treh komponent.

Preglednica 13: Primerjava rezultatov napovedane vsebnosti vode posameznih komponent v zmesi po enem tednu in izmerjenih rezultatov s TGA

Snov	Vsebnost vode odčitana iz grafa	Vsebnost vode pri $t=0$ [%]	Vsebnost vode pri $t=1$ teden [%]
Koruzni škrob	$\sim 10,5$ %	12,6	10,6
NKMSŠ	$\sim 11,5$ %	7,2	11,7
Sorbitol	$\sim 0,6$ %	0,6	0,5

Glede na rezultate analize TGA, ki so prikazani v preglednici 13, smo ugotovili, da je izdelava izotermalne krivulje primerno orodje za napoved migracije vode v formulaciji, saj se rezultati napovedi in dejanske vsebnosti vode razlikujejo le za $\sim 0,2$ %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Airaksinen s sodelavci (2005) in Guo s sodelavci (2013) v svojih raziskavah razlagata vpliv vode na farmacevtske formulacije. Poudarjata, kako pomembno je spremljati vsebnost vode tako snovi kot tudi končnega izdelka, da bi zagotovili kakovosten in stabilen izdelek. Tudi v okviru naše raziskave smo potrdili, da je poznavanje vsebnosti vode, obnašanja vode v snovi in v formulacijah, ki predstavljajo heterogen sistem ter spremembe snovi pod vplivom vode ključnega pomena za razvoj končnega izdelka.

Vsebnost vode v snovi in njena aktivnost sta vodilo za pojav migracije vode. Zaradi migracije vode lahko v formulaciji pride do fizikalnih in kemijskih sprememb, ki neugodno vplivajo na končni izdelek. V sklopu naše raziskave smo zasledili pojav hidratov in polimorfne prehode, Guo in sod. (2013) pa navajajo tudi spremembe v barvi snovi, aglomeracijo in tudi mikrobiološko ter kemijsko nestabilnost. Končni izdelek je tako lahko senzorično nesprejemljiv s slabšo obstojnostjo in krajšim rokom trajanja.

Ker sta vsebnost vode in njena aktivnost povezana z lastnostmi snovi (Labuza in Altunakar, 2007), smo v prvem delu predposkusa okarakterizirali lastnosti koruznega škroba in NKMS. Analizirali smo obliko in velikost delcev, sorpcijske lastnosti materiala, določili vsebnost vode in izmerili vodno aktivnost. Ugotovili smo, da je imel koruzni škrob v primerjavi z NKMS manjšo velikost delcev. Povprečna velikost delcev koruznega škroba je bila 13 μm , povprečna velikost NKMS pa 44 μm . Razlikovala sta se tudi po načinu sorpcije vode. Koruzni škrob je na vlažnih pogojih sorbiral do $\sim 15\%$ vode glede na začetno maso vzorca, NKMS pa do $\sim 30\%$ vode. Koruznemu škrobu se v vodi velikost delcev ni spremenila, zato smo predvidevali, da vodo adsorbira, NKMS pa se je velikost delcev povečala za 4-krat, zato smo predvidevali, da je vodo tudi absorbiral. Celokupna vsebnost vode NKMS v izhodnem stanju je bila 7,5 % od tega 5,9 % nevezane vode z vodno aktivnostjo 0,17. Koruzni škrob je vseboval 12,2 % celokupne vode, od tega 11,3 % nevezane vode z vodno aktivnostjo 0,47. Obe snovi sta imeli le $\sim 1\%$ v strukturo vezane vode iz česar smo razbrali, da je bilo večina vode, ki sta jo sorbirala, nevezane in tako razpoložljive za vstop v kemijske reakcije in v proces migracije vode. Koruzni škrob je svojo vezano vodo oddal lažje, saj je imel v primerjavi z NKMS višjo vodno aktivnost. Glede na analizo vsebnosti vode in njene aktivnosti v koruznem škrobu in NKMS smo predvidevali, da bo koruzni škrob z višjo vodno aktivnostjo oddal svojo nevezano vodo NKMS z nižjo vodno aktivnostjo.

Za analizo migracije vode med snovmi smo morali konstruirati komoro, ki predstavlja nepredušne pogoje za izmenjavo vode med snovmi. Zaradi poznanih dimenzij komore smo lahko preko njene prostornine izračunali maso vlage, ki je v komori v začetnem stanju in vpliva na sorpcijo vlage snovi. Ker migracija vode temelji na vodni aktivnosti vzorcev, smo najprej zagotovili, da metoda določanja vode ni vplivala na vsebnost vode v snoveh.

Ker se med analizo vzpostavi ravnovesje med vlago vzorca in vlago v merilni komori, smo predvidevali, da se vsebnost vode v vzorcu po končani analizi spremeni. Uporabniški priročnik aparata za določanje vodne aktivnosti zagotavlja, da lahko vpliv atmosferske vlage zanemarimo, če analiziramo zadostno količino vzorca, pri čemer je vpliv atmosferske vlage skoraj ničeln (AquaLab..., 2014). Trditev smo potrdili s teoretičnim izračunom vpliva atmosferske vlage na vzorec, tako da smo maso vlage v atmosferi primerjali z maso vzorca. Ugotovili smo, da je bil vpliv atmosferske vlage v primerjavi z maso vzorca v masnih odstotkih le $8 \cdot 10^{-5} \%$, ki je bila dovolj nizka vrednost, da smo jo dejansko lahko zanemarili. Teoretični izračun smo potrdili z analizo vsebnosti vode s TGA analizo tako, da smo primerjali vsebnost vode v vzorcu pred in po končani analizi vodne aktivnosti in ugotovili, da je bila vsebnost vode v vzorcih v obeh primerih enaka.

V prvem delu glavnega poskusa smo raziskali vpliv tehnoloških postopkov na vodno aktivnost snovi. Abramovič (2006) in Ramsey s sodelavci (2005) trdita, da lahko z različnimi tehnološkimi postopki vplivamo na vodno aktivnost različnih materialov. Preverili smo hipotezo 1, ki trdi, da velikost delcev vpliva na vodno aktivnost in jo na podlagi rezultatov analiziranih vzorcev delno ovrgli. Ugotovili smo, da sprememba velikosti delcev z mletjem ne vpliva na aktivnost vode, ampak le na hitrost doseganja končne točke.

Vpliv dodatka humektantov smo preverili z rentgensko praškovno difrakcijo, s katero smo lahko učinkovito spremljali nastanek hidratov v neki snovi. Analizo smo izvedli na primeru koruznega škroba z relativno visoko vsebnostjo vode in magnezijevega klorida z lastnostmi humektanta. Z analizo vodne aktivnosti zmesi obeh snovi smo ugotovili znatno znižanje vodne aktivnosti že pri 0,5 % dodatku $MgCl_2$ kot humektanta, in sicer se je vodna aktivnost koruznega škroba znižala iz 0,47 na 0,34, pri 5 % dodatku $MgCl_2$ pa se je znižala na 0,03. Zaradi opaznega znižanja vodne aktivnosti zmesi smo predvidevali, da $MgCl_2$ sorbira vodo in prehaja v hidratno obliko. Ker je hidratna voda, ki jo je sorbiral $MgCl_2$, močnejše vezana, kot je bila pri koruznem škrobu, se je vodna aktivnost zmanjšala. To smo dokazali z rentgensko praškovno difrakcijo. V difraktogramu zmesi $MgCl_2$ in koruznega škroba smo zaznali karakteristične uklone hidratne oblike $MgCl_2$ primerjalno na brezvodno obliko $MgCl_2$ in koruzni škrob. Rezultate smo potrdili tudi z diferenčno dinamično kalorimetrijo. Na termogramu zmesi koruznega škroba in $MgCl_2$ smo primerjalno na krivuljo koruznega škroba in $MgCl_2$ v brezvodni in hidratni obliki opazili izostanek vrha v temperaturnem območju, kar je značilno za izgubo nevezane vode ter dodatna dva trebušasta vrhova, ki sta značilna za izgubo hidratne vode. Z dvema metodama smo tako potrdili, da je $MgCl_2$ sorbiral nevezano vodo koruznega škroba in jo porabil za prehod v hidratno obliko, pri čemer se je aktivnost tako vezane vode zmanjšala, kar je potrdilo znižanje vodne aktivnosti. Ta pojav bi lahko izkoristili v realni formulaciji, pri kateri je migracija vode na učinkovino nezaželena vode, saj bi $MgCl_2$ sorbiral vodo in obenem znižal vodno aktivnost celotne formulacije.

Ko smo razumeli princip vodne aktivnosti in migracije vode ter signifikantnost poznavanja fizikalno-kemijskih lastnosti snovi, ki sodelujejo v migraciji vode, smo spremljali spremembo vsebnosti vode snovi pri simulaciji binarnih zmesi kot posledica migracije vode, do katere pride zaradi razlik v vodni aktivnosti snovi. Snov z višjo vodno aktivnostjo odda vodo snovi z nižjo vodno aktivnostjo (Abramovič, 2005).

Izbrali smo več simulacij binarnih zmesi na podlagi različnih vodnih aktivnosti. Snovem v izhodnem stanju smo izmerili vodno aktivnost, jih zmešali v razmerju 1:1 in nato izmerili vodno aktivnost zmesi. Simulacije različnih zmesi smo pripravili tako, da smo po dva vzorca, vsakega v svojem lončku, skupaj zaprli v komoro za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi za 1 teden, da sta dosegla ravnovesje. Spremembo vsebnosti vode smo spremljali termogravimetrično tako, da smo primerjali končno maso vzorca z začetno maso vzorca s TGA analizo. Koruzni škrob z vodno aktivnostjo 0,47 je oddal svojo nevezano vodo NKMS z nižjo vodno aktivnostjo 0,17, da sta dosegla ravnovesno vodno aktivnost 0,31. V procesu migracije je koruzni škrob oddal ~ 1 % vode, NKMS pa jo je sprejel ~ 3 %. V zmesi sukraloze in koruznega škroba migracija vode zaradi enake vodne aktivnosti obeh snovi ni potekla, zato se vsebnost vode pri obeh snoveh tekom analize ni spremenila. Na primeru zmesi ZU1 in Kros повідona, ki je zaradi višje vodne aktivnosti oddal svojo nevezano vodo ZU1, smo prikazali uporabnost DSC metode za opazovanje migracije vode, ki se je izkazala za uporabno in hitro metodo. Na primeru zmesi četrte binarne zmesi ZU2 in koruznega škroba smo dokazali, da je vodna aktivnost res vodilo migracije vode v zmesi. Z DVS metodo smo določili, da je ZU2 močno higroskopična snov, ki lahko sorbira do 35 % vlage, kar je za aktivno farmacevtsko učinkovino zelo veliko. Zaradi zelo podobne vodne aktivnosti obeh snovi do migracije vode navkljub higroskopsnosti ZU2 in razpoložljive proste vode koruznega škroba ni prišlo. Hipotezo 2 o migraciji vode iz mesta višje vodne aktivnosti na mesto nižje vodne aktivnosti, neodvisno od vsebnosti vode, smo v sklopu glavnega poskusa potrdili.

V zaključnem poskusu smo želeli kvantitativno ovrednotiti migracijo vode. Pri oblikovanju končnega izdelka je poznavanje vsebnosti vode posameznih snovi ključnega pomena, saj lahko na podlagi poznavanja le-te predvidevamo fizikalno-kemijske spremembe izdelka, vplivamo na stabilnost in določimo rok trajanja izdelka. Zaradi migracije vode je končna vsebnost vode snovi drugačna kakor vsebnost vode v izhodnem stanju. Če poznamo smer in obseg migracije vode, lahko preprečimo neželene spremembe posameznih komponent končnega izdelka, kot so nastanek hidratov, sprememba polimorfne oblike, nastanek amorfnih oblik, nabrekanje izdelka zaradi sorpcije vlage, spremembe senzoričnih lastnosti in druge nezaželene spremembe.

Na podlagi raziskave Guillarda s sodelavci (2004), v kateri trdi, da vsaka snov sorbira vodo na specifičen način, smo izoblikovali umeritvene krivulje, ki jih imenujemo sorpcijske izotermalne krivulje vsebnosti vode v odvisnosti od vodne aktivnosti.

V prvem poskusu smo pripravili sorpcijske izotermalne krivulje za binarno zmes koruznega škroba in NKMS. Vsako snov smo kontrolirano navlaževali in sušili ter jim na vsaki točki izmerili vodno aktivnost in vsebnost vode z metodo LOD. Točke smo združili v graf vsebnosti vode v odvisnosti od vodne aktivnosti. Sabaawi in Pei sta že leta 1977 razdelila snovi glede na sorpcijske izotermalne krivulje v več razredov. Na podlagi oblike krivulje smo ugotovili, da sta oba, koruzni škrob in NKMS, sorbiral vodo tipično za fizikalno sorpcijo tipa II in da sta pri nizkih parnih tlakih vodo vezala v mono-molekulske plasti vode, pri višjih tlakih pa je prišlo do prevoja na krivulji, ko se je začela formacija multi-molekulske plasti. Pri koruznem škrobu in pri NKMS je do prevoja prišlo pri vodni aktivnosti $\sim 0,50$.

Novo pridobljeno znanje o izotermalnih krivuljah smo preizkusili na simulaciji tri-komponentne zmesi koruznega škroba, NKMS in sorbitola. Sorbitol smo v formulacijo vključili kot humektanta (Ramsey in sod., 2005). Za vse tri snovi smo izdelali izotermalne krivulje s kontroliranim sušenjem in navlaževanjem. Zmešali smo jih v zmes v enakih deležih in jim po enem tednu izmerili končno vodno aktivnost, ki je bila 0,34. Na podlagi končne vodne aktivnosti zmesi, ki jih snovi dosežejo, ko vse dosežejo ravnovesje, smo iz umeritvene krivulje odčitali končno vsebnost vode vseh snovi v tej točki. Koruzni škrob je oddal svojo vodo do končne vsebnosti 10,5 %, NKMS je vodo sorbiral do končne vsebnosti 11,5 %, sorbitolu pa se vsebnost vode v zmesi ni spremenila. Metodo določevanja končne vsebnosti vode snovi v zmesi preko umeritvenih krivulj smo preverili še z določevanjem vsebnosti vode s TGA analizo potem, ko so vzorci dosegli ravnovesje v komori za izmenjavo vode med vzorci v kontrolirani atmosferi. Koruzni škrob je iz začetne vsebnosti vode 12,6 % prišel na 10,6 %, NKMS je sprejel vodo iz začetne 7,2 % na 11,7 %, sorbitolu pa se vsebnost vode praktično ni spremenila, saj je imel začetno vsebnost vode 0,6 %, končno pa 0,5 %. Tako smo potrdili ustreznost metode za določanje končne vsebnosti vode komponent formulacij preko izotermalnih krivulj.

Do zanimivih spoznanj smo prišli, ko smo opazovali obnašanje sorbitola v formulaciji. Ugotovili smo, da sorbitol sorbira vodo po tipu III glede na klasifikacijo fizikalne sorpcije, saj je bila njegova krivulja konveksne oblike in pri nizkih vodnih aktivnostih ni sorbiral vode. Do intenzivne sorpcije vode je prišlo šele pri vodni aktivnosti $\sim 0,70$. Sorbitol ni primeren humektant za trdne farmacevtske formulacije, ki so ponavadi zelo suhe z nizko vodno aktivnostjo, bi bil pa zelo primeren za živilsko formulacijo, ki so ponavadi bolj vlažne z višjo vodno aktivnostjo.

Metoda za določanje končne vsebnosti posamezne komponente formulacije iz različnih snovi, aktivnih učinkovin in pomožnih snovi je zelo uporabna za napoved smeri in kar je najbolj pomembno tudi obsega migracije vode znotraj formulacije. Uporabna je za ugotavljanje vzrokov fizikalnih in kemijskih sprememb v končnem izdelku in tudi za napoved potencialne migracije vode že v začetnih predformulacijskih študijah, ko sestavo formulacije končnega izdelka šele raziskujemo.

5.1 SKLEPI

- Vpliv vsebnosti vode v atmosferi merilne komore aparata za določanje vodne aktivnosti na vzorec, ki ga analiziramo v komori, je zaradi izmenjave vlage med vzorcem in komore med analizo zanemarljiva, saj je vpliv atmosferske vlage v primerjavi z vlago vzorca v masnih odstotkih le $8 \cdot 10^{-5} \%$. Vzorec po analizi vodne aktivnosti z vidika vsebnosti vode ostane nespremenjen.
- Koruzni škrob vodo adsorbira na površino na vseh stopnjah RV, pri čemer najprej tvori monomolekulska plast in nato pri 50 % RV še multimolekulska plast na površini; zaradi tega se velikost in oblika delcev ne spreminja, medtem ko modificiran škrob vodo najprej adsorbira na površino, ko pa doseže RV $\sim 30 \%$ prične vodo absorbirati v svojo strukturo. Na račun absorbirane vode se poveča tudi velikost delcev.
- Velikost delcev snovi ne vpliva na obseg, ampak vpliva na hitrost vezave vode. Kompleksnost strukture na vodno aktivnost vpliva, saj smo opazili razlike v vodni aktivnosti in načinu vezave vode med škrobom v nativnem stanju in zamreženem škrobu s kompleksnejšo strukturo. Hipotezo 1 smo deloma potrdili.
- Snovi, imenovane humektanti, sorbirajo vodo v formulaciji in jo zadržijo v svoji strukturi. Dokazali smo, da z uporabo teh lahko ciljano vodo povlečemo v želeno smer (stran od snovi, za katero je neugodna) kar nam omogoča uporabo snovi z višjo vodno aktivnostjo in vsebnostjo vode v formulaciji.
- Hipotezo 3 smo potrdili saj dodatek MgCl_2 v zmesi zmanjša aktivnost vode celotne zmesi tako, da sorbira in zadrži vodo tako, da jo porabi med prehodom iz brezvodne v hidratno obliko. Hidratna voda je močnejše vezana v strukturo MgCl_2 zato je njena aktivnost nižja in kot taka težje vstopa v kemijske reakcije.
- Migracija vode poteka od mesta visoke aktivnosti vode na mesto nizke aktivnosti, neodvisno od higroskopnosti snovi in vsebnosti vode snovi, ki je udeležena v procesu migracije. Vodno aktivnost neke snovi lahko zato uporabimo za napovedovanje smeri in obsega migracije vode. Hipotezo 2 smo potrdili.

- Koruzni škrob v kombinaciji z NKMS odda svojo nevezano vodo, ki jo sorbira NKMS, dokler ne dosežeta termodinamskega ravnovesja in se njuna vodna aktivnost izenači na 0,31.
- Koruzni škrob in sladilo sukraloza z različno vsebnostjo vode in enako vodno aktivnostjo si v zmesi ne izmenjata vode, ker sta že v izhodnem stanju v termodinamskem ravnovesju.
- Zelo higroskopna ZU2 v kombinaciji s koruznim škrobom s kar 13 % nevezane vode zaradi termodinamskega ravnovesja ne sorbira vode, saj imata v izhodnem stanju enako vodno aktivnost. Taka formulacija z vidika migracije vode ostane nespremenjena.
- Samo na osnovi meritev a_w posameznih komponent in heterogenih zmesi ne moremo napovedati natančne količine vode, ki se bo izmenjala v procesu migracije vode, lahko napovemo le smer. Vzrok za to je specifičnost snovi v smislu fizikalno-kemijskih lastnosti; zaradi tega sorpcije vode različnih snovi ne moremo linearizirati, saj lahko vsako opišemo s svojo specifično sorpcijsko izotermalno krivuljo.
- Za natančno napoved količine vezane/oddane vode potrebujemo določitev vsebnosti vode pri različnih aktivnostih vode vsake posamezne komponente, na osnovi izrisanega grafa lahko kvantitativno napovemo rezultat migracije vode, ki ga bo heterogeni sistem dosegel v ravnovesju.

6 POVZETEK

V magistrski nalogi smo hoteli na praktičnih primerih dokazati dejstvo, da se voda v snovi obnaša v skladu s svojim kemijskih potencialom, ki pa je odvisen od načina vezave vode v snovi. Termodinamsko ravnovesje vpliva tako na migracijo vode med posameznimi komponentami v zmesi, kot tudi na izmenjavo vode med zmesjo in atmosfero. Sistem teži k vzpostavitvi ravnotežnega stanja. Prehajanje vode bo zato potekalo iz mesta višje na mesto nižje aktivnosti vode, dokler se proces ne uravnoteži in sistem doseže svoje optimalno stanje.

Postavili smo 3 hipoteze, ki smo jih raziskali v eksperimentalnem delu naloge. Trdili smo, da migracija vode v neki zmesi poteka iz mesta višje vodne aktivnosti proti mestu nižje vodne aktivnosti neodvisno od vsebnosti vode ali higroskopnosti komponent med katerimi migrira voda. To smo najbolje prikazali na primeru simulacije binarne zmesi močno higroskopske ZU2 in koruznega škroba z veliko razpoložljive proste vode. ZU2 je imela vodno aktivnost 0,44, koruzni škrob pa 0,47. Navkljub higroskopnim lastnostim ZU2 in dovolj razpoložljive vode v zmesi, do izmenjave vode med njima vseeno ni prišlo, ker sta bili komponenti v termodinamskem ravnovesju še preden smo jih združili v zmes. ZU2 kot aktivna učinkovina je tako v zmesi ostala stabilna.

Hipotezo 2 smo oblikovali po predpostavki, da lahko s spremembo velikosti delcev neke snovi oziroma njihove specifične površine vplivamo na vodno aktivnost snovi. Hipotezo smo na podlagi rezultatov mletja koruznega škroba in NKMS ovrgli, saj se vodna aktivnost ni spremenila, spremenila se je le hitrost doseganja končne ravnovesne vodne aktivnosti na sobnih pogojih pri $\sim 50\%$ RV. Manjši, mleti delci koruznega škroba in NKMS so ravnovesno vodno aktivnost dosegli nekoliko hitreje kakor nemleti delci. Zaključimo lahko, da s spremembo velikosti delcev vplivamo le na hitrost izmenjave vode, končna vsebnost vode in končna vodna aktivnost pa je pogojena s fizikalnimi lastnostmi materiala in ostane pri analiziranih vzorcih ne glede na velikost delcev nespremenjena.

V nalogi smo dokazali, da si lahko pri izdelavi končne stabilne formulacije pomagamo s pomožnimi snovmi, imenovanimi humektanti. V primerih, ko so določene vrste pomožnih snovi nenadomestljive, vendar nestabilne s stališča prehajanja vode, v formulacijo dodamo snovi, s katerimi to nezaželeno migracijo vode omejimo ali jo obrnemo v drugo smer. Da bi dobro razumeli mehanizem delovanja humektantov smo izbrali MgCl_2 . Predvidevali smo, da bo vodo vezal v svojo strukturo pri čemer bo prešel iz brezvodne v hidratno obliko. Hipotezo 3 smo potrdili z rentgensko praškovo difrakcijo, ki omogoča ločevanje med brezvodno in hidratno obliko snovi, ki se razlikujejo v periodični urejenosti kristalov zaradi česar pride do specifičnega odboja in interference rentgenskih žarkov (Goldstein in sod., 2007). MgCl_2 je imel v brezvodnem stanju zelo nizko vodno aktivnost 0,03, zato je v zmesi s koruznim škrobom z vodno aktivnostjo 0,47 intenzivno sorbiral razpoložljivo

vodo, da bi zmes dosegla termodinamsko ravnotežje. Na podlagi difraktograma zmesi koruznega škroba in MgCl_2 smo pri primerjavi različni oblik (brezvodne in hidratne) ugotovili, da je MgCl_2 razpoložljivo vodo vezal v strukturo in pri tem prehajal v hidratno obliko. Ker je rentgenska digfrakcija primerna le za spremljanje vezave kristalno vezane vode, smo z uporabo diferenčne dinamične kalorimetrije lahko spremljali še spremembe koruznega škroba v zmesi. Na termogramu smo v zmesi ugotovili izostanek trebušastega vrha kjer izhaja voda koruznega škroba in vrhove, ki so značilni za hidratno obliko MgCl_2 .

Z raziskavo smo zaključili, da moramo za oceno migracije vode v zmesi najprej preučiti lastnosti sorpcije vode vsake komponente posebej in izdelati umeritvene krivulje v obliki spremembe mase v odvisnosti od aktivnosti vode. Iz takih krivulj lahko z relativno veliko natančnostjo napovemo koliko vode bo določena snov sprejela ali oddala v formulaciji glede na končno ravnotežno vodno aktivnost.

Naše ugotovitve, do katerih smo prišli s tem magistrskim delom, pripomorejo k optimalnejšemu izboru kombinacij zdravilne učinkovine in pomožnih snovi že v zgodnjih fazah razvoja formulacije, pristope pa je smiselno uporabiti že v predformulacijski fazi.

7 VIRI

- Abramovič H. 2006. Voda v živilih. Ciklus predavanj pri predmetu živilska kemija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 85 str. (CD-ROM)
- Airaksinen S., Karjalainen M., Shevchenko A., Westermarck S., Leppänen E., Rantanen J., Yliruusi J. 2005. Role of water in the physical stability of solid dosage formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, 10: 2147-2165
- Al Deeb O.A.A., Mahgoub H., Foda N.H. 2013. Sucralose. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 38: 423-462
- Andrade P., Lemus R.M., Perez C.E. 2011. Models of sorption isotherms for food: uses and limitations. *Vitae Revista de la Facultad de Química Farmaceutica*, 18, 3: 325-334
- AquaLab water activity meter. Uporabniški priročnik za verzijo 4TEV. 2014. Pullman, Decagon Devices Inc.: 111 str. (Navodilo za uporabo)
- Baldwin P.M. 2001. Starch-granule associated proteins and polypeptides: a review. *Starch-Stärke*, 53, 10: 475-503
- Brittain H.G. 2001. Particle-size distribution, part I. Representations of particle shape, size, and distribution. *Pharmaceutical Technology North America*, 25, 12: 38-45
- Butre C.I., Wierenga P.A., Gruppwn H. 2014. Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 49, 11: 1903-1912
- Callahan J., Cleary G., Elefant M., Kaplan G., Kensler T., Nash R. 1982. Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 8: 355-369
- FAO/WHO. 2014. Codex general standard for food additives (GSFA) online database: Magnesium chloride (511). Rome, FAO/WHO: baza podatkov <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=73> (maj 2014)
- Coral D., Pineda-Gomez P., Rosales-Rivera A., Rodriguez-Garcia M.E. 2009. Determination of the gelatinization temperature of starch presented in maize flours. *Journal of Physics: Conference Series*, 167: 012057, doi:10.1088/1742-6596/167/1/012057: 5 str.
- Decagon Devices. 2007. Application Note: Water activity definition. Pullman, Decagon Devices Inc.: 2 str. <http://www.aqualab.com/assets/Uploads/AwDefinition.pdf> (maj 2014)
- El Sabaawi M., Pei D.C.T. 1977. Moisture isotherms of hygroscopic porous solids. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, 16, 3: 321-326

- Encyclopedia Britannica. 2014. Deliquescence. V: Encyclopaedia Britannica Online. Chicago, Academic Edition: 1 str.
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/156605/deliquescence> (maj 2014)
- Gift A.D., Luner P.E., Leudeman L., Taylor L.S. 2008. Influence of polymeric excipients on crystal hydrate formation kinetics in aqueous slurries. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 12: 5198-5211
- Goldstein J., Newbury D., Joy D., Lyman C., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J., 2007. Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis 3rd ed. New York, Springer Science: 690 str.
- Guillard V., Bourlieu C., Gontard N. 2013. Food structure and moisture transfer: A modeling approach. New York, Springer Science: 60 str.
- Guo Y., Shalaev E., Smith S. 2013. Physical stability of pharmaceutical formulations: solid-state characterization of amorphous dispersions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 49: 137-144
- Heinemann C., Cardinaux F., Scheffold F., Schurtenberger P., Escher F., Conde-Petit B. 2004. Tracer microrheology of γ -dodecalactone induced gelation of aqueous starch dispersions. *Carbohydrate Polymers*, 55: 155-161
- JAZMP. 2015. Evropska farmakopeja, Ph.Eur. Ljubljana, JAZMP - Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke: 1 str.
http://www.jazmp.si/farmakopeja/evropska_farmakopeja/ (marec 2015)
- Jones, F.E. 1985. Mass basis Karl Fischer titration equation for moisture determination. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62: 1605-1605
- Kaatze U. 2011. Bound water: Evidence from and implications for the dielectric properties of aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids*, 162, 3: 105-112
- Kachrimanis K., Noisternig M., Griesser U.J., Malamataris S. 2006. Dynamic moisture sorption and desorption of standard and silicified microcrystalline cellulose. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64, 3: 307-315
- Kearsley M.W., Deis R. 2006. Sorbitol and mannitol. V: *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. Mitchell H. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing Ltd.: 249-261
- Kontny M.J., Zografi G. 1995. Sorption of water by solids. V: *Physical characterization of pharmaceutical solids*. Brittain H.G. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc.: 387-418
- Labuza T.P., Altunakar B. 2007. Water activity prediction and moisture sorption isotherm. V: *water activity in foods: Fundamentals and Applications*. Gustavo V., Barbosa-Cánovas K. (eds.). Iowa, IFT Press: 109-154

- Mackin L., Zanon R., Park J.M., Foster K., Opalenik H., Demonte M. 2002. Quantification of low levels (<10 %) of amorphous content in micronized active batches using dynamic vapor sorption and isothermal microcalorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 231: 227-236
- McClements J. 2003. Analysis of food products (Food science 581): Determination of moisture and total solids. Amherst, University of Massachusetts, Department of Food Science: 5 str.
<http://people.umass.edu/~mcclemen/581Toppage.html> (maj 2014)
- Mettler Toledo. 2001. Collected applications: Thermal analyses: Pharmaceuticals. Greifensee, Mettler Toledo Collected Applications TA: 100 str.
http://us.mt.com/us/en/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/Application_Browse_thermal_analysis/TA_Appl_Handb/Pharmaceutical/_jcr_content/standardpar/66089/file/file.res/Pharmaceuticals_Handbook_Example.pdf (maj 2014)
- Mettler Toledo. 2009. Moisture determination with the halogen moisture analyzer: Guide to moisture analysis. Greifensee, Mettler Toledo Collected Applications TA: 45 str.
- Nakanishi S., Fujii M., Sugamura Y., Suzuki A., Shibata Y., Koizumi N., Watanabe Y. 2011. Evaluation of the physicochemical characteristics of crospovidone that influence solid dispersion preparation. *International Journal of Pharmaceutics*, 4313, 1-2: 119-125
- Nyman S.J., Gorochow E.L., Horch A.R., Uppuganti S., Zein-Sabatto A., Manhard M., Does D.M. 2013. Partial removal of pore and loosely bound water by low-energy drying decreases cortical bone toughness in young and old donors. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 22: 136-145
- Primojel Productsheet. 2011. Goch, DFE Pharma: 2 str.
www.dfepharma.cn (junij 2014)
- ProUmid 2014. SPS – Moisture sorption analysis. Ulm, ProUmid GmbH & Co. KG: 9 str.
http://proumid.com/uploads/jdillenz/Downloads/ProUmid_Prospekt_SPS_16s_klein.pdf (junij 2014)
- Ramsey R.J.L., Stephenson G.R., Hall J.C. 2005. A review of the effects of humidity, humectants, and surfactant composition on the absorption and efficacy of highly water-soluble herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82, 2: 162-175
- Roca E., Guillarda V., Guilbert S., Gontarda N. 2006. Moisture migration in a cereal composite food at high water activity: Effects of initial porosity and fat content. *Journal of Cereal Science*, 43, 2: 144-151
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 365 str.

- Roudaur G., Debeaufort F. 2011. Moisture loss, gain and migration in foods. V: Food and beverage stability and shelf life. Kilcast D., Subramaniam P. (eds.). Oxford, Woodhead Publishing Series: 63-105
- Saripella K.K., Mallipeddi R., Neau S.H. 2014. Crospovidone interactions with water. II. Dynamic vapor sorption analysis of the effect of polyplasdone particle size on its uptake and distribution of water. *International Journal of Pharmaceutics*, 475, 1-2: 174-180
- Schmidt S.J. 2004. Water and solids mobility in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 48: 112-118
- Sharp K.A. 2001. Water: Structure and properties. V: *Encyclopedia of life sciences*. New Jersey, John Wiley & Sons: 7 str.
http://crystal.med.upenn.edu/sharp-lab-pdfs/sharp_EncLifeSci.pdf (maj 2014)
- Szakonyi G., Zelko R. 2012. The effect of water on the solid state characteristics of pharmaceutical excipients: Molecular mechanisms, measurement techniques and quality aspects of final dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2, 1; 18-25
- Šegatin N., Rudan-Tasič D., Poklar Ulrih N. 2011. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Laboratorijske vaje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: str. 23
- Šircelj H. 2004. Gradivo za vaje iz botanike za študente univerzitetnega študija agronomije. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 22 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2711/Gradiva_Vaje/Sircelj_V_AG-UNI_Citologija.pdf (januar 2015)
- Škrabanja V. 2005. Genetske in biotehniške osnove kakovosti škroba v rastlinskih pridelkih in živilih. *Acta agriculturae Slovenica*, 85, 2: 419-427
- Vippagunta S.R., Brittain H.G., Grant D.J.W. 2001. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48: 3-26
- Wathsala L.H. 2014. FST 393.1.0 Food science and technology practicals, V. Determination of moisture content. Cookeville, Tennessee Technological University: 17 str. (interno gradivo) (maj 2015)
- Yu L. 2001. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48: 27-42
- Zhu J., Lia X., Huang C., Li L. 2014. Structural changes and triacetin migration of starch acetate film contacting with distilled water as food simulant. *Carbohydrate Polymers*, 104, 15: 1-7

ZAHVALA

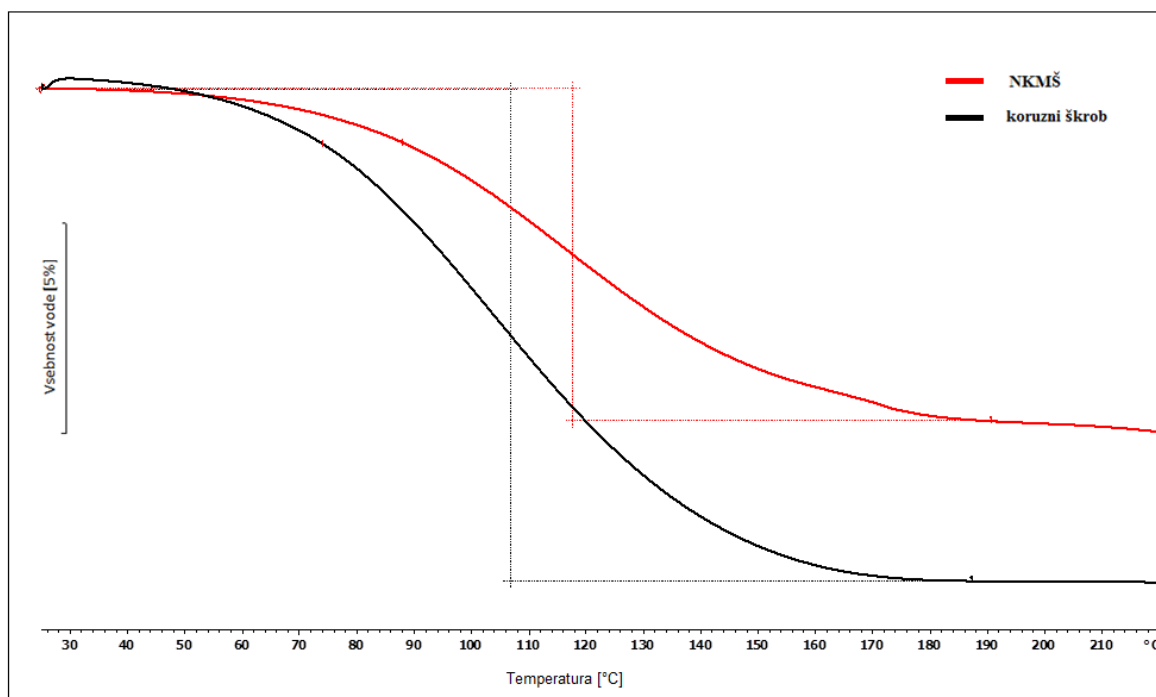
Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tomažu Požrlu in recenzentki doc. dr. Nataši Šegatin za strokovne nasvete, za vso pomoč in podporo ter za vztrajnost in razumevanje. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Tatjani Košmerl za podporo in nasvete.

Hvala mojemu somentorju dr. Boštjanu Jermanu za strokovno vodenje, za pridobljeno znanje in vse razlage na področju problematike vode. Velika zahvala gre tudi vodji oddelka za strukturne analize Poloni Bukovec v prvi vrsti zato, ker mi je omogočila raziskovanje v podjetju in tudi za vodenje, nasvete ter strokovni pregled naloge.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem oddelka za strukturne analize za ideje, pomoč, znanje in dostopnost, predvsem pa za dobro voljo.

Največja zahvala gre staršem za podporo na vseh področjih v času študija, hvala prijateljem, sošolcem za veselje in smeh. Brez vas ne bi šlo!

PRILOGE



Priloga A. Diagram izgube vezane vode koruznega škroba in NKMS po dinamični metodi TGA v temperaturnem območju od 25 °C do 220 °C