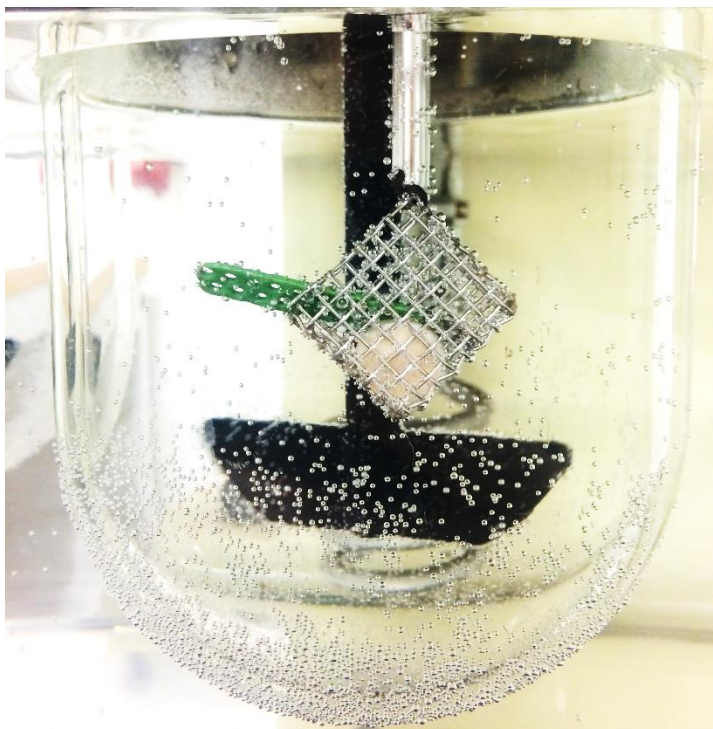




CHALMERS



Extraktion och kemisk modifiering av hemicellulosa

Kandidatarbete inom Organisk Kemi

Emilia Artursson
Gustav Eriksson
Jessica Fredriksson
Özlem Temur
Albin Tärnåsen
Linnea Viklund

Institutionen för Kemi och Kemiteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige, 2016

”Vi är inte snälla men vi kan hemicellulosa fälla.” Tack Gunnar för dina motiverande ord. Ditt engagemang, din vägledning och din inspiration har varit mycket betydelsefullt för oss.

Anette, tack för att du var värmen i kylan trots att du var insnöad. Din utstrålning och energi har verkligen smitta av sig på oss under den här våren.

Tack Filip för att du stått ut med oss trots att vi följt efter dig som 3-åringar på väg till affären. Din positiva anda och all din hjälp har fört oss i mål.

Detta projekt hade inte varit möjligt utan någon av Er.

Sammanfattning

I takt med de klimatförändringar och den globala uppvärmning som sker i världen växer behovet av att på ett mer effektivt sätt utnyttja förnyelsebara råvaror. En sådan råvara är hemicellulosa vars potentiella användningsområden ännu inte utforskats fullständigt. Hemicellulosa är en polymer uppbyggd av olika monosackarider och som finns i växters cellväggar. Denna polymer skulle kunna komplettera cellulosa och ersätta bland annat plast i flertalet produkter.

I den här studien har hemicellulosa extraherats ur kornskal (*Hordeum vulgare*) och kemiska modifieringar har genomförts för att undersöka råvarans potential som uppbyggnadsmaterial i läkemedelstabletter. Modifiering utfördes genom addition av butenoxid samt bensylbromid alternativt allylbromid. Karakterisering och jämförelse med omodifierad hemicellulosa visade att modifieringarna lyckades.

Frisättningsstudier utförda på både modifierad och omodifierad hemicellulosa visar att hemicellulosa modifierad med butenoxid samt butenoxid tillsammans med allylbromid uppvisar bättre frisättningsprofiler än den omodifierade motsvarigheten. Resultatet öppnar upp för framtida användning av den förnyelsebara råvaran hemicellulosa som uppbyggnadsmaterial i läkemedelstabletter.

Abstract

As climate change continues across the world and global warming increases, the need to use renewable materials in an efficient way also increases. One material whose possible applications has been far from fully explored is hemicellulose. Hemicellulose is a polymer which is made of various monosaccharides and is present in the cell walls of plants. It has the potential to complement cellulose and to replace materials such as plastic in several applications.

In this study, hemicellulose has been extracted from *Hordeum vulgare* and chemical modifications has been performed to examine the materials potential to be used as an excipient in pharmaceutical tablets. The modifications were executed through addition of butene oxide and benzyl bromide or allyl bromide. Characterization and comparison with unmodified hemicellulose indicated that the modifications were successful.

Release studies were performed on both modified and unmodified hemicellulose and the results show that hemicellulose modified with butene oxide as well as butene oxide together with allyl bromide give better drug release than unmodified hemicellulose. This study enables future use of the renewable material hemicellulose as an excipient in pharmaceutical tablets.

Innehållsförteckning

1 Inledning.....	1
1.1 Syfte	1
1.2 Avgränsningar	1
2 Teori	2
2.1 Biomaterial	2
2.2 Cellulosa.....	2
2.3 Lignin	2
2.4 Hemicellulosa.....	2
2.5 Extraktion av hemicellulosa från kornskal	3
2.6 Modifiering av hemicellulosa för kontrollerad frisättning	3
2.6.1 Hydrogel.....	3
2.6.2 Modifiering genom addition av aromat.....	4
2.6.3 Modifiering med butenoxid.....	4
2.6.4 Modifiering med bensylbromid.....	5
2.6.5 Modifiering med allylbromid	5
2.7 Frisättning av aktiv substans ur tablett	6
2.8 Analys av hemicellulosaderivat	6
2.8.1 NMR.....	6
2.8.2 IR-spektroskopi	6
2.8.3 Kolhydratanalys	7
2.8.4 UV-vis-spektroskopi	7
2.8.5 Grumlighetspunkt.....	7
3 Experimentellt utförande.....	8
3.1 Extraktion av hemicellulosa	8
3.2 Modifiering av hemicellulosa.....	8
3.3 Genomförande av frisättningsstudie.....	9
3.3.1 Frisättningsstudiens förberedelser	9
3.3.2 Frisättningsstudie av hemicellulosabaserade tabletter	9
3.4 Analys av hemicellulosa och dess derivat.....	9
3.4.1 Förberedelser inför analys av extraherad hemicellulosa	9
3.4.2 Analys av hemicellulosa modifierad med butenoxid, allylbromid och bensylbromid	10
3.4.3 Analys av frisättning	10
4 Resultat.....	11
4.1 Resultat från analys av omodifierad hemicellulosa.....	11
4.2 Resultat från analys av modifierad hemicellulosa.....	12

4.3 Frisättningsresultat	16
4.3.1 Resultat av frisättningsstudier	16
4.4 Resultat av grumlighetspunktsanalys	18
5 Diskussion	20
5.1 Extraktion	20
5.2 Modifiering	20
5.3 Frisättning	21
5.4 Grumlighetspunkt	21
6 Slutsats	23
7 Referenser	24
Appendix A: Protokoll	I
Appendix B: Beräkningar	XI
Appendix C: Bilder	XIII

1 Inledning

Att leva i ett samhälle som är baserat på användning av material från fossila källor skapar globala miljöproblem som är svåra att övervinna och anses inte längre vara ett hållbart levnadssätt [1]. För att forma en hållbar framtid är det istället önskvärt att i största möjliga utsträckning använda förnyelsebara material och ta tillvara på de naturliga biprodukter som produceras vid industriell bearbetning av olika råvaror.

Skogs- och jordbruksindustrin är exempel på stora och viktiga industrier för Sverige. Genom att förbättra tillvaratagandet av biprodukter inom dessa industrier kan miljömässiga steg i rätt riktning tas som dessutom kan stärka svensk industris konkurrenskraft. Polymeren hemicellulosa utgör cirka 20 till 30 % av råvarorna i dessa industrier och är en biprodukt som i dagsläget inte utnyttjas [2]. För att kunna ta tillvara på denna resurs är det därför önskvärt att utveckla högkvalitativa produkter av hemicellulosa i nya materialtillämpningar.

Ett av många möjliga tillämpningsområden för hemicellulosa är inom läkemedelsindustrin. Hemicellulosan arabinoxylan finns i skaldelar från bland annat korn och har visat sig ha gelbildande egenskaper som kan nyttjas i tablettformade läkemedel [3]. I detta projekt ligger fokus på att extrahera och modifiera denna typ av hemicellulosa för att den ska kunna användas som uppbyggnadsmaterial i tabletter. Tillämpningen i projektet är att kontrollera frisättningen av en aktiv substans genom att skapa en tablett med löslig matris av hemicellulosa. För att undvika biverkningar hos en patient är det viktigt att den aktiva substansen i en tablett frisätts kontinuerligt över en längre tid [4]. Detta kan uppnås genom att tablettens sväller kontrollerat vilket kan styras genom dess polymeregenskaper. Dessa egenskaper kan modifieras så att hastigheten på frisättningen kan optimeras och på så sätt uppnå en lång frisättningstid.

1.1 Syfte

Projektets syfte är att framställa hemicellulosaderivat som kan användas som regulator så att en jämn dosering av aktiv substans från läkemedel erhålls. Hemicellulosan extraheras och modifieras kemiskt med avsikt att ge den modifierade hemicellulosan egenskaper som främjar en kontinuerlig frisättning av aktiv substans över en längre tid.

1.2 Avgränsningar

I detta projekt används korn som råvara vid extraktion av hemicellulosa. Anledningen till att extraktion från endast en råvara tillämpas är att fokus i detta projekt ligger på att undersöka olika modifieringar och frisättningsprofiler istället för olika extraktionsmetoder. Frisättningsstudien begränsas till att undersöka lösliga matrisbaserade system med ett substitut till en aktiv substans.

För att modellera en verklig frisättning av läkemedel i människokroppen bör frisättningshastigheten vara konstant i miljöer där pH-värdet varierar. Detta innebär att de valda modifieringarna måste resultera i hemicellulosaderivat som frisätter lika mycket aktiv substans oavsett pH-värde och omgivning [5]. För att uppnå dessa egenskaper behöver den extraherade hemicellulosan modifieras så att stabila bindningar som exempelvis eterbindningar eller aminbindningar bildas. Aminbindningar är dock inte lämpliga för denna studie eftersom kväveatomer lätt protoneras vid lågt pH [6].

2 Teori

För förståelse och genomförande av projektet har litteraturstudier utförts inom huvudområdena; struktur hos växtmaterial, extraktion av hemicellulosa, kemisk modifiering av polymerer, egenskaper och frisättningsmekanismer. Den grundläggande kunskap presenterad i detta kapitel är nödvändig för att förstå projektets motivering av metoder och tolkning av resultat.

2.1 Biomaterial

Cellväggar i växter är till största del uppbyggda av cellulosa, lignin och hemicellulosa. Lignin tillsammans med cellulosa ger växten styrka och struktur medan hemicellulosa bidrar till elasticitet och sammanhållning [7]. Fibrösa växter tenderar att innehålla en högre andel cellulosa medan spröda växter och växtdelar ofta utgörs till större del av lignin [8].

Ett av jordbrukets vanligaste spannmål är korn [9]. Arten *Hordeum vulgare* är en av de mest använda kornarterna och cirka 30 % av kornskalets vikt består av hemicellulosa. Detta gör *Hordeum vulgare* till en bra kandidat för studier av hemicellulosa.

2.2 Cellulosa

Cellulosa är en linjärt ordnad polysackarid bestående av ett flertal glukosenheter [10]. Mellan dessa glukosenheter finns vätebindningar som förstärker polymerens linjära konformation och gör den stabil. Den linjära konformationen tillsammans med de starka bindningarna gör att cellulosa lätt bildar aggregat som har en tendens att vara svårslösliga i vatten och organiska lösningsmedel [11].

Eftersom cellulosa är en naturlig råvara är det en fördel att kunna utnyttja polymeren industriellt, vilket kan vara svårt på grund av dess aggregerande egenskaper. Detta ökar intresset av att hitta metoder för att modifiera cellulosa så att polymeren blir mer industriellt applicerbar. Om polymeren till exempel görs vattenlöslig möjliggörs nya användningsområden. HPMC, *Hydroxipropylmetylcellulosa*, är en välanvänd hydrofob variant av cellulosa som modifierats för att kunna användas vid produktion av hydrogeler inom läkemedelsindustrin [12]. För att tillverka HPMC har metoxygrupper och hydroxypropylgrupper adderats till cellulosa.

2.3 Lignin

Lignin finns i alla landväxter och är som tidigare nämnt en av cellväggens dominerande komponenter. Dess struktur är mer komplex än andra naturliga polymerer, som till exempel cellulosa, och har därför aldrig definierats lika precist [13]. Vidare är lignin uppbyggt av fenyylpropanenheter till skillnad från sockerenheter som cellulosa och hemicellulosa är uppbyggda av [14]. Dessa enheter är bundna till varandra med eter- och kol-kol-bindningar på ett oregelbundet och slumpmässigt sätt.

2.4 Hemicellulosa

Hemicellulosa är, likt cellulosa, en polysackarid som förekommer i växters cellväggar. Dess roll i växtcellen är att fungera som en väv och binda samman cellulosa med lignin, vilket gör växtcellen starkare [15]. Till skillnad från cellulosa som har en linjär struktur är hemicellulosa en oregelbunden polysackarid med en grenad struktur vars sidogrupper saknar ordning. Medan cellulosa är uppbyggt av uteslutande glukos är hemicellulosa även uppbyggt av bland annat xylos, arabinos, galaktos och mannos [16, 17].

Variationen i monosackarider som hemicellulosa är uppbyggd av och dess varierande struktur leder till att det förekommer olika typer av hemicellulosa i olika växter. Den största gruppen av hemicellulosa är xylan som är uppbyggd av en ryggrad med β -(1 \rightarrow 4)-bundet xylos och sidogrupper [18]. En typ av xylan är arabinoxylan där ryggraden är täckt med sidogrupper av arabinos. Arabinoxylan är vanligt förekommande i sädeslag som till exempel korn.

2.5 Extraktion av hemicellulosa från kornskal

För att erhålla ren hemicellulosa från kornskal måste en extraktion genomföras. Förutom att utvinna ren hemicellulosa är det också önskvärt att separera och tillvarata övriga komponenter så att de inte går förlorade.

Tillvägagångssättet för extraktion skiljer sig från växt till växt, då strukturen hos hemicellulosa varierar mellan olika växtarter. Dock måste i regel samma komponenter alltid avlägsnas för att erhålla ren hemicellulosa. Från råvaran måste det intracellulära innehållet såsom fetter och proteiner avlägsnas samt övriga komponenter i cellväggarna, det vill säga lignin och cellulosa.

Fetter och proteiner kan avlägsnas med syrabehandling eftersom syran löser upp dessa. För att avlägsna ligninet från råvaran är behandling med natriumklorit effektivt [19]. Natriumklorit bryter bindingarna mellan hemicellulosa och lignin. Separation av cellulosa från hemicellulosa kan göras under alkaliska förhållanden, vilket medför att esterbindingarna mellan hemicellulosan och cellulosan bryts [20]. Det leder till att cellulosan kan fällas ut och ren hemicellulosa kan erhållas. Utbytet av ren hemicellulosa vid extraktion från kornskal kan maximalt uppnå 27 % [18].

2.6 Modifiering av hemicellulosa för kontrollerad frisättning

För att ett ämne ska erhålla önskade egenskaper kan kemisk modifiering utföras. I detta projekt modifieras hemicellulosa för att uppnå egenskaper som är önskvärda för kontrollerad frisättning av aktiv substans ur en gel. Modifieringarna utförs därmed för att hemicellulosa ska erhålla egenskaper som liknar de hos HPMC vilka har uppvisat goda resultat vid bildning av hydrogeler i läkemedel.

2.6.1 Hydrogel

En metod för frisättning av aktiv substans från tablett är att använda gelbildande polymerer som sväller och ger diffusion av den aktiva substansen vid vätning. Bildning av hydrogel i läkemedelssyfte har visat skydd mot denaturering av den aktiva substansen i magens sura miljö [3]. Det är även fördelaktigt då en lång frisättning är önskvärd eftersom en gel kan utformas så att en aktiv substans får längre uppehållstid i tablett. Hydrogeler har dessutom egenskaper som liknar vävnaders och passar därför mycket bra i biokemiska och farmaceutiska syften [21]. Just hemicellulosa är uppbyggd av ofarliga och naturliga monomererna som enkelt bryts ned i kroppen och är därför mycket lämplig som bildare av hydrogel i läkemedel [3].

Hydrogeler består av nätverk av polymerer som kan absorbera stora mängder vatten och sväller i takt med absorptionen. Hur mycket vatten som absorberas beror på gelens kemiska struktur, bindingar och den omgivande miljöns pH [21]. Detta är något som måste tas hänsyn till vid design av läkemedel som ska intas oralt.

En stor svällningsradie hos den bildade gelen innebär hastigare frisättning [3]. Det kan därför vara önskvärt med hydrofoba inslag i modifieringen om målet är en långsam frisättning för att förhindra att vatten tränger in i polymerstrukturerna med allt för hög hastighet.

En förutsättning för gelbildning hos polymerer är att tvärbindingar uppstår. Tvärbindingarna bidrar till att gelen blir fastare och är mycket viktiga för kontroll av frisättningen. För att erhålla kovalenta tvärbindingar kan alkyl-funktionella grupper adderas till hemicellulosan [3]. Utan tvärbindingar kommer gelen lösas upp i den omgivande miljön och aktiv substans frisätts för snabbt.

2.6.2 Modifiering genom addition av aromat

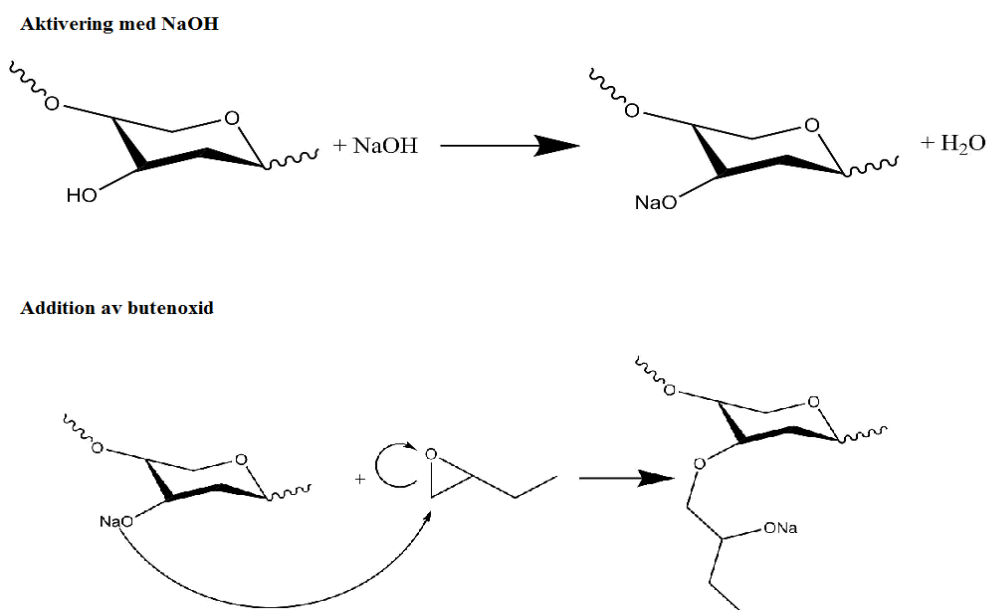
En tumregel inom kemi är att "lika löser lika" [22]. För att säkerställa att den valda aktiva substansen i en läkemedelstablett fördelas jämt genom hela tabletten eftersträvas det att den aktiva substansen kan lösa sig med matrisen och polymererna. I annat fall finns det en risk för att den aktiva substansen aggregerar och därmed skapar områden med mycket hög koncentration medan det i övriga delar av tabletten förekommer mycket låg koncentration av aktiv substans.

I denna studie används det aromatiska kolvätet metylparaben som modell för en aktiv substans. Om aromater adderas till polymerstrukturerna bör metylparaben attraheras av dessa och koordineras så att det fördelas jämnt i tabletten.

2.6.3 Modifiering med butenoxid

För att ge hemicellulosan mer hydrofoba inslag förlängs monomerernas sidogrupper med hjälp av butenoxid. Butenoxiden består av en mättad kolvätekedja vilket bidrar till att hydrofobiciteten ökar och tvärbindingar bildas mellan polymererna. Detta resulterar i en starkare och mer sammanhållen matris [3].

Modifieringen inleds med att polymeren aktiveras genom tillsats av natriumhydroxid [23]. Natriumhydroxiden substituerar vätet på monomerens hydroxidgrupper med natrium. Figur 1 visar reaktionsstegen i processen där hemicellulosa modifieras med butenoxid. Genom att butenoxiden adderas till en hydroxidgrupp bildas en eterbinding mellan monomeren och kolkedjan som butenoxiden är uppbyggd av. Eterbindingar bildar en stabil bindning som inte reagerar i låga pH. Detta är viktigt för att den modifierade hemicellulosa ska bibehålla sin struktur och sina egenskaper.

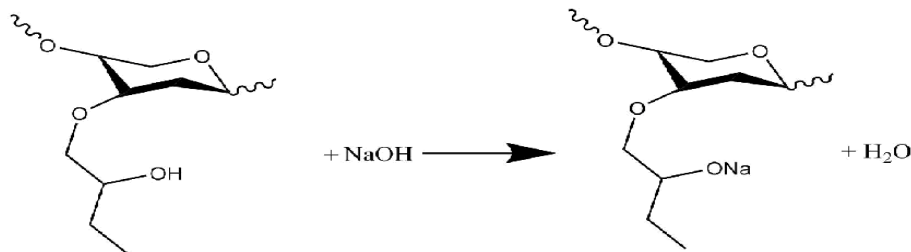


Figur 1. Reaktionssteg vid modifiering av hemicellulosa med butenoxid efter aktivering med natriumhydroxid.

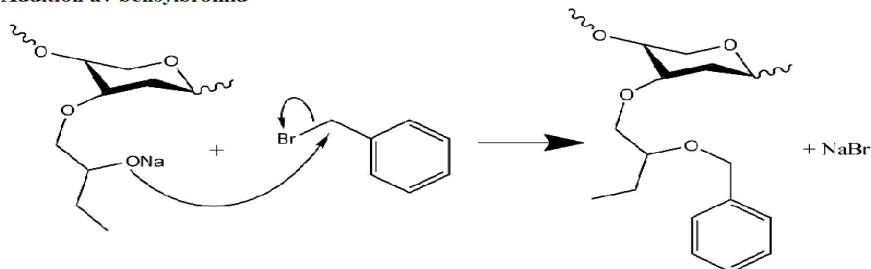
2.6.4 Modifiering med bensylbromid

Som tidigare nämnt är det önskvärt att hemicellulosa får en aromatisk struktur för att bättre interagera med den aktiva substansen. Därför modifieras hemicellulosa med bensylbromid som är aromatiskt. Vissa av butenoxidgrupperna kommer att ha en hydroxidgrupp istället för ett natrium och därför ger aktivering av polymeren med natriumhydroxid högre substitutionsgrad. För en överblick över reaktionsstegen, se Figur 2.

Aktivering med NaOH



Addition av bensylbromid

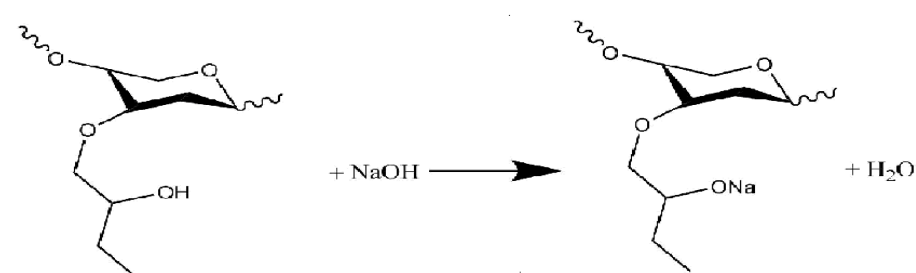


Figur 2. Reaktionssteg vid addition av bensylbromid till hemicellulosa modifierad med butenoxid efter aktivering med natriumhydroxid.

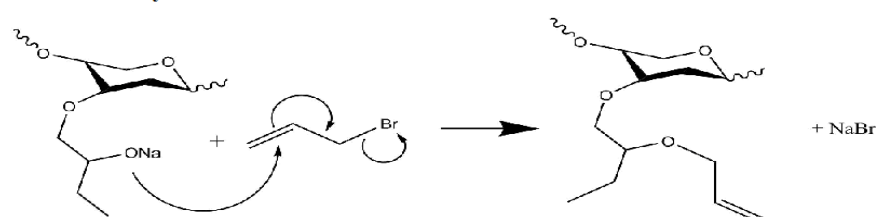
2.6.5 Modifiering med allylbromid

Allylbromid har en struktur där en dubbelbindning sitter tillgänglig i ena änden av molekylen. Denna dubbelbindning är reaktiv och reagerar med hemicellulosa så fler förgreningar uppstår, vilket är en önskvärd egenskap i hydrogeler. Addition av allylbromid kan utan komplikationer genomföras på samma sätt som addition av bensylbromid. För en bild av reaktionen, se Figur 3.

Aktivering med NaOH



Addition av allylbromid



Figur 3. Reaktionssteg vid addition av allylbromid till hemicellulosa modifierad med butenoxid efter aktivering med natriumhydroxid.

2.7 Frisättning av aktiv substans ur tablett

In vitro frisättningsstudier av tabletter sker i temperaturkontrollerade bad med önskat medium som efterliknar den fysiologiska miljön som är i magsäck och tarmkanaler [24]. Prover tas regelbundet av badet för kvantitativ analys av utsöndrad aktiv substans. Målet är vanligtvis en kontinuerlig frisättning inom ett bestämt tidsintervall som varierar beroende på typ av tablett. En medicin vars syfte är att ge snabb smärtlindring kräver en snabbare frisättningshastighet än exempelvis en hjärtmedicin där en mindre dos över lång tid är önskvärd. Det är tablettens matris som bestämmer frisättningens karaktär och det är därmed denna som modifieras och anpassas. Det tar allt mellan 1,5 till 3 dygn för föda att passera kroppen [25] och det är därmed under så lång tid frisättningen är relevant att studera.

2.8 Analys av hemicellulosaderivat

För att verifiera att de genomförda modifieringarna har lyckats används diverse kvantitativa liksom kvalitativa analysmetoder. Metoderna som används innefattar spektroskopiska och kromatografiska metoder såsom NMR, IR, UV-vis och kolhydratsanalys. Dessutom används grumlighetspunktsanalys för att avgöra hydrofobiciteten av hemicellulosaderivatet.

2.8.1 NMR

NMR är en vanlig metod för bestämning av molekylers struktur och utförs genom att ett prov placeras i ett starkt magnetfält där det utsätts för radiovågor som får atomkärnornas spinn att absorbera energi [26]. De vanligaste metoderna inom organisk kemi är ^{13}C -NMR och ^1H -NMR. Av dessa metoder är ^1H -NMR mest känslig, vilket beror på att kol-isotopen ^{13}C endast är 1 % naturligt förekommande och därmed finns i betydligt lägre mängd i molekylen.

Den egenskap som tillåter integration med magnetfältet är kärnans spinn [26]. Inom ^{13}C - och ^1H -NMR kan kärnan ha två olika energilägen då den bestrålas. De två olika energilägena beror direkt utav kärnans spin. Om spinnets axel är riktad längsmed magnetfältets vågor ger detta kärnan en lägre energi än om spinnets axel hade varit riktad mot magnetfältet.

Elektrondensiteten i kemiska föreningar ger upphov till en så kallad skärmande effekt, vilket är ett svagt motverkande magnetfält runt atomerna [26]. Detta får till konsekvens att atomkärnor av samma atomslag upplever olika magnetfält och därmed ger signal vid olika frekvenser. Ju färre elektroner en kärna har i sin närvaro desto mer utsatt är den för magnetfält.

2.8.2 IR-spektroskopi

Infraröd (IR) spektroskopi är en metod som används för bestämning av funktionella grupper i en molekyl [26]. Metoden är särskilt effektiv för att detektera asymmetriska bindningar som till exempel OH, C=O och NH₂ i funktionella grupper. Detta eftersom varje bindning ger upphov till en specifik frekvens som enkelt kan mätas. IR-spektroskopi används ofta som komplement till andra analysmetoder som till exempel NMR för att bestämma strukturen av en molekyl. Bindningarna i en molekyl vibrerar med en frekvens som faller inom det infraröda spektrumet [27]. Tyngre atomer och svagare intramolekylära bindningar vibrerar ofta långsammare än starka bindningar och lättare atomer [26].

Analysen utförs med en spektrometer som sänder ut ljus i form av infraröd strålning [27]. Provet som undersöks absorberar strålningen och resultatet sammanställs i ett IR-spektrum där absorption plottas mot våglängd eller frekvens.

2.8.3 Kolhydratanalys

Kolhydratanalys är en metod för att bestämma vilka monosackarider som finns närvarande i det analyserade provet. Det finns olika sätt att utföra detta på, där jonkromatografi är ett exempel [28]. I denna studie används en metod som kallas HPAE-PAD (High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection). Den här metoden nyttjar att kolhydraterna bildar anjoner vid högt pH [29]. De kan därmed separeras genom jonkromatografi och anjonbytare för att sedan undersökas genom detektion av spänningen som uppstår då de oxiderar.

2.8.4 UV-vis-spektroskopi

UV-vis-spektroskopi är en analysmetod som baseras på att funktionella grupper absorberar ljus och därmed exciteras vid specifika våglängder [30]. Vanligtvis ges utslag i området 200-800 nm av det elektromagnetiska våglängdsspektrat. Lambert-Beers lag, se Ekvation 1, behandlar det linjära sambandet mellan absorbans och koncentration vilken är viktigt för förståelse vid användning av UV-vis-spektroskopi.

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (1)$$

I denna undersökning används UV-vis för att erhålla koncentrationer av ett visst ämne i ett prov. Detta görs baserat på Lambert-Beers lag där uppmätt absorbans, känd kvvettlängd och den molära absorbtiviteten möjliggör beräkning av koncentrationer [31].

2.8.5 Grumlighetspunkt

En polymer har en konformation som bland annat beror på det lösningsmedel den är löst i samt dess temperatur [32]. Då temperaturen varierar förändras polymerens konformation vilket leder till att dess löslighet påverkas. Temperaturen vid vilken polymeren övergår från löslig och transparent till att den börjar falla ut och bli grumlig kallas grumlighetspunkt. Den kan användas för att ge en indikation på polymerens hydrofobicitet där ett högre värde på grumlighetspunkt visar på en mer hydrofob polymer.

Mätning av grumlighetspunkt kan ske med UV-vis-spektroskopi eftersom transmittansen minskar vid utfällning. Denna kan beräknas genom mätvärden på absorbans enligt Ekvation 2,

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-A} \quad (2)$$

där I_0 är intensiteten på ljuset som går in i provet och I är intensiteten på ljuset som lämnar det. A är absorbansen som är tydligt kopplad till kvoten mellan intensiteterna [32].

3 Experimentellt utförande

Projektets laborativa arbete delades upp i extraktion, modifiering, frisättningsstudie och analys. Extraktion, modifiering och frisättningsstudie utfördes successivt medan analyserna genomfördes kontinuerligt.

3.1 Extraktion av hemicellulosa

Den laborativa delen av projektet inleddes med extraktion av hemicellulosa från kornskal. För en mer noggrann dokumentation av utförandet se Appendix A.1 och A.2.

Kornskal vägdes upp, blandades med saltsyra och fick stå under omrörning över en natt. Följande dag centrifugerades lösningen. Den resulterande fällningen resuspenderades i vatten och pH justerades till ungefär 3. Till lösningen sattes sedan natriumhypoklorit löst i vatten. Därefter fick lösningen stå under omrörning i ett varmt bad för att sedan återigen centrifugeras. Den bildade fällningen återuppslammades i avjoniserat vatten varefter lösningen centrifugerades igen. Till den erhållna fällningen tillsattes natriumborhydrid löst i natriumhydroxid. Denna lösning fick stå under omrörning över natten.

Dagen efter inleddes med att lösningen pH-neutraliserades och centrifugerades. Hemicellulosan fälldes ut genom att supernatanten tillsattes stegvis och under omrörning till etanol. Därefter centrifugerades lösningen och fällningen tillvaratogs. För att vid ett senare tillfälle kunna utföra en frisättningsstudie på den omodifierade hemicellulosan så behövde ett fint pulver erhållas. En mindre mängd torkad omodifierad hemicellulosa löstes upp med avjoniserat vatten i ett varmt skakbad. På samma sätt som tidigare fälldes hemicellulosan ut med etanol. Den fick därefter lufttorkas för att sedan mortlas till ett pulver.

3.2 Modifiering av hemicellulosa

Hemicellulosan som extraherats modifierades i två omgångar. Den första modifieringen gjordes med butenoxid med två olika molekvivalentkoncentrationer. Delar av dessa prover modifierades en andra gång med bensylbromid eller allylbromid vilket gav totalt sex olika modifieringar. För en mer noggrann dokumentation av utförandet se Appendix A.3 och A.4.

Den tidigare extraherade hemicellulosan vägdes och löstes upp i avjoniserat vatten under uppvärmning i vattenbad. Lösningen blandades med en natriumhydroxidlösning under fortsatt uppvärmning. Provet delades därefter upp i två kolvar och till de båda kolvarna tillsattes olika mängder butenoxid. Detta resulterade i hemicellulosa med hög molekvivalent substituent per hydroxylgrupp (2,5-buten) och hemicellulosa med låg molekvivalent substituent per hydroxylgrupp (0,5-buten). Proverna fick därefter stå i värmebad för att sedan pH-neutraliseras. Polymererna fälldes ut och flyttades till petriskålar och lufttorkades i rumstemperatur. Av de torkade massorna sparades en del av varje prov för fortsatt modifiering medan resten mortlades ner till två finfördelade pulver.

Proven från modifiering med butenoxid vägdes upp i fyra kolvar, med 0,5-buten i två och 2,5-buten i två. Dessa blandades med en lösning av natriumhydroxid i dimetylsulfoxid. Till proverna 0,5-buten tillsattes antingen bensylbromid eller allylbromid så att två nya prover bildades (0,5-bensyl och 0,5-allyl). På samma sätt bildades ytterligare två nya prov; 2,5-bensyl och 2,5-allyl. Kolvarna fick sedan stå i ett varmt vattenbad i fyra timmar. Därefter tillsattes metanol för att avbryta reaktionen och fälla ut hemicellulosan. Eftersom hemicellulosan inte fälldes ut så undersöktes andra alternativa lösningar. Det visade sig att olika kombinationer av isopropanol och etylacetat fick hemicellulosan att falla ut. Därefter filterades proverna och filterkakorna fick lufttorka innan de mortlades till fina pulver.

3.3 Genomförande av frisättningsstudie

Med den modifierade och den omodifierade hemicellulosa utfördes en frisättningsstudie. Tabletter av hemicellulosa med metylparaben som modell för en aktiv substans tillverkades och dess frisättningshastighet bestämdes genom att absorptions mättes på prover från frisättningsmediet. För en mer noggrann dokumentation av förberedelser och studie se Appendix A.5, A.6 och A.7.

3.3.1 Frisättningsstudiens förberedelser

Innan frisättningsstudierna kunde genomföras krävdes färdiga tabletter av hemicellulosa samt dess olika modifieringar. Ett recept på tabletter togs fram innehållande de olika komponenterna hemicellulosa, cellulosa och metylparaben. Cellulosa fungerade som utfyllnadsmaterial och metylparabenet som modell för den aktiva substansen. Alla komponenter mortlades samman och trycktes sedan i en press under 1 tons tryck till tabletter. Det gjordes två tabletter av varje modifiering med undantag för 0,5-allyl samt 0,5-bensyl.

Två lösningar förbereddes, en saltsyralösning och en fosfatbuffert, som båda placerades i vattenbad vid 37°C. Dessa skulle komma att användas som frisättningsmedium.

3.3.2 Frisättningsstudie av hemicellulosabaserade tabletter

Tabletterna placerades i nätkorgar och sänktes ner i saltsyralösningen. Därefter togs prover från alla frisättningsbad varje halvtimme. Då två timmar gått flyttades nätkorgarna med tabletter från syralösningen till fosfatbufferten eftersom en verklig mag-tarmkanal ville efterliknas. Därefter fortsatte provtagningen tills dess att all metylparaben frisatts.

3.4 Analys av hemicellulosa och dess derivat

De analysmetoder som användes för att bestämma de kemiska egenskaperna var kolhydratanalys, NMR-, IR-, UV-vis-spektroskopi samt bestämning av grumlighetspunkt.

3.4.1 Förberedelser inför analys av extraherad hemicellulosa

För att kontrollera vilken typ av hemicellulosa som extraherats samt för att kunna bedöma dess kvalitet genomfördes kolhydrat-, IR och NMR-analys. Inför varje analysprocess krävdes en del förberedelser, där första steget var att hydrolysera proverna. För en mer noggrann dokumentation av förberedelserna, se Appendix A.8, A.9 och A.10.

3.4.1.1 Hydrolys av extraherad hemicellulosa

En mindre del av den extraherade hemicellulosa vägdes upp och placerades i ugn för torkning över natten. Dagen efter tillsattes en svavelsyralösning till provet och hemicellulosa finfördelades. Provet placerades sedan i en exsickator kopplad till en vakuumsug för intorkning och därefter i ett 30 °C varmt skakbad. Avjoniserat vatten tillsattes till provet och bägaren täcktes med aluminiumfolie för att kunna autoklaveras.

3.4.1.2 Provberedning inför kolhydrat-, IR- och NMR-analys av extraherad hemicellulosa

Provet från hydrolysen sugfiltrerades och filtratet späddes med avjoniserat vatten. Lösningen filtrerades genom ett sprutmembran och injicerades på kromatografen så att kolhydratanalysen kunde utföras.

Den resterande mängden av filtratet blandades med bariumhydroxid och fick stå under omrörning i tre till fyra timmar innan provet pH-neutraliserades. Bariumhydroxiden sugfiltrerades bort så att den kvarvarande vätskan blev helt genomskinlig. Vätskan blandades sedan med deuteriumoxid innan NMR-analysen utfördes.

Inför IR-analysen blandades en liten mängd prov med kaliumbromid. Pulvren mortlades och pressades till en tablett som sedan analyserades med hjälp av en spektrometer.

3.4.2 Analys av hemicellulosa modifierad med butenoxid, allylbromid och bensylbromid

För att verifiera att modifieringarna lyckats utfördes flera analyser på proverna med modifierad hemicellulosa. De analyser som genomfördes var IR- och NMR-analys samt analys av grumlighetspunkt. För en mer noggrann dokumentation av utförandet, se Appendix A.11.

3.4.2.1 Provberedning av IR- och NMR-analys på modifierad hemicellulosa

En liten mängd av varje modifieringstyp vägdes upp och blandades med deuteriumoxid innan NMR-analysen kunde utföras. Provet med 0,5-bensyl analyserades inte eftersom det inte fanns prov av denna modifiering som var rent.

Inför IR-analysen förbereddes proverna på samma sätt som för den omodifierade hemicellulosan.

3.4.2.2 Analys av grumlighetspunkt på modifierad hemicellulosa

En liten mängd modifierad och omodifierad hemicellulosa blandades med fosfatbuffert (pH ~6.8) i små vialer enligt proportioner redovisade i Appendix A.12. Analysen utfördes med koncentrationerna 0,5 och 2 w/w % hemicellulosa. Vialerna värmdes upp under omrörning och temperaturen samt absorbansen mättes var tionde grad. Därefter beräknades transmittanserna, enligt Ekvation 1, för att hitta grumlighetspunkterna.

3.4.3 Analys av frisättning

Under frisättningsstudien togs prover på alla bad upprepade gånger. Varje prov analyserades med UV-vis så att absorbansen kunde bestämmas. Appendix A.13 beskriver hur den kalibreringskurva som behövdes för absorbansanalysen framställdes.

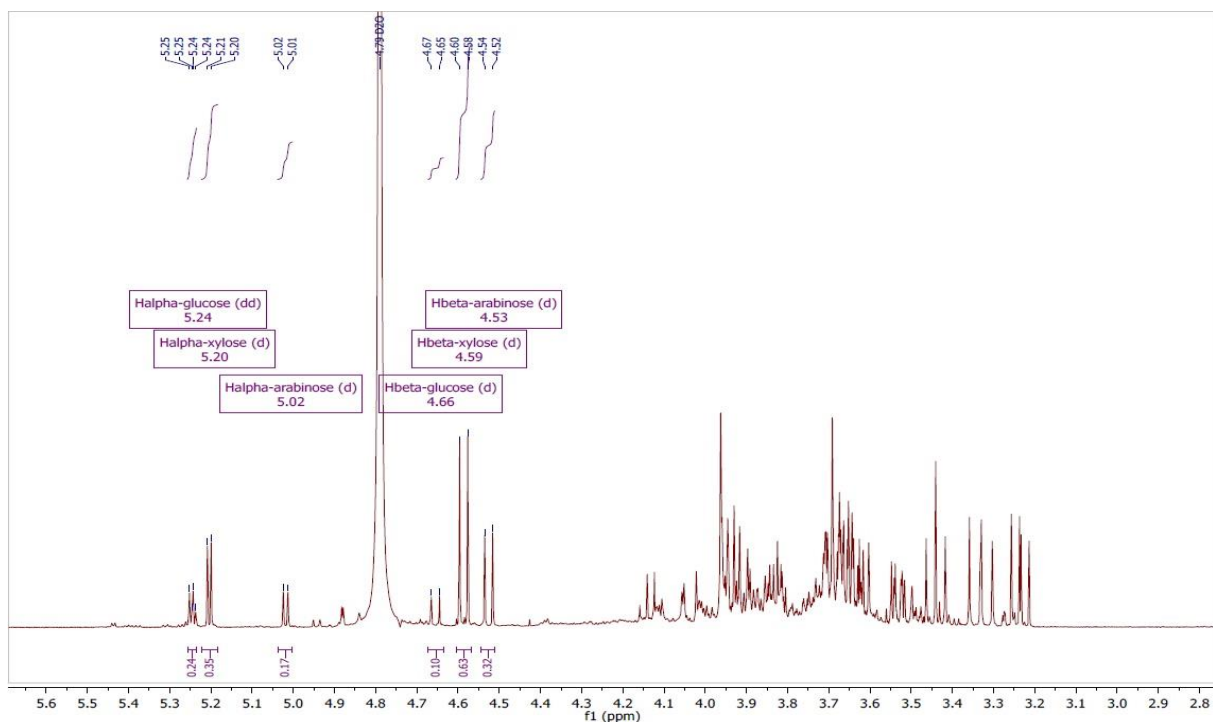
4 Resultat

I studien erhöjls resultat genom analys av den omodifierade och den modifierade hemicellulosa. Analysmetoderna som användes var NMR, IR, kolhydratanalys och grumlighetspunktsanalys. Dessutom utfördes en frisättningsstudie på tabletter tillverkade av hemicellulosa.

4.1 Resultat från analys av omodifierad hemicellulosa

Massutbytet av hemicellulosa ur kornskal beräknas till 24,82 %. För beräkning, se Appendix B.2. Jämfört med den förväntade mängden är detta ett resultat som anses vara acceptabelt.

NMR visar att provet innehåller alfa-glukos, alfa-xylos, alfa-arabinos, beta-glukos, beta-xylos och beta-arabinos, se Figur 4.



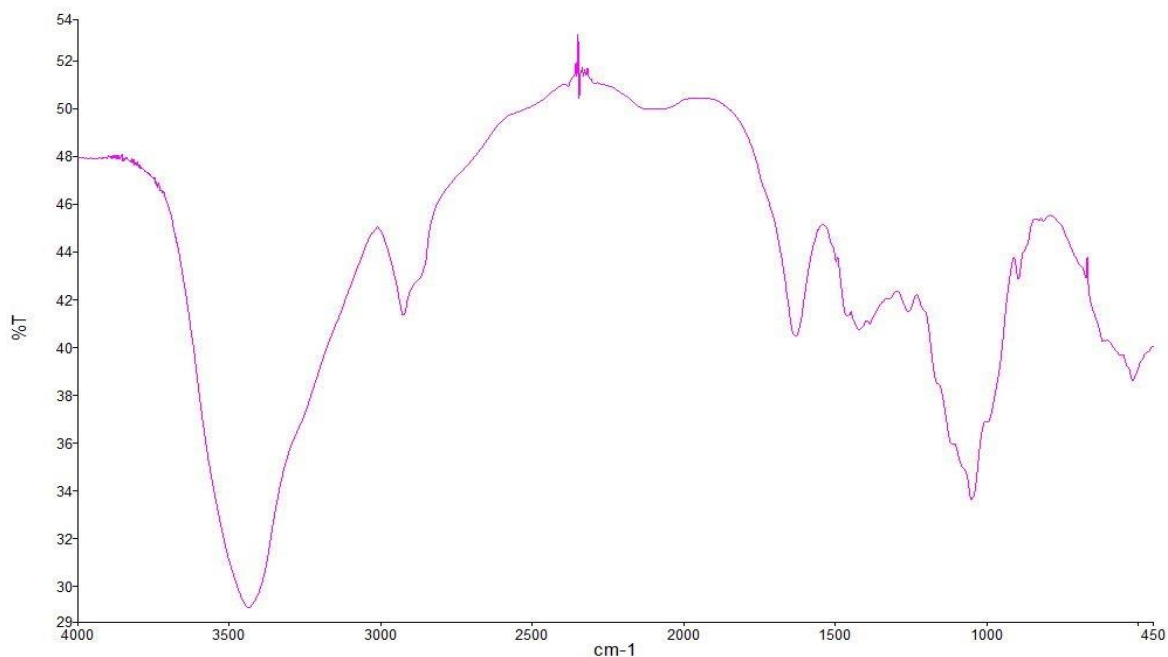
Figur 4. NMR-spektrum över provet innehållandes omodifierad hemicellulosa som visar utslag vid olika frekvens i ppm.

Med kolhydratanalys fastställs mängder av det kända innehållet i hemicellulosa. Resultatet kan utläsas i Tabell 1 där det framgår att det finns övervägande mängder xylos och arabinos jämfört med glukos.

Tabell 1. Resultat från kolhydratsanalys av omodifierad hemicellulosa. Varje analys utförs två gånger för att få ett säkert resultat. Hemicellulosa innehåller olika mängd arabinos, glukos och xylos.

Arabinos [mg/l]	Glukos [mg/l]	Xylos [mg/l]
12,4400	3,9996	32,6012
12,0701	3,9159	-

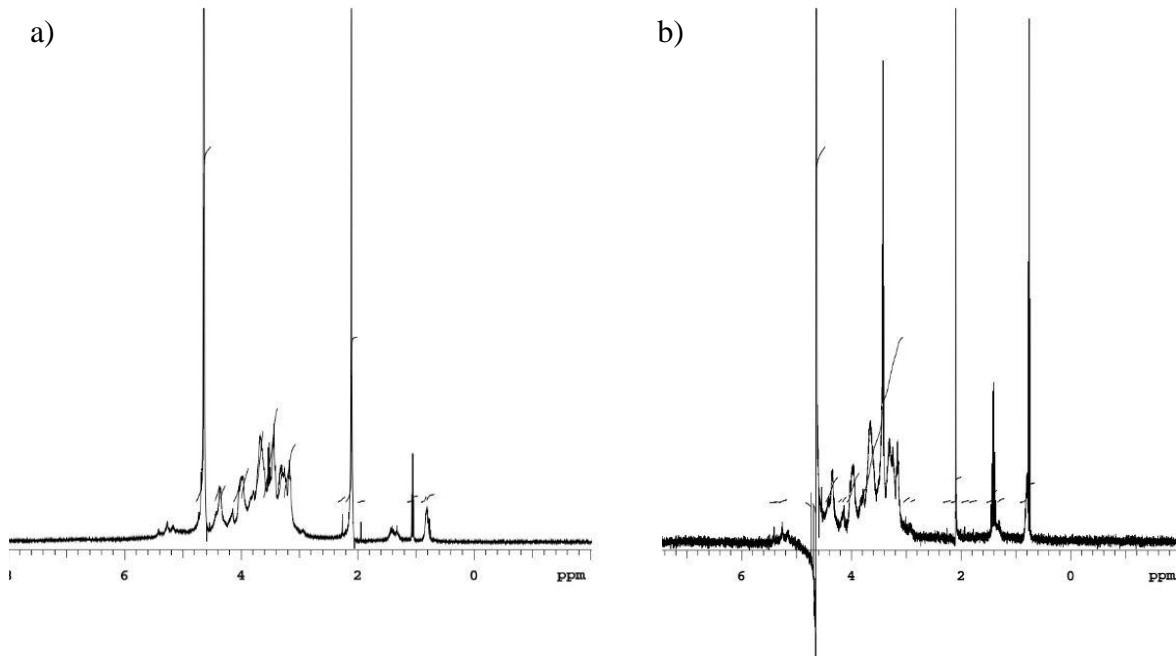
IR-spektroskopins resultat redovisas i Figur 5. Den används främst för jämförelse mellan den omodifierade hemicellulosa och dess modifieringar.



Figur 5. IR-spektrum av omodifierad hemicellulosa. Transmittans i procent plottas mot inversen av vågtalet i cm.

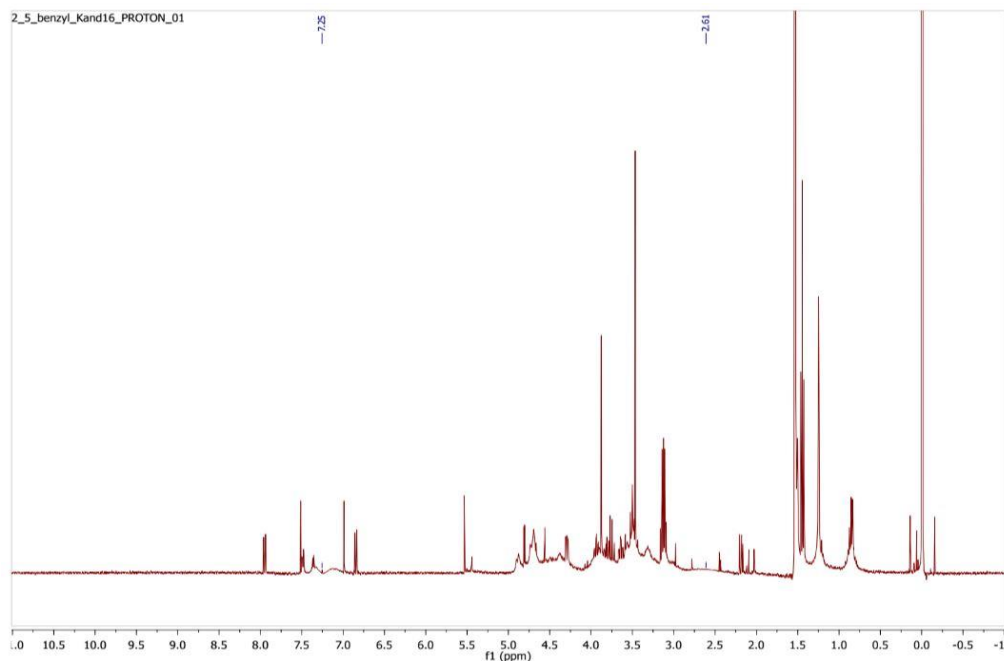
4.2 Resultat från analys av modifierad hemicellulosa

NMR-spektra över modifiering med butenoxid i 0,5 och 2,5 molekvivalenter presenteras i Figur 6a respektive b. Topparna mellan 2-0,9 är kolväten som förekommer i butenoxidkedjan. Topparna i intervallet 3,5 - 6 är hemicellulosa.

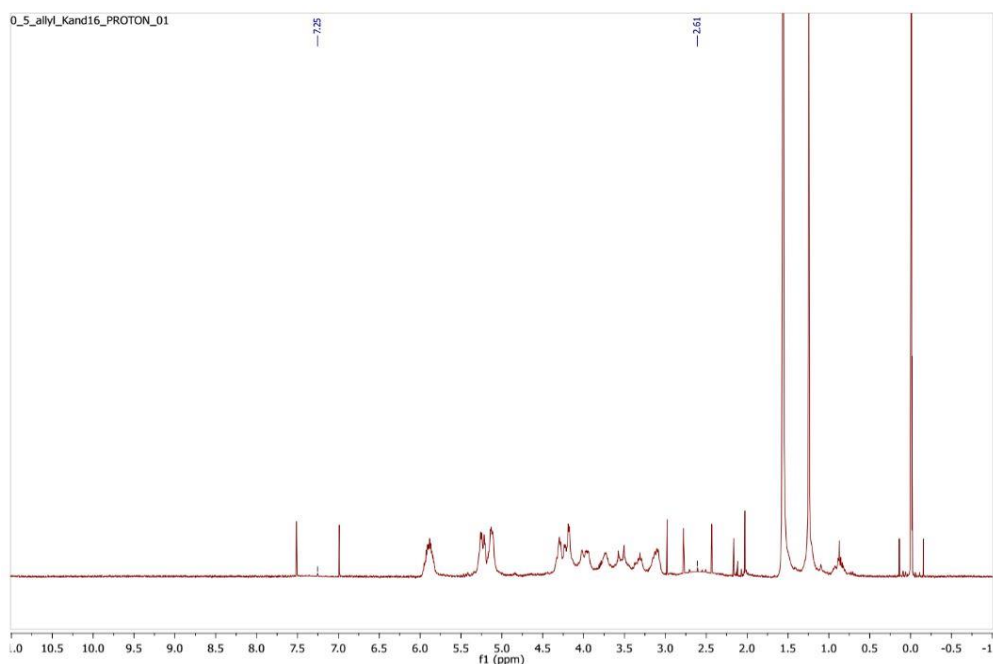


Figur 6. a) NMR-spektrum för hemicellulosa modifierad med 0,5 molekvivalenter butenoxid som visar utslag vid olika frekvens i ppm. b) NMR-spektrum för hemicellulosa modifierad med 2,5 molekvivalenter som visar utslag vid olika frekvens i ppm.

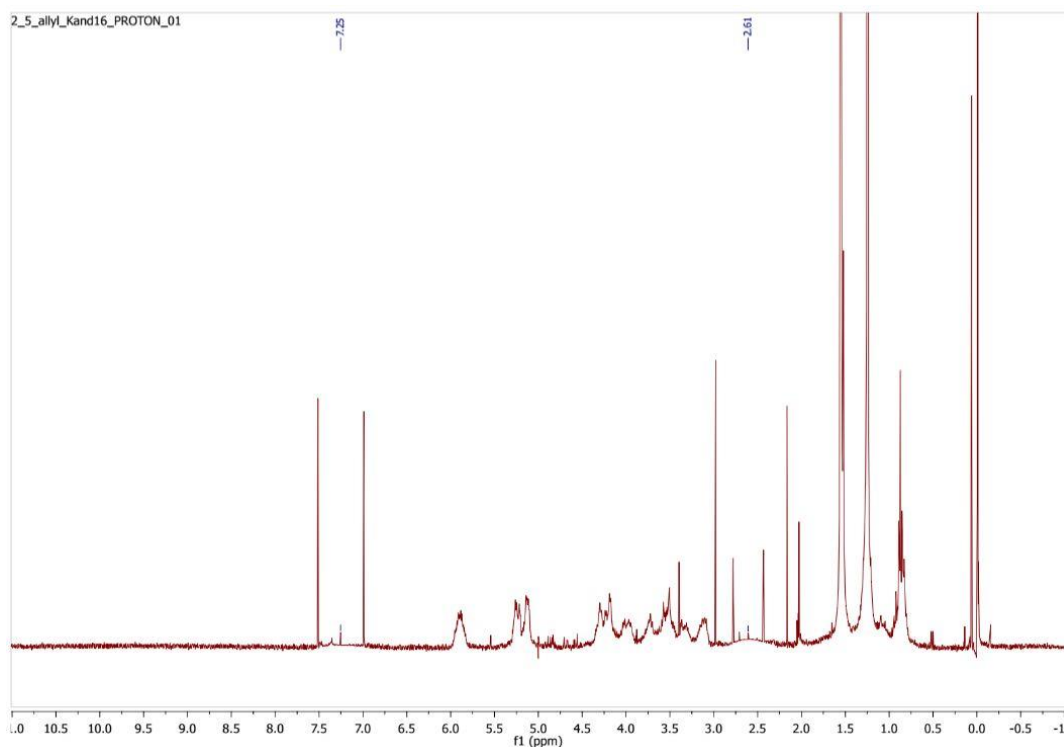
I Figur 7, 8 och 9 redovisas NMR-resultat för alla modifieringar förutom 0,5-bensyl då denna modifiering kontaminerades innan analysen utfördes och inte ansågs brukbar. I Figur 7 ses toppar som representerar aromater vid 7-8 ppm och sackarider vid 3-4,5 ppm. I Figur 8 och 9 finns toppar i intervallet 5-6 ppm som motsvarar allylgrupperna. Även här kan toppar för sackarider vid 3-4,5 ppm observeras. I alla figurer kan toppar ses i området 0,8-2 ppm vilket är signaler från butenoxidkedjan.



Figur 7. NMR-spektrum för hemicellulosa modifierad först med 2,5 molekvalenter butenoxid och därefter med bensylbromid som visar utslag vid olika frekvens i ppm.

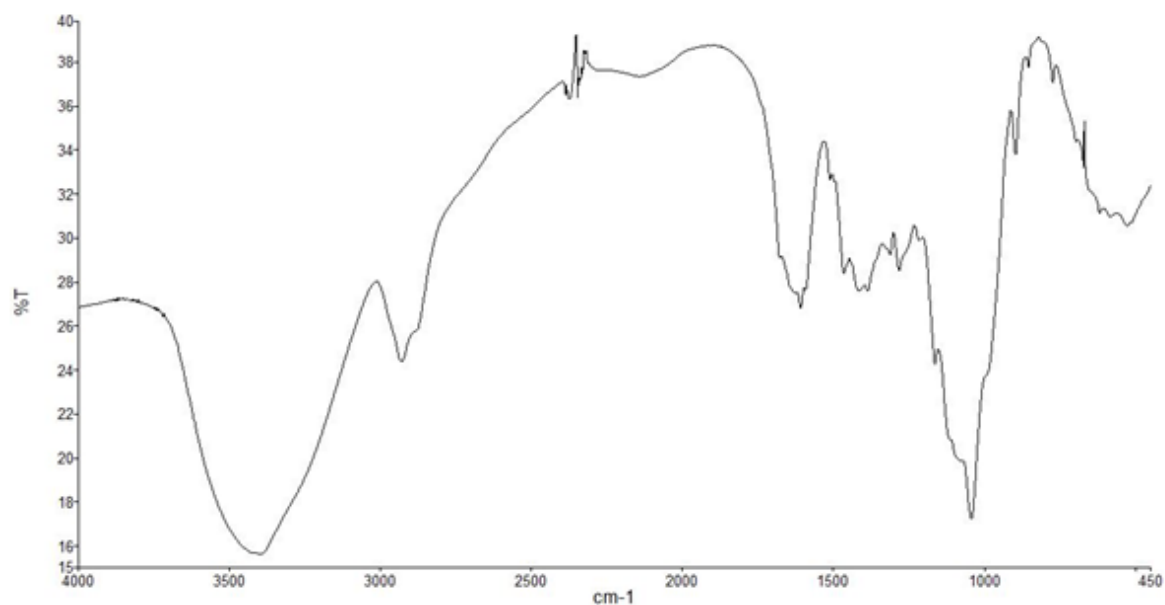


Figur 8. NMR-spektrum för hemicellulosa modifierad först med 0,5 molekvalenter butenoxid och därefter med allylbromid som visar utslag vid olika frekvens i ppm.

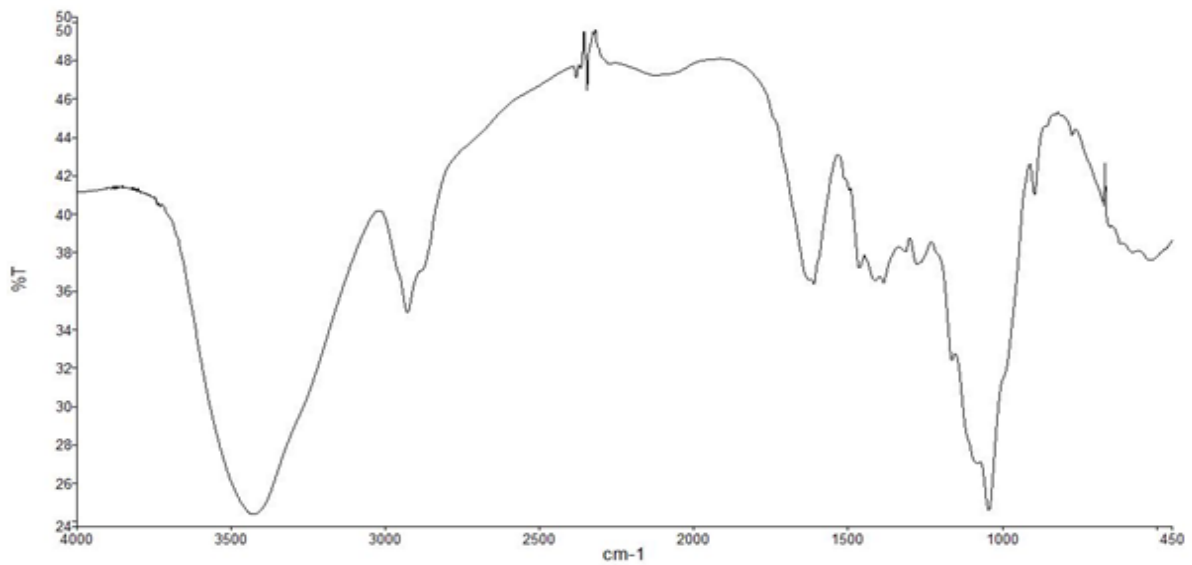


Figur 9. NMR-spektrum för hemicellulosa modifierad först med 2,5 molekvivalenter butenoxid och därefter med allylbromid som visar utslag vid olika frekvens i ppm.

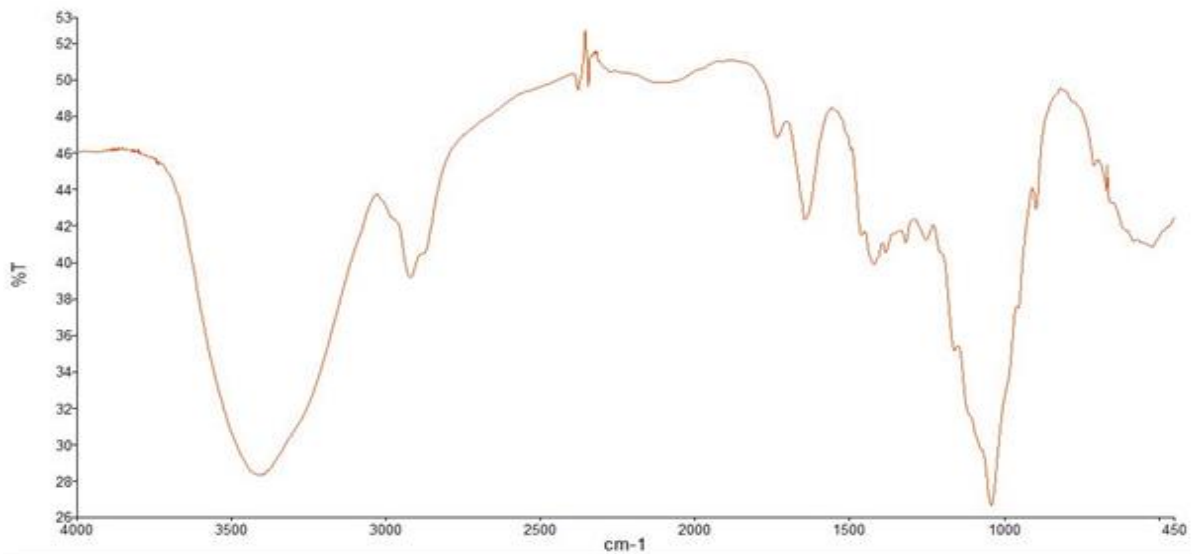
Resultat från IR-spektroskopi på de olika modifieringarna, förutom 0,5-bensyl, redovisas i Figur 10, 11, 12, 13 och 14. Alkyltoppar finns representerade i samtliga modifieringar i intervallet $2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$. Dubbelbindningar förekommer också i olika varianter kring $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. I Figur 14 syns tydliga aromattoppar kring $860\text{-}680\text{ cm}^{-1}$. Aromater förekommer också i intervallen $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ där dubbelbindningarna är representerade, vilket också framgår av figurerna.



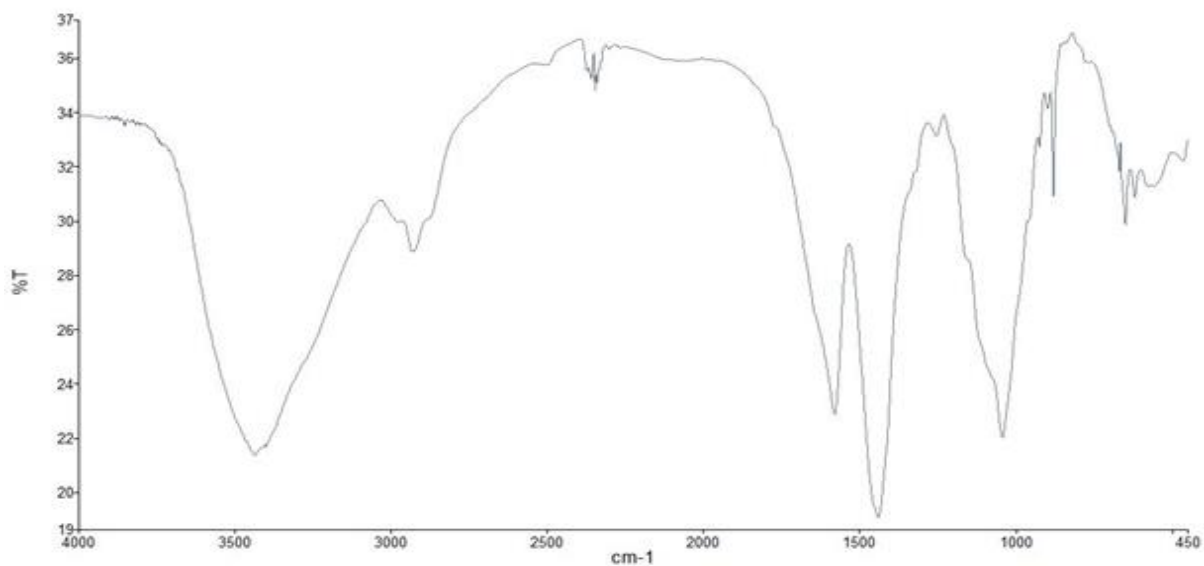
Figur 10. IR-spektrum för hemicellulosa modifierad med 0,5 molekvivalenter butenoxid. Transmittans i procent plottas mot inversen av vågtalet i cm.



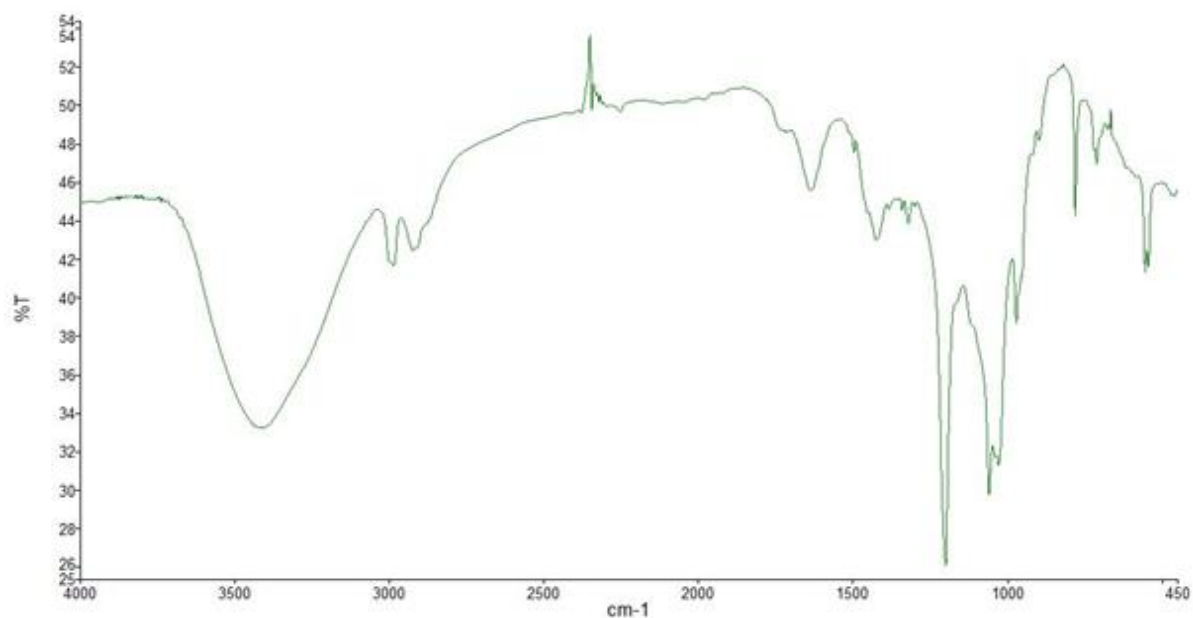
Figur 11. IR-spektrum för hemicellulosa modifierad med 2,5 molekvivalenter butenoxid. Transmittans i procent plottas mot inversen av vågtalet i cm.



Figur 12. IR-spektrum för hemicellulosa modifierad först med 0,5 molekvivalenter butenoxid och därefter med allylbromid. Transmittans i procent plottas mot inversen av vågtalet i cm.



Figur 13. IR-spektrum för hemicellulosa modifierad först med 2,5 molekvivalenter butenoxid och därefter med allylbromid. Transmittans i procent plottas mot inversen av vågtalet i cm.



Figur 14. I IR-spektrum för hemicellulosa modifierad först med 2,5 molekvivalenter butenoxid och därefter med bensylbromid. Transmittans i procent plottas mot inversen av vågtalet i cm.

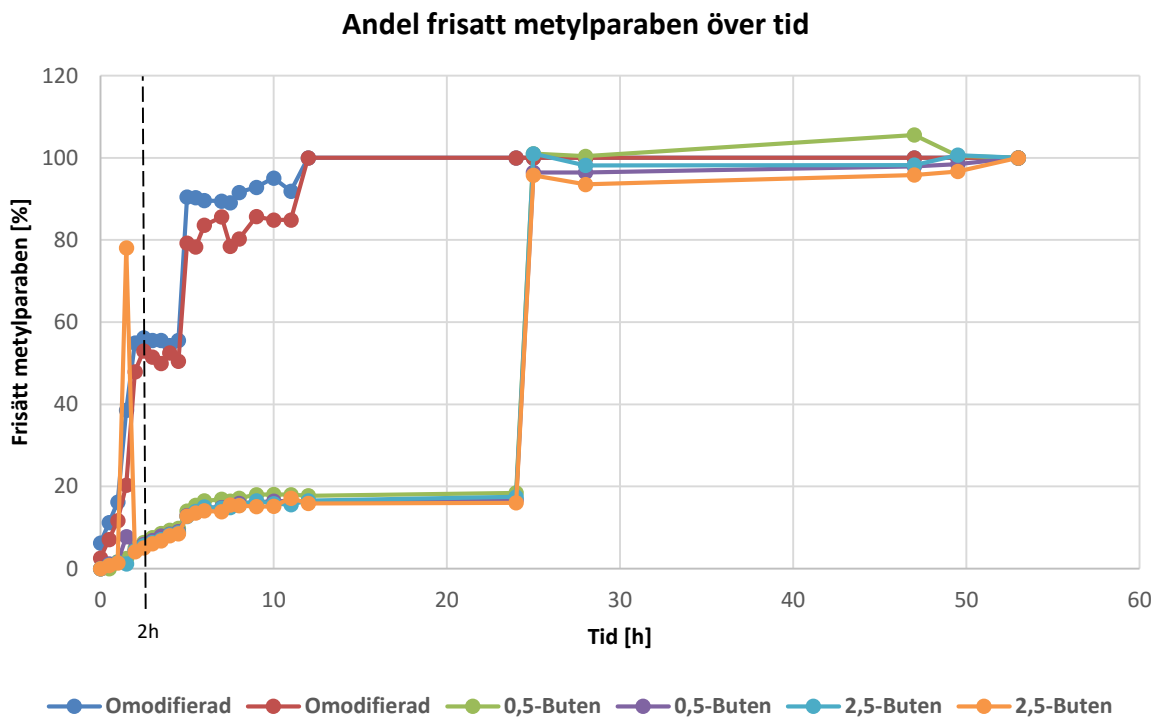
4.3 Frisättningsresultat

Resultat från frisättningsstudier erhålls genom mätning av absorbansen hos metylparaben. För att kunna genomföra absorbansmätning måste först en kalibreringskurva utformas.

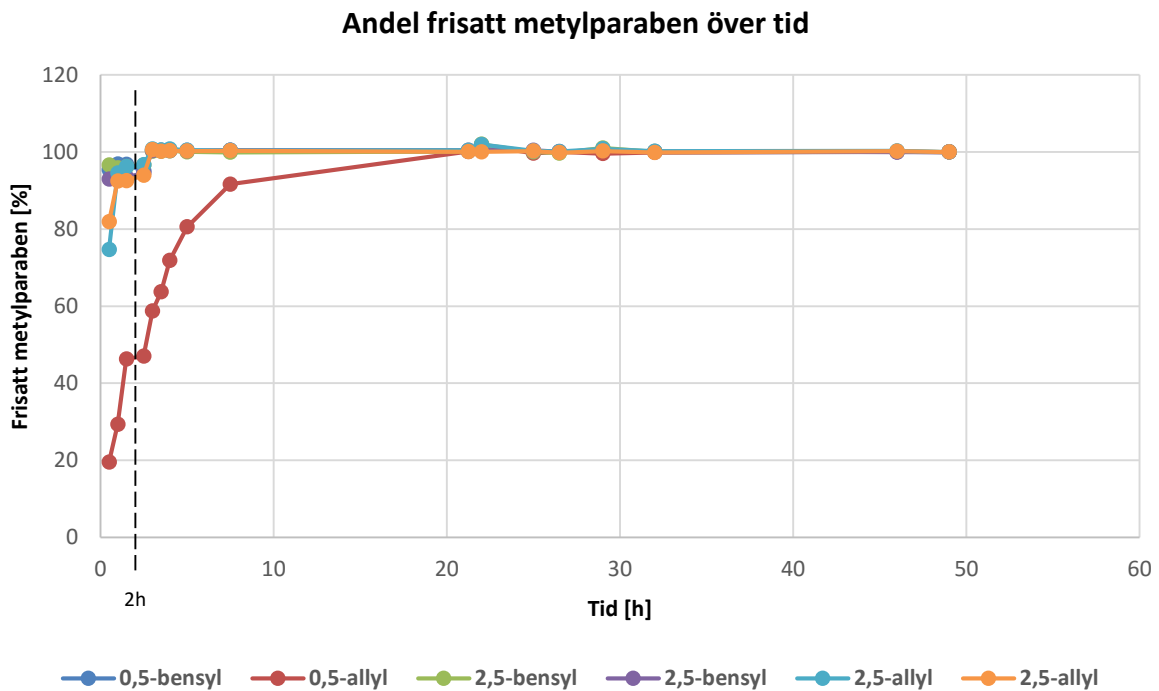
4.3.1 Resultat av frisättningsstudier

Från frisättningsstudierna erhålls resultat genom mätning av absorbans. Denna mäts utifrån mängden frisatt aktiv substans i form av metylparaben i frisättningsmedierna vid våglängden 255,5 nm. Från den totala mängden metylparaben beräknas den procentuella andelen frisatt substans vid varje mätpunkt, se Figur 15 och 16. Enligt Figur 15 når den omodifierade hemicellulosan en maximal frisättning efter cirka 10 timmar. De modifierade hemicellulosa-proverna når maximum efter cirka 27 timmar, vilket är noterbart eftersom det sker drastiskt.

Grafen för 2,5-buten har en punkt vid två timmar som avviker från övriga punkter. Figur 16 visar att 0,5-bensyl, 2,5-allyl, 2,5-bensyl når fullständig frisättning innan fem timmar medan 0,5-allyl når maximum efter 20 timmar.



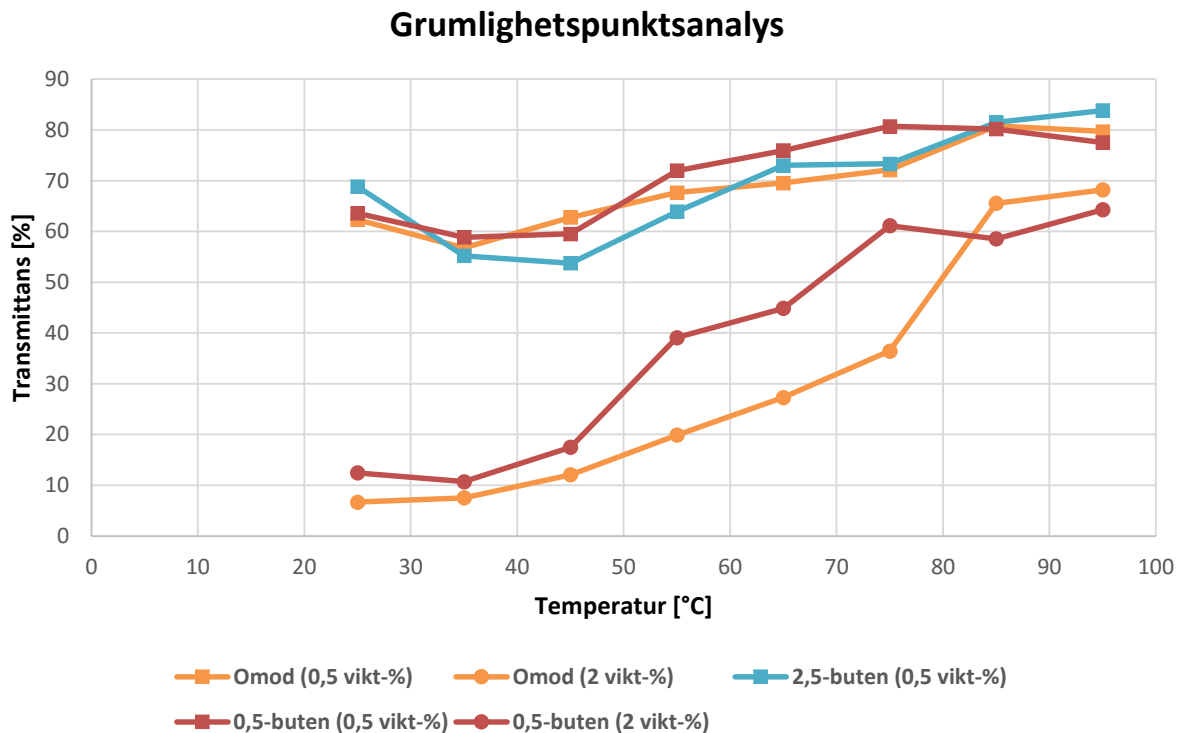
Figur 15. Resultat från frisättning av omodifierad hemicellulosa, hemicellulosa modifierad med 0,5 molekvivalenter butenoxid och hemicellulosa modifierad med 2,5 molekvivalenter butenoxid. Andel frisatt metylparaben i procent plottat mot tid.



Figur 16. Resultat från frisättning av hemicellulosa modifierad med antingen 0,5 eller 2,5 molekvivalenter butenoxid och därefter med bensylbromid respektive allylbromid. Andel frisatt metylparaben i procent plottat mot tid.

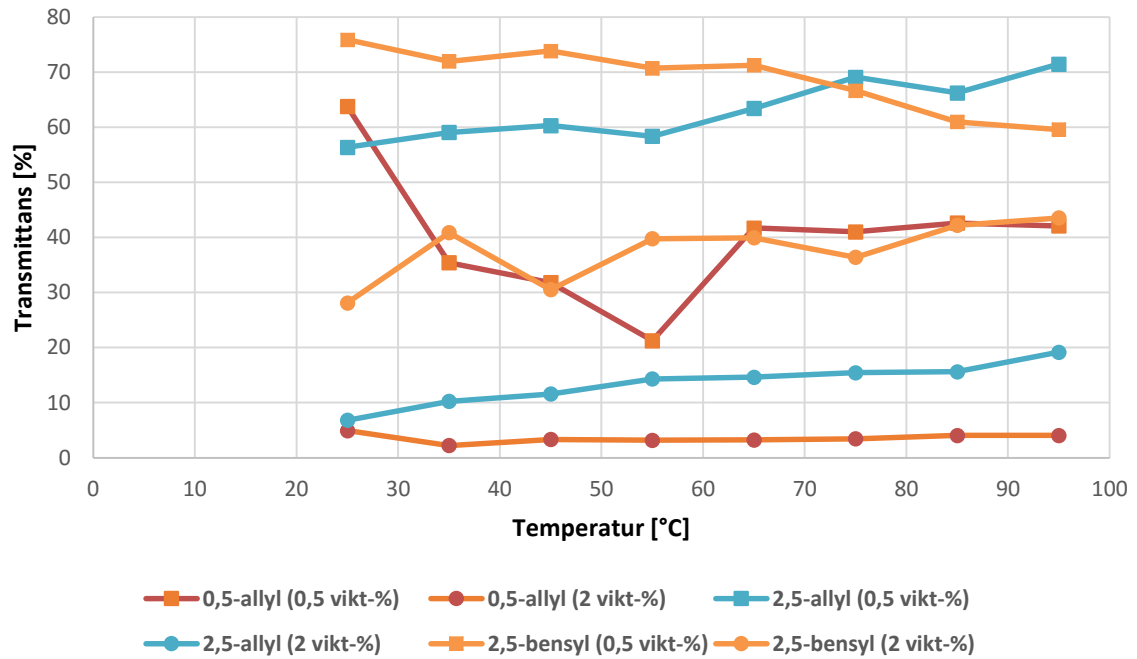
4.4 Resultat av grumlighetspunktsanalys

Från grumlighetspunktsanalysen erhålls resultatet genom att absorbansen för varje prov mäts vid jämna mellanrum i ett temperaturintervall. Utifrån den uppmätta absorbansen beräknas transmittansen och plottas mot temperaturen enligt Figur 17 och 18. Transmittansen i alla grafer i Figur 17 ökar med temperaturen. Värt att notera är att den omodifierade hemicellulosa och 2 vikt-% 0,5-buten ökar mer drastiskt än de andra proverna. Graferna i Figur 18 följer inget uppenbart mönster.



Figur 17. Resultat från grumlighetspunktsanalys av omodifierad hemicellulosa, hemicellulosa modifierad med 0,5 molekvivalenter butenoxid och hemicellulosa modifierad med 2,5 molekvivalenter butenoxid. Transmittansen plottas i procent mot temperaturen.

Grumlighetspunktsanalys



Figur 18. Resultat från grumlighetspunktsanalys av hemicellulosa modifierad med antingen 0,5 eller 2,5 molekvivalenter butenoxid och därefter med bensylbromid respektive allylbromid. Transmittansen plottas i procent mot temperaturen.

För bilder på tablettorna före, under och efter frisättningsstudie, se Appendix C.

5 Diskussion

De erhållna resultaten från studiens laborativa delar analyseras i följande avsnitt. Utifrån resultaten besvaras frågeställningarna om vilka modifieringar som genomfördes med framgång och vilka som visar sig ge hemicellulosan önskade egenskaper.

5.1 Extraktion

En förutsättning för utförande av projektet är en lyckad extraktion av hemicellulosa ur kornskal. Det förväntade resultatet är högt utbyte och stor andel arabinoxylan vilket motsvarar den erhållna produkten, detta bevisas också i samtliga analyser.

5.2 Modifiering

Modifieringsresultaten studeras och bedöms utifrån de genomförda analysernas spektra, det vill säga IR- och NMR-spektra. Det är genom dessa en slutsats angående modifieringarnas framgång kan dras. En lyckad modifiering innebär att de förväntade substitutionsgraderna uppnås och att reaktionerna har utförts med hög omsättningsgrad. Först jämförs modifieringen med butenoxid med den omodifierade hemicellulosan för att se vilka skillnader och likheter som finns. Därefter jämförs butenoxidmodifieringarna med allyl- och bensylmodifieringarna då dessa utfördes med butenoxidmodifieringarna som bas.

Gemensamt för hemicellulosaderivatet är att det i IR-spektrarna finns en djup topp i hydroxidområdet. Detta är naturligt då xylos och arabinos innehåller mycket hydroxidgrupper som inte kommer att reagera med butenoxiden.

NMR-spektrerna visar tydligt att kolväten adderats till hemicellulosan vid modifieringen med butenoxid. Detta fastställs genom att det tillkommit toppar i förväntat intervall där det tidigare inte funnits några. I IR-spektrerna tydliggörs att toppen som motsvarar hydroxidgrupper är bredare för modifieringarna vilket indikerar att nya sorters hydroxidgrupper har introducerats. Toppen som motsvarar kolväten är dessutom djupare i modifieringarnas spektra vilket tyder på att det finns fler kolväten och även att de nu förekommer i flera varianter.

Skillnaden mellan buten-proverna är att det i spekrat för 2,5-buten är tydligt att det förekommer fler kolväten än i provet med 0,5-buten vilket tyder på att det finns fler kolkedjor som härstammar från butenoxiden och att en högre substitutionsgrad har uppnåtts. Detta syns tydligt både i IR- och NMR-spektra.

Då bensyl- och allylgrupper adderas förändras utseendet på topparna i kolväte-intervallet för både IR- och NMRspektrerna. Detta beror på att både bensylen och allylen innehåller kolväten men att dessa ser lite annorlunda ut än de i kolkedjan vilket ger ett annorlunda utslag och förändrad topp.

NMR-spektret för provet med 2,5-bensyl visar tydligt på att det finns aromater och sackerider i provet, vilket tyder på en lyckad modifiering. Sackariden som NMR-spekrat visar förekommer i hemicellulosans ryggrad. Aromater som påvisas i spekrat tyder på att bensylgrupperna har adderats, däremot är signalen relativt svag vilket kan tyda på liten provmängd alternativt dålig löslighet i lösningsmedlet vid NMR-analysen. De många topparna tyder dessutom på att provet inte är helt rent utan kan innehålla rester av biprodukter. I IR-spektret finns tydliga toppar som visar på aromater vilket innebär att resultaten från de olika analyserna är entydiga.

Modifieringarna 0,5-allyl och 2,5-allyl visar båda två på innehåll av allyler och sackarider. Signalerna i NMR-spektrumet är något starkare för 2,5-allyl vilket tyder på högre substitutionsgrad, vilket var förväntat. I övrigt är de mycket lika varandra vad gäller placering av toppar. IR-spektran över allyl-modifieringarna har relativt stora skillnader vad gäller antal toppar och dess djup. Den största skillnaden är att 2,5-allylmodifieringen har en märkbart större C=C topp och en mycket tydligare C-H topp vilket motsvarar innehållet i allylerna och tyder på att koncentrationen allyler i 2,5-modifieringen är betydligt större. Detta resultatet var förväntat.

5.3 Frisättning

Resultatet från det första frisättningsbadet som redovisas i Figur 17 visar skillnaden mellan tablettorna med omodifierad hemicellulosa och hemicellulosa modifierad med butenoxid. Den omodifierade hemicellulosan uppnår nästan maximal frisättning efter några timmar medan den modifierade varianten når ungefär 20 % frisättning på samma tid. Frisättningen från tablettorna med modifierad hemicellulosa verkar stanna upp vid 20 % fram till efter ungefär ett dygn har passerat då andelen frisatt metylparaben snabbt ökar till nästan 100 %.

Den andra frisättningsstudien, se Figur 18, visar att tablettorna med hemicellulosa modifierad med 0,5-allyl ger jämn frisättning av aktiv substans. Däremot löstes tablettorna gjorda med hemicellulosa modifierad med 2,5-allyl samt 2,5-bensyl upp i stort sett direkt i frisättningsbadet. Detta tyder på att modifieringen med bensylbromid kan ha försämrat möjligheten för tvärbindingar att uppstå mellan monomererna. Att 2,5-allyl löses upp kan bero på de reaktiva dubbelbindingarna på substituenterna reagerar med saltsyran i frisättningsbadet i högre grad än 0,5-allyl.

Då skillnaden mellan de olika modifierade varianterna av hemicellulosa var så pass liten och på grund av den snabba ökningen från 20 till 100 % efter ungefär ett dygn i den första frisättningsstudien gjordes ingen mer ingående analys av resultaten. Den snabba ökningen kan bero på att det gick några dagar mellan att proverna togs och absorptionsmätning genomfördes för proverna med hög andel frisatt metylparaben.

Frisättningsstudierna tyder överlag på att modifiering med högre molekylvärdeter inte har gett något annat resultat än motsvarande med lägre ekvivalenter. Detta tyder på att en gräns kan ha passerats där tillsats av större mängd modifiering inte har någon större betydelse för själva frisättningsresultatet. Detta stämmer inte överens med det förväntade resultatet men är en intressant observation. Vidare tyder studierna på att modifieringen med butenoxid samt butenoxid tillsammans med allylbromid har gett önskade resultat i form av hydrofobicitet och tvärbindingar. Däremot har modifieringen med både butenoxid och bensylbromid inte gett en jämnare frisättning än den omodifierade hemicellulosan.

5.4 Grumlighetspunkt

Grumlighetspunktsanalysen visar att hemicellulosa modifierad med butenoxid får en ökad transmittans med ökad temperatur, vilket följer trenden för den omodifierade hemicellulosan. Resultaten innebär därför att grumlighetspunkten påverkas ytterst lite av modifiering med butenoxid. Detta tyder på att butenoxiden inte gör det mer sannolikt att hemicellulosa får tvärbindingar och därmed kan bilda aggregat.

Hemicellulosa modifierad med allylbromid visar en relativt konstant transmittans med ökande temperatur. Transmittansen för 2,5-allyl vid båda samtliga koncentrationer ökar väldigt lite då provet värms vilket tyder på att en mindre mängd aggregat går i lösning. Modifieringen med 0,5-allyl vid den lägre koncentrationen är det enda provet som uppvisar grumlighet vilket

tyder på att polymererna bildar aggregat med ökande temperatur. Detta indikerar att 0,5-allyl har fått tvärbindingar mellan de olika sidogrupperna, vilket är i linje med resultatet från frisättningsstudierna.

Då inget av de andra proverna uppvisar någon tydlig tendens till grumlighetspunkt kan ingen närmare jämförelse göras mellan de olika hemicellulosaderivatet och den omodifierade hemicellulosan. Detta innebär att ingen ytterligare slutsats kan dras angående hydrofobiciteten proven emellan och därför gjordes ingen mer ingående analys av resultatet.

6 Slutsats

Studien visar att hemicellulosa extraherad från kornskal har potential att användas som grundmaterial till tabletter för kontrollerad frisättning av aktiv substans i kroppen efter att ha modifierats med butenoxid. Vidare visar studien att ytterligare modifiering med allylbromid har potential att ge jämnare frisättning. Studien visar dessutom att en substitutionsgrad på 0,5 molekvivalenter räcker för att ge önskade resultat i form av egenskaper hos hemicellulosan. Frisättningsprofilen för hemicellulosa modifierad med butenoxid är långsam vilket tyder på att den är lämplig att använda i tabletter för exempelvis hjärtmedicin eller andra mediciner som behöver verka under en längre tid.

Framtida studier skulle kunna syfta till att utveckla modifieringsförfarandet för att effektivisera och skala upp processen. Studier skulle även kunna bidra till att hitta optimala substitutionsgrader av butenoxid samt allylbromid för modifiering av hemicellulosa. Vidare arbete inom området skulle kunna leda till en mer omfattande användning av förnyelsebara material och på så sätt föra oss närmare en hållbar framtid.

7 Referenser

1. Fossila energikällor [Internet]. Energimyndigheten; 2009 [uppdaterad 2014-02-20; citerad 2016-04-28]. Tillgänglig från: <http://www.energikunskap.se/sv/FAKTABASEN/Vad-ar-energi/Energibarare/Fossil-energi/>
2. Speight J. Biofuels Handbook. Royal Society of Chemistry; 2011. s 358.
3. Sun X, Wang H, Jing Z, Rajaratnam M. Hemicellulose-based pH-sensitive and biodegradable hydrogel for controlled drug delivery. Elsevier. 2013 Feb 15;92(2):1357-1366
4. Mekanistisk beskrivning av svällande polymerer i läkemedel med kontrollerad frisättning [Internet]. Lunds tekniska högskola; 2010 [citerad 2016-05-04]. Tillgänglig från: <http://vrproj.vr.se/detail.asp?arendeid=79365>
5. Timmins P, Pygall S R, Melia C D. Hydrophilic Matrix Tablets for Oral Controlled Release, New York: Springer-Verlag New York; 2014.
6. Solomons G, Fryhle C.B. Organic Chemistry. 8 uppl. John Wiley & Sons; 2004
7. Glick B R, Pasternak J J, Patten C J. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. Washington: American Society for Microbiology; 2010
8. Lehtikangas, P. Lagringshandbok för trädbränslen. Kista: Kista Snabbtryck AB; 1999 [citerad 2016-04-11]. s 9. Tillgänglig från: <https://www.svebio.se/sites/default/files/LAGRINGSHANDBOK%20f%C3%B6r%20tr%C3%A4dbr%C3%A4nslen.pdf>
9. Jordbruk, skogsbruk och fiske. Statistisk årsbok. Statistiska centralbyrån. 2011 [citerad 2016-05-15]. s 128-156. Tillgänglig från: http://www.scb.se/statistik/publikationer/ov0904_2011a01_br_06_a01br1101.pdf
10. Clayden J, Greeves N, Warren S. Organic Chemistryl. Uppl. 2. New York: Oxford University Press; 2001. s 1110-1111.
11. Sun R C, Liu C F. Cellulose. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose. Amsterdam: Elsevier; 2010. s 131-162.
12. Ford J L. Design and Evaluation of Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix Tablets for Oral Controlled Release: A Historical Perspective. I: Timmins P, Pygall S R, Melia C D. Hydrophilic Matrix Tablets for Oral Controlled Release. Springer; 2014. s 17-19. DOI: 10.1007/978-1-4939-1519-4
13. Chen H. Lignocellulose Biorefinery Engineering - Principles and Applications. Elsevier; 2015. s 78.
14. Eero Sjöström. Wood Chemistry: Fundamentals and Applications. Uppl. 2. San Diego: Academic Press; 1993
15. Gibson J L. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. The Royal Society; 2012. Journal of the Royal Society Interface; 9:2749-2766. DOI: 10.1098/rsif.2012.0341
16. Popa I V, Spiridon I. Hemicelluloses: Structure and Properties. I: Dumitriu S. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. New York: Marcel Dekker, Inc; 1998. s 297-309.
17. Cunha A G, Gandini A. Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates. Cellulose. 2010;17(6):1045–1065.

18. Sun R C, Ren J L. Hemicelluloses. I: Sun R C. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose. Amsterdam: Elsevier; 2010. s 73-119.
19. Höijea A, Gröndahla M, Tømmeraasb K, Gatenholma P. Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. Elsevier B.V; 2005 [citerad 25-05-2016]. DOI: [10.1016/j.carbpol.2005.02.009](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.009).
20. Persson T, Dinh E, Jönsson A. Improvement of arabinoxylan isolation from barley husks. Elsevier B.V; 2008. [citerad 25-05-2016]. DOI: [10.1016/j.fbp.2008.10.001](https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.10.001).
21. Hu J. Adaptive and functional polymers, textiles and their applications. London: Imperial College Press; 2011. s 73-76.
22. Atkins P, Jones L. Chemical Principles: The quest for insight. Uppl. 5. W.H. Freeman Co Ltd; 2010
23. Ramos L A, Frollini E, Koschella A, Heinze T. Benzylation of cellulose in the solvent dimethylsulfoxide/tetrabutylammonium fluoride trihydrate. Cellulose. 2005;12(6):607–619.
24. Maniruzzaman M. Practical Guide to Hot-Melt Extrusion - Continuous Manufacturing and Scale-up. [Internet]. Smithers Rapra Technology, 2015. s 124. Tillgänglig från: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPGHMECM3/practical-guide-hot-melt/practical-guide-hot-melt>
25. Hur lång tid tar det för föda att passera kroppen, Illustrerad Vetenskap, 2008;10. Tillgänglig från: <http://illvet.se/manniskan/hur-lang-tid-tar-det-for-foda-att-passera-kroppen>
26. Clayden J, Greeves N, Warren S. Organic Chemistryl. Uppl. 2. New York: Oxford University Press; 2001. s 43-72.
27. Daintith J, Martin E. Dictionary of Science. Uppl. 6. Oxford University Press; 2010. s 421
28. Lee D P, Bunker M T. Carbohydrate Analysis by Ion Chromatography. J Chromatogr Sci. 1989;27(8):496-503. DOI: [10.1093/chromsci/27.8.496](https://doi.org/10.1093/chromsci/27.8.496)
29. Rohrer J S, Basumallick L, Hurum D. HighPerformance AnionExchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection for Carbohydrate Analysis of Glycoprotein. Biochemistry. 2013;78(7):697-709
30. Thomas S, Rajisha K R, Hanna M J, Chan C H, Pothen L A. Natural Rubber Materials. Volume 1 - Blends and IPNs. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2014. s 442. Tillgänglig från: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpNRMVBIP1/natural-rubber-materials/natural-rubber-materials>
31. Baalousha M, Lead J R. Frontiers of Nanoscience, Volume 8 - Characterization of Nanomaterials in Complex Environmental and Biological Media. South Carolina: Elsevier; 2015. s 159-160. Tillgänglig från: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFNVCNCE1/frontiers-nanoscience/frontiers-nanoscience>
32. Serdyuk I N, Zaccai N R, Zaccai J. Macromolecules as physical particles. Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics and Function. Cambridge University Press; 2007.

Appendix A: Protokoll

I Appendix A presenteras protokoll för de laborativa arbeten som utförts i studien.

A.1: Extraktionsprotokoll

Detta protokoll beskriver hur hemicellulosa extraheras från kornskal i denna studie.

Dag 1

1. 250 g kornskal vägs upp och tillsätts i 5 l 0.05 M HCl.
2. Lösningen får stå under omrörning över natten.

Dag 2

1. Lösningen centrifugeras och vätskan dekanteras.
2. Pelletsen löses upp i 1 l avjoniserat vatten och dess pH regleras med 2 M NaOH till ~3.
3. 50 g NaCl löses upp i 500 ml avjoniserat vatten och tillsätts till pelletlösningen.
4. Pelletlösningen placeras under omrörning med uppvärmning, 80 °C i 3 timmar.
5. Lösningen centrifugeras och vätskan dekanteras.
6. Pelleten återuppslmmas i avjoniserat vatten och centrifugeras igen.
7. 25 g NaBH₄ löses upp i 2,5 l 1 M NaOH. Därefter tillsätts pelleten till denna lösning.
8. Lösningen får stå under omrörning över natten.

Dag 3

1. Lösningen neutraliseras med HCl till pH 7.
2. Därefter centrifugeras lösningen och vätskan tillvaratas.
3. Vätskan tillsätts stegvis under omrörning i etanol (95%) med förhållandet 1:0.4 och får stå 10-15 minuter.
4. Lösningen centrifugeras och pelletsen tillvaratas. Den väger nu 138,74 g innan torkning.

A.2: Protokoll för utfällning av omodifierad hemicellulosa

Detta protokoll beskriver hur den omodifierade hemicellulosan fälls ut för att tabletter ska kunna tillverkas.

1. 8 g omodifierad hemicellulosa vägs upp och tillsätts i en E-kolv tillsammans med 100 ml avjoniserat vatten.
2. Lösningen sätts i ett 30-70 °C vattenbad med omrörning under natten.
3. 400 ml etanol (96 %) mäts upp och placeras på en magnetomrörare.
4. Den uppvärmda lösningen tillsätts droppvis och långsamt ner i etanolen under omrörning.
5. Utfälld hemicellulosa centrifugeras och etanolen dekanteras.
6. Hemicellulosan lufttorkas över natten.

A.3: Protokoll för modifiering med butenoxid

Detta protokoll beskriver hur den extraherade hemicellulosa modifieras med butenoxid.

Dag 1

1. Hemicellulosa vägs upp och torkas i ugn över natten, 60 °C.

Dag 2

1. 10 g hemicellulosa vägs upp och tillsätts till två olika E-kolvar.
2. 400 ml avjoniserat vatten tillsätts till varje E-kolv.
3. Proven placeras i vattenbad med temperaturen 60 °C i 20 min.
4. 29,23 g NaOH vägs upp och blandas med 29,36 ml avjoniserat vatten.
5. NaOH-lösningen tillsätts till lösningen innehållandes hemicellulosa.
6. Lösningen placeras i vattenbad 60 °C i 20 min.
7. Till ena E-kolven tillsätts 67,00 ml butenoxid (2,5-buten)
8. Till den andra E-kolven tillsätts 12,52 ml butenoxid (0,5-buten)
9. Båda kolvarna placeras i vattenbad med temperaturen 60 °C i 60 min.
10. Ytterligare vattenbad 90 °C i 60 min.
11. Lösningarna neutraliseras med 2 M HCl.
12. En liten del av lösningen 2,5-buten flyttas till dialysmembran (1 kDa) och placeras i en hink med destillerat vatten.
13. Resten av lösningen 2,5-buten, 200 ml, hålls i 400 ml isopropanol.
14. 250 ml av lösningen 0,5-buten hålls i 500 ml isopropanol.
15. Proverna centrifugeras i 3x15 min och vätskan dekanteras till 2 olika E-kolvar.
16. Till pelleten för 0,5-buten tillsätts aceton och etanol. Till pelleten för 2,5-buten tillsätts mer isopropanol och lösningen sätts på is.
17. Lösningarna centrifugeras i 15 min och vätskan dekanteras till 2 olika bägare.
18. Pelleten för de olika proverna flyttas till varsin petriskål och får lufttorka i rumstemperatur. Erhållen mängd redovisas i Tabell A3.1.

Tabell A3.1. Erhållen mängd hemicellulosa modifierad med 0,5-buten och 2,5-buten uppvägd strax innan tabletttillverkning.

Modifiering	Vikt [g]
0,5-buten	7,25
2,5-buten	7,31

A.4: Protokoll för modifiering med bensylbromid och allylbromid

Detta protokoll beskriver hur den andra och tredje modifieringen av den extraherade hemicellulosa genomförs. För att genomföra denna modifiering används bensylbromid och allylbromid.

Dag 1

1. En NaOH-lösning förbereds genom uppvägning av 9,18 g NaOH som löses i 124 ml DMSO.
2. Modifierad hemicellulosa vägs upp och placeras i fyra olika kolvar:
2 x 3,1 g av 0,5-buten. Tot: 6,2 g.
2 x 3,1 g av 2,5-buten. Tot: 6,2 g.
1 g av varje modifiering sparas för karakteriseringsanalys.

- 31 ml NaOH-lösning tillsätts till varje kolv.
- Allylbromid och bensylbromid tillsätts enligt proportionerna som står i Tabell A4.1. För redovisning av volymsberäkningarna, se Appendix B.1.
- Kolvorna placeras i vattenbad i 70 °C i 4 timmar.

Tabell A4.1. Volymen tillsatt reaktant till prover i modifiering med bensylbromid och allylbromid. För redovisning av volymsberäkningarna, se Appendix B.1.

Modifiering	Reaktant	Volym [ml]
0,5-allyl	Allylbromid	4,0
2,5-allyl	Allylbromid	4,5
0,5-bensyl	Bensylbromid	5,5
2,5-bensyl	Bensylbromid	6,0

Dag 2

- Metanol (80 %) tillsätts till varje kolv med förhållandet 1:1. Den modifierade hemicellulosa förväntas fällas ut vilket inte sker.
- Proverna rullindunstas för att metanolen ska avdunsta.
- Olika kombinationer av hexan, isopropanol, etylacetat dietyleter och avjoniserat vatten testas i olika ordningar för att få hemicellulosa att fällas ut. Försöken redovisas i Tabell A4.2.
- De utfällda proverna filtreras och filterkakan lufttorkas. De torra filterkakorna mortlas sedan till fina pulver och vägs. De uppvägda massorna presenteras i Tabell A4.3.

Tabell A4.2. Testade kombinationer av lösningsmedel för utfällning av prover med modifierad hemicellulosa. Lösning 1 tillsattes innan lösning 2.

Modifiering	Lösning 1	Lösning 2	Anmärkning
Bensyl & allyl	Isopropanol	Hexan	Fungerade ej
Bensyl & allyl	Hexan	Isopropanol	Fungerade ej
Bensyl & allyl	Isopropanol	Aceton	Fungerade ej
Bensyl & allyl	Aceton	Isopropanol	Fungerade ej
Bensyl & allyl	Isopropanol	Dietyleter	Fungerade ej
Bensyl & allyl	Vatten	-	Fungerade ej
0,5-allyl	Isopropanol	Etylacetat	Fungerade okej
2,5-allyl	Isopropanol	Etylacetat	Fungerade okej
0,5-allyl	Isopropanol	-	Fungerade bra
2,5-allyl	Isopropanol	-	Fungerade bra
0,5-bensyl	Isopropanol	Etylacetat	Fungerade bra
2,5-bensyl	Isopropanol	Etylacetat	Fungerade bra

Tabell A4.3. Erhållna massor av proverna med modifierad hemicellulosa.

Modifiering	Vikt [mg]
0,5-allyl	333,48
2,5-allyl	747,87
0,5-bensyl	319,95
2,5-bensyl	740,66

A.5: Protokoll för frisättningsstudiens förberedelser

Detta protokoll redovisar förberedelserna inför frisättningsstudierna. Protokollet omfattar tabletttillverkning samt förberedelse av de lösningar som tablettorna ska undersökas i.

1. Hemicellulosa och dess modifieringar vägs upp till 200 mg +/- 0,2 mg. Alla modifieringar samt den omodifierade hemicellulosa ger två tabletter vardera med undantag för 0,5-allyl och 0,5-bensyl. Detta på grund av att det inte finns tillräckligt mycket prov för att framställa två tabletter med 0,5-bensyl och för att frisättningsbadet inte räckte till för två tabletter av 0,5-allyl.
2. Recept på tablett tas fram, se Tabell A5.1.
3. Mikrokristallin cellulosa (MCC) vägs upp.
4. Aktiv substans (metylparaben) vägs upp med viss marginal då en viss del försvinner då substansen överförs från våg till mortel.
5. De olika komponenterna blandas ihop i en mortel, placeras i en form och trycks med trycket 1 ton.
6. Frisättningsmedium bestående av saltsyralösning förbereds genom att blanda 630 ml 2 M HCl i 12 l avjoniserat vatten. Detta ger en lösning som räcker till 14 st frisättningsbad med en volym på 900 ml/st, vilket ger en reservmängd på 1,8 l. Det fastställs att lösningens pH är 1 med hjälp av pH-papper.
7. Fosfatbuffertlösning med pH~6.81 förbereds för att kunna simulera tarmen.
 - a) En stamlösning av 1 M NaH_2PO_4 bereds genom att 138 g NaH_2PO_4 löses i avjoniserat vatten till en volym på 1 l.
 - b) En stamlösning av 0,5 M Na_2HPO_4 bereds genom att 89 g Na_2HPO_4 löses i avjoniserat vatten till en volym på 1 l.
 - c) 352,8 ml NaH_2PO_4 stamlösning och 604,8 ml Na_2HPO_4 stamlösning löses i avjoniserat vatten till volymen 12,6 l. Denna mängd räcker till 14 frisättningsbad på 900 ml/st, vilket ger en reservmängd på 1,8 l.
8. Syrabadet förbereds genom att 40 gradigt vatten hålls ned i det kar som frisättningsbadet ligger i. Denna maskin klarar inte av att värma vatten eller hålla temperaturer vid dessa grader så lite varmare vatten används då det kommer kylas ned något under de två timmar frisättningen kommer ske i syrabadet.
9. 900 ml 0,1 M HCl hålls ned i varje frisättningsbad.
10. Fosfatbadet förbereds genom att karet fylls med vatten. Värmen slås på för att badet ska ställas in på temperaturen 37 °C.
11. 900 ml fosfatbuffert hålls ner i varje frisättningsbad.

Tabell A5.1. Komponenter och mängder som används vid tillverkning av tabletter.

Komponenter i tablett	Vikt [mg]
Modifierad hemicellulosa	200
Metylparaben, aktiv substans (API-BP)	20
Mikrokristallin cellulosa (MCC)	100
Totalvikt per tablett	320

A.6: Protokoll för frisättningsstudie 1

Detta protokoll beskriver hur den första frisättningsstudien genomförs. I denna omgång undersöks sex tabletter under en sexdagarsperiod. Absorbans mäts vid våglängden 255,5 nm.

Dag 1

1. Nätkorgar förbereds med 6 st tabletter då två av varje derivat analyseras samtidigt. I detta bad studeras omodifierad hemicellulosa, 0,5-buten och 2,5-buten.
2. Kl. 8:50 sänks korgarna ner i salsyrabadet och omrörarna slås på.
3. Prov tas på bad 1 och bad 2 (omodifierad hemicellulosa) efter 10 min eftersom dessa börjar falla sönder.
4. Prover tas varje halvtimme från kl 08:50 till 15:00. Rådata från alla prover redovisas i Tabell A6.1 och A6.2.
5. Efter två timmar flyttas nätkorgarna över till fosfatbuffertbadet.
6. Från kl 15:00 till 21:00 tas prov en gång i timmen.
7. Från kl 21:00 fram till 09:00 tas inga prover.

Dag 2

1. Prov tas kl 9:00, 10:00 och 13:00.
2. Absorbanserna analyseras.

Dag 3

1. Prov tas kl 8:00, 10:30 och 14:00.
2. Absorbanserna analyseras.

Dag 6

1. Prov tas kl 08:30.
2. Absorbanserna analyseras.

Tabell A6.1. Tabell över rådata från frisättningsstudie 1 för saltsyrabadet.

Tid [h]	Abs omod 1	Abs omod 2	Abs 0,5-buten 1	Abs 0,5-buten 2	Abs 2,5-buten 1	Abs 0,5-buten 2
0	0,01	0,005	-	-	-	-
0,5	0,018	0,014	-	0,018	0,013	0,012
1	0,026	0,023	0,025	0,025	0,024	0,022
1,5	0,062	0,04	0,0358	0,1222	0,0184	1,2458
2	0,072	0,0647	0,0379	0,0382	0,0385	0,0438
24	0,0783	0,0781	0,0441	0,0456	0,0451	0,0387

Tabell A6.2. Tabell över rådata från frisättningsstudie 1 för fosfatbuffertbadet.

Tid [h]	Abs omod 1	Abs omod 2	Abs 0,5-buten 1	Abs 0,5-buten 2	Abs 2,5-buten 1	Abs 2,5-buten 2
0,5	0,01	0,016	0,03	0,024	0,023	0,027
1	0,012	0,026	0,049	0,047	0,04	0,042
1,5	0,011	0,023	0,066	0,062	0,052	0,058
2	0,011	0,02	0,08	0,079	0,063	0,07
2,5	0,009	0,025	0,092	0,087	0,081	0,09
3	0,011	0,021	0,098	0,096	0,088	0,097
3,5	0,0671	0,0775	0,1597	0,1579	0,1488	0,1654
4	0,0669	0,0757	0,1795	0,1701	0,1679	0,1777
5	0,0657	0,086	0,1956	0,1876	0,1845	0,1858
5,5	0,0655	0,09	0,201	0,1887	0,1793	0,1822
6	0,0649	0,076	0,1943	0,1918	0,1825	0,2084
7	0,0689	0,0794	0,2045	0,2047	0,1908	0,2066
8	0,0709	0,0901	0,2177	0,2085	0,2065	0,2025
9	0,0745	0,0885	0,2182	0,2125	0,1957	0,2034
10	0,0694	0,0885	0,2174	0,2132	0,1929	0,2352
22	0,0824	0,1182	0,2139	0,2107	0,2072	0,2149
23	0,0782	0,0973	0,2236	0,2179	0,2213	0,217
26	0,0306	0,08	1,4224	1,4695	1,4956	1,4891
45	0,032	0,0925	1,4138	1,4695	1,4526	1,4535
47,5	0,0326	0,0909	1,4886	1,4924	1,4537	1,4905
51	0,0338	0,0854	1,4151	1,5016	1,4903	1,5041
69,5	0,00324	0,0828	1,4079	1,5254	1,4804	1,5568

A.7: Protokoll för frisättningsstudie 2

Detta protokoll beskriver hur den andra frisättningsstudien genomförs. I denna omgång undersöks sex tabletter under en tredagarsperiod.

Dag 1

De båda baden, saltsyrabadet och fosfatbuffertbadet, förbereds på samma sätt som vid frisättningsstudie 1, detsamma gäller metod, temperatur och utrustning.

- Nätkorgar förbereds med 6 tabletter som analyseras samtidigt. I detta bad studeras:
 - 1 tablett av 0,5-bensyl
 - 1 tablett av 0,5-allyl
 - 2 tabletter av 2,5-bensyl
 - 2 tabletter av 2,5-allyl
- Kl 10:30 sänks korgarna ner i saltsyrabadet och omrörarna slås på.
- Prover tas varje halvtimme de första två timmarna. Rådata från varje provtagning redovisas i Tabell A7.1 och A7.2.
- Efter två timmar flyttas nätkorgarna över till fosfatbuffertbadet.
- Prover tas kl 13:08, 13:38, 14:00, 15:35 och 18:00.
- Absorbanserna analyseras.

Dag 2

1. Prov tas kl 7:45, 8:30, 11:10, 12:50, 15:15 och 18:00.
2. Absorbanserna analyseras.

Dag 3

1. Prov tas kl 08:00 och 11:00.
2. Absorbanserna analyseras.

Tabell A7.1. Tabell över rådata från frisättningstudie 2 för saltsyrabadet

Tid [h]	Abs 0,5-bensyl	Abs 0,5-allyl	Abs 2,5-bensyl 1	Abs 2,5-bensyl 2	Abs 2,5-allyl 1	Abs 2,5-allyl 2
0,5	2,2965	0,478	2,3018	2,2313	1,9086	2,0311
1	2,3325	0,718	2,2829	2,2583	2,4165	2,293
1,5	2,33	1,134	2,2913	2,2432	2,4592	2,2943
2,5	2,2897	1,1504	2,3002	2,2704	2,4713	2,3308
7,5	2,4035	1,2193	2,3039	2,3235	2,4937	2,3801
23	2,4078	1,2684	2,3751	2,4023	2,5591	2,4752

Tabell A7.2. Tabell över rådata från frisättningsstudie 2 för fosfatbuffertbadet.

Tid [h]	Abs 0,5-bensyl	Abs 0,5-allyl	Abs 2,5-bensyl 1	Abs 2,5-bensyl 2	Abs 2,5-allyl 1	Abs 2,5-allyl 2
0,5	0,0106	0,1704	0,0105	0,0057	0,0172	0,02
1	0,0114	0,2919	0,0114	0,0073	0,0102	0,0098
1,5	0,0122	0,4914	0,0131	0,0073	0,0177	0,0126
2,5	0,0098	0,7041	0,0076	0,0044	0,0085	0,0111
5	0,0105	0,9758	0,0048	0,0092	0,0081	0,0127
18,75	0,0038	1,1837	0,0101	0,0087	0,0088	0,007
19,5	0,0109	1,2263	0,054	0,0092	0,0473	0,0056
22,5	0,0058	1,1724	0,0074	0,0088	0,0049	0,0105
24	-	1,1807	-	-	-	-
26,5	0,0087	1,1699	0,0315	0,0086	0,0184	0,0106
29,5	-0,0013	1,1778	0,0086	0,001	0,0027	0,001
43,5	0,0027	1,1807	0,0098	-0,0033	0,0049	0,0095
46,5	0,0006	1,1805	0,0068	-0,0016	-0,0023	0,0048

A.8: Hydrolysisprotokoll

Detta protokoll beskriver hur den hydrolysis som föregår kolhydratanalys och NMR-analys genomförs i denna studie.

Dag 1

1. 200 mg hemicellulosa vägs upp och placeras i ugn för torkning vid 70 °C över natten.

Dag 2

1. 3 ml 72 % svavelsyra blandas och tillsätts till provet med hemicellulosa.
2. Hemicellulosan finfördelas med glasstav. Vid detta moment går glasbägaren sönder och en mindre del av provet går förlorat. Bedömningen görs att det ändå finns tillräckligt mycket prov kvar för att fortsätta.
3. Provet placeras i exsickator kopplad till vakuumsug för intorkning i 15 minuter.
4. Provet placeras därefter i ett 30 °C varmt skakbad i 60 minuter.
5. 84 g destillerat vatten tillsätts till provet.
6. Bägaren täcks med aluminiumfolie och autoklaveras vid 125 °C med tryck i 30 minuter.
7. Provet kyls ned för analys vid senare tillfälle.

A.9: Protokoll förberedelse av kolhydratanalys

Detta protokoll beskriver förberedelser inför och genomförande av kolhydratanalysen som utförs på den extraherade hemicellulosan.

1. Det hydrolyserade provet tinas upp och sugfiltreras.
2. Lösningen överförs till en 100 ml mätkolv som fylls med avjoniserat vatten till en total volym av 100 ml.
3. 2 ml av det utspädda provet mäts upp och förs över till en 25 ml mätkolv. Därefter fylls kolven med avjoniserat vatten till en slutgiltig volym på 25 ml.
4. Provet filtreras genom ett sprutmembran.
5. Analysen görs med jonkromatografi (ICS-3000) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) med en Carbo Pac™ PA1 (4 x 250 mm) analytisk kolonn.
6. Resten av lösningen i 100 ml kolven kyls ner för senare NMR-analys.

A.10: Protokoll för förberedelse av NMR-analys för omodifierad hemicellulosa

Detta protokoll beskriver förberedelser inför och genomförande av NMR-analys som utförs på den extraherade hemicellulosan.

1. Provet plockas ut ur kylskåpet och får ställa in sig till rumstemperatur.
2. Bariumhydroxid tillsätts och provet får stå under omrörning i 3-4 timmar.
3. Svavelsyra tillsätts för att neutralisera provet.
4. Bariumhydroxiden filtreras bort genom sugfiltrering tills att en klar vätska erhålls. I detta steg används dubbla och tredubbla filter för att kunna filtrera bort bariumhydroxiden.
5. 10 mg filtrat löses i 0,7 ml deuteriumoxid i NMR-provrör med lock.
6. Dessa analyseras sedan i en NMR-spektrometer.

A.11: Protokoll för förberedelse av IR- och NMR-analys av modifierad hemicellulosa

Detta protokoll beskriver förberedelser inför IR- och NMR-analyserna som utförs på den modifierade hemicellulosan.

NMR-analys:

1. 10 mg av varje modifieringstyp (förutom 0,5-bensyl) vägs upp och överförs till NMR-provrör med lock för att användas till NMR-analys.

2. 0,7 ml deuteriumoxid tillsätts till varje rör.
3. Proverna analyseras i en NMR-spektrometer.

IR-analys:

1. 3 mg av varje modifieringstyp vägs upp och överförs till vialer för att användas vid IR-analys.
2. 100 mg K₂SO₄ tillsätts till varje vial.
3. Pulvren mortlas för att blandas.
4. Pulvren i varje vial pressas till tabletter.
5. Tabletterna analyseras i en spektrometer.

A.12: Protokoll för mätning av grumlighetspunkt

Detta protokoll beskriver förberedelser inför och genomförande av grumlighetspunktsanalys. Den modifiering som inte går att undersöka är 0,5-bensyl.

1. Hemicellulosa blandas med fosfatbuffert (pH~6.8) enligt proportionerna som står i Tabell A12.1 och Tabell A12.2 i små vialer.
2. Vialerna placeras i värmeblock på en magnetomrörare och värms upp.
3. Spektrometern nollställs genom en mätning av ett blankprov bestående av fosfatbuffert.
4. Absorbansen mäts var tioende grad (start 25 °C) för alla proven vid våglängden 600 nm.
5. Absorbansen omräknas till transmittans enligt Ekvation 2.

Tabell A12.1. Uppvägd mängd hemicellulosa i mg och fosfatbuffert i ml.

Hemicellulosa	Mängd AX [mg] 0,5 % w/w	Volym fosfatbuffert [ml]	Total volym [ml]
Omodifierad	10	1,99	2
0,5-buten	10	1,99	2
2,5-buten	7,5	1,4925	1,5
0,5-allyl	10	1,99	2
2,5-allyl	10	1,99	2
2,5-bensyl	10	1,99	2

Tabell A12.2. Uppvägd mängd hemicellulosa i mg och fosfatbuffert i ml.

Hemicellulosa	Mängd AX [mg] 2 % w/w	Volym fosfatbuffert [ml]	Total volym [ml]
Omodifierad	40	1,96	2
0,5-buten	40	1,96	2
2,5-buten	-	-	-
0,5-allyl	40	1,96	2
2,5-allyl	40	1,96	2
2,5-bensyl	40	1,96	2

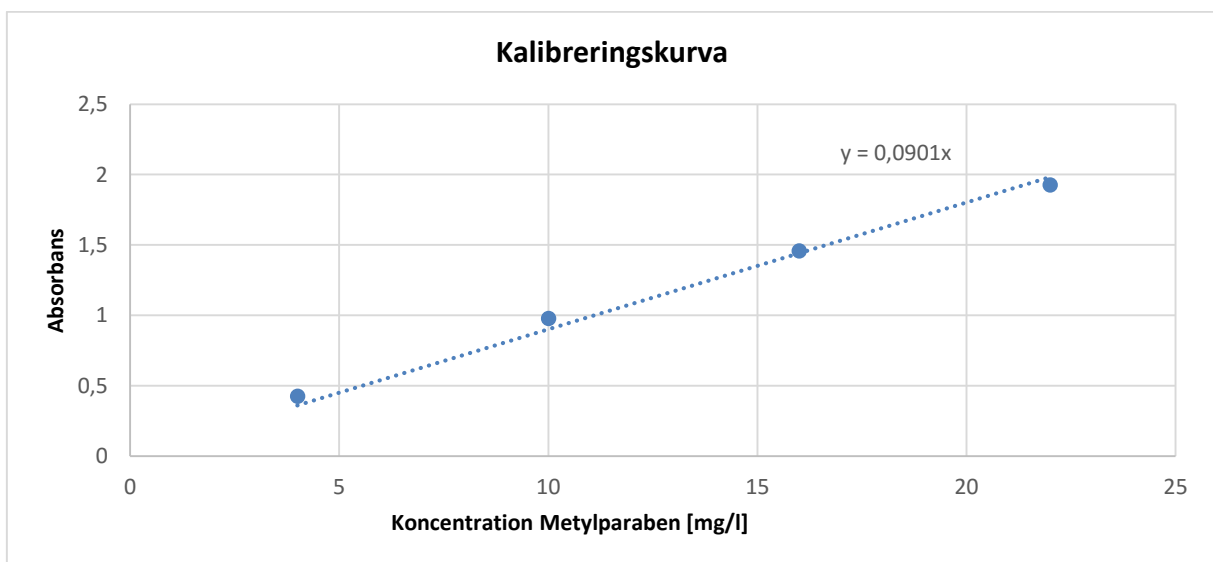
A.13: Protokoll för framställning av kalibreringskurva

Detta protokoll beskriver hur kalibreringskurvan för analys av absorbans framställs. Den erhållna kalibreringskurvan kan användas för att bestämma koncentrationer från absorbanser uppmätta under frisättningsstudier.

1. Ett blankprov görs med avjoniserat vatten.
2. Det ämne som analyseras är metylparaben. Fyra lösningar med olika koncentrationer förbereds genom att metylparabenet vägs upp och löses i avjoniserat vatten. De vikter som vägs upp är 0,004 g, 0,010 g, 0,016 g och 0,022 g. Koncentrationerna som analyseras är 4, 10, 16 och 22 mg/l.
3. Modellen på spektrofotometern som används heter Agilent Technologies Cary60. En QS-kyvett fylls med de olika lösningarna där den svagaste koncentrationen analyseras först för att minimera risken för att metylparaben som blir kvar i kyvetten ska ge något utslag.
4. De uppmätta värdena tabelleras i Tabell A13.1 och absorbansen plottas mot koncentrationen i Figur A13.1.

Tabell A13.1: Uppmätta värden på absorbans med varierande koncentration av metylparaben. Absorbansen mäts vid 255,5 nm. * Provet för koncentrationen 10 mg/l metylparaben mäts om då resultatet är något avvikande.

Koncentration metylparaben [mg/l]	Absorbans
0	0
4	0,4243906
10*	0,6583118*
10	0,9781122
16	1,456475
22	1,925096



Figur A13.1. Kalibreringskurva för metylparabens absorbans vid 255,5 nm.

Appendix B: Beräkningar

I Appendix B redovisas de beräkningar som utfördes i studien.

B.1: Beräkning mängd tillsättning av bensylbromid och allylbromid

Beräkning av hur mycket bensylbromid och allylbromid som behöver tillsättas till den modifierade hemicellulosa sker med förutsättning att det är önskvärt att modifieringen sker fullständigt. Alltså att alla syreatomer på den butenoxid som tidigare modifierats till hemicellulosa reagerar.

Därför utgås det från hur mycket butenoxid som tillsattes hemicellulosa vid den första modifieringen för att beräkna hur mycket bensylbromid och allylbromid som krävs för att fullständigt genomföra modifieringen.

$$V(0,5 - \text{buten}) = 12,52 \text{ ml}$$

$$V(2,5 - \text{buten}) = 66,96 \text{ ml}$$

$$M(\text{butenoxid}) = 72,106 \text{ g/mol}$$

$$\rho(\text{butenoxid}) = 812,9 \text{ kg/m}^3$$

För beräkning av massor butenoxid som tillsätts till 10 g hemicellulosa används Ekvation B.1,

$$m = \rho \cdot V \tag{B.1}$$

där ρ är densitet och V volym.

$$m(0,5 - \text{buten}) = 0,0101775 \text{ kg}$$

$$m(2,5 - \text{buten}) = 0,054431 \text{ kg}$$

För att erhålla hur många mol detta motsvarar används Ekvation B.2,

$$n = \frac{m}{M} \tag{B.2}$$

där M är molmassan för butenoxid. Substansmängderna som erhålls är då

$$n(0,5 - \text{buten}) = 0,14115 \text{ mol}$$

$$n(2,5 - \text{buten}) = 0,7549 \text{ mol}$$

vilket är antalet mol syremolekyler som kan reagera om all tillsatt butenoxid reagerat och bundit till hemicellulosa. Detta är helt omöjligt då erhållen produkt ur den första modifieringen har massorna 7,25 och 7,31 g för 0,5- respektive 2,5-buten.

Ett antagande görs att maximalt 4 g av produkten innehåller butenoxid och då ett överskott är önskvärt för att säkerställa att reaktionen är fullständig räknas det på att 10 g butenoxid finns i provet vilket ger nedan beräknade substansmängder per prov.

$$n(0,5 - \text{buten}) = 0,047991 \text{ mol}$$

$$n(2,5 - \text{buten}) = 0,0498234 \text{ mol}$$

För att erhålla mängderna och volymerna bensylbromid och allylbromid som måste tillsättas används Ekvation B.1 och B.2 igen.

$$M(\text{bensylbromid}) = 171,03 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{allylbromid}) = 120,99 \text{ g/mol}$$

$$\rho(\text{bensylbromid}) = 143 \text{ kg/m}^3$$

$$\rho(\text{allylbromid}) = 1\,398 \text{ kg/m}^3$$

vilket ger

$$V(0,5 - \text{bensyl}) = 5,741 \text{ ml}$$

$$V(2,5 - \text{bensyl}) = 5,958 \text{ ml}$$

$$V(0,5 - \text{allyl}) = 4,156 \text{ ml}$$

$$V(2,5 - \text{allyl}) = 4,29 \text{ ml}$$

B.2: Massutbyte hemicellulosa ur kornskal

För beräkning av massutbytet kornskal används massorna på kornskal och erhållen hemicellulosa.

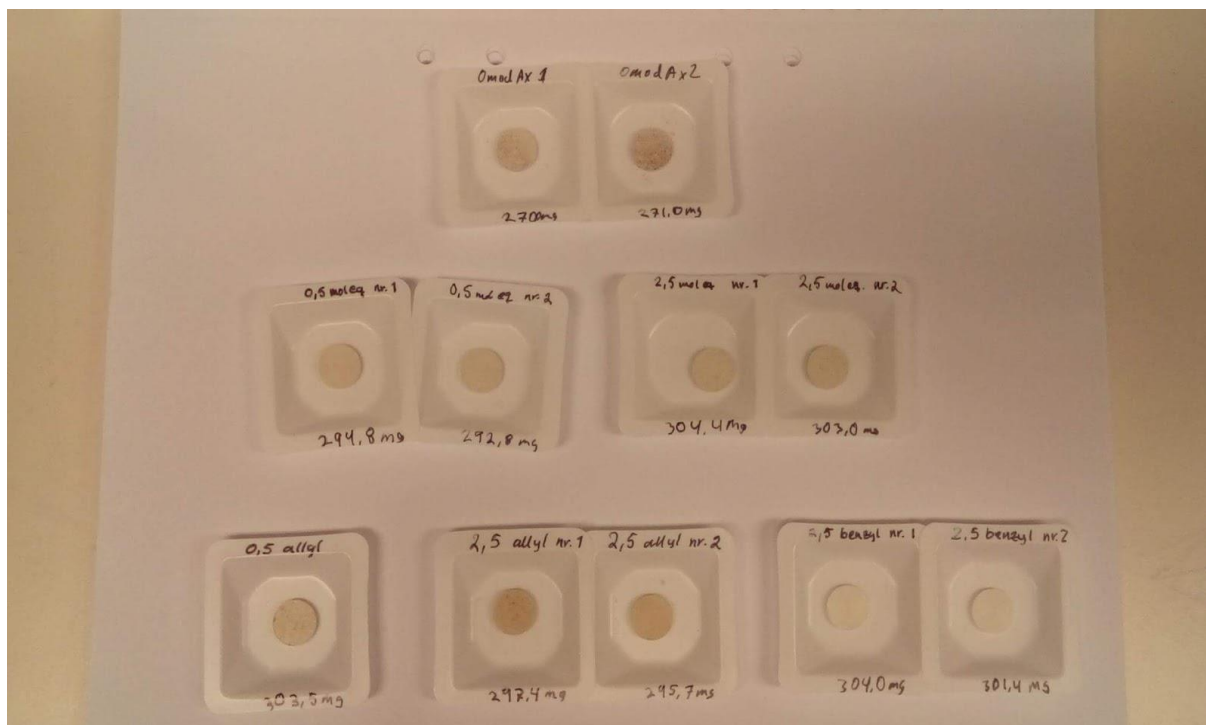
$$m_{\text{kornskal}} = 250,0 \text{ g}$$

$$m_{\text{hemicellulosa}} = 62,04 \text{ g}$$

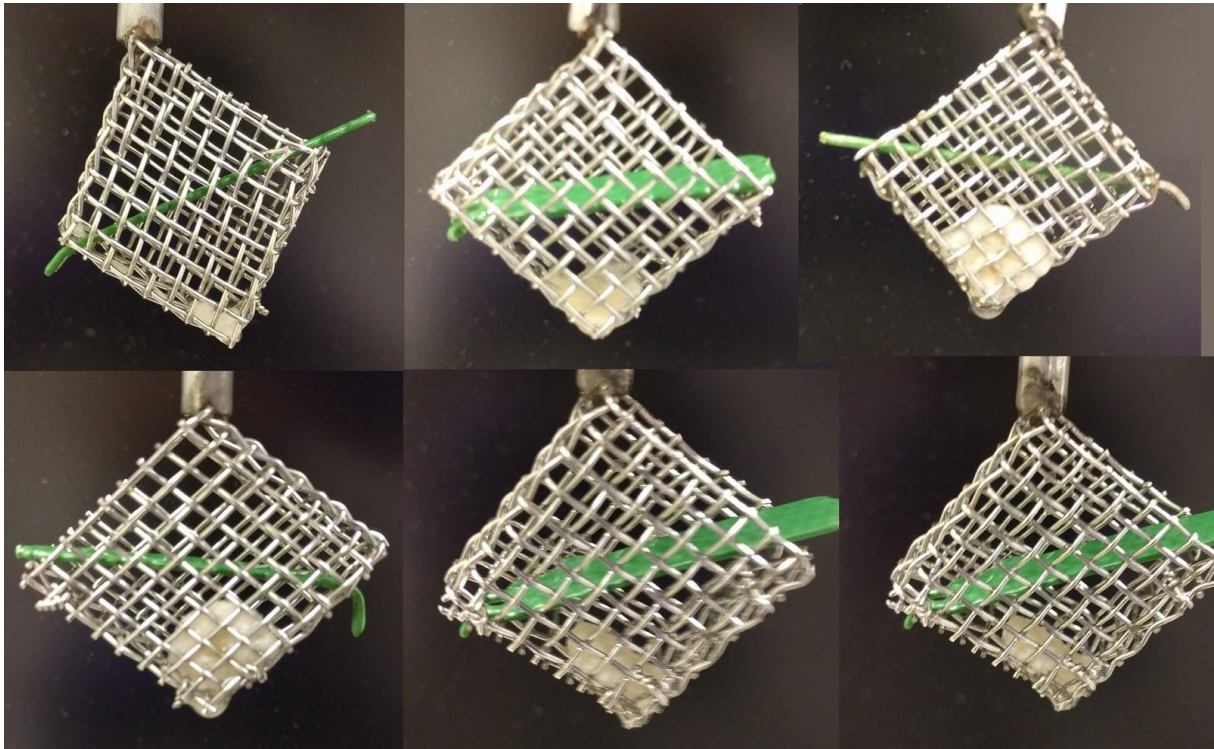
$$\text{Massutbyte} = \frac{m_{\text{hemicellulosa}}}{m_{\text{kornskal}}} = 0,24816$$

Appendix C: Bilder

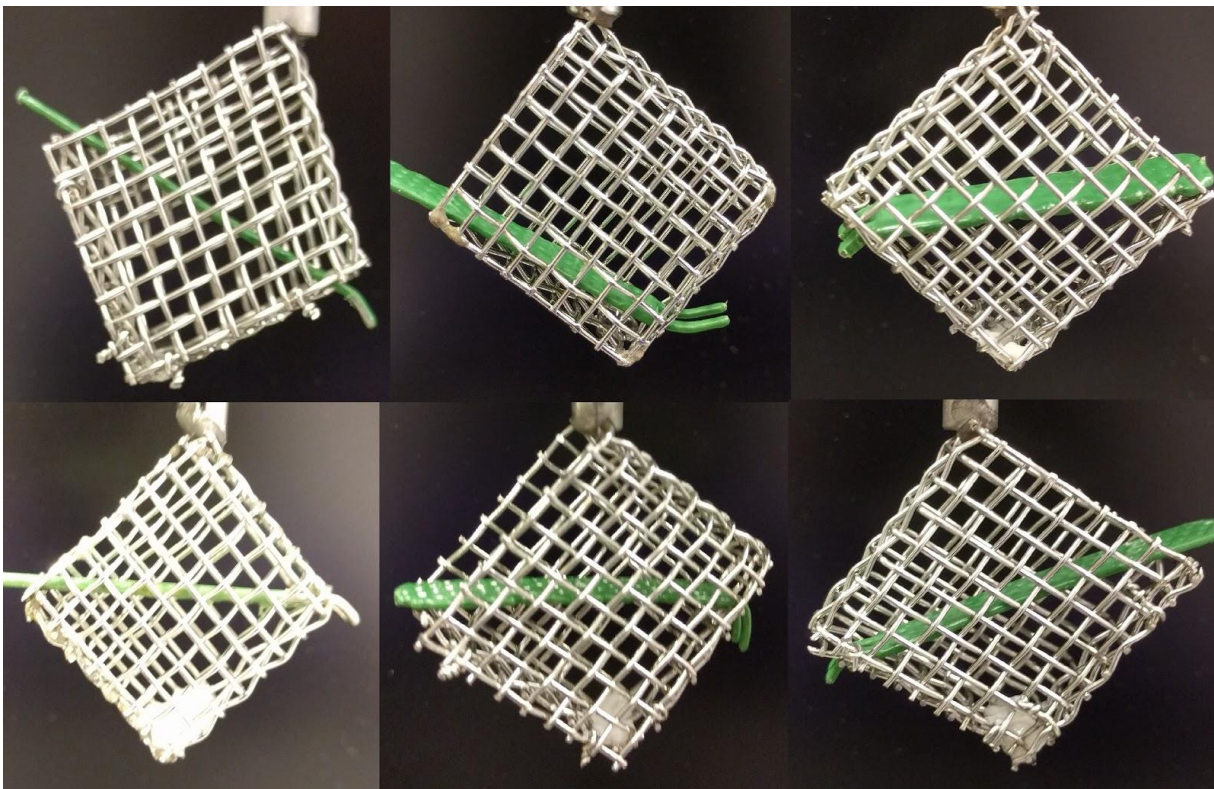
I Appendix C presenteras bilder som tagits under det laborativa arbete som utförts under studien. Figur C1 visar tabletterna för hemicellulosaderivatet innan frisättningsstudierna påbörjats. De andra fyra bilderna visar tabletterna under samt efter frisättningsstudierna, där Figur C2 och C4 visar under och Figur C3 och C5 visar efter.



Figur C1. Tabletter innan frisättningsstudierna påbörjades. Överraden, vänster till höger: omodifierad, omodifierad. Mellanraden, vänster till höger: 0,5-buten, 0,5-buten, 2,5-buten, 2,5-buten. Underraden, vänster till höger: 0,5-allyl, 2,5-allyl, 2,5-allyl, 2,5-bensyl, 2,5-bensyl.



Figur C2. Bilder tagna 5 timmar efter frisättningsstudie 1 påbörjats. Övraden vänster till höger: omodifierad, omodifierad och 0,5-buten. Underraden, vänster till höger: 0,5-buten, 2,5-buten och 2,5-buten.



Figur C3. Bilder tagna efter att samtliga tester avslutats. Övraden vänster till höger: omodifierad, omodifierad och 0,5-buten. Underraden, vänster till höger: 0,5-buten, 2,5-buten och 2,5-buten.



Figur C4. Bild tagen 5 timmar efter frisättningsstudien påbörjats på 0,5-allyl. Övriga tabletter upplösta.



Figur C5. Bild tagen efter att testerna avslutats på 0,5-allyl. Övriga tabletter upplösta.