

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA HERCOG

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



NINA HERCOG

VPLIV SESTAVE IN NAČINA PRIPRAVE SUSPENZIJE UČINKOVINE V
RAZTOPINI POLIMEROV NA LASTNOSTI NANOVLAKEN S KARVEDILOLOM

INFLUENCE OF COMPOSITION AND THE WAY OF PREPARATION OF DRUG
SUSPENSION IN POLYMER SOLUTION ON PROPERTIES OF NANOFIBERS WITH
CARVEDILOL

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm. SEM-slike je posnela doc. dr. Petra Kocbek, mag. farm., na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Zahvala

Za pomoč, strokovne nasvete in napotke ter čas se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm. Hvala tudi Tanji Potrč, mag. farm., s Katedre za farmacevtsko tehnologijo, za prijaznost in pomoč v laboratoriju.

Največja zahvala za podporo, spodbudo in ljubezen pa gre očetu in materi, saj mi brez njiju ne bi uspelo. Hvala bratu Timiju, svakinji Kaji in fantu Alešu za pomoč in motivacijo. Lepa hvala tudi preostalim članom družine in prijateljem, ki so mi na študijski poti stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

Nina Hercog

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član magistrske komisije: doc. dr. Žiga Jakopin

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS.....	X
SEZNAM OKRAŠAV.....	X
1 UVOD	1
1.1 Nanovlakna	1
1.1.1 Prednosti nanovlaken.....	1
1.2 Priprava nanovlaken	2
1.2.1 Elektrostatsko sukanje	2
1.2.1.1 Sestava naprave za elektrostatsko sukanje	2
1.2.1.2 Potek elektrostatskega sukanja.....	3
1.2.1.3 Vplivi različnih dejavnikov na proces in končni produkt elektrostatskega sukanja.....	4
1.3 Vrednotenje nanovlaken	5
1.4 Uporaba nanovlaken v biomedicini	7
1.5 Nanovlakna kot dostavni sistem za učinkovine	7
1.6 Nanovlakna kot dostavni sistem za težko topne učinkovine	9
1.7 Sestava nanovlaken v raziskavi	11
1.7.1 Karvedilol.....	11
1.7.2 Polietilenoksid (PEO).....	12
1.7.3 Poloksameri.....	13
1.7.3.1 Poloksamer 188	14
1.7.3.2 Poloksamer 407	15
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17
3.2 Naprave	17
3.3 Metode	18
3.3.1 Priprava raztopin polimerov.....	18
3.3.2 Priprava suspenzij karvedilola v raztopini polimerov	18
3.3.3 Priprava nanosuspenzij karvedilola v raztopinah polimerov	19
3.3.4 Izdelava polimernih filmov iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola.....	20

3.3.5 Priprava polimernih nanovlaken iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola z metodo elektrostatskega sukanja	20
3.3.6 Priprava vzorcev polimernih nanovlaken in filmov za test sproščanja.....	20
3.3.7 Test sproščanja	21
3.3.7.1 Pogoji.....	21
3.3.7.2 Odvzem vzorcev	22
3.3.8 Spektrofotometrično določanje koncentracije karvedilola.....	22
3.3.8.1 Priprava umeritvene premice.....	23
3.3.9 Določanje končne točke sproščanja (raztapljanja) karvedilola iz polimernih nanovlaken in filmov.....	23
3.3.10 Določanje vsebnosti karvedilola v polimernih nanovlaknih in filmih	23
3.3.11 Analiza velikosti delcev karvedilola s fotonsko korelacijsko spektroskopijo...	23
3.3.12 Priprava vzorcev za SEM-analizo	24
3.3.13 Priprava fizikalnih zmesi karvedilola s polimeri.....	25
3.3.14 Določanje homogenosti porazdelitve učinkovine v filmih	25
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	26
4.1 Priprava raztopin polimerov	26
4.2 Priprava suspenzij karvedilola v raztopini polimerov	26
4.3 Priprava nanosuspenzij karvedilola v raztopini polimerov.....	27
4.4 Priprava nanovlaken s procesom elektrostatskega sukanja	27
4.5 Test sproščanja učinkovine	28
4.5.1 Priprava vzorcev za test sproščanja.....	28
4.5.2 Sproščanje karvedilola iz nanovlaken in filmov	29
4.5.3 Primerjava sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z različno vsebnostjo poloksamerov	39
4.6 Morfologija nanovlaken in filmov	43
4.6.1 Morfologija filmov, pripravljenih iz suspenzij	43
4.6.2 Morfologija filmov, pripravljenih iz nanosuspenzij.....	45
4.6.3 Morfologija nanovlaken, pripravljenih iz suspenzij.....	46
4.6.4 Morfologija nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzij	48
4.7 Določevanje vsebnosti karvedilola v nanovlaknih in filmih	50
4.8 Homogenost filmov, pripravljenih iz suspenzije karvedilola v polimerni raztopini .	51
4.9 Hidrodinamski premer delcev karvedilola po redispergiranju nanovlaken in filmov, izdelanih iz nanosuspenzije karvedilola	51

4.9.1 Polimerni filmi iz nanosuspenzij karvedilola.....	52
4.9.2 Nanovlakna iz nanosuspenzij karvedilola	53
5 SKLEP.....	55
6 LITERATURA.....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: SEM-slika polimernih nanovlaken.	1
Slika 2: Naprava za elektrostatsko sukanje.	3
Slika 3: Strukturna formula karvedilola. Rdeča puščica označuje kiralni center.	11
Slika 4: Splošna strukturna formula poloksamerov: a – število etilenoksidnih enot, b – število propilenoksidnih enot.	13
Slika 5: Vzorec filma, ki smo ga pripravili iz suspenzije karvedilola v polimerni raztopini, na aluminijasti foliji.	21
Slika 6: Naprava za test sproščanja.	22
Slika 7: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 1 : 1: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	29
Slika 8: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov PEO/le s poloksamerom 188: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	31
Slika 9: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 4 : 1: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	32
Slika 10: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 3 : 2: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	34
Slika 11: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 2 : 3: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	35
Slika 12: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 1 : 4: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	36
Slika 13: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov PEO/le s poloksamerom 407: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	37
Slika 14: Profili sproščanja karvedilola iz vzorcev nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzij z različnim masnim razmerjem poloksamerov 188 in 407: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	39

Slika 15: Profili sproščanja karvedilola iz filmov, pripravljenih iz nanosuspenzij z različnimi masnimi razmerji poloksamerov 188 in 407: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	41
Slika 16: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzij z različnim masnim razmerjem poloksamerov 188 in 407: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	41
Slika 17: Profili sproščanja karvedilola iz filmov, pripravljenih iz suspenzije z različnim masnim razmerjem poloksamerov 188 in 407: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.	42
Slika 18: SEM-slika filma iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 2 : 3. Z zeleno sta označena delca karvedilola, ki sta prekrita s polimernim filmom.	44
Slika 19: SEM-slika površine filma, pripravljenega iz suspenzije karvedilola (le s poloksamerom 188). S puščico je označen kristal karvedilola (premer (a) = ~ 11 µm; dolžina (b) = ~ 41 µm).	44
Slika 20: SEM-slika filma iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 1 : 1: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi. S puščicami so označeni delci karvedilola.	45
Slika 21: SEM-slika filma iz suspenzije karvedilola le s poloksamerom 407: (a) pri večji in (b) pri manjši povečavi. S puščicami so označeni majhni delci na površini filma.	45
Slika 23: SEM-slika filma, pripravljenega iz nanosuspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 1 : 1: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi. Z zeleno so označeni delci karvedilola. Velikost delca : x= ~ 4 µm, y= ~ 5 µm.	46
Slika 26: SEM-slika nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov: 1 : 1: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi.	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Dejavniki, ki vplivajo na izdelavo in morfologijo nanovlaken.	5
Preglednica II: Sestava vodnih raztopin polimerov.	18
Preglednica III: Sestava suspenzij karvedilola v vodnih raztopinah polimerov.	19
Preglednica IV: Sestava nanosuspenzij karvedilola.	19
Preglednica V: Povprečna velikost in Pdl-delcev učinkovine ter delež intenzitete sipane svetlobe posameznega vrha po redispergiranju vzorcev filmov v nasičeni vodni raztopini karvedilola.	53
Preglednica VI: Povprečna velikost in Pdl delcev učinkovine ter delež intenzitete sipane svetlobe posameznega vrha po redispergiranju vzorcev nanovlaken v nasičeni vodni raztopini karvedilola.	54

POVZETEK

Karvedilol je v vodi težko topna zdravilna učinkovina, kar predstavlja težavo v razvoju ustreznih farmacevtskih oblik. Ena izmed tehnoloških rešitev je vgrajevanje učinkovine v nanovlakna, ki spadajo med nanodostavne sisteme. V okviru magistrske naloge smo želeli ugotoviti, kako različna sestava in način priprave suspenzije karvedilola v raztopini polimerov vplivata na lastnosti nanovlaken. Nanovlakna v raziskavi so bila sestavljena iz karvedilola, polietilenoksida (PEO) in dveh različnih poloksamerov (188 in 407). Pripravili smo nanovlakna iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola ter za primerjavo izdelali polimerne filme z enako kvali- in kvantitativno sestavo kot nanovlakna. S proučevanjem sproščanja smo dokazali najpočasnejše sproščanje učinkovine iz fizikalne zmesi karvedilola s polimeri glede na hitrost sproščanja učinkovine iz nanovlaken in polimernih filmov. Potrdili smo tudi, da je sproščanje karvedilola iz nanovlaken in filmov, pripravljenih iz suspenzij, počasnejše v primerjavi s sproščanjem iz vzorcev, pripravljenih iz nanosuspenzij. Z analizo velikosti delcev smo dokazali, da po dispergiranju nanovlaken in filmov, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzij, v vodnem mediju nastane disperzija nanometrskih delcev. Torej smo z metodo nanoprecipitacije zmanjšali delce karvedilola in povečali njihovo površino ter omogočili hitrejšo raztapljanje učinkovine, kar se kaže v hitrejšem sproščanju. Pri nanovlaknih iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola je bilo začetno sproščanje hitro, kar je bila posledica velike površine nanovlaken in možne prisotnosti amorfne oblike karvedilola. Ugotovili smo, da pri vzorcih, pripravljenih iz nanosuspenzij, proces izdelave nanovlaken z elektrostatskim sukanjem ne vpliva bistveno na sproščanje učinkovine. Pri vzorcih, ki smo jih pripravili iz suspenzij, pa smo z izdelavo nanovlaken pospešili sproščanje karvedilola glede na filme. Med seboj smo primerjali vzorce z različno vsebnostjo poloksamerov 188 in 407 ter ugotovili, da različna razmerja le-teh ne vplivajo bistveno na sproščanje karvedilola. Pregledali in primerjali smo tudi morfologijo vzorcev. SEM-analiza je pokazala prisotnost manjših delcev karvedilola v karo obliki v vzorcih iz nanosuspenzij v primerjavi z vzorci iz suspenzij, v katerih so bili delci večji in nepravilnih oblik. Prav tako je bil povprečni premer nanovlaken iz nanosuspenzij manjši kot pri nanovlaknih iz suspenzij. Zaključimo lahko, da je izdelava nanovlaken iz suspenzij, zlasti iz nanosuspenzij težko topnih učinkovin v raztopini PEO in poloksamerov obetaven pristop za izboljševanje hitrosti raztapljanja teh učinkovin.

ABSTRACT

Carvedilol is a poorly water soluble drug which presents problems associated with the development of suitable dosage forms and its application. One of the technological solutions is incorporation of the drug in nanofibers, belonging to nanodelivery systems. In the scope of the master thesis we have investigated the impact of composition of carvedilol suspension in polymer solutions and the method of suspension preparation on the properties of nanofibers. Nanofibers in our study were composed of carvedilol, polyethylene oxide and two different poloxamers (188 and 407). We have prepared nanofibers from the carvedilol suspensions and nanosuspensions. As a reference formulation, we have prepared polymer films with the same qualitative and quantitative composition as the nanofibers. The drug release studies have shown the slowest drug release from the physical mixture of carvedilol with polymers. The particle size analysis have shown that dispersion of nanofibers and films, prepared from nanosuspensions, in aqueous medium results in formation of nanometer-sized particle dispersion. Thus, with the nanoprecipitation method we have reduced the carvedilol particles size, increased its surface area and enabled faster drug dissolution, resulting in faster drug release. In the case of nanofibers prepared from carvedilol suspensions and nanosuspensions an initial burst drug release was observed as a result of the large surface area of nanofibers and possible presence of amorphous form of carvedilol. We have shown that the way of preparation of nanofibers from nanosuspensions by electrospinning has no significant influence on the drug release. On the other hand, the drug release from nanofibers prepared from carvedilol suspensions was increased compared to polymer films with the same composition. The results have shown, that the different content of poloxamers 188 and 407 in the samples did not affect the carvedilol release significantly.

We have also analyzed the morphology of nanofibers and films. SEM imaging has shown the presence of small, rhomboidal particles of carvedilol in the samples prepared from nanosuspensions compared with samples prepared from suspensions, where the particles were larger and more irregular in shape. The average diameters of the nanofibers prepared from nanosuspensions were smaller than the average diameters of the nanofibers prepared from the suspensions. We can conclude that the preparation of nanofibers from drug suspensions and nanosuspensions, in particular, in solution of PEO and poloxamers is a promising approach for improving the dissolution rate of poorly soluble drugs.

KLJUČNE BESEDE

Elektrostatsko sukanje, nanovlakna, polimerni filmi, karvedilol, poloksamer 188, poloksamer 407

Electrospinning, nanofibers, polymer films, carvedilol, poloxamer 188, poloxamer 407

SEZNAM OKRAJŠAV

3-D: tridimenzionalno (*ang. Three-dimensional*)

AFM: mikroskopija na atomsko silo (*ang. Atomic-force microscopy*)

CMC: kritična micelska koncentracija (*ang. Critical micelle concentration*)

FTIR: infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (*ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

HLB: hidrofilno-lipofilno ravnovesje (*ang. Hydrophilic-lipophilic balance*)

NMR: jedrsko magnetno resonanco (*angl. Nuclear magnetic resonance*)

PAS: površinsko aktivna snov

Pdl: polidisperzni indeks

PEG: polietilenglikol

PEO: polietilenoksid

POE: polioksietilen

RH: relativna vlažnost (*ang. Relative humidity*)

SAXC: ozkokotno rentgensko sipanje (*ang. Small-angle X-ray scattering*)

SEM: vrstična elektronska mikroskopija (*ang. Scanning electron microscopy*)

TEM: presewni elektronski mikroskop (*ang. Transmission electron microscopy*)

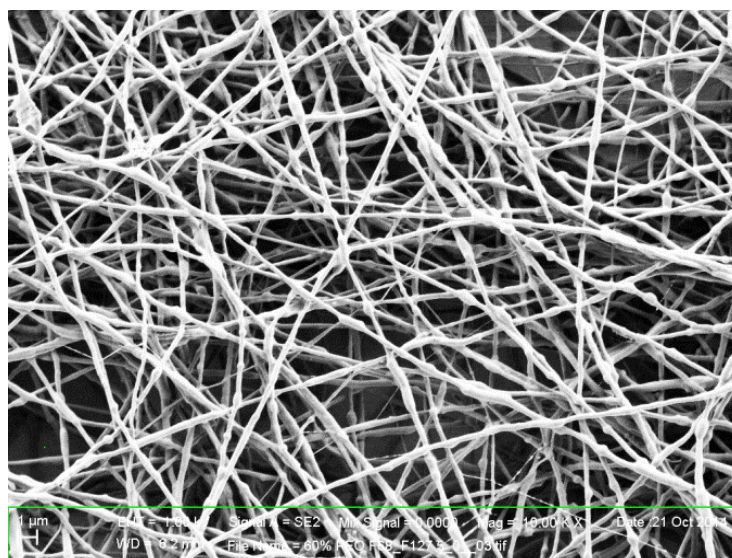
WAXD: širokokotno rentgensko slikanje (*ang. Wide-angle X-ray Diffraction*)

Z-Ave: povprečni hidrodinamski premer (*ang. Z-average particle size*)

1 UVOD

1.1 NANOVLAKNA

Besedo nanovlakna lahko razdelimo na dva dela in tako opredelimo njen pomen. Vlakno predstavlja tanek, podolgovat predmet. Predpona nano- pomeni desetiško potenco 10^{-9} , ki se navezuje na debelino vlakna, ki meri od 10 do 1000 nm, njihova dolžina pa je teoretično neomejena. Nanovlakna torej spadajo med nanomateriale in so trda vlakna z relativno veliko površino na enoto mase, veliko poroznostjo, majhno velikostjo por in veliko mehansko trdnostjo (1). Uporabljajo jih na številnih področjih, npr. v vojski, v kozmetiki, v elektroindustriji in medicini (1, 2). Primer polimernih nanovlaken z zdravilno učinkovino karvedilol je prikazan na sliki 1.



Slika 1: SEM-slika polimernih nanovlaken.

1.1.1 Prednosti nanovlaken

Velik potencial nanovlaken izhaja iz njihovih fizikalnih lastnosti, ki jim dajejo prednost pred enakim materialom makro- in mikrovelikosti. Odlikujejo jih naslednje lastnosti:

- velika fleksibilnost in mehanska trdnost v primerjavi s podobnimi materiali drugih oblik in večjih dimenzij;

- majhna debelina vlaken, posledica katere je večja površina na enoto mase, kar pomeni več molekul na površini, to pa povzroči večjo površinsko energijo in večjo reaktivnost površine;
- poroznost;
- dobra adhezivnost, ki je odraz velike površine in porozne zgradbe ter
- možnost posnemanja biomolekul na nanonivoju (1, 3).

1.2 PRIPRAVA NANOVLAKEN

Nanovlakna pripravljamo iz umetnih in naravnih polimerov, ki predstavljajo njihovo ogrodje. Primeri polimerov, ki se uporabljajo pri pripravi nanovlaken, so: polietilen, najlon, polipropilen, polietilenoksid, kolagen, hitosan itd. Za uporabo v farmaciji morajo biti polimeri biokompatibilni, zaželeno pa je, da so tudi biorazgradljivi. Poznamo več metod za pripravo nanovlaken. Mednje spadajo fazna separacija (ang. *phase separation*), vlečenje (ang. *drawing*), samozdruževanje (ang. *self-assembly*), uporaba predložnih membran (ang. *template synthesis*) in elektrostatsko sukanje (ang. *electrospinning*). Najpogosteje se uporablja zadnja od naštetih metod (1, 2).

1.2.1 Elektrostatsko sukanje

Proces elektrostatskega sukanja je leta 1934 razvil Anton Formhals in ga istega leta tudi patentiral (US Patent, 1-975-504). V 70. letih prejšnjega stoletja je Simm s sodelavci patentiral postopek za izdelavo vlaken s premerom, manjšim od 1 mm. Prva nanovlakna, pripravljena z elektrostatskim sukanjem, so bila namenjena izdelavi filmov. Z razcvetom nanotehnologije v 80-ih letih prejšnjega stoletja je metoda dobila več pozornosti tudi na drugih področjih. Predstavlja namreč najenostavnejšo metodo za pripravo nanovlaken s premerom od 50 do 1000 nm in teoretično neomejeno dolžino. Izdelava nanovlaken poteka na podlagi elektrohidrodinamskega procesa iz nabitega curka polimerne raztopine ali taline (2, 4, 5).

1.2.1.1 Sestava naprave za elektrostatsko sukanje

Napravo za elektrostatsko sukanje (primer naprave je prikazan na sliki 2) sestavljajo trije pomembni deli:

- vir visoke napetosti;

- brizga s kovinsko iglo z notranjim premerom, manjšim od $100\ \mu\text{m}$, in
- zbiralo za vlakna (5, 6).



Slika 2: Naprava za elektrostatsko sukanje.

1.2.1.2 Potek elektrostatskega sukanja

Proces poteka pri sobni temperaturi. Zanj je potreben vir visoke napetosti, ki ga priključimo na kovinsko iglo (slika 2). Ta je, glede na pogoje elektrostatskega sukanja, različno oddaljena od zbirala, ki ga ozemljimo. Brizga je napolnjena s polimerno raztopino ali talino. Ob priključitvi vira visoke napetosti uvajamo v polimerno raztopino ali talino električni naboj, ki se razporedi po površini kapljice, ki nastane na konici igle zaradi delovanja črpalke. Povečanje napetosti povzroči naraščanje odbojnih sil med enakimi naboji v kapljici ter naraščanje privlačnih sil med kapljico in nasprotno nabitim zbiralom. Ob izenačitvi površinske in električne napetosti pride do oblikovanja kapljice polimerne raztopine v Taylorjev stožec. Ko električna napetost preseže površinsko napetost, nastane električno nabit curek polimerne raztopine. Enojni curek se razcepi v več majhnih curkov s podobnimi premeri (2, 7).

Pri procesu elektrostatskega sukanja sodeluje več različnih sil:

- Coulombove sile med naboji na površini curka polimerne raztopine/taline;
- elektrostatske sile zaradi zunanjega električnega polja;

- viskoelastična sila raztopine, ki preprečuje raztezanje curka;
- sila površinske napetosti;
- gravitacijska sila in
- sila zračnega upora (8).

Na poti do kovinskega zbirala topilo iz polimerne raztopine izhlapi in nastanejo nabita polimerna nanovlakna, ki se naključno naložijo na zbiralu (2, 7). Čas potovanja polimerne raztopine od konca igle do zbirala, kjer se naložijo polimerna nanovlakna, je do 0,1 s. Čas nastajanja nanovlakna je torej okoli 0,01 s, zato je verjetnost kristalizacije učinkovin, ki so raztopljene v polimerni raztopini ali talini, majhna. Vzroka za to sta hitro izhlapevanje topila in kratek čas, ki je na voljo za nastanek kristalov učinkovine med procesom elektrostatskega sukanja. To so potrdili tudi Ignatious, Nagy s sodelavci, Verreck s sodelavci in Yu s sodelavci (9). Ta ugotovitev je pomembna predvsem pri oblikovanju nanovlaken z v vodi težko topnimi učinkovinami, saj zmanjšanje stopnje in obsega kristalizacije omogoči hitrejše raztapljanje vgrajene učinkovine. Amorfn oblika učinkovine ima višjo notranjo energijo kot kristalna. To je na modelu težko topne učinkovine diosmin potrdil Vrbata s sodelavci. Z vgrajevanjem le-tega v nanovlakna se je pospešilo njegovo sproščanje v primerjavi z njegovim sproščanjem iz komercialno uporabljenih tablet (5, 9).

1.2.1.3 Vplivi različnih dejavnikov na proces in končni produkt elektrostatskega sukanja

Na proces nastanka nanovlaken vplivajo številni dejavniki. Delimo jih na sistemske (lastnosti polimerne raztopine) in procesne dejavnike ter dejavnike okolja (preglednica I) (2, 5).

Eden najbolj pomembnih dejavnikov, ki vpliva na končni produkt procesa, je lastnost polimerne raztopine, ki je odvisna od izbire polimera. Teh (sintetičnih in naravnih) so že več kot 100 uspešno uporabili za pripravo nanovlaken. Najbolj raziskovani polimer za uporabo pri elektrostatskem sukanju je polietilenoksid (PEO). Veliko zanimanje zanj je med drugim posledica njegove dobre topnosti v različnih topilih (5). Na lastnosti polimerne raztopine vpliva tudi izbor topila. Za uspešen nastanek nanovlaken morajo biti zagotovljeni naslednji pogoji: izbran polimer mora biti topen v uporabljenem topilu, parni tlak topila mora biti primeren, da je izhlapevanje dovolj hitro, kar omogoča zbiranje suhih

nanovlaken na zbiralu. Ustrezni morata biti tudi viskoznost in površinska napetost topila (10).

V številnih raziskavah so preučevali vpliv različnih dejavnikov (preglednica I) na lastnosti nanovlaken. Ti so: premer nanovlaken, homogenost debeline nanovlaken, pojav vozlov in lastnosti površine nanovlaken. Če so pogoji, ki so potrebni za nastanek curka, izpolnjeni, na nastanek nanovlaken vpliva viskoznost raztopine polimerov. Večja viskoznost povzroči nastanek nanovlaken z večjim premerom. Nastanek nanovlaken različne debeline je posledica cepitve curka polimerne raztopine v več curkov (2, 11, 12). Nastanek nanovlaken z vozli je posledica neenakomernega (nestabilnega) curka polimerne raztopine med procesom elektrostatskega sukanja, in sicer zaradi visoke površinske napetosti curka. Dodatek snovi, ki znižajo površinsko napetost, oz. dodatek topil, ki imajo nižjo površinsko napetost, omogoča nastanek gladkih nanovlaken brez vozlov (7, 13).

Preglednica I: Dejavniki, ki vplivajo na izdelavo in morfologijo nanovlaken.

Sistemski dejavniki		Procesni dejavniki in dejavniki okolja
Lastnosti polimera	Lastnosti polimerne raztopine	
molekulska masa	viskoznost	jakost električne napetosti
temperatura steklastega prehoda	koncentracija polimera	relativna vlažnost (RH)
topnost	površinska napetost	parni tlak topila
	prevodnost	oblika elektrod
		temperatura

1.3 VREDNOTENJE NANOVLAKEN

Metode za vrednotenje nanovlaken se delijo na metode za vrednotenje morfologije, strukture in mehanskih lastnosti nanovlaken (14, 15).

– Morfologija nanovlaken

Pri proučevanju morfologije lahko opazujemo in vrednotimo debelino nanovlaken in porazdelitev njihove debeline, njihovo obliko, prisotnost vozlov, morebitno prisotnost kristalov učinkovine in orientacijo nanovlaken. Za vrednotenje morfologije nanovlaken

uporabljamo mikroskopske metode (14, 15). Te temeljijo na elektronskem mikroskopiranju. Elektroni imajo kratko valovno dolžino, zato omogočajo boljšo ločljivost kot je ločljivost optične mikroskopije. Pri elektronski mikroskopiji uporabljamo vakuum zaradi absorpcije elektronov v zraku. Obstajajo tri vrste: presevna elektronska mikroskopija (TEM), vrstična elektronska mikroskopija (SEM) in mikroskopija na atomsko silo (AFM). Prednost mikroskopskih metod je, da dajo poleg velikosti tudi podatek o obliki nanovlaken (14, 16). Vrstični elektronski mikroskop se uporablja, kadar želimo tridimenzionalno (3-D) sliko nanovlaken. Poleg debeline lahko opazujemo tudi njihovo obliko, prisotnost kristalov in vozlov. Deluje tako, da elektronski curek tipa raziskovano površino po vzporednih črtah. Detektor zaznava elektrone, ki jih elektronski curek izbije s površine vzorca. Tega je treba predhodno obdelati s težkimi kovinami, da zagotovimo njegovo prevodnost (14, 16). AFM podaja 3-D sliko površine z merjenjem sil (npr. van der Waalsovih) med tipalom in površino vzorca. V primerjavi s SEM in TEM je prednost te metode, da med analizo ni potreben vakuum, vzorec pa je lahko tudi moker (14).

– **Struktura nanovlaken**

Pri strukturi nanovlaken določamo kemijsko in fizikalno strukturo. Določamo ju s pomočjo infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo (*angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR*) in z jedrsko magnetno resonanco (*angl. Nuclear magnetic resonance, NMR*). Z omenjenima metodama lahko določimo tudi intramolekularne interakcije. Konfiguracijo makromolekul v nanovlaknih analiziramo s širokokotnim rentgenskim slikanjem (*angl. Wide-angle X-ray Diffraction, WAXD*), z ozkokotnim rentgenskim sipanjem (*angl. Small-angle X-ray scattering, SAXC*) in z optično dvojno refrakcijo (2, 15).

– **Mehanske lastnosti nanovlaken**

V večini primerov preučujemo skupek nanovlaken in pri tem uporabimo standardne tehnike za proučevanje natezne trdnosti. Zaradi majhnih premerov je mehanska karakterizacija posameznega nanovlakna zelo zahtevna in si pri njej pomagamo z ostalimi komplementarnimi metodami (TEM, SEM in AFM) (2, 15).

1.4 UPORABA NANOVLAKEN V BIOMEDICINI

Nanovlakna se v farmaciji uporabljajo kot sodobne obloge za celjenje ran, za razvoj tkivnih nadomestkov in kot dostavni sistemi za vnos zdravilnih učinkovin (2).

1. Celjenje kroničnih ran in opeklin z nanovlakni

Nanovlakna lahko uporabljamo za zdravljenje opeklin in oskrbo kroničnih ran, in sicer tako, da jih neposredno naneseemo na poškodovano kožo, kjer spodbujajo obnovo in zmanjšajo nastajanje brazgotin, ki se pojavijo pri tradicionalnem zdravljenju opeklin ali drugih ran. Nanoporozna struktura ščiti rano pred mikroorganizmi, velika površina pa učinkovito absorbira eksudat iz rane (1–3).

2. Razvoj tkivnih nadomestkov

Tkivni nadomestki s pomočjo živih celic in/ali z bioaktivnimi molekulami nadomeščajo, obnavljajo, ohranjajo in zdravijo poškodovana tkiva ter spodbujajo njihovo regeneracijo. Nanovlakna imajo torej velik potencial za uporabo v regenerativni medicini, in sicer kot tkivni nadomestki za kosti, žile in živce (1, 2).

3. Nanovlakna kot dostavni sistem za učinkovine

Nanovlakna so dostavni sistem, ki je primeren za različne načine uporabe. Velik pomen imajo npr. pri oblikovanju farmacevtskih oblik z zdravilnimi učinkovinami, ki so težko topne v vodi, saj omogočajo izboljšanje njihove biološke uporabnosti (9).

1.5 NANOVLAKNA KOT DOSTAVNI SISTEM ZA UČINKOVINE

Nanovlakna spadajo med sodobne dostavne sisteme, ki omogočajo različne načine aplikacije (npr. oralno, peroralno, transdermalno) in različne načine sproščanja vgrajene učinkovine (9, 17, 18).

Primeri učinkovin, ki so jih že vgradili v nanovlakna, so antibiotiki, analgetiki, antimikotiki, protivnetne učinkovine in rastni dejavniki (2). Učinkovine so v nanovlakna vključene na več načinov:

- učinkovina je lahko vezana na površino nanovlaken;

- polimerni nosilec tvori ogrodje, v katero je vključena učinkovina;
- nanovlakna, kjer nosilni polimerni material z elektrostatskim sukanjem oblikujemo v tubularno obliko, v katero so vgrajeni delci učinkovine;
- posebej pripravimo nanovlakna, ki vsebujejo učinkovino, in nanovlakna brez nje, končni produkt pa je preplet nanovlaken, ki vsebujejo zdravilno učinkovino, in tistih, ki je ne (2).

Različne načine sproščanja učinkovin iz nanovlaken lahko dosežemo z izbiro polimera, z načinom vključevanja učinkovine v nanovlakna in z izbiro parametrov procesa izdelave nanovlaken, s čimer spreminjamo morfologijo, debelino in poroznost vlaken (3).

Različni načini sproščanja učinkovine iz nanovlaken so:

- takojšnje sproščanje zdravilne učinkovine;
- prirejeno sproščanje zdravilne učinkovine:
 - zakasnjeno sproščanje (ang. *delayed release*);
 - ponavljajoče sproščanje (ang. *repeat release*);
 - podaljšano oz. zadržano sproščanje (ang. *prolonged/sustained release*) (19).

Nosilni materiali za zdravilno učinkovino v nanovlaknih so običajno biorazgradljivi polimeri. Sproščanje učinkovine iz nanovlaken je odvisno od topnosti učinkovine, njene difuzije skozi polimerno ogrodje in procesa erozije/razgradnje slednjega. Erozijski je fizikalni proces, ki predstavlja raztapljanje polimernih verig in difuzijo vode v dostavni sistem. Na vrsto erozije vpliva struktura polimera. Poznamo površinsko erozijo in erozijo po celotnem volumnu (ang. *bulk erosion*). Prva se pojavi, ko je hitrost erozije ogrodja večja od hitrosti difuzije vode v notranjost polimernega ogrodja, v nasprotnem primeru pa govorimo o eroziji po celotnem volumnu. Pri nanovlaknih sta zaradi velike površine kinetiki površinske erozije in erozije po celotnem volumnu podobni (20, 21).

Prednosti nanovlaken so:

- velika površina glede na maso daje možnost za izboljšanje topnosti težko topnih učinkovin, kar izboljša njihovo biološko uporabnost;
- nadzorujemo lahko profil sproščanja učinkovin, in sicer s spreminjanjem morfologije in sestave nanovlaken;

- zanje je značilna večja vgradnja zdravilnih učinkovin v primerjavi z drugimi dostavnimi sistemi nanovelikosti (17, 21).

Slabosti nanovlaken kot dostavnega sistema za zdravilne učinkovine so:

- kljub številnim raziskavam je še vedno veliko neznank, povezanih s procesom izdelave;
- malo *in vivo* raziskav;
- začetno hipno sproščanje (ang. *initial burst release*) učinkovine, ki je posledica prisotnosti učinkovine na površini nanovlakna. Ta učinek lahko omejimo ali preprečimo, če uspemo učinkovino v celoti vključiti v nanovlakna;
- uporaba organskih topil in njihov zaostanek v nanovlaknih (17).

1.6 NANOVLAKNA KOT DOSTAVNI SISTEM ZA TEŽKO TOPNE UČINKOVINE

V vodi težko topne zdravilne učinkovine imajo običajno slabo biološko uporabnost zaradi majhne topnosti in nizke hitrosti raztapljanja. S pomočjo tehnoloških postopkov lahko vplivamo na oba parametra. Primeri takšnih pristopov so:

- dodatek solubilizatorjev;
- tvorba soli;
- dodatek sotopil in
- zmanjšanje velikosti delcev.

Razvoj nanotehnologije je odprl nove možnosti, s katerimi lahko odpravimo oz. zmanjšamo težave, ki so posledica težke topnosti učinkovin. Z zmanjšanjem velikosti delcev dosežemo povečanje površine in s tem večjo hitrost raztapljanja slabo topnih učinkovin, povečamo pa tudi njihovo biološko uporabnost. Taepaiboon je s sodelavci dokazal, da je sproščanje učinkovin iz nanovlaken hitrejše za različne zdravilne učinkovine (natrijev salicilat, ki je dobro topen v vodi, natrijev diklofenak, ki je srednje topen v vodi, ter v vodi težko topna naproksen in indometacin) v primerjavi s polimernimi filmi z enako kvalitativno in kvantitativno sestavo (17, 22). Hitrejše sproščanje težko topnih učinkovin iz nanovlaken v primerjavi s sproščanjem iz polimernih filmov s kvantitativno in kvalitativno

enako sestavo so dokazali tudi Potrč in sodelavci. Pripravili so nanovlakna iz polikaprolaktona ter dveh učinkovin: ibuprofena in karvedilola. Ugotovili so, da je bilo sproščanje obeh učinkovin iz nanovlaken v primerjavi s filmi hitrejše (23).

Pri pripravi nanovlaken z zdravilno učinkovino lahko z metodo priprave nanosuspenzije že pred nastankom nanovlaken zmanjšamo velikost delcev učinkovine na nanovelikost. Nanosuspenzija predstavlja koloidnodisperzni sistem delcev učinkovine nanometrskih velikosti v tekočem mediju. Delež zdravilne učinkovine v nanosuspenziji je lahko do 40 %, zato te predstavljajo način oblikovanja težko topnih zdravilnih učinkovin, ki imajo topnost manjšo od 200 µg/mL. Bistveni prednosti nanosuspenzij sta:

- povečana topnost učinkovine (povečanje površine ter medfazne napetosti med učinkovino in medijem zaradi večje ukrivljenosti površine delcev) in
- povečana hitrost raztapljanja (zaradi zmanjšanja delcev in povečane površine) (16).

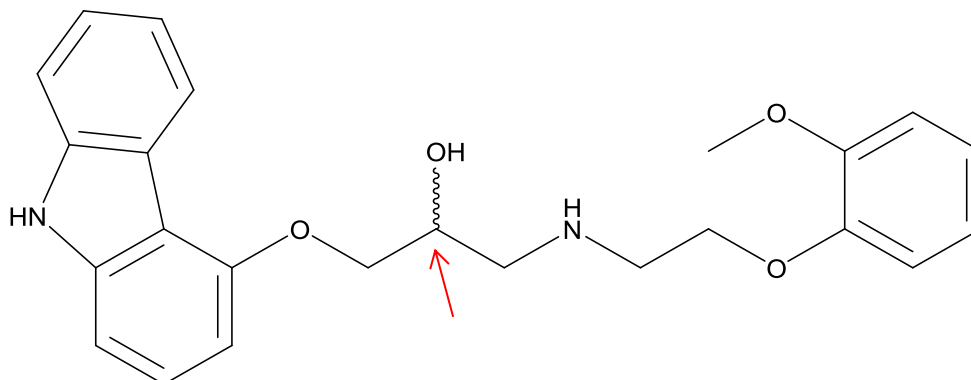
Nanosuspenzijam zaradi fizikalne nestabilnosti dodajamo stabilizatorje. Njihova naloga je, da preprečijo rast in združevanje delcev. Med stabilizatorje spadajo npr. lecitin, polisorbit in poloksameri. Za bolj učinkovito stabilizacijo lahko uporabimo kombinacijo stabilizatorjev.

Poznamo več načinov izdelave nanosuspenzij. Eden od načinov je obarjanje učinkovine s pomočjo injiciranja raztopine učinkovine v netopilo, tj. nanoprecipitacija. Obe topili, ki ju uporabimo, se morata mešati med seboj, proces pa mora biti nadzorovan (16, 24).

Hitrejše sproščanje učinkovine pri pripravi nanosuspenzije v primerjavi s suspenzijo učinkovine so dokazali Papdiwal in sodelavci (25). Liu je s sodelavci s pripravo nanosuspenzije prav tako omogočil hitrejše sproščanje karvedilola v primerjavi s praškom karvedilola in komercialnimi tabletami z isto učinkovino (26).

1.7 SESTAVA NANOVLAKEN V RAZISKAVI

1.7.1 Karvedilol



Slika 3: Strukturna formula karvedilola. Rdeča puščica označuje kiralni center.

Kemijsko ime za karvedilol je (2*RS*)-1-(9*H*-karbazol-4-iloksi)-3-[[2-(2-metoksifenoksi)etil]amino]propan-2-ol (slika 3). Pri sobni temperaturi je bel kristaličen prašek z molekulsko maso 406,47 g/mol. Zanj je značilna velika mehanska stabilnost (26, 27, 28, 29).

Prisoten je v različnih polimorfnih modifikacijah, ki so odvisne od načina sinteze in procesa kristalizacije. Odkrite so bile tri polimorfne oblike (polimorf I, II in III), hidrat in solvat (30). Temperatura tališča karvedilola je 117–121 °C (Alves, 2015) (29). Ima en kiralni center, ki je na sliki 3 označen z rdečo puščico.

Je šibka baza s p*K*_a-vrednostjo 8,77, kar povzroči slabšo topnosti v nevtralnem in bazičnem mediju. S padanjem pH medija pa njegova topnost narašča. Delno je topen v etanolu, dobro topen pa v metilen kloridu, metanolu, dimetilsulfoksidu in acetonu (27, 28, 29). Po biofarmacevtski klasifikaciji spada v II. razred, kamor spadajo učinkovine, ki so težko topne in dobro permeabilne. Topnost karvedilola v vodi pri sobni temperaturi je 0,020 mg/mL (28, 30). Prašek karvedilola ima slabe pretočne lastnosti, ki jih pri izdelavi farmacevtskih oblik reguliramo z dodajanjem ustreznih pomožnih snovi. Občutljiv je na prisotnost vlage (29).

Pri metabolizmu karvedilola sodelujejo encimi skupine CYP-450. Le-ta poteka z oksidacijo aromatskega obroča in njegove glukuronidacije, pri čemer nastanejo trije metaboliti. V plazmi se od 98 % do 99 % karvedilola veže na proteine, predvsem albumin. Ker je lipofilna molekula, se v velikem obsegu porazdeljuje v ekstravaskularna tkiva in ima volumen porazdelitve 115 L (28). Najvišjo plazemsko koncentracijo po peroralnem vnosu doseže po 1,47 h. Razpolovni čas karvedilola je 6 h. 2 % karvedilola se izločita nespremenjenega z urinom, metaboliti pa se izločajo s fecesom. Zaradi slabe topnosti v prebavnem traktu in veliki podvrženosti metabolizmu prvega prehoda je biološka uporabnost pri ljudeh le 25–35 % (26).

Karvedilol spada med neselektivne zaviralce adrenergičnih receptorjev beta, prav tako pa zavira adrenergične alfa 1-receptorje. V klinični uporabi je racemat. Beta-receptorje naj bi zaviral (S)-enantiomer. Za oba enantiomera je značilno zaviranje alfa 1-receptorjev (29).

Z vazodilatatornim delovanjem, ki je posledica selektivnega zaviranja alfa 1-receptorjev, zmanjšuje periferni žilni upor. Z neselektivnim zaviranjem receptorjev beta zavira sistem renin-angiotenzin (31). Uporablja se pri zdravljenju kardiovaskularnih bolezni, kot so primarna hipertenzija, ishemična srčna bolezen, zdravljenje po infarktu z dokazano disfunkcijo levega ventrikla, blago do hudo srčno popuščanje. Ima tudi nekaj pomožnih terapevtskih učinkov, npr. zaviranje apoptoze, antioksidativno delovanje, ki je posledica karbazolnega dela molekule, zaviranje proliferacije gladkih mišic žil, in ugodno vpliva na občutljivost na inzulin pri osebah z diabetesom (30, 32).

1.7.2 Polietilenoksid (PEO)

Leta 1860 je Laurence prvi razvil proces pridobivanja PEO z nizko molekulsko maso (33). 1920 je sledila sinteza PEO z visoko molekulsko maso in leta 1957 njegova komercialna proizvodnja (33).

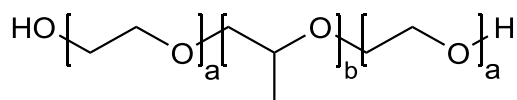
PEO je sintezni neionski polimer s formulo $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$, kjer je n število etilenoksidnih skupin. Je amfifilen polimer, ki je pri sobni temperaturi topen v vodi v vseh razmerjih. Topen je tudi v organskih topilih, npr. v etanolu, acetonu, kloroformu, toluenu. Temperatura tališča je odvisna od molekulske mase polimera in ni višja od 67 °C (34, 35).

Komercialno je PEO na voljo v širokem razponu molekulskih mas: od 200 g/mol do več milijonov g/mol. Glede na molekulsko maso so za polimer značilna različna poimenovanja: PEO, polietilenglikol (PEG) in polioksietilen (POE). PEG so oligomeri in polimeri etilenoksida z molekulsko maso do 20.000 g/mol, PEO so polimeri z molekulsko maso nad 20.000 g/mol in POE so polimeri s poljubno molekulsko maso. Lastnosti polimera so odvisne od njegove molekulske mase, tako so PEG viskozne tekočine ali voskaste trdne snovi, PEO pa so vedno v trdnem agregatnem stanju (34).

PEO se v farmaciji uporablja za izdelavo in oblaganje tablet, za izdelavo dostavnih sistemov z nadzorovanim sproščanjem ter za izdelavo mukoadhezivnih in transdermalnih dostavnih sistemov (20). Je eden najpogostejše uporabljenih in raziskovanih polimerov za pripravo nanovlaken z elektrostatskim sukanjem. S to metodo lahko izdelamo nanovlakna iz vodne raztopine PEO s premerom 3–1000 nm in dolžino od nekaj cm do nekaj metrov (2). Uporablja se kot dodatek pri elektrostatskem sukanju nekaterih naravnih polimerov, saj omogoča nastanek nanovlaken. Tako je Bhatrai s sodelavci v raziskavah dodal PEO k hitosanu, da je zmanjšal viskoznost raztopine in omogočil pripravo nanovlaken z višjo koncentracijo naravnega polimera (36).

1.7.3 Poloksameri

Poloksameri so bili na trgu prvič predstavljeni ob koncu 50. let prejšnjega stoletja. So blok kopolimeri etilenoksida in propilenoksida s površinsko aktivnimi lastnostmi. Njihova splošna struktura je predstavljena na sliki 4. Črka a predstavlja hidrofilni polietilenoksidni (PEO) del molekule, b pa hidrofobni polipropilenoksidni (PPO) del molekule. Dolžini PEO- in PPO-dela molekule lahko spreminjamo, zato je na tržišču več poloksamerov, ki se razlikujejo po molekulski masi ter po razmerju med hidrofilnim in hidrofobnim delom, npr. poloksameri 124, 188, 237, 338 in 407. V farmaciji se najpogostejše uporabljata poloksamer 407 (a = 101, b = 56) z molekulsko maso 9.840–14.600 g/mol in poloksamer 188 (a = 80, b = 27) z molekulsko maso 7.680–9.510 g/mol (37, 38).



Slika 4: Splošna strukturna formula poloksamerov: a – število etilenoksidnih enot, b – število propilenoksidnih enot.

Imena poloksamerov vsebujejo trimestno številko, ki opisuje njihove lastnosti. Če zadnjo številko pomnožimo z 10, dobimo število, ki predstavlja delež polietilenoksida v molekuli v %. Prvi dve številki, pomnoženi s 100, pa predstavljata približno molekulsko maso hidrofobnega dela molekule (38).

Poloksameri so topni v vodi, v polarnih in nepolarnih organskih topilih, kar omogoča njihovo razširjeno uporabo v številnih farmacevtskih oblikah. Topnost v vodi je posledica tvorbe vodikovih vezi med PEO-delom poloksamera in kisikom v molekuli vode. So neionske amfifilne snovi. V nizkih koncentracijah so poloksameri v vodi dispergirani v obliki molekul. Če povečujemo koncentracijo poloksamera in dosežemo kritično micelsko koncentracijo (CMC), pride do nastanka micelov. CMC-vrednost je odvisna od velikosti hidrofobnega dela molekule – z večanjem se le-ta zmanjšuje. Micel je sestavljen iz hidrofobnega jedra, ki ga sestavljajo metilne skupine PPO-dela, in hidrofilne površine (PEO). Hidrofobni del micela tvori preko metilnih skupin van der Waalsove vezi s slabo topnimi učinkovinami, kar povzroči njihovo solubilizacijo. To je eden izmed načinov povečevanja topnosti in hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin zaradi povečanja močenja učinkovine, kar poveča njihovo navidezno topnost in posledično hitrost raztapljanja (39, 40). Z uporabo poloksamerov so dokazali izboljšanje raztapljanja številnih učinkovin, npr. ibuprofena, bikalutamida, nifedipina, etorikoksiba, rofekoksiba in meloksikama (37, 41, 42). Učinkovitost izboljšanja raztapljanja je odvisna od izbire poloksamera in njegove količine. Medarević je s sodelavci primerjal vpliv poloksamerov 407 in 188 na izboljšanje raztapljanja karbamazepina. Ugotovil je, da poloksamer 188 učinkoviteje izboljša sproščanje težko topne učinkovine karbamazepina iz trdne disperzije kot poloksamer 407, in sicer zaradi manjše molekulske mase in njegovih hidrofilnih lastnosti (42). Liao je ugotovil, da dodatek poloksamera 188 k peletam, sestavljenim iz poloksamera 407 in slabo topne učinkovine, dodatno poveča sproščanje učinkovine v primerjavi s sproščanjem učinkovine iz pelet, ki vsebujejo le poloksamer 407 (43). Poloksameri se uporabljajo tudi kot emulgatorji in koemulgatorji, pri oblaganju tablet, kot stabilizatorji za suspenzije, emulzije, nanodelce in nanosuspenzije (40).

1.7.3.1 Poloksamer 188

Poloksamer 188 ($a = 12$, $b = 20$), imenovan tudi Lutrol F 68, je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Je bel ali skoraj bel voskast prah ali v obliki kosmičev (44).

Dinamična viskoznost raztopine znaša 1.000 mPas. Temperatura tališča je 52 °C. Njegovo hidrofilno-lipofilno ravnotežje (HLB) je 29 (39).

Uporablja se kot emulgator in koemulgator. Izboljša topnost, absorpcijo in biološko uporabnost učinkovin z nizko topnostjo po vnosu v obliki peroralnih farmacevtskih oblik (39). Potencialno se lahko uporablja tudi za zmanjšanje vnetja in poškodb tkiva po možganskih poškodbah, kar so dokazali pri podganah (40).

1.7.3.2 Poloksamer 407

Poloksamer 407 ($a = 101$, $b = 56$), imenovan tudi Lutrol F 127, je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Je bel ali skoraj bel voskast prah ali v obliki kosmičev (44). Dinamična viskoznost raztopine znaša 3.100 mPas. Temperatura tališča je 56 °C, HLB-vrednost pa znaša 18–23 (39).

V farmacevtskih oblikah se uporablja kot emulgator, zgoščevalo in tvorilec gela. Je dober solubilizator za nekatere učinkovine (npr. nifedipin, inzulin, naproksen in fentikonazol) (37, 39, 40).

2 NAMEN DELA

Slaba topnost zdravilnih učinkovin v vodi je težava in velik izziv, s katerim se pogosto srečujejo farmacevti pri razvoju in izdelavi zdravil. Z razvojem nanotehnologije so se odprle nove možnosti za uspešne rešitve tovrstnih izzivov. Nanodostavni sistemi, kamor spadajo nanovlakna, imajo edinstvene lastnosti, ki so posledica njihove majhnosti. Z vgrajevanjem težko topnih učinkovin vanje lahko povečamo njihovo topnost in/ali hitrost raztapljanja. To je še zlasti pomembno pri razvoju zdravil z zdravilnimi učinkovinami, ki spadajo po biofarmacevtski klasifikaciji učinkovin v II. razred, kar pomeni, da sta zanje značilni dobra permeabilnost in slaba topnost. Takšnim učinkovinam lahko z izboljšanjem topnosti izboljšamo absorpcijo in posledično povečamo biološko uporabnost. Predstavnik te skupine zdravilnih učinkovin je karvedilol. Namen magistrske naloge je preučiti, kako različna sestava in način priprave suspenzije v vodi težko topne učinkovine karvedilola v raztopini polimerov vplivata na lastnosti produkta elektrostatskega sukanja. Preučevali bomo tudi vpliv procesa nanoprecipitacije in priprave nanosuspenzije zdravilne učinkovine na produkt elektrostatskega sukanja.

Najprej bomo pripravili polimerne raztopine, ki jim bomo nato dodali karvedilol (bodisi s suspendiranjem bodisi z metodo izdelave nanosuspenzije). Kot ogrodni polimer pri pripravi nanovlaken bomo uporabili PEO, ki mu bomo dodali različne količine poloksamerov 188 in 407. Ugotoviti želimo, kakšen je vpliv posameznega poloksamera in različnih masnih razmerij poloksamerov na izdelavo nanovlaken ter sproščanje karvedilola iz nanovlaken in polimernih filmov. Pripravljene suspenzije in nanosuspenzije karvedilola bomo elektrostatsko sukali. S tem procesom bomo pripravili hidrofilna nanovlakna na osnovi PEO. Za primerjavo z njimi bomo z vlivanjem izdelali polimerne filme z enako kvali- in kvantitativno sestavo kot nanovlakna. Sledili bodo izvedba testa sproščanja karvedilola, spektrofotometrična analiza sproščene učinkovine, vrednotenje morfologije nanovlaken in filmov s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije ter določanje hidrodinamskega premera delcev učinkovine po razpadu nanovlaken v vodnem mediju s fotonsko korelacijsko spektroskopijo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

- karvedilol, Krka d.d., Novo mesto, Slovenija;
- Lutrol® F127 (poloksamer 407), Sigma-Alderlich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija;
- polietilenoksid (PEO), Mr 400.000 g/mol, Sigma-Alderlich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija;
- Lutrol® F68 (poloksamer 188), Sigma-Alderlich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija;
- aceton (CH_3COCH_3) (> 99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija;
- prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo;
- metanol HPLC GRADIEN GRADE, Mr 32,04 g/mol, J. T. Barker;
- brizge:
 - Injekt® 20 mL, BRAUN, B. Braun MelsnngenAG, Melsingen, Nemčija;
 - injekcijske brizge (10 mL, 20 mL, 50 mL), BD Discordit™ II., Becton Dickinson S.A., Španija;
- mikrocentrifugirke;
- injekcijske igle;
- igle za elektrostatsko sukanje NEL 0815 (notranji premer 0,8 mm, tip: ploska), Linari Engineering S.r.l., Pisa, Italija;
- Parafilm M® Laboratory Film, BEMIS®, Neenah, ZDA;
- filtri:
 - Minisart® RC 0,45 μm , Sartorius, Nemčija;
 - 10- μm filter, Agilent Technologies, ZDA.

3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica Mettler Toledo AG245, Scherzenbach, Švica;
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra pio d.o.o., Kranj, Slovenija;
- ročni higrometer FT-H 620, Ingolstadt, Nemčija;
- pipeta 5000 μl , Sartorius, Nemčija;
- črpalka Razer Scientific Instruments, Vermont, ZDA;
- UV-VIS-spektrofotometer, Hewlett Packard 8453, Agilent Tehnologies, Nemčija;

- naprava z vesli VanKel VK 7000, ZDA;
- vrstični elektronski mikroskop (SEM), Supra 35 VP, Carl Zeiss, Švica;
- Zetasizer Nano ZS, Malvern instruments, Velika Britanija.

3.3 METODE

3.3.1 Priprava raztopin polimerov

Vodne raztopine polimerov smo pripravili pri sobni temperaturi, in sicer 20 g posamezne raztopine. Med seboj so se razlikovale po masah dodanih poloksamerov 188 in 407. Skupna masa dodanih poloksamerov je bila v vseh raztopinah 0,6 g. V erlenmajerico smo natehtali 18,8 g prečiščene vode. Dodali smo magnet primerne velikosti in erlenmajerico postavili na magnetno mešalo. Na plastičen čolniček smo natehtali 0,6 g PEO in ustrezno količino poloksamerov 188 in 407. Točna sestava raztopin je predstavljena v preglednici II. Zmes prahov smo med mešanjem kvantitativno prenesli v erlenmajerico s prečiščeno vodo in raztopino pustili pokrito mešati na magnetnem mešalu s hitrostjo 220 obratov/min 24 h. S tem smo zagotovili, da so se polimeri popolnoma raztopili v vodi.

Preglednica II: Sestava vodnih raztopin polimerov.

Masno razmerje poloksamer 188 : poloksamer 407	Masa PEO	Masa poloksamera 188	Masa poloksamera 407	Masa prečiščene vode
188*	0,60 g	0,60 g	/	18,80 g
3 : 2	0,60 g	0,36 g	0,24 g	18,80 g
4 : 1	0,60 g	0,48 g	0,12 g	18,80 g
1 : 1	0,60 g	0,30 g	0,30 g	18,80 g
407*	0,60 g	/	0,60 g	18,80 g
2 : 3	0,60 g	0,24 g	0,36 g	18,80 g
1 : 4	0,60 g	0,12 g	0,48 g	18,80 g

* – le poloksamer 188 oz. le poloksamer 407

3.3.2 Priprava suspenzij karvedilola v raztopini polimerov

Predhodno pripravljenim raztopinam polimerov, katerih sestava je podana v preglednici II, smo dodali 0,3 g karvedilola (preglednica III) in jih pokrite mešali na magnetnem mešalu s hitrostjo 220 obratov/min nadaljnjih 24 h pri sobni temperaturi. Tako smo pripravili suspenzije karvedilola v raztopini polimerov.

Preglednica III: Sestava suspenzij karvedilola v vodnih raztopinah polimerov.

Oznaka suspenzije	Masno razmerje poloksamer 188 : poloksamer 407	Masa PEO	Masa poloksamera 188	Masa poloksamera 407	Masa prečiščene vode	Masa karvedilola
S 188	/	0,60 g	0,60 g	/	18,80 g	0,30 g
S 3 : 2	3 : 2	0,60 g	0,36 g	0,24 g	18,80 g	0,30 g
S 4 : 1	4 : 1	0,60 g	0,48 g	0,12 g	18,80 g	0,30 g
S 1 : 1	1 : 1	0,60 g	0,30 g	0,30 g	18,80 g	0,30 g
S 407	/	0,60 g	/	0,60 g	18,80 g	0,30 g
S 2 : 3	2 : 3	0,60 g	0,24 g	0,36 g	18,80 g	0,30 g
S 1 : 4	1 : 4	0,60 g	0,12 g	0,48 g	18,80 g	0,30 g

3.3.3 Priprava nanosuspenzij karvedilola v raztopinah polimerov

V stekleno vialo s plastičnim pokrovom smo natehtali 0,3 g karvedilola. S pipeto smo dodali 6 mL acetona in magnet ter na magnetnem mešalu mešali, dokler se učinkovina ni popolnoma raztopila. Z injekcijsko brizgo z iglo smo iz vial v brizgo posesali vso raztopino učinkovine. Sledil je proces nanoprecipitacije, in sicer smo predhodno pripravljenim raztopinam polimerov (preglednica II) povečali hitrost mešanja z magnetnim mešalom na 500 obratov/min in v vsako raztopino po kapljicah injicirali raztopino karvedilola v acetonu. Ko smo injicirali vso raztopino, smo pustili vsebino erlenmajerice na magnetnem mešalu mešati še 5 min. Sestava pripravljenih nanosuspenzij, ki je bila enaka sestavi suspenzij karvedilola, le da je bil prisoten tudi aceton, in njihove oznake so predstavljene v preglednici IV. Priprava nanosuspenzij je potekala tik pred izvedbo elektrostatskega sukanja.

Preglednica IV: Sestava nanosuspenzij karvedilola.

Oznaka	Masno razmerje poloksamer 188 : poloksamer 407	Masa PEO	Masa poloksamera 188	Masa poloksamera 407	Masa prečiščene vode	Volumen acetona	Masa karvedilola
NS 188	/	0,60 g	0,60 g	/	18,80 g	6 mL	0,30 g
NS 3 : 2	3 : 2	0,60 g	0,36 g	0,24 g	18,80 g	6 mL	0,30 g
NS 4 : 1	4 : 1	0,60 g	0,48 g	0,12 g	18,80 g	6 mL	0,30 g
NS 1 : 1	1 : 1	0,60 g	0,30 g	0,30 g	18,80 g	6 mL	0,30 g
NS 407	/	0,60 g	/	0,60 g	18,80 g	6 mL	0,30 g
NS 2 : 3	2 : 3	0,60 g	0,24 g	0,36 g	18,80 g	6 mL	0,30 g
NS 1 : 4	1 : 4	0,60 g	0,12 g	0,48 g	18,80 g	6 mL	0,30 g

3.3.4 Izdelava polimernih filmov iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola

Za izdelavo polimernih filmov iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola smo uporabili plastično petrijevko in aluminijasto folijo. Petrijevko smo ovili s folijo in jo postavili na tehtnico. Vanjo smo natehtali 10 g predhodno pripravljene suspenzije ali nanosuspenzije karvedilola. Petrijevko smo postavili na ravno površino in pustili vzorec najmanj 48 h na sobni temperaturi, da se je film popolnoma posušil. Pri pripravi filmov iz suspenzij smo disperzijo pred pripravo filma postavili za 10 min na ultrazvočno kadičko, da so se morebitni agregati učinkovine razbili, in s tem smo zagotovili večjo homogenost suspenzije.

3.3.5 Priprava polimernih nanovlaken iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola z metodo elektrostatskega sukanja

Za pripravo polimernih nanovlaken smo uporabili metodo elektrostatskega sukanja. Za zagotavljanje ustreznih parametrov okolja smo metodo izvajali v izolirani komori. Ustrezno RH zraka (20–30 %) smo zagotovili z uporabo sušilnega sredstva silikagel, ustrezno kroženje zraka v komori pa z električnim ventilatorjem. Ugotovili smo, da je za izvedbo elektrostatskega sukanja pomembna postavitev posodic s sušilnim sredstvom v komori, saj lahko predvsem pri pripravi nanovlaken iz nanosuspenzije le-te motijo električno polje v komori. Zaradi tega smo jih postavili tako, da na območju med zbiralom in iglo ni bilo postavljene nobene posodice. Proces elektrostatskega sukanja smo izvajali pri sobni temperaturi. Napetost je bila 15.000 V. Kot zbiralo smo uporabili plastično stojalo, prekrito z aluminijasto folijo. Razdalja od konice igle do zbirala je bila 15 cm. Kovinska igla je imela notranji premer 0,8 mm. S črpalko smo zagotovili konstanten pretok vzorca, in sicer 2,0 mL/h. Pri izdelavi nanovlaken iz nanosuspenzij učinkovine smo morali uporabiti injekcijske brizge, odporne na aceton. Vzorce smo v primeru suspenzij elektrostatsko sukali 2,5 h, pri nanosuspenzijah pa 3 h.

3.3.6 Priprava vzorcev polimernih nanovlaken in filmov za test sproščanja

Priprava vzorcev za test sproščanja se je razlikovala med vzorci nanovlaken in filmov. Pri obeh vrstah smo vzorce za test sproščanja jemali iz sredine oz. mesta, kjer je bil nanos najdebelejši (slika 5).

Pri nanovlaknih, pripravljenih iz suspenzij in nanosuspenzij, smo s pomočjo skalpela izrezali del vzorca in ga ovili na stekleno palčko, ki je predstavljala nosilec za vzorec pri testu sproščanja. Masa vzorca na 8-cm palčki s premerom 0,5 cm je bila 30–35 mg.

Pri pripravi vzorcev iz filmov, pripravljenih iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola, smo s skalpelom izrezali trak vzorca in ga zavezali na stekleno palčko. Masa vzorca na palčki je bila 30–35 mg.



***Slika 5:** Vzorec filma, ki smo ga pripravili iz suspenzije karvedilola v polimerni raztopini, na aluminijasti foliji.*

3.3.7 Test sproščanja

3.3.7.1 Pogoji

Za test sproščanja smo uporabljali napravo z vesli (ang. *paddle apparatus*) (naprava II (45) s šestimi posodami in ročnim odvzemom vzorcev (slika 6)). Medij za sproščanje je bila prečiščena voda (volumen 900 mL). Zagotovljeni so bili sink pogoji. Temperatura medija je bila $37 \pm 0,5$ °C. Vesla so bila od spodnjega roba posode odmaknjena 65 mm. Po Evropski farmakopeji je definirana odmaknjenost vesel od dna posode 25 ± 2 mm (45). Vesla smo dvignili od dna, saj smo izvajali preskus z vzorci, ovitimi/zavezanimi na stekleno palčko. Hitrost vrtenja mešal je bila 50 ± 1 obratov/min.



Slika 6: Naprava za test sproščanja.

3.3.7.2 Odvzem vzorcev

Vzorčili smo v predhodno določenih časovnih točkah (10, 20, 30, 60, 90, 120, 165, 210, 270 in 330 min). Test smo izvajali v 3 paralelah, tako da smo naenkrat izvajali test na dveh različnih vzorcih. Čas smo merili s štoparico. Z namenom odvzema v optimalnem času smo vzorce pričeli jemati 20 s pred časom odvzema, in sicer 2 cm od stene posode, saj je ob steni možna adsorpcija učinkovine in bi lahko dobili lažno višje rezultate. Vzorce smo odvezemali s plastično brizgo, ki je imela na konici 10- μ m filter. Po odvzemu smo vzorec filtrirali skozi filter Satorius RC 0,45 μ m, in sicer tako, da smo prve 3 mL filtrata zavrgli, preostali del (7 mL) pa prefiltrirali v ustrezno označeno stekleno epruveto. Vzorec smo nato zatesnili s parafilmom, s čimer smo preprečili izhlapevanje. Odvzetih vzorcev nismo nadomeščali s svežim medijem, kar smo upoštevali pri izračunu količine sproščene učinkovine.

3.3.8 Spektrofotometrično določanje koncentracije karvedilola

Za kvantitativno določanje koncentracije sproščenega karvedilola smo uporabili UV-VIS-spektrofotometer. Absorbanco vzorcev smo merili pri valovni dolžini 241 nm. Pri tej valovni dolžini je absorpcijski vrh dobro definiran in gre za absorpcijski maksimum karvedilola. Na podlagi umeritvene premice (poglavje 3.3.8.1) smo določili koncentracijo karvedilola v vzorcih. Kot slepi vzorec smo pri spektrofotometričnem določanju karvedilola uporabili prečiščeno vodo.

3.3.8.1 Priprava umeritvene premice

Umeritveno premico smo pripravili v koncentracijskem območju 0,43–4,27 µg/mL karvedilola. Natehtali smo približno 8,55 mg karvedilola, ga kvantitativno prenesli v 1000-mL merilno bučko in dodali 20 mL metanola ter nekaj vode (približno 200 mL). Bučko smo postavili v UZ-kadičko za uro in pol. Nato smo bučko do oznake volumna dopolnili s prečiščeno vodo. Pripravili smo serijo redčitev osnovne raztopine (1/2, 1/4, 1/5, 1/10, 1/20) in spektrofotometrično izmerili absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 241 nm. Na podlagi rezultatov smo narisali umeritveno premico. Kot slepi vzorec smo pri meritvah uporabili prečiščeno vodo. Za meritve smo uporabili kiveto iz kvarčnega stekla z optično potjo 1 cm.

3.3.9 Določanje končne točke sproščanja (raztapljanja) karvedilola iz polimernih nanovlaken in filmov

Končno točko sproščanja karvedilola iz polimernih nanovlaken in filmov smo določili tako, da smo vzorec natehtali in ga kvantitativno prenesli v 250-mL merilno bučko. Masa vzorca je bila 8–10 mg (tako je bila koncentracija v bučki primerljiva koncentraciji karvedilola v mediju po končanem preskusu sproščanja). Dodali smo približno 100 mL prečiščene vode in vzorec za 10 min postavili v UZ-kadičko. Potem smo bučko do oznake dopolnili s prečiščeno vodo, ji dodali magnet ustrezne velikosti in jo postavili na magnetno mešalo, kjer se je vzorec mešal 144 h. Pri vsakem vzorcu smo naredili 3 paralele. Vzorčili smo po 48, 72 in 144 h. Pred merjenjem absorbance pri 241 nm smo vzorce dobro premešali, prefiltrirali najprej skozi 10-µm filter in nato skozi filter z velikostjo por 0,45 µm (tj. enako kot pri testu sproščanja). Koncentracijo karvedilola v vzorcih smo določili na podlagi umeritvene premice (poglavje 3.3.8.1).

3.3.10 Določanje vsebnosti karvedilola v polimernih nanovlaknih in filmih

Postopek priprave in odvzema vzorcev je bil enak kot pri določanju končne točke sproščanja karvedilola, le da smo vzorec odvzeli po 144 h (ugotovljena končna točka sproščanja karvedilola). Tudi tukaj smo poskus izvedli v 3 paralelah in koncentracijo učinkovine v vzorcih določili spektrofotometrično pri valovni dolžini 241 nm.

3.3.11 Analiza velikosti delcev karvedilola s fotonsko korelacijsko spektroskopijo

Metodo fotonske korelacijske spektroskopije (Zetasizer Nano ZS) smo uporabili za merjenje hidrodinamske velikosti delcev karvedilola po dispergiranju vzorcev nanovlaken

in filmov v mediju. Meritve smo izvajali pri temperaturi 25 °C in kotu merjenja sipane svetlobe 173°. Minimalni volumen vzorca za meritev je bil 150 µL. Velikost delcev smo preverjali le pri vzorcih nanovlaken in filmov, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzij karvedilola. Del vzorca (približno 3 mg) smo dispergirali v 3 mL nasičene vodne raztopine karvedilola. Za ta medij smo se odločili, da se delci učinkovine med dispergiranjem ne bi raztapljali.

Nasičeno raztopino karvedilola smo pripravili tako, da smo v 250-mL merilno bučko prenesli količino omenjene učinkovine, ki je presegala njegovo topnost v vodi, in bučko do oznake dopolnili s prečiščeno vodo. Suspenzijo karvedilola smo 24 h mešali na magnetnem mešalu. Pred uporabo smo suspenzijo centrifugirali (4000 obratov/min, 5 min), da smo neraztopljen karvedilol ločili od nasičene raztopine. Nato smo z injekcijsko brizgo z nameščeno iglo pazljivo, da smo se izognili oborini, odvzeli nasičeno raztopino karvedilola in jo prefiltrirali skozi 0,2-µm filter.

Vzorec polimernih nanovlaken ali filma smo dispergirali v nasičeni raztopini karvedilola in takoj izmerili povprečno velikost delcev v vzorcu. Po končani meritvi smo vzorec prefiltrirali skozi filter z velikostjo por 0,8 µm in ponovno izmerili povprečno velikost delcev. Pred meritvijo smo kiveto spirali s pripravljenim vzorcem. Pri polnjenju le-te smo pazili, da ni bilo prisotnih mehurčkov, ki bi lahko motili meritev in bi bili vzrok lažnih rezultatov. Prav tako smo kiveto, preden smo jo dali v napravo, dobro obrisali s papirjem in tako preprečili napake pri meritvi. Opravili smo po 3 meritve za vsak vzorec in programska oprema je podala povprečne rezultate.

3.3.12 Priprava vzorcev za SEM-analizo

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali morfologijo polimernih filmov in nanovlaken. Iz vsakega vzorca smo s škarjami izrezali majhen kvadratega, ga ločili od aluminijaste folije in ga s pinceto pritrdili na obojestranski prevodni lepilni trak, ki je bil z eno stranjo pritrjen na nosilec za SEM-analizo. Vzorce smo analizirali pri pospeševalni napetosti 1 kV z uporabo detektorja za sekundarne elektrone. Z računalniškim programom ImageJ 1.44p smo analizirali posnete slike. Naključno smo izbrali 30 nanovlaken in jim določili povprečni premer. S pomočjo programa smo izmerili tudi velikosti delcev učinkovine v vzorcih.

3.3.13 Priprava fizikalnih zmesi karvedilola s polimeri

Fizikalne zmesi karvedilola s PEO in poloksameri smo pripravili tako, da smo v majhno pateno po pravilu rastočih mas natehtali vse praškaste sestavine, ki smo jih uporabili pri pripravi vzorcev nanovlaken oz. filmov, in zmesi homogenizirali. Kvantitativna sestava prašnih komponent v fizikalnih zmesih je bila enaka sestavi nanovlaken in filmov. Pripravili smo le fizikalni zmesi karvedilola, PEO in poloksamera 188 ter karvedilola, PEO in poloksamera 407.

Izvedba testa sproščanja karvedilola iz pripravljenih fizikalnih zmesi se je glede na ostale vzorce (poglavje 3.3.7) razlikovala v tem, da smo fizikalno zmes natehtali v stekleni čolnicek, z njim smo zagotovili kvantitativnen prenos vzorcev v napravo za spremljanje sproščanja.

3.3.14 Določanje homogenosti porazdelitve učinkovine v filmih

Homogenost porazdelitve učinkovine v filmih smo preverili tako, da smo filma iz suspenzij karvedilola vlili v raztopini polimerov z oznako S 3 : 2 in S 2 : 3 (preglednica III). Iz posameznega filma smo izrezali 5 vzorcev na različnih mestih filma. Masa posameznega vzorca je bila 8–10 mg. Kvantitativno smo jih prenesli v 250-mL bučko, dolili približno 100 mL vode in postavili v UZ-kadičko za 10 min. Nato smo dopolnili bučko do oznake s prečiščeno vodo in vanjo dodali magnetno mešalo primerne velikosti. Bučke smo pokrite postavili na magnetno mešalo, kjer smo raztopine 144 h mešale s hitrostjo 220 obratov/min. Po tem času (končna točka sproščanja karvedilola, poglavje 3.3.9) smo bučke pretresli, vzorce prefiltrirali najprej skozi 10- μ m filter in nato skozi filter z velikostjo por 0,45 μ m ter pomerili vzorce z UV-VIS-spektrofotometrom. Glede na meritve smo določili vsebnost karvedilola v posameznem vzorcu in povprečno vsebnost karvedilola v petih vzorcih, odvzetih z različnih mest na posameznem filmu.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Nanovlakna predstavljajo sodoben nanodostavni sistem za zdravilne učinkovine. S spreminjanjem sestave in načina priprave suspenzij težko topne učinkovine karvedilola v polimerni raztopini PEO in poloksamerov smo spremljali, kako spremembe vplivajo na končni produkt elektrostatskega sukanja. Za primerjavo z nanovlakni smo pripravili polimerne filme z enako kvali- in kvantitativno sestavo.

4.1 PRIPRAVA RAZTOPIN POLIMEROV

Raziskovalno delo smo pričeli s pripravo polimernih raztopin. Vse raztopine so vsebovale enako količino PEO. Masni delež tega polimera v vodni raztopini je bil 3 % (m/m), kar pomeni, da količina PEO ni dosegla koncentracije (tj. 4–10 % (m/m)), ki bi zagotovila ustrezno viskoznost raztopine in z elektrostatskim sukanjem omogočila nastanek nanovlaken iz takšne raztopine (11). Ustrezno viskoznost raztopine smo dosegli z dodatkom poloksamerov 407 in 188, ki imata veliko molekulsko maso in tako povečata viskoznost raztopine za izdelavo nanovlaken. Spreminjali smo količine dodanih poloksamerov, da so se vzorci pripravljenih polimernih raztopin (preglednica II) razlikovali v masnem deležu le-teh.

4.2 PRIPRAVA SUSPENZIJ KARVEDILOLA V RAZTOPINI POLIMEROV

Pri pripravi suspenzij karvedilola v raztopinah polimerov smo se v praksi soočili z veliko adhezijo karvedilola na steklen, kovinski in gumijast material, zato smo omejili stik te učinkovine z različnimi površinami in priborom pri pripravi vzorcev, kolikor je bilo to možno (npr. karvedilol smo pri pripravi nanosuspenzij neposredno natehtali v stekleno vialo, ki smo jo kasneje uporabili za pripravo nanosuspenzij). S tem smo zmanjšali izgube karvedilola med pripravo vzorcev in napake pri kasnejši obravnavi vzorcev. Delež karvedilola v suspenziji je bil 1,48 % (m/m). Vzorci suspenzij so bili mlečno bele barve.

4.3 PRIPRAVA NANOSUSPENZIJ KARVEDILOLA V RAZTOPINI POLIMEROV

Pri pripravi vzorcev smo uporabili metodo izdelave nanosuspenzij. Bili smo pazljivi, da smo karvedilol popolnoma raztopili v acetonu. To smo dosegli z mešanjem raztopine na magnetnem mešalu pri visoki hitrosti. Ugotovili smo, da igra pri procesu priprave nanosuspenzij pomembno vlogo velikost magnetnega mešala; le-to mora biti dovolj veliko, saj v nasprotnem primeru nanosuspenzija ne nastane. Poudariti je treba, da z nobeno metodo nismo preverili, ali je nanosuspenzija dejansko nastala (kljub temu smo v obravnavi rezultatov uporabili izraz nanosuspenzija, saj smo vzorce pripravili z metodo izdelave nanosuspenzij). Njihov nastanek smo ocenili na podlagi izgleda vzorca. Le-ta je bil opalescenten v nasprotju s suspenzijo, ki je bila mlečno bela. Ugotovili smo, da moramo raztopino karvedilola v acetonu počasi injicirati v vodno raztopino polimerov, saj so se v nasprotnem primeru oborili preveliki delci učinkovine, ki so se med procesom elektrostatskega sukanja posedli v brizgi in zamašili iglo.

4.4 PRIPRAVA NANOVLAKEN S PROCESOM ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA

Takoj po pripravi suspenzij/nanosuspenzij smo pričeli s pripravo nanovlaken. Vzorce suspenzij smo pred elektrostatskim sukanjem postavili v UZ-kadičko. S tem smo poskusili razbiti morebitne agregate učinkovine v suspenziji. Elektrostatsko sukanje smo izvajali v komori s konstantno relativno vlago, pri konstantni napetosti in konstantnem pretoku skozi iglo. Pri vseh pripravljenih vzorcih, ki smo jih kasneje uporabili za nadaljnje preučevanje, je bil curek med procesom elektrostatskega sukanja neprekinjen. Konstantno relativno vlažnost zraka v komori, ki bistveno vpliva na proces elektrostatskega sukanja in na lastnosti produkta, smo zagotovili z uporabo suhega silikagela. Pri elektrostatskem sukanju so se, kljub enakim parametrom procesa, nanovlakna iz suspenzij nabrala na zbiralu v obliki kroga, pri vzorcih nanosuspenzije pa na večji površini nepravilne oblike. Vzrok je bil verjetno v različni sestavi obeh vzorcev oz. prisotnosti acetona v nanosuspenziji. Ker je bil nanos produkta na zbiralu pri elektrostatskem sukanju nanosuspenzij posledično tanjši, smo pri pripravi nanovlaken iz nanosuspenzij podaljšali čas elektrostatskega sukanja v

primerjavi s časom pri pripravi vzorcev suspenzij. Tako smo zagotovili, da se je na zbiralu nabral dovolj debel sloj produkta elektrostatskega sukanja.

4.5 TEST SPROŠČANJA UČINKOVINE

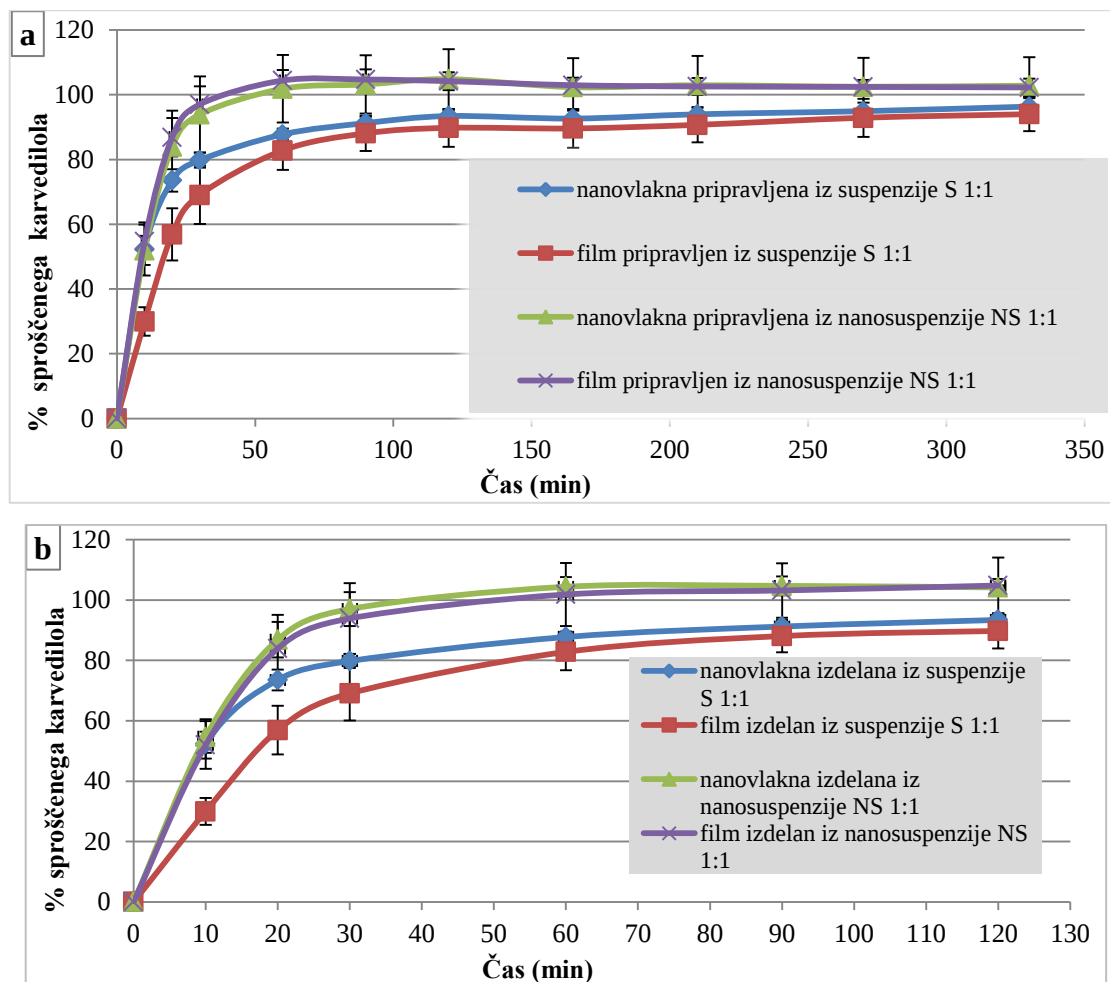
Test sproščanja karvedilola smo najprej izvedli za vzorce, ki smo jih pripravili iz suspenzij karvedilola, kasneje za vzorce iz nanosuspenzij in nazadnje še za fizikalni zmesi karvedilola s polimeri (poglavje 3.3.13). Pri vzorcih nanovlaken in filmov smo izvedli test za vsa masna razmerja poloksamerov. Pri fizikalni zmesi smo izvedli test sproščanja karvedilola le za oba vzorca, kjer je bil prisoten samo en poloksamer, da bi ovrednotili vpliv posameznega proučevanega poloksamera na sproščanje učinkovine. Pri tistih vzorcih, katerih profili sproščanja so zelo odstopali glede na rezultate sproščanja karvedilola iz ostalih vzorcev iste vrste, smo test sproščanja ponovili. Pri teh vzorcih smo za rezultate sproščanja upoštevali povprečno vrednost prvotnih in ponovljenih rezultatov testa. To smo naredili pri naslednjih vzorcih: nanovlakna, pripravljena iz suspenzije S 3 : 2 (preglednica III), nanovlakna, pripravljena iz nanosuspenzije NS 2 : 3, ter filma iz nanosuspenzije NS 188 in NS 1 : 4 (preglednica IV). Ponovno smo pripravili in testirali tudi vzorce, kjer je pri rezultatih predhodno prišlo do velikih odstopanj med tremi paralelami istega vzorca. V tem primeru smo kot rezultat upoštevali rezultate vzorca z manjšim odstopanjem znotraj paralel.

4.5.1 Priprava vzorcev za test sproščanja

Pri pripravi vzorcev za test sproščanja smo uporabili stekleno paličico, ki je služila kot nosilec vzorca. Pripravljena nanovlakna smo previdno navili nanjo. To je bilo izvedljivo zaradi izredne adhezivnosti nanovlaken, ki je posledica velikosti njihove površine in porozne zgradbe. Pri nanovlaknih, pripravljenih iz nanosuspenzij, smo za pripravo vzorca potrebovali večjo površino nanovlaken na aluminijasti foliji, saj je bil sloj le-teh kljub daljšemu času procesa priprave zelo tanek. Pri vzorcih filmov smo izrezali trak in ga zavezali na stekleno palčko, saj ovijanje zaradi premajhne adhezivnosti filma ni bilo mogoče. S tem smo onemogočili plavanje vzorcev na površini medija in njihovo ovijanje okoli vesla naprave.

4.5.2 Sproščanje karvedilola iz nanovlaken in filmov

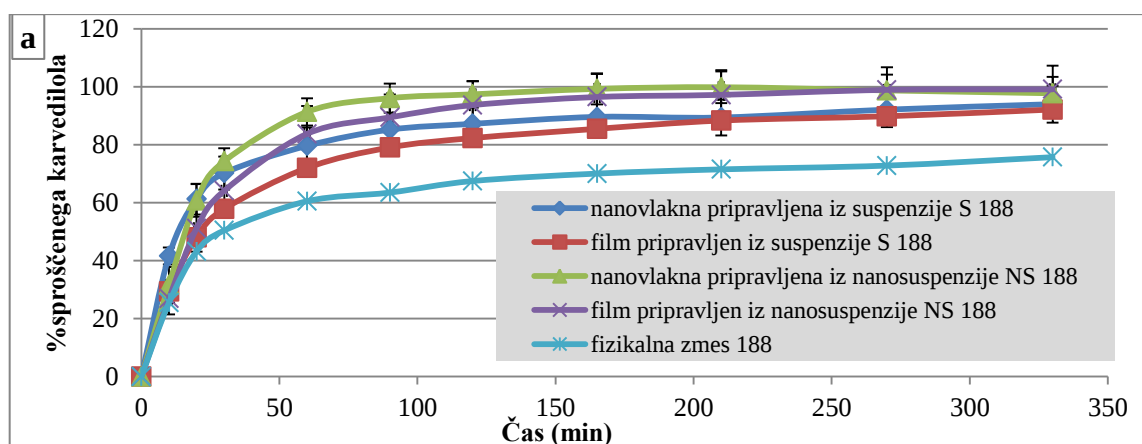
Zanimalo nas je, kako način priprave vzorca vpliva na sproščanje karvedilola iz nanovlaken in filmov. Rezultati testa sproščanja so prikazani v grafični obliki, in sicer kot profili sproščanja učinkovine. Pri tem smo predpostavili, da se je po 24 h sprostila vsa učinkovina.

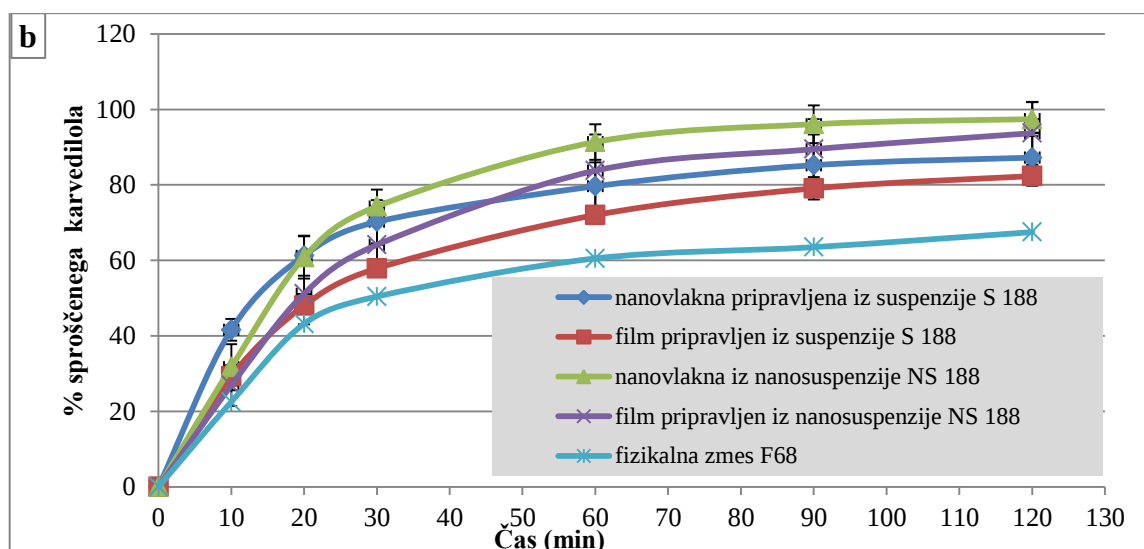


Slika 7: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 1 : 1: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev $\pm$ SD.

Med vzorci z masnim razmerjem poloksamerov 1 : 1 je bilo sproščanje najpočasnejše v primeru filma, ki smo ga izdelali iz suspenzije učinkovine (slika 7). V prvih 10 min se je sprostilo le 30 % učinkovine, v 60 min 83 % in po 330 min 94 % karvedilola. V časovnem intervalu od 0 do 10 min (slika 7 b) se profili sproščanja karvedilola iz obeh vzorcev nanovlaken in filma, pripravljenega iz nanosuspenzije, bistveno niso razlikovali. Razlike so se pokazale po 10 min od začetka testa sproščanja. Tako se je iz nanovlaken,

pripravljenih iz suspenzije, v prvih 10 min sprostito kar 52 % učinkovine, v 60 min 88 % in po 330 min 96 % karvedilola. Pri tem vzorcu smo ugotovili hitro začetno raztapljanje učinkovine. Med seboj zelo podobna profila sproščanja sta imela oba vzorca, pripravljena iz nanosuspenzije. Največja hitrost raztapljanja je bila pri nanovlaknih, izdelanih iz nanosuspenzije, kjer se je v 10 min sprostito 55 % karvedilola, v 40 min pa se je sprostila vsa učinkovina. Iz filma, pripravljenega iz nanosuspenzije, se je v prvih 10 min sprostito 52 % učinkovine, v 50 min pa se je sprostil ves karvedilol. Karvedilol v filmu je torej potreboval nekoliko daljši čas, da se je popolnoma raztopil v mediju, v primerjavi s tistim v nanovlaknih. To je lahko posledica povečanja hitrosti raztapljanja karvedilola zaradi velike površine nanovlaken v primerjavi s filmom in možnosti, da pri elektrostatskem sukanju tisti del karvedilola, ki je raztopljen v polimerni raztopini, ne kristalizira, kar pomeni, da je prisoten v amorfni obliki, ki ima višjo notranjo energijo in se hitreje raztaplja. Sproščanje karvedilola nad 100 % po 60 min pri obeh vzorcih, pripravljenih iz nanosuspenzije, je posledica tega, da smo podali rezultate glede na meritev koncentracije pri zadnjem odvzemu vzorcu, pri čemer je med testom sproščanja najverjetneje prišlo do prenasičenja raztopine, kar smo potrdili s prisotnostjo bele oborine na dnu posode, v kateri smo izvajali test. Zaradi tega je bila izmerjena koncentracija karvedilola nižja. Glede na rezultate lahko sklepamo, da smo z izdelavo nanovlaken iz suspenzije v primerjavi s filmom, pripravljenim iz suspenzije, pospešili sproščanje učinkovine, kar je v skladu s teorijo. S pripravo nanosuspenzije in z zmanjšanjem delcev karvedilola smo pospešili sproščanje karvedilola v primerjavi z obema oblikama iz suspenzije, kar je v skladu z zaključki iz literature (27).



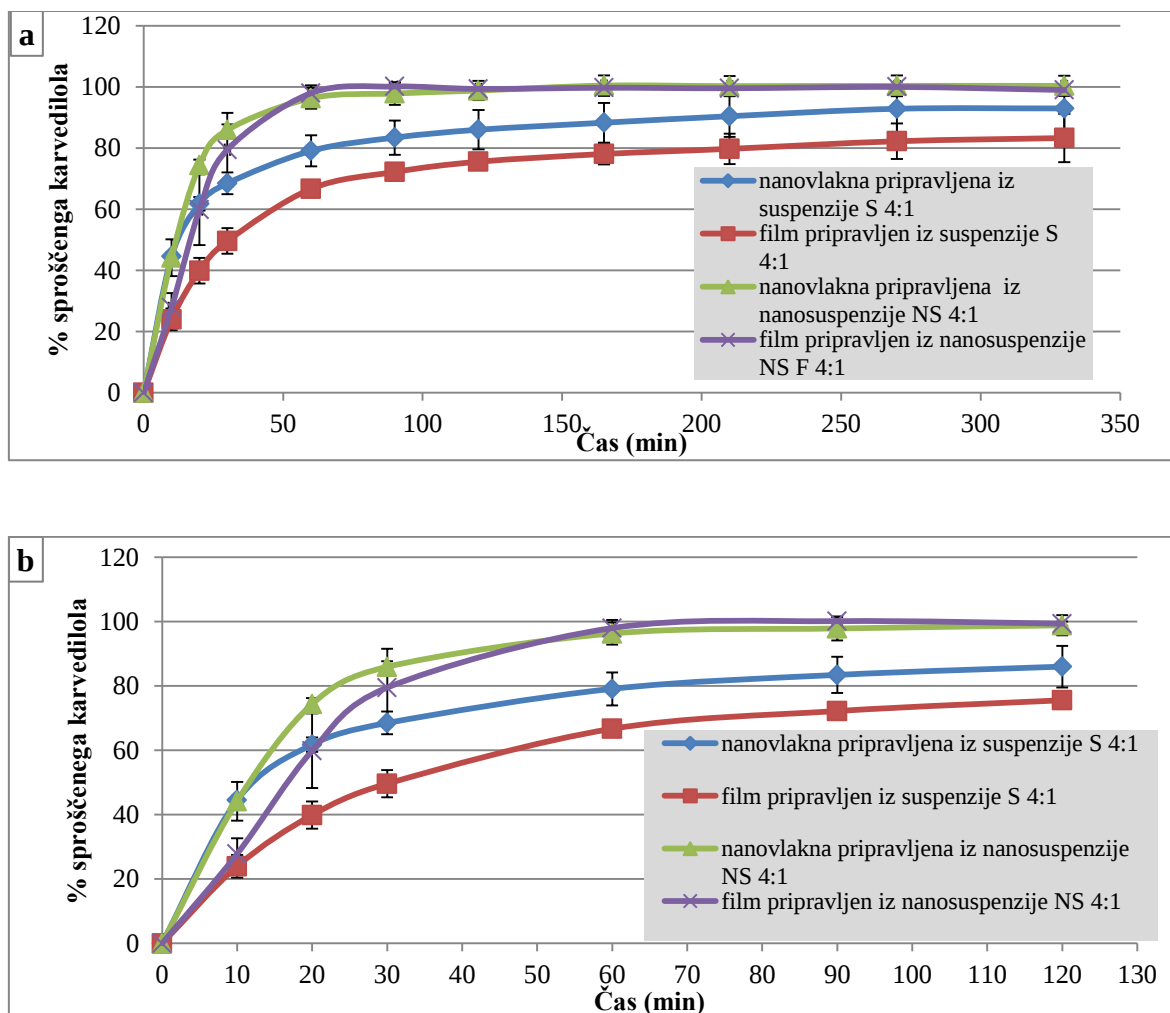


Slika 8: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov PEO/le s poloksamerom 188: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev $\pm$ SD.

Pri vzorcih nanovlaken in filmov, kjer je bil prisoten le poloksamer 188 (slika 8), je bilo sproščanje karvedilola v prvih 10 min najhitrejše iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije. V tem času se je iz njih sprostil 42 % učinkovine, v 60 min 80 % in v 330 min 94 %. Iz filma, pripravljenega iz suspenzije, je bilo raztapljanje najpočasnejše; v prvih 10 min se je raztopilo le 29 %, v 60 min 72 % in v 330 min 92 % karvedilola. Raztapljanje učinkovine iz nanovlaken iz suspenzije je bilo torej hitrejše kot iz filma, ki smo ga pripravili iz suspenzije. Pri nanovlaknih, pripravljenih iz nanosuspenzije, se je v prvih 10 min sprostil 31 %, v 60 min 91 % in v 330 min 98 % karvedilola. Pri filmu iz nanosuspenzije se je v prvih 10 min sprostil 26 %, torej manj kot v istem času iz nanovlaken enake sestave, v 60 min 84 % in v 330 min 99 % karvedilola. Odstotek sproščene učinkovine iz obeh oblik, ki sta bili pripravljene iz suspenzije, je bil nižji kot pri vzorcih, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzije (slika 8 a). Rezultati dokazujejo, da smo s pripravo nanosuspenzije pospešili raztapljanje karvedilola v primerjavi z vzorci, pripravljenimi iz suspenzije.

Izvedli smo tudi test sproščanja karvedilola iz fizikalnih zmesi s PEO in poloksameri v enakem masnem razmerju kot v nanovlaknih in filmih. V prvih 10 min se je iz fizikalne zmesi sprostil le 23 % karvedilola, v 60 min 61 % in v 330 min 68 %. Rezultati kažejo, da smo že z izdelavo filma izboljšali raztapljanje karvedilola v primerjavi s fizikalno zmesjo. Počasnejše raztapljanje karvedilola je posledica tega, da pri pripravi fizikalne zmesi ne

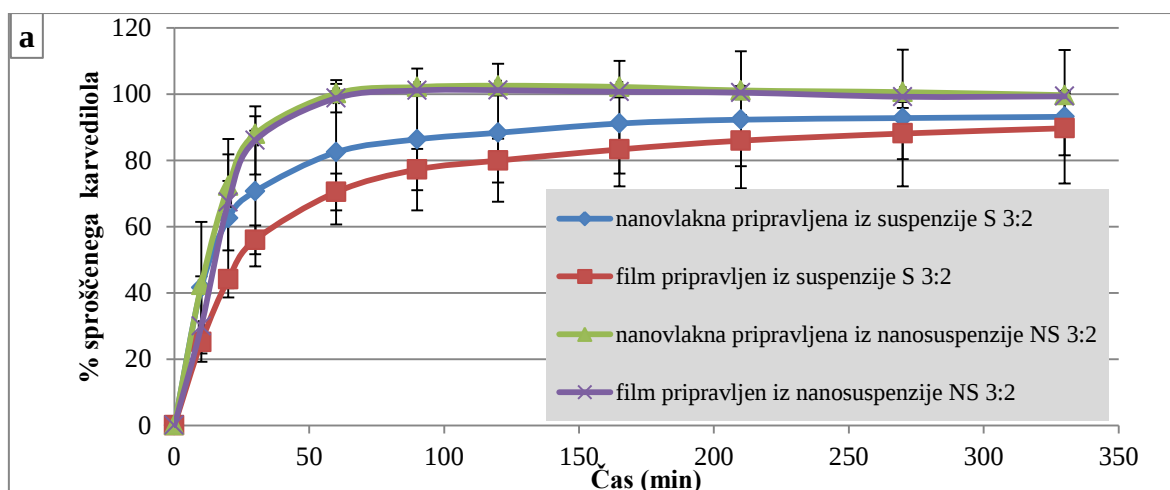
zmanjšamo velikosti delcev karvedilola, kot smo to storili pri pripravi nanosuspenzije, prav tako je učinek poloksamerov kot solubilizatorjev in močljivcev manjši, saj polimeri in učinkovina niso v neposrednem stiku kot pri filmu ali nanovlaknih.

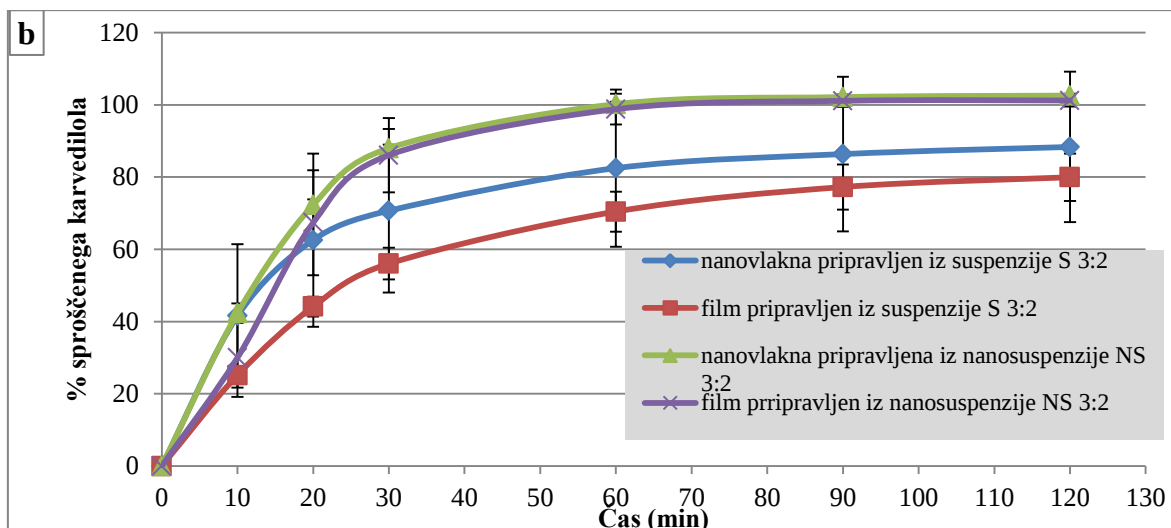


Slika 9: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 4 : 1: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.

V prvih 10 min se je iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije in nanosuspenzije karvedilola v raztopini polimerov (poloksamer 188 : poloksamer 407 = 4 : 1), sprostila podobna količina karvedilola (slika 9). Iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije, se je sprostilo 45 %, iz nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzije, pa 44 % karvedilola. V 60 min se je iz nanovlaken iz nanosuspenzije sprostilo 96 % učinkovine, iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije, pa samo 79 %. V 330 min se je iz nanovlaken, pripravljenih iz

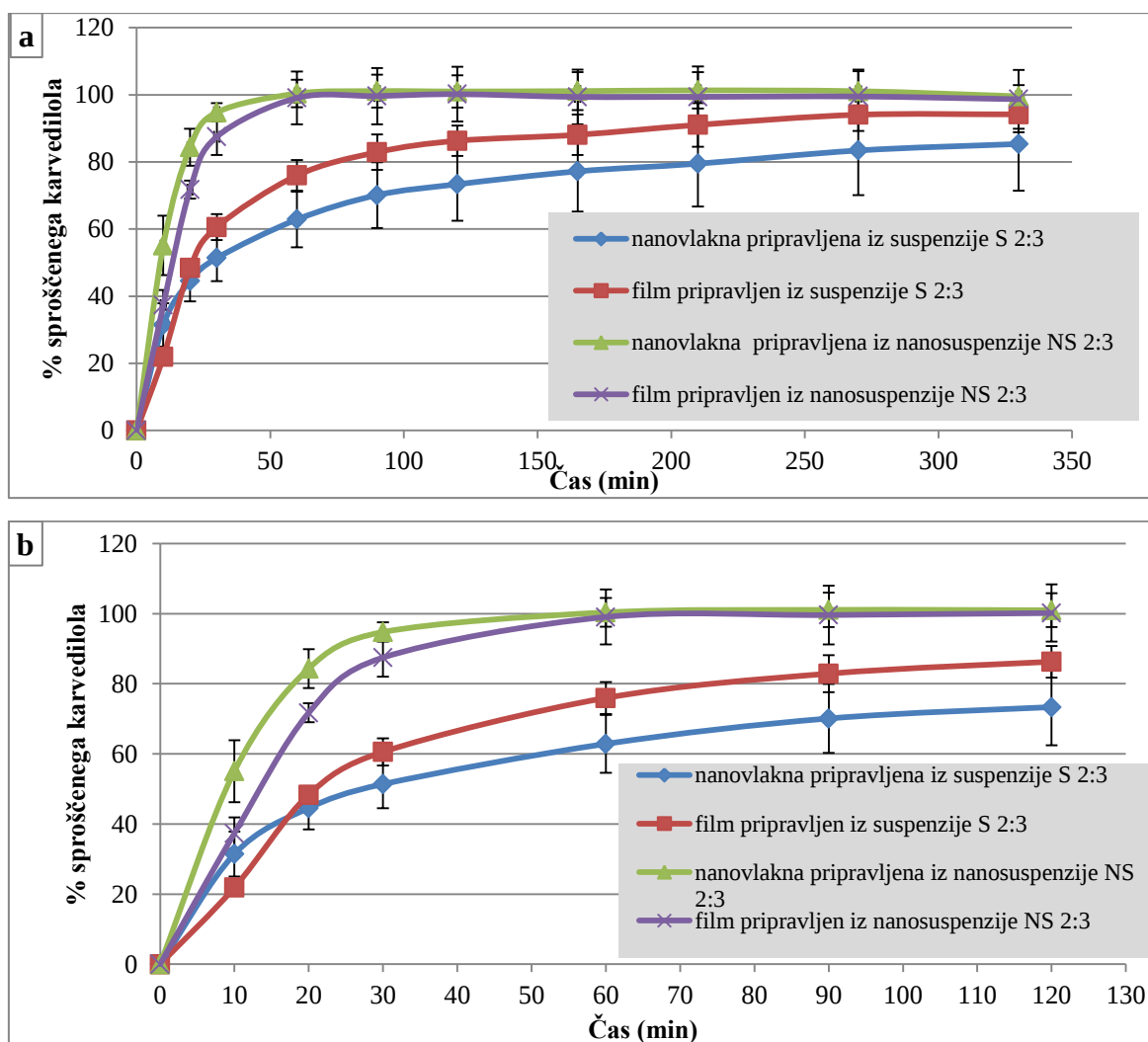
nanosuspenzije, sprostito 99 % karvedilola, iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije, pa 86 %. Rezultati kažejo, da smo z izdelavo nanovlaken iz nanosuspenzije karvedilola povečali hitrost raztapljanja učinkovine. Pri nanovlaknih, izdelanih iz suspenzije karvedilola, je bilo v prvih 10 min prisotno hitro sproščanje, nato pa se je hitrost sproščanja zmanjšala. Pri primerjavi profilov sproščanja učinkovine iz nanovlaken in filmov, pripravljenih iz suspenzije karvedilola, opazimo hitrejše sproščanje učinkovine iz nanovlaken. V prvih 10 min se je iz filmov sprostito le 24 %, v 60 min 67 % in v 330 min 76 % karvedilola, medtem ko se ga je iz nanovlaken v 10 min sprostito 45 %, v 60 min 79 % ter v 330 min 86 %. Profila sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov, ki smo jih pripravili iz suspenzije učinkovine, kažeta počasnejše sproščanje v primerjavi z vzorci, pripravljenimi iz nanosuspenzij (slika 9 a). Na podlagi primerjave sproščanja učinkovine iz nanovlaken in filmov iz nanosuspenzije, kjer se je v prvih 10 min iz filmov sprostito le 28 % karvedilola, lahko sklepamo, da smo z izdelavo nanovlaken povečali začetno hitrost sproščanja karvedilola, kar je lahko posledica velike površine nanovlaken, ki pospeši raztapljanje. V kasnejših časovnih točkah se sproščanje karvedilola iz nanovlaken in sproščanje iz filmov, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzije, nista razlikovala bistveno. V 60 min se je iz filma sprostito 98 %, v 330 min pa 99 % karvedilola.





Slika 10: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 3 : 2: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.

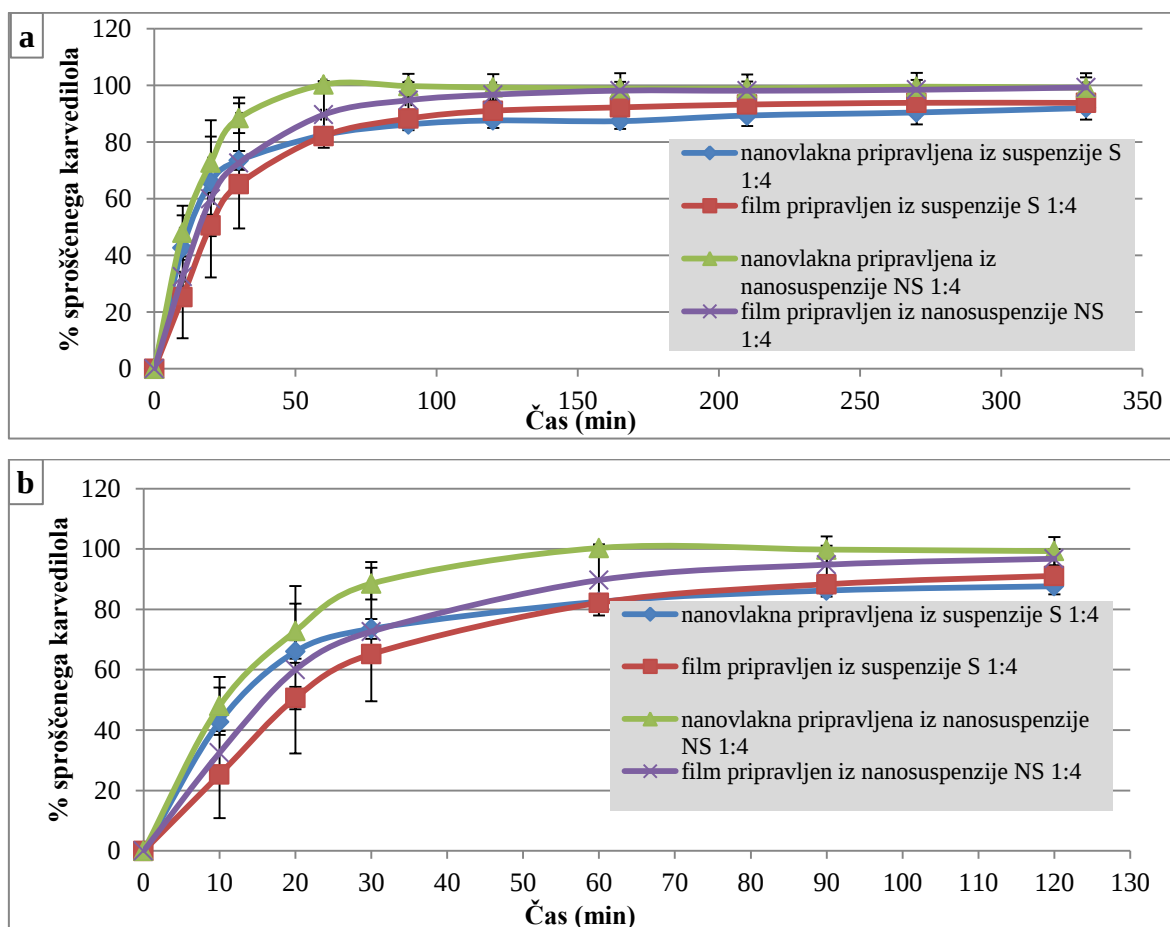
Iz nanovlaken, ki smo jih izdelali iz suspenzije S 3 : 2, se je v prvih 10 min sprostilo 42 %, v 60 min 83 % in v 330 min 93 % karvedilola. Iz filma, pripravljenega iz suspenzije karvedilola, je bilo sproščanje počasnejše (slika 10) – v prvih 10 min se je sprostilo 25 % učinkovine, v 60 min 71 % in v 330 min 90 %. Rezultati dokazujejo, da smo z izdelavo nanovlaken iz suspenzije karvedilola izboljšali raztapljanje učinkovine. Iz nanovlaken, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzije, se je v prvih 10 min sprostila približno enaka količina karvedilola kot pri nanovlaknih iz suspenzije, tj. 42 %, v 60 min pa se je sprostil ves karvedilol. Iz filma, ki smo ga izdelali iz nanosuspenzije, se je v prvih 10 min sprostilo 30 % in v 60 min 99 % učinkovine. Oba vzorca, ki smo ju pripravili iz nanosuspenzije, sta imela po prvih 20 min enak profil sproščanja. Delež sproščenega karvedilola je bil v končnih točkah večji pri vzorcih, pripravljenih iz nanosuspenzije, kot pri vzorcih iz suspenzije (slika 10 b).



Slika 11: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 2 : 3: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev $\pm$ SD.

Raztapljanje karvedilola je bilo najhitrejše iz nanovlaken, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzije NS 2 : 3 (slika 11) – v prvih 10 min se je sprostil 55 % učinkovine, v 60 min pa se je sprostila vsa učinkovina. Iz filma, ki smo ga izdelali iz iste nanosuspenzije, se je v prvih 10 min sprostil 37 % učinkovine, vsa pa se je sprostila v 120 min. V primerjavi s karvedilolom v filmu je karvedilol v nanovlaknih torej potreboval krajši čas, da se je popolnoma raztopil v prečiščeni vodi. Pri nanovlaknih, pripravljenih iz suspenzije S 2 : 3, se je v prvih 10 min sprostil 31 % učinkovine (manj kot pri obeh oblikah, pripravljenih iz nanosuspenzije), v 330 min pa se je sprostil le 85 % učinkovine. Film iz iste suspenzije karvedilola je v prvih 10 min sprostil najmanj učinkovine, tj. 22 %, v 60 min 76 % in v 330

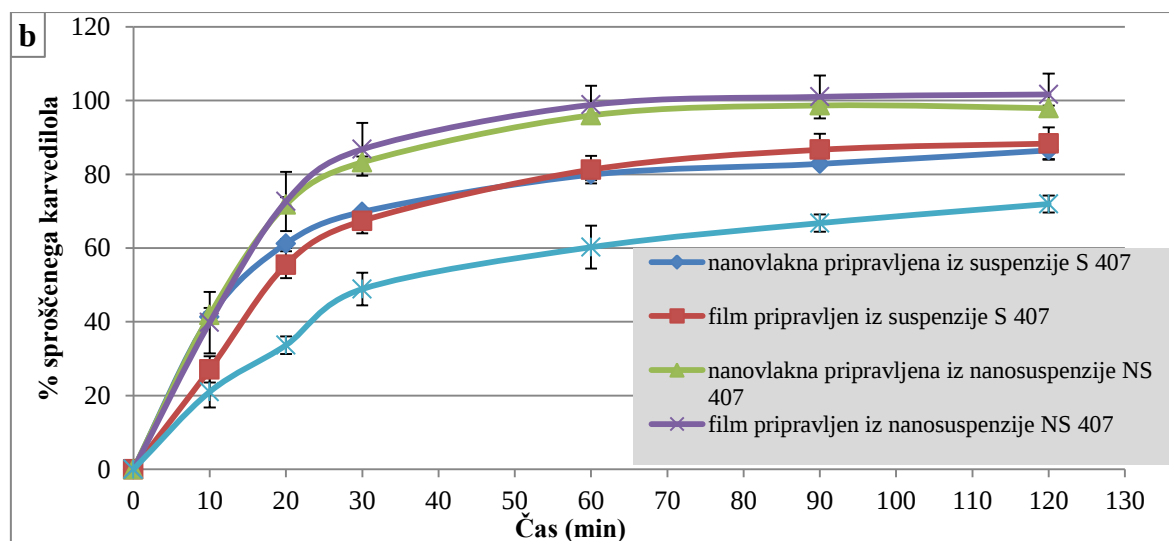
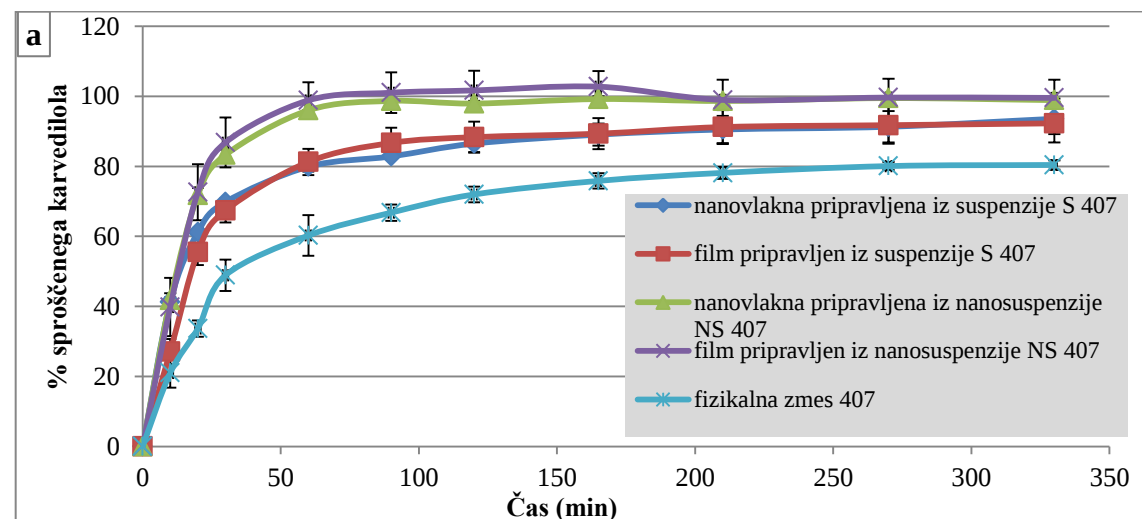
min 94 % učinkovine. Delež sproščene učinkovine po 330 min je bil pri oblikah, ki smo ju pripravili iz suspenzije, manjši kot pri oblikah iz nanosuspenzij (slika 11 a).



Slika 12: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z masnim razmerjem poloksamerov 188 : 407 1 : 4: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev $\pm$ SD.

Najhitrejšo sproščanje učinkovine med vzorci, kjer je bilo razmerje med poloksameroma 1 : 4 (poloksamer 188 : poloksamer 407), je bilo pri nanovlaknih, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzije (slika 12). V prvih 10 min se je sprostil 48 % karvedilola, v 60 min pa se je sprostil vsa učinkovina. Sproščanje učinkovine iz filma, pripravljenega iz nanosuspenzije, je bilo nekoliko počasnejše v prvih 10 min, in sicer se je sprostil 33 % učinkovine, v 60 min 89,7 % in v 330 min 97 % karvedilola. S pripravo nanovlaken smo povečali hitrost raztapljanja karvedilola v primerjavi s sproščanjem učinkovine iz filma. Največja hitrost raztapljanja v prvih 10 min je bila pri nanovlaknih, pripravljenih iz suspenzije. V prvih 10 min se je iz njih sprostil 43 % karvedilola, v 60 min 83 % in v 330

min 92 %. Najpočasnejše je bilo sproščanje učinkovine iz filma, pripravljenega iz suspenzije. Prvih 10 min je bilo sproščanje najpočasnejše, saj se je raztopilo le 25 % učinkovine, v 60 min se je sprostilo 82 % in v 330 min 94 % karvedilola. Obliki, pripravljeni iz suspenzije, sta imeli počasnejši profil sproščanja kot obliki iz nanosuspenzije (slika 12 a).



Slika 13: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov PEO/le s poloksamerom 407: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev $\pm$ SD.

V prvih 10 min sta imela vzorca nanovlaken in filma (slika 13), ki smo ju pripravili iz nanosuspenzije (le poloksamer 407), podobno hitrost sproščanja karvedilola. Pri nanovlaknih iz nanosuspenzije karvedilola se je v prvih 10 min sprostilo 42 %, v 60 min 96

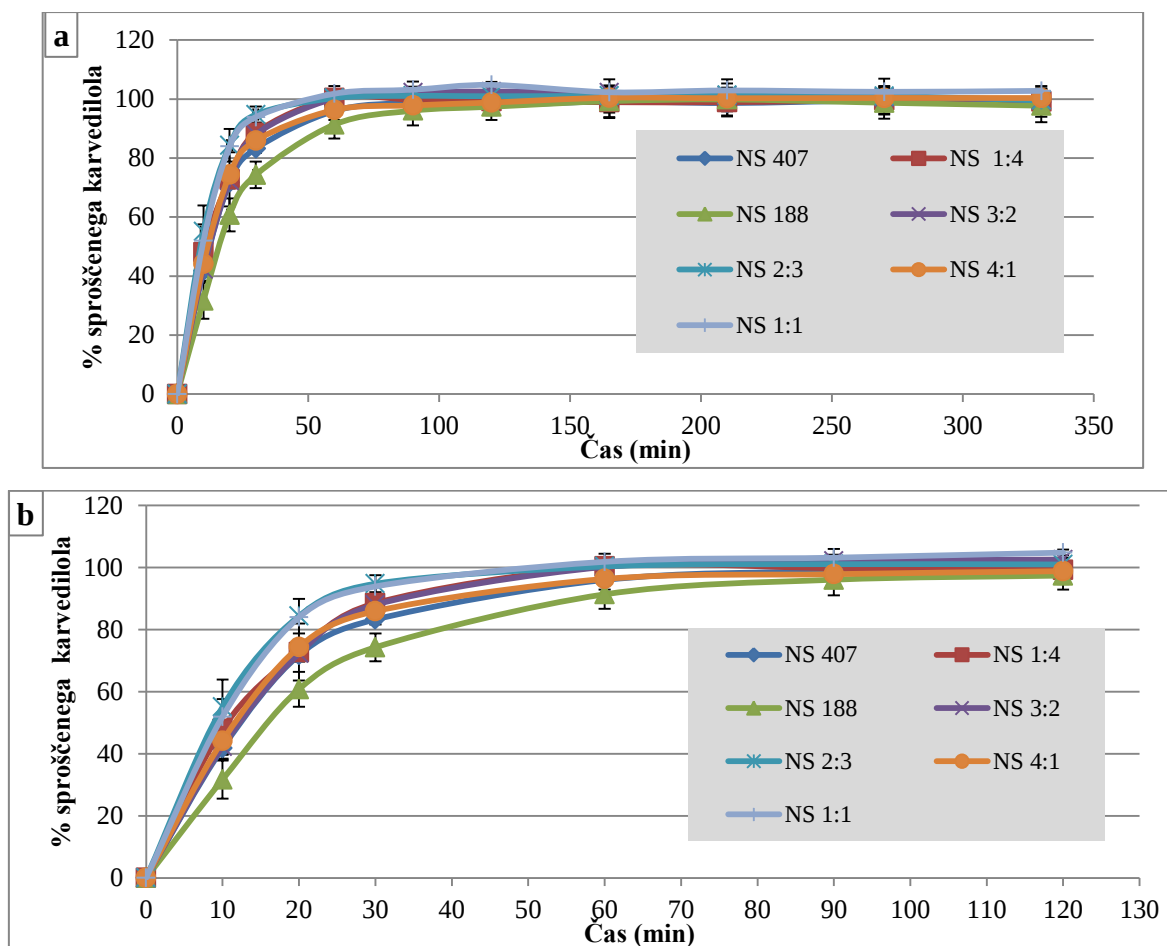
% in v 330 min 98 % karvedilola. Podobno hitrost sproščanja smo določili tudi pri filmu iz nanosuspenzije. V prvih 10 min se je raztopilo 40 %, v 60 min 99 % in po 330 min 101 % karvedilola. Vrednost nad 100 % je posledica tega, da smo podali rezultate glede na meritev koncentracije pri zadnjem odvzemu vzorca, kjer je prišlo do prenasíčenja raztopine (prisotna bela oborina na dnu posode, v kateri smo izvajali test), zato je bila izmerjena koncentracija karvedilola nižja. Hitrosti sproščanja karvedilola iz obeh oblik, pripravljenih iz nanosuspenzije, se nista bistveno razlikovali. Pri nanovlaknih, ki smo jih izdelali iz suspenzije, se je v prvih 10 min sprostilo 41 %, v 60 min 80 % in v 330 min 94 % karvedilola. Ta se je v začetku raztapljal počasneje iz filma, izdelanega iz suspenzije, in sicer se je v prvih 10 min raztopilo 27 %, v 60 min 81 % in v 330 min 93 % karvedilola. Pri vzorcih, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzije, smo dosegli večji delež sproščene učinkovine po 330 min (slika 13 b). Tako kot pri sestavi, kjer je bil prisoten le poloksamer 188, smo tudi za to razmerje polimerov pripravili fizikalno zmes, ki je imela najpočasnejši profil raztapljanja karvedilola, kar pomeni, da smo že z izdelavo filma pospešili raztapljanje učinkovine. V prvih 10 min se je iz fizikalne zmesi sprostilo 21 %, v 60 min 60 % in v 330 min 72 % karvedilola. Fizikalna zmes je imela najnižjo hitrost raztapljanja učinkovine, saj pri pripravi ni prišlo do zmanjšanja delcev, ni bilo učinka solubilizacije in izboljšanja močljivosti karvedilola, ker ni bilo neposrednega stika med poloksameri in učinkovino.

Pri skoraj vseh vzorcih, razen dveh izjem, je profil sproščanja karvedilola iz filma in nanovlaken, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzij, podoben. Izdelava nanovlaken s procesom elektrostatskega sukanja torej bistveno ne vpliva na sproščanje učinkovine. S pripravo nanovlaken smo povečali le začetno hitrost raztapljanja učinkovine. Z izdelavo nanovlaken iz suspenzij karvedilola se je pospešilo sproščanje karvedilola glede na filme enake sestave. Vzrok je velika površina nanovlaken in morebitna prisotnost amorfne oblike karvedilola, ki se v vodi hitreje raztopi kot kristalna učinkovina. Za potrditev prisotnosti amorfne oblike učinkovine bi bilo treba opraviti diferenčno dinamično kalorimetrijo, ki je zaradi obsega naloge nismo izvajali. Vzrok je lahko tudi izboljšano raztapljanje polimerov v obliki nanovlaken in s tem posledično hitrejše raztapljanje karvedilola. Podobno so ugotovili tudi ostali raziskovalci (20, 21). Glede na rezultate sklepamo, da zmanjšanje delcev karvedilola z metodo nanoprecipitacije poveča njihovo površino in omogoči hitrejše raztapljanje učinkovine, kar se kaže v večji hitrosti sproščanja učinkovine.

4.5.3 Primerjava sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov z različno vsebnostjo poloksamerov

Pri primerjavi sproščanja karvedilola iz oblik z različno vsebnostjo poloksamerov smo se osredotočili le na vzorce z najhitrejšim in najpočasnejšim profilom sproščanja. Zanimal nas je vpliv različne vsebnosti poloksamerov 407 in 188 na sproščanje karvedilola iz nanovlaken in filmov. Poloksameri so površinsko aktivne snovi, ki jih uporabljamo kot solubilizatorje težko topnih učinkovin. Na raztapljanje vplivajo z izboljšanjem močenja površine delcev učinkovine, ki lahko pripomore k večji hitrosti raztapljanja z vplivom na topnost učinkovine ali brez njega. Pri raztapljanju učinkovine iz nanovlaken/filmov lahko poleg boljšega močenja na izboljšanje raztapljanja vpliva tudi dobra topnost poloksamerov, ki povzroči lokalni razpad nanovlaken/filma.

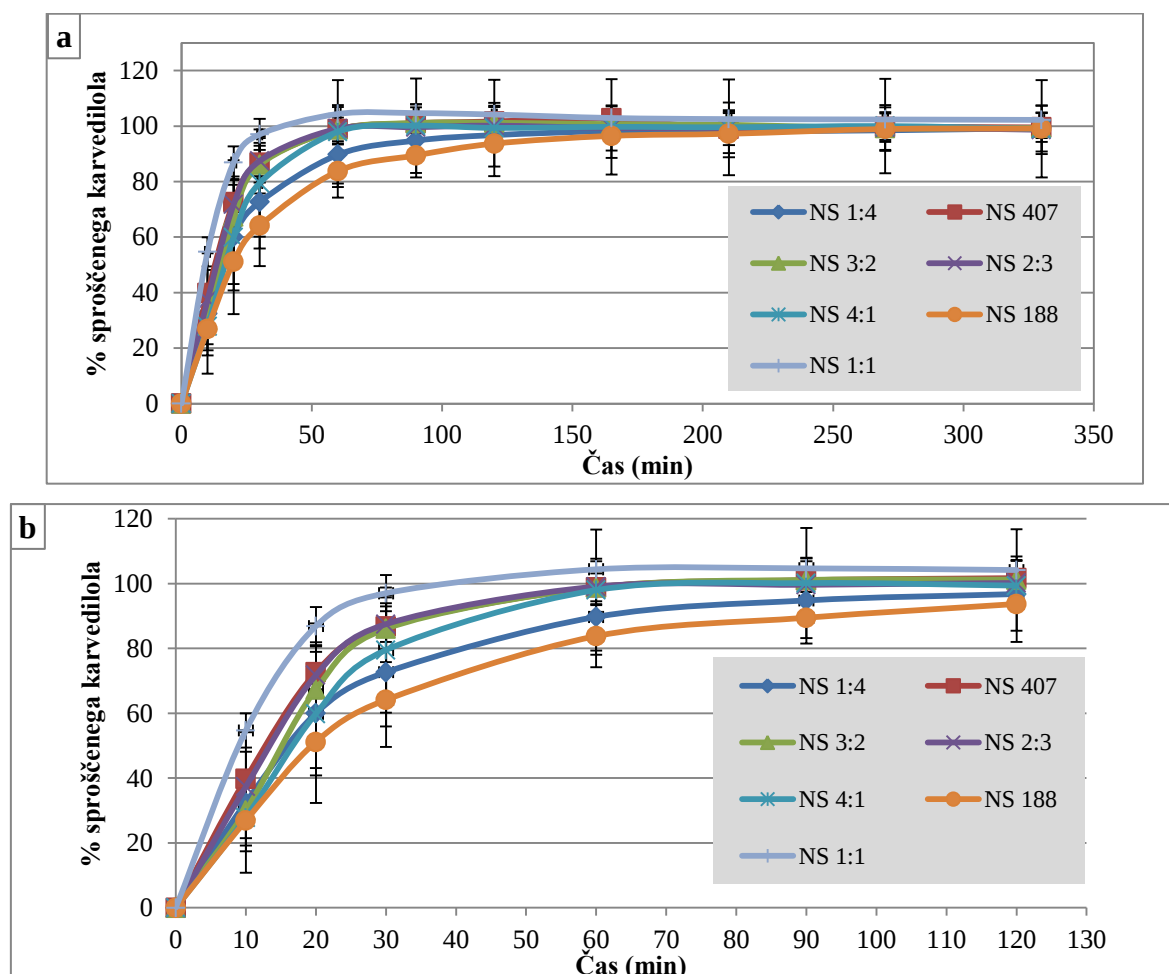
– Sproščanje karvedilola iz nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzij



Slika 14: Profili sproščanja karvedilola iz vzorcev nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzij z različnim masnim razmerjem poloksamerov 188 in 407: (a) celotni profili sproščanja, (b) izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev $\pm$ SD.

Najhitrejšje sproščanje karvedilola iz nanovlaken, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzij, je pri vzorcu iz nanosuspenzije NS 2 : 3, sledi vzorec, pripravljen iz nanosuspenzije NS 1 : 1 (slika 14). V prvih časovnih točkah je sproščanje iz teh vzorcev najbolj izstopalo glede na vzorce z drugimi razmerji poloksamerov. V prvih 10 min se je iz vzorca NS 2 : 3 sprostil 55 % karvedilola, pri vzorcu iz nanosuspenzije NS 1 : 1 pa 52 %. V 30 min se je iz vzorca nanosuspenzije NS 2 : 3 sprostil 95 %, pri nanosuspenziji NS 1 : 1 pa 94 % karvedilola. V 60 min se je ves karvedilol sprostil iz vzorcev nanosuspenzije z razmerjem poloksamerov 2 : 3, 1 : 1, 1 : 4 in 3 : 2. Zanimivo je, da vzorec nanosuspenzije iz nanosuspenzije NS 3 : 2 v začetnih točkah meritev ni kazal izstopajočih rezultatov, čeprav je po sestavi podoben vzorcu z razmerjem poloksamerov 2 : 3. Najpočasnejše sproščanje smo dokazali pri nanovlaknih iz nanosuspenzije NS 188, kjer se je v prvih 10 min sprostil le 32 %, v 30 min 74 % in v 60 min 91 % karvedilola. Pri ostalih razmerjih so bile razlike med profili sproščanja zelo majhne.

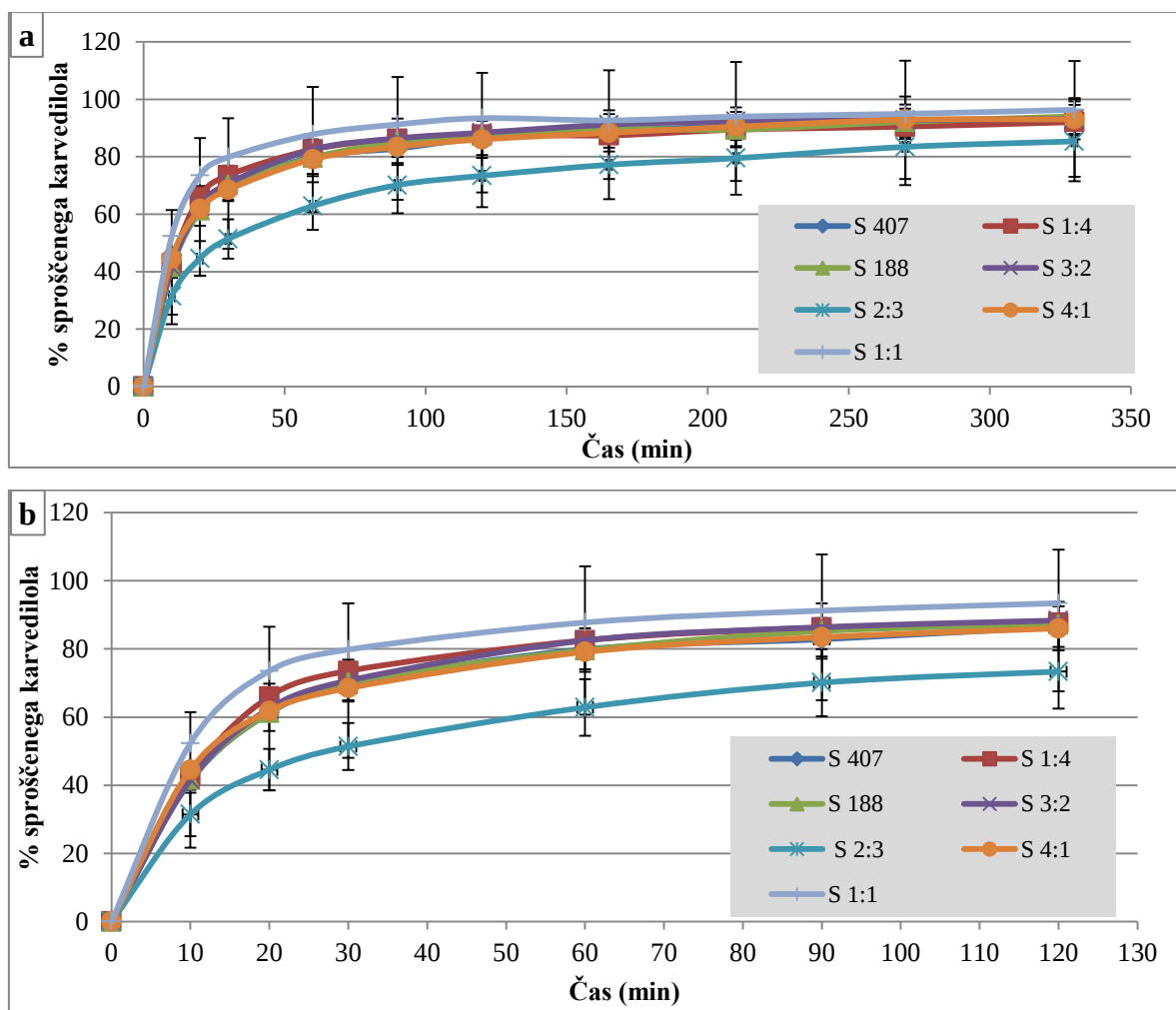
– **Sproščanje karvedilola iz filmov, pripravljenih iz nanosuspenzij**



Slika 15: Profili sproščanja karvedilola iz filmov, pripravljenih iz nanosuspenzij z različnimi masnimi razmerji poloksamerov 188 in 407: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev $\pm$ SD.

Najhitrejše sproščanje karvedilola je bilo v primeru filma, pripravljenega iz nanosuspenzije NS 1 : 1 (slika 15), kjer se je v prvih 10 min sprostil 55 % in v 30 min 97 % karvedilola ter v 40 min vsa učinkovina. Profila sproščanja iz filma iz nanosuspenzije 2 : 3 in filma iz nanosuspenzije NS 407 sta enaka. Najpočasnejše sproščanje učinkovine smo določili v primeru filma, ki smo ga pripravili le s poloksamerom 188. Pri ostalih razmerjih so bile razlike med profili sproščanja majhne.

– Sproščanje karvedilola iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzij

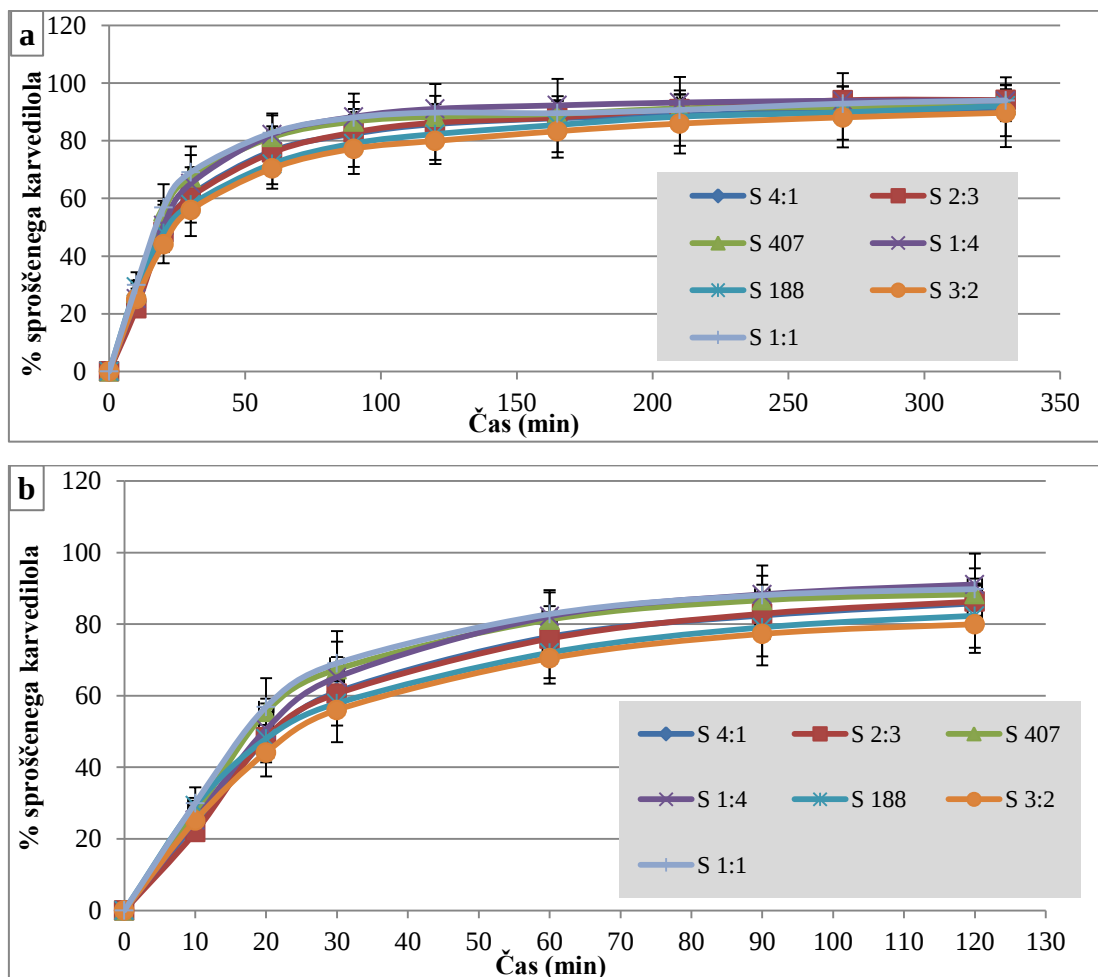


Slika 16: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken, pripravljenih iz suspenzij z različnim masnim razmerjem poloksamerov 188 in 407: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)**

izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.

Najhitrejše sproščanje karvedilola je bilo v primeru nanovlaken, ki smo jih izdelali iz suspenzije S 1 : 1 (slika 16), kjer se je v prvih 10 min sprostilo 52 %, v 30 min 79 % in v 60 min 87 % karvedilola. Najpočasnejše sproščanje je bilo v primeru nanovlaken, ki smo jih pripravili iz suspenzije S 2 : 3, kjer se je v prvih 10 min sprostilo 31 %, v 30 min 51 % in v 60 min 63 % karvedilola. Pri ostalih razmerjih poloksamerov so bile razlike med profili sproščanja majhne.

– Sproščanje karvedilola iz filmov, pripravljenih iz suspenzij



Slika 17: Profili sproščanja karvedilola iz filmov, pripravljenih iz suspenzije z različnim masnim razmerjem poloksamerov 188 in 407: **(a)** celotni profili sproščanja, **(b)** izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu 0–120 min. Rezultati predstavljajo povprečje treh meritev +/- SD.

Najhitrejšje sproščanje karvedilola (slika 17) je bilo iz filma, pripravljenega iz suspenzije S 1 : 1, kjer se je v prvih 10 min sprostilo 30 %, v 30 min 69 % in v 330 min 90 % karvedilola. Najpočasnejše sproščanje v prvih 10 min je bilo pri filmu iz suspenzije S 2 : 3 (slika 17 b). V 330 min se je najmanj karvedilola sprostilo iz filma, pripravljenega iz suspenzije S 3 : 2. Pri ostalih razmerjih so bile razlike med profili sproščanja majhne.

Na podlagi rezultatov sproščanja karvedilola iz vzorcev nanovlaken in filmov z različno vsebnostjo poloksamerov lahko zaključimo, da je najhitrejšje sproščanje karvedilola iz vzorcev, ki smo jih pripravili iz poloksamerov v masnem razmerju 1 : 1. Glede na literaturo smo pričakovali večjo hitrost sproščanja karvedilola pri vzorcih z več poloksamera 188, in sicer zaradi večje hidrofilnosti v primerjavi s poloksamerom 407 (42). Tega naši rezultati niso potrdili. Ravno nasprotno smo pri nanovlaknih in filmu iz nanosuspenzije opazili najpočasnejše sproščanje pri vzorcih, kjer je bil prisoten samo poloksamer 188.

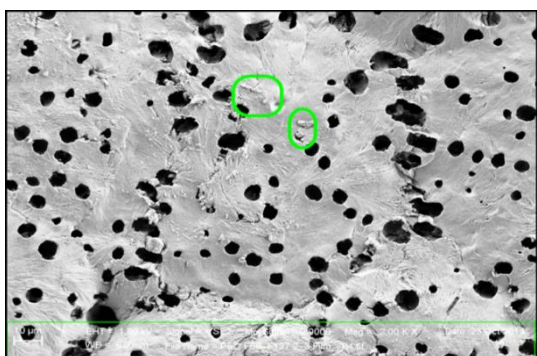
4.6 MORFOLOGIJA NANOVLAKEN IN FILMOV

Morfologijo vzorcev smo preučili s SEM-analizo. Posneli smo več slik istega vzorca pri različnih povečavah. Posebej smo preučili slike nanovlaken in filmov. Pri prvih smo opazovali prisotnost delcev karvedilola, njihovo vključenost v ogrodje nanovlaken, hrapavost/gladkost površine vlaken, prisotnost vozlov, porazdelitev nanovlaken na podlagi ter s pomočjo računalniškega programa določili povprečni premer naključno izbranih 30 nanovlaken pri posameznem vzorcu in velikost delcev učinkovine. Pri filmih, ki smo jih uporabili za primerjavo z nanovlakni pri testu sproščanja, smo opazovali prisotnost por, izgled površine filma, prisotnost in obliko delcev učinkovine. Najti smo skušali tudi povezavo med morfologijo vzorcev in profilom sproščanja učinkovine.

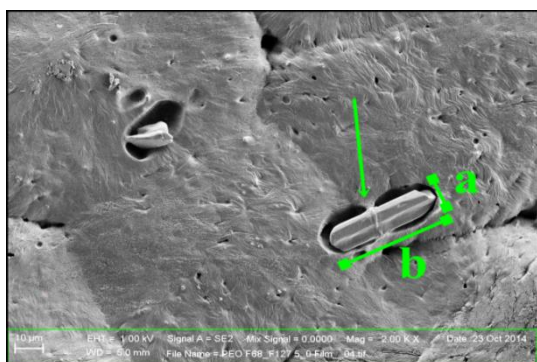
4.6.1 Morfologija filmov, pripravljenih iz suspenzij

SEM-slike so pokazale, da imajo filmi, pripravljeni iz suspenzij karvedilola, porozno strukturo. Razlikovali so se v številu por, ki so posledica izhlapevanja topila med sušenjem. Najbolj porozno strukturo je imel vzorec, pripravljen iz suspenzije S 2 : 3 (slika 18), zato bi za ta vzorec pričakovali najhitrejšje sproščanje učinkovine. Glede na naše rezultate sproščanja pa tega nismo ugotovili. Najmanjšo poroznost je imel vzorec, ki je

vseboval le poloksamer 188 (slika 19). Pri nekaterih vzorcih so vidni večji delci karvedilola, ki so delno prekrti s polimernim filmom in segajo na površino filma, kar je vidno pri vzorcu, ki vsebuje le poloksamer 188 (slika 19). Pri slednjem so vidni tudi majhni delci na površini filma, ki lahko predstavljajo delce karvedilola. Pri tem vzorcu je bilo sproščanje karvedilola na začetku hitro, kar je lahko posledica raztapljanja majhnih delcev karvedilola na površini filma. Po 20 min se je hitrost sproščanja zmanjšala, kar je lahko posledica počasnejšega raztapljanja velikih delcev karvedilola na površini in v filmu. Velikost teh kristalov je bila mikrometrski velikosti (slika 19).



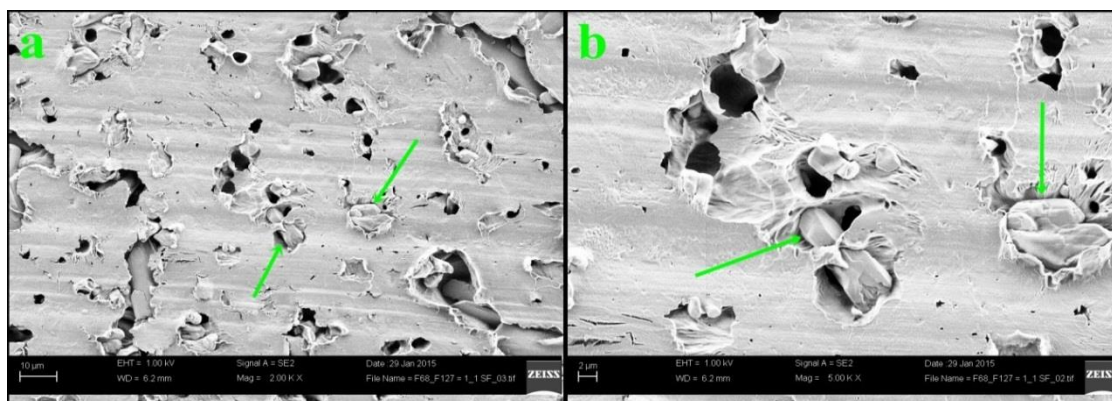
Slika 18: SEM-slika filma iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 2 : 3. Z zeleno sta označena delca karvedilola, ki sta prekrita s polimernim filmom.



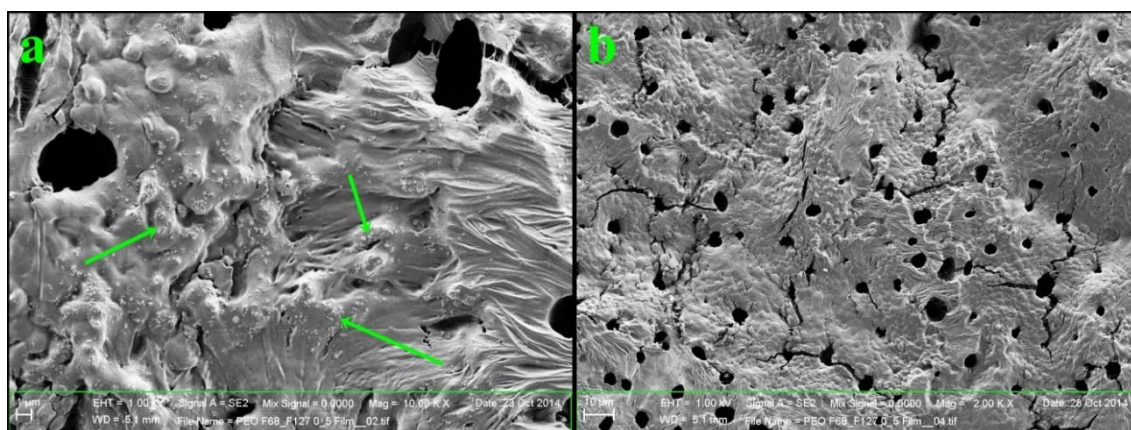
Slika 19: SEM-slika površine filma, pripravljenega iz suspenzije karvedilola (le s poloksamerom 188). S puščico je označen kristal karvedilola (premer (a) = $\sim 11 \mu\text{m}$; dolžina (b) = $\sim 41 \mu\text{m}$).

Povezavo med morfologijo in rezultati testa sproščanja smo našli še pri vzorcu filma iz suspenzije S 1 : 1 in delno pri filmu iz suspenzije S 407 (preglednica III). Pri prvem so vidne pore, ki niso enotne velikosti in oblike. Prisotnih je veliko kristalov karvedilola, ki so ujeti v polimerno ogrodje filma (slika 20). Ti kristali so delno ali v celoti prekrti s polimeri. Za ta film smo ugotovili najhitrejšo sproščanje karvedilola glede na ostala masna razmerja poloksamerov. Vzroki za to so lahko veliko število manjših kristalov učinkovine, ki so delno prekrti s polimeri, razgibana površina vzorca, ki dodatno poveča površino, in prisotnost por, kar omogoči hitrejšo raztapljanje polimernega ogrodja in vgrajene

učinkovine. Pri filmu iz suspenzije karvedilola le s poloksamerom 407 so na površini filma vidni majhni delci, ki so prekrti s polimeri in verjetno predstavljajo delce učinkovine (slika 21). Le-ti so verjetno razlog za hitro sproščanje učinkovine v začetnih točkah testa sproščanja (poglavje 4.5).



Slika 20: SEM-slika filma iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 1 : 1: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi. S puščicami so označeni delci karvedilola.

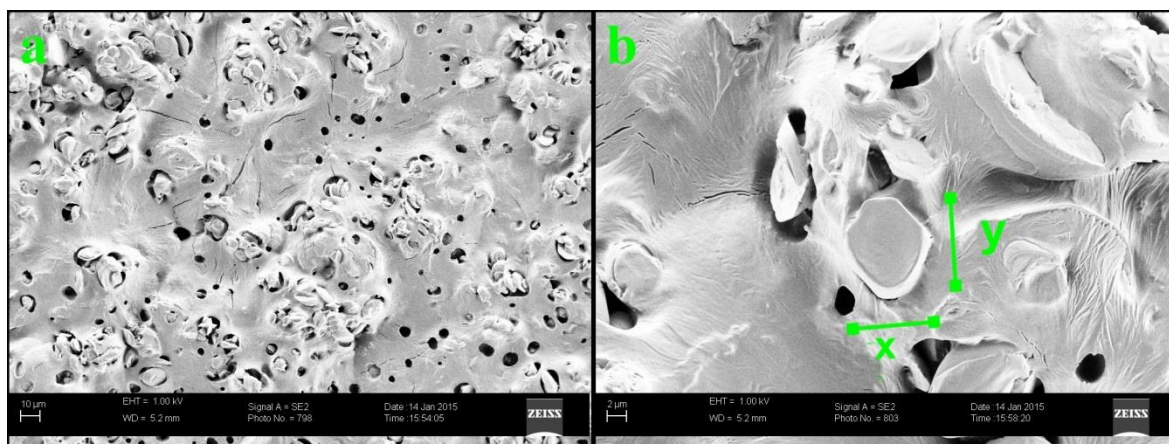


Slika 21: SEM-slika filma iz suspenzije karvedilola le s poloksamerom 407: (a) pri večji in (b) pri manjši povečavi. S puščicami so označeni majhni delci na površini filma.

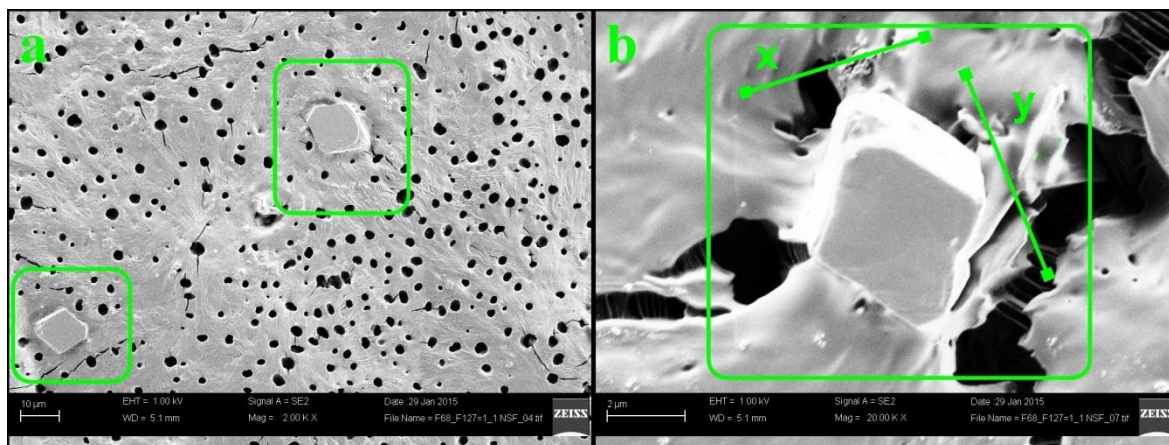
4.6.2 Morfologija filmov, pripravljenih iz nanosuspenzij

Filmi, pripravljeni iz nanosuspenzij, imajo številne pore, ki so posledica hitrega hlapenja acetona med sušenjem filma, in negladko reliefno površino. Pri vseh vzorcih so prisotni delci specifične oblike. Gre za delce pravilne karo oblike z zaobljenimi oglišči, ki so verjetno delci karvedilola, ki so nastali med izdelavo nanosuspenzije z metodo nanoprecipitacije (slika 22). Oblika teh delcev se močno razlikuje od oblike delcev učinkovine v vzorcih, ki smo jih pripravili iz suspenzij (npr. slika 19). Edina povezava med

morfologijo filmov in sproščanjem učinkovine je, da so najmanjši delci karvedilola, ujeti v polimerno ogrodje, prisotni v vzorcu z razmerjem poloksamerov 1 : 1 (slika 23), kar lahko pojasni najhitrejše sproščanje karvedilola iz tega vzorca v primerjavi s sproščanjem učinkovine iz filmov iz nanosuspenzij z ostalimi razmerji poloksamerov.



Slika 22: SEM-slika filma iz nanosuspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 4 : 1: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi. Velikost delca: $y = \sim 10 \mu\text{m}$, $x = \sim 8 \mu\text{m}$.

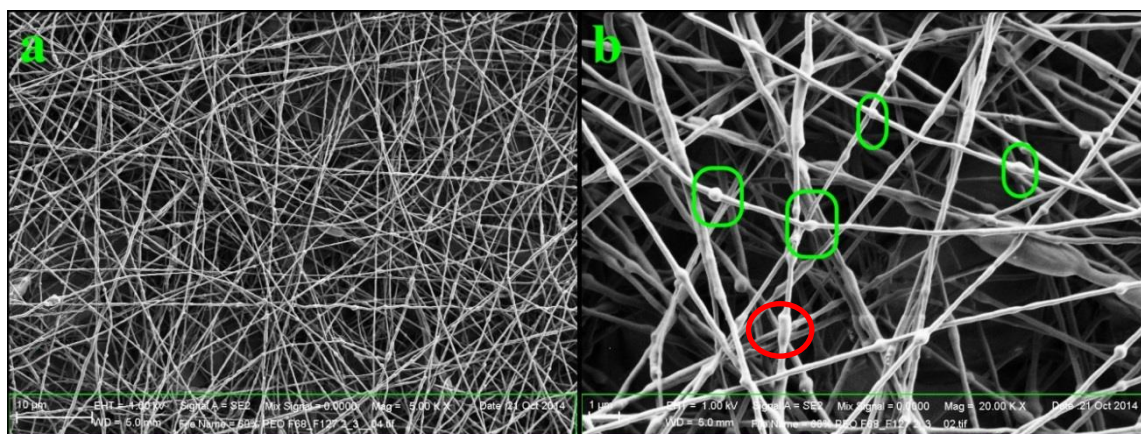


Slika 23: SEM-slika filma, pripravljenega iz nanosuspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 1 : 1: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi. Z zeleno so označeni delci karvedilola. Velikost delca : $x = \sim 4 \mu\text{m}$, $y = \sim 5 \mu\text{m}$.

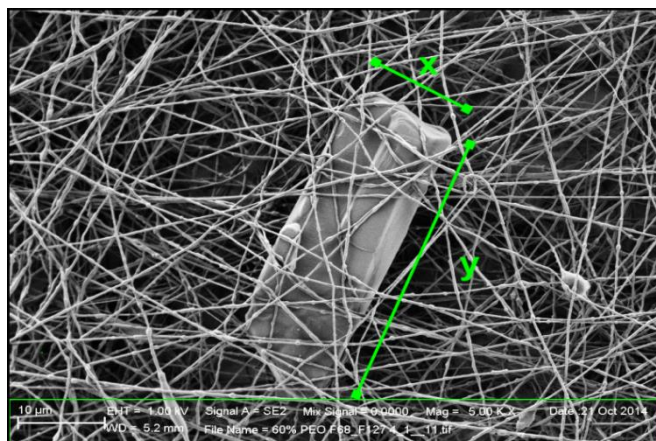
4.6.3 Morfologija nanovlaken, pripravljenih iz suspenzij

Z metodo elektrostatskega sukanja smo iz vseh suspenzij karvedilola v polimernih raztopinah uspeli izdelati gladka nanovlakna z redkimi majhnimi vozli v strukturi, kar

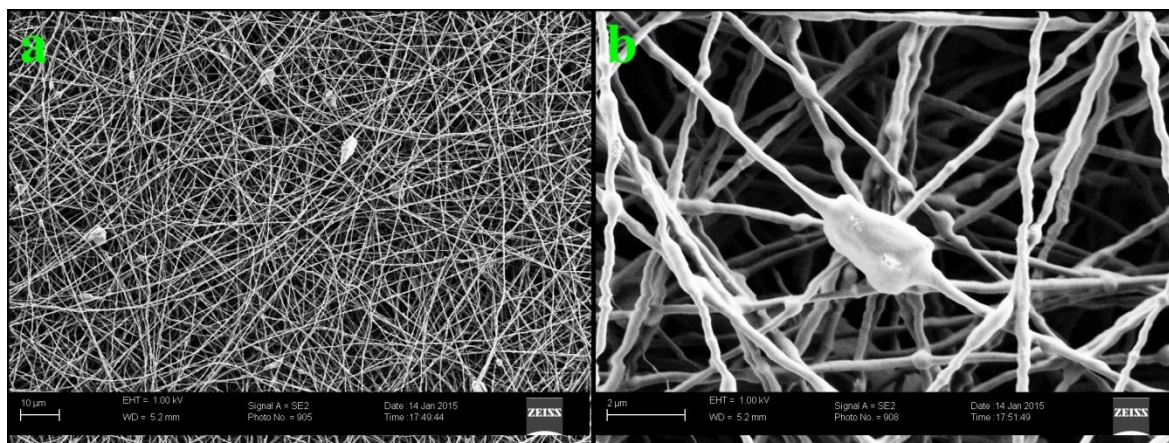
kaže, da pogoji izdelave nanovlaken niso bili popolnoma optimalni (slika 24). Pri vseh vzorcih so prisotne vzdolžne zadebelitve nanovlaken (slika 25 b), ki verjetno predstavljajo delce karvedilola, ki so ujeti v polimernem ogrodju nanovlaken, saj so osnovni delci karvedilola paličaste oblike. Poleg tega so v nekaterih vzorcih prisotni kristali, ki niso ujeti v nanovlakna (slika 25). Le-ti so mikrometrске velikosti, zato se počasneje raztapljajo, kar se lahko kaže kot počasnejše sproščanje učinkovine. Odsotnost kristalov pri nekaterih razmerjih je lahko posledica tega, da v delu vzorca, ki smo ga uporabili za SEM-analizo ni bilo prisotnih kristalov (vzorec smo vzeli na robu območja nanovlaken, ki so se zbrala na zbiralu) ali pa so bili delci karvedilola tako veliki, da so med procesom elektrostatskega sukanja padli na podlago in niso dosegli kovinskega zbiralca. Najmanjši premer nanovlaken smo določili v primeru nanovlaken z razmerjem poloksamerov 1 : 1, in sicer 265 ± 47 nm. Le pri tem vzorcu smo zasledili večji delec, ki je bil ujet v polimerno ogrodje nanovlakna (slika 26 b), medtem ko večjih delcev, ki bi bili ujetih v mrežo nanovlaken, nismo opazili. Slednje je lahko bilo vzrok za najhitrejše sproščanje karvedilola iz omenjenega vzorca glede na preostala nanovlakna, ki smo jih pripravili iz suspenzij (poglavje 4.5.4). Povprečni premer vseh nanovlaken, ki smo jih pripravili iz suspenzij, je bil 358 nm.



Slika 24: SEM-slika nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 2 : 3: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi. Z zeleno so označeni vozli. Z rdečo je označena vzdolžna zadebelitev nanovlaken.



Slika 25: SEM-slika nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 4 : 1. Na sliki je viden delec karvedilola, velik $x = \sim 13 \mu\text{m}$, $y = \sim 39 \mu\text{m}$.



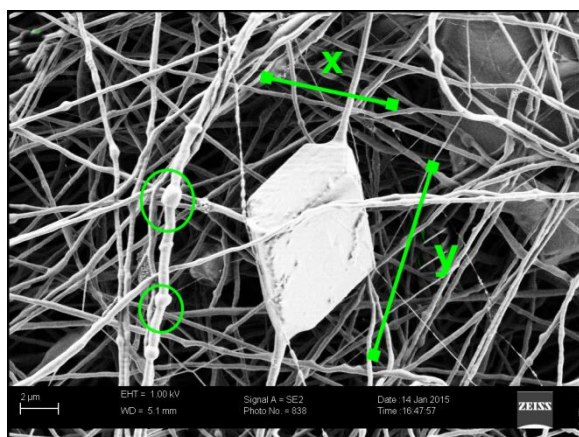
Slika 26: SEM-slika nanovlaken, pripravljenih iz suspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov: 1 : 1: (a) pri manjši in (b) pri večji povečavi.

4.6.4 Morfologija nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzij

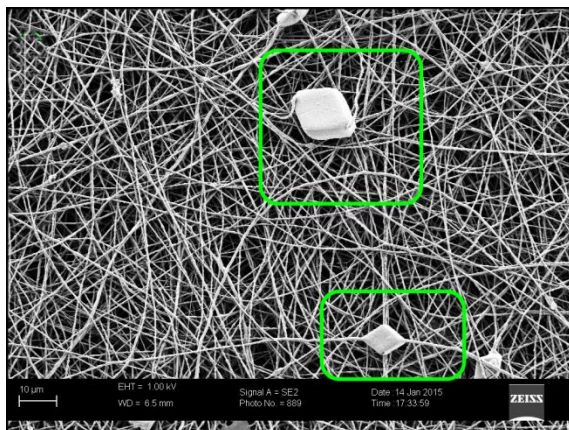
Analiza morfologije nanovlaken je pokazala, da smo uspeli izdelati gladka nanovlakna iz nanosuspenzij. Pri vseh nanovlaknih so bili prisotni vozli v strukturi (slika 27), kar kaže, da pogoji izdelave nanovlaken niso bili popolnoma optimalni. Vzdolžnih zadebelitev je bilo pri nanovlaknih iz nanosuspenzije manj (v primerjavi z nanovlakni, pripravljenimi iz suspenzije) ali jih sploh ni bilo, kar je lahko posledica postopka izdelave. V postopku izdelave nanosuspenzije se namreč učinkovina obori v manjših delcih oz. v delcih drugačne oblike, del karvedilola je lahko prisoten tudi v amorfni obliki. V strukturi pa smo zasledili tudi večje delce učinkovine pravilne karo oblike z zaobljenimi oglišči (slika 28), ki so bili nanizani na nanovlakna. Le-ti so lahko nastali zaradi lokalnega prenasíčenja in

kristalizacije karvedilola iz raztopine acetona pri pripravi nanosuspenzije. Delce s takšno obliko smo zasledili tudi pri filmih, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzij (slika 23).

Najmanjši premer so imela nanovlakna, ki smo jih pripravili iz polimerne raztopine z masnim razmerjem poloksamerov 1 : 1, in sicer 234 ± 63 nm. Sproščanje karvedilola iz teh nanovlaken je bilo hitrejše v primerjavi z nanovlakni, ki smo jih pripravili z ostalimi razmerji poloksamerov. Povprečni premer vseh nanovlaken, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzij, je bil 328 nm, kar pomeni, da se je s pripravo nanosuspenzij zmanjšal premer nanovlaken, kar je lahko posledica prisotnosti acetona. Z dodatkom le-tega v polimerno raztopino se je namreč nekoliko zmanjšala viskoznost raztopine, kar je povzročilo zmanjšanje premera nanovlaken (2). Pri nobenem od vzorcev nismo zasledili delcev učinkovine, ki bi bili ujeti v mrežo med nanovlakna, kot smo to zasledili pri nanovlaknih, pripravljenih iz suspenzij. To je lahko tudi razlog, da smo pri nanovlaknih, ki smo jih pripravili iz suspenzij, zaznali počasnejše sproščanje kot pri tistih iz nanosuspenzij. Delci učinkovine med nanovlakni se namreč počasneje raztapljajo kot delci, ki so obdani s hidrofilnim polimernim ogrodjem. K temu pripomore tudi dejstvo, da so delci v nanovlaknih iz nanosuspenzij manjši v primerjavi z delci učinkovine v vzorcih nanovlaken iz suspenzij (slika 27).



Slika 27: SEM-slika nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzije karvedilola le s poloksamerom 188. Velikost delca na sliki je: $x = \sim 5 \mu\text{m}$, $y = \sim 9 \mu\text{m}$. Z zeleno barvo so obkroženi vozli nanovlaken.



Slika 28: SEM-slika nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzije karvedilola z masnim razmerjem poloksamerov 2 : 3. Z zeleno sta označena kristala karvedilola.

4.7 DOLOČEVANJE VSEBNOSTI KARVEDILOLA V NANOVLAKNIH IN FILMIH

Poskus smo izvajali, da bi ugotovili, ali je vsebnost karvedilola v vzorcih primerljiva s teoretično (20 %, m/m), in da bi rezultate vsebnosti karvedilola uporabili za preračun profilov sproščanja učinkovine. Te bi tako podali glede na dejansko vsebnost karvedilola v posameznem vzorcu in ne tako kot sedaj, ko smo predpostavili, da se vsa učinkovina sprosti iz nanovlaken/filma v 24 h. Najprej smo določili končno točko sproščanja pri treh različnih vzorcih in ugotovili, da se vsa učinkovina sprosti po 144 h. Na žalost pa rezultatov vsebnosti pri testu sproščanja nismo mogli uporabiti, saj smo v tem primeru dobili profile, ki so kazali sproščanje učinkovine večje od 100 %, kar je nerealno. Vzrok, da smo določili prenizko vsebnost karvedilola v nanovlaknih in filmih, je verjetno velika tendenca učinkovine, da se veže na vse površine (laboratorijsko steklovino in pribor). Pri izvajanju testa smo ustrezno količino vzorca najprej natehtali v plastičen čolniček in jo nato z železno pinceto prenesli v stekleno bučko. Na ta način smo zaradi vezave izgubili del karvedilola. Problem je bil lahko tudi, da smo uporabili vzorce, kjer smo prvotno že odvzeli vzorce za test sproščanja, tako da so za test vsebnosti ostali robni deli, kjer je bila lahko vsebnost učinkovine manjša. Da bi se izognili napaki, bi bilo smiselno, da bi test sproščanja podaljšali do določene končne točke sproščanja učinkovine, torej na 144 h. Le tako bi lahko bolj natančno določili dejansko vsebnost karvedilola v vzorcih.

4.8 HOMOGENOST FILMOV, PRIPRAVLJENIH IZ SUSPENZIJE KARVEDILOLA V POLIMERNI RAZTOPINI

Ugotavljali smo homogenost vsebnosti učinkovine v filmih, ki smo jih uporabili kot primerjalni vzorec pri vrednotenju sproščanja učinkovine iz nanovlaken. Na podlagi končne točke sproščanja karvedilola, ki smo jo določili s testom, opisanem v poglavju 3.3.9, in z merjenjem koncentracije karvedilola v končni točki sproščanja karvedilola, smo ovrednotili homogenost pripravljenih filmov. Proučili smo homogenost dveh filmov iz suspenzij z različnima masnima razmerjema poloksamerov (2 : 3 in 3 : 2) in vlili po dva filma z enako sestavo. Pri razmerju poloksamerov 2 : 3 smo dobili naslednje rezultate: za prvi film smo določili povprečno vsebnost karvedilola $16,9 \pm 3,0$ %, pri drugem filmu iz iste suspenzije pa $16,4 \pm 2,9$ %, kar pomeni, da je bila povprečna vsebnost učinkovine v obeh filmih $16,6 \pm 2,8$ %. Rezultati vsebnosti učinkovine v filmih z razmerjem poloksamerov 3 : 2 so naslednji: pri vzorcih iz prvega filma je bila vsebnost $19,3 \pm 2,3$ %, pri vzorcih iz drugega filma pa $19,2 \pm 2,1$ %. Povprečna vsebnost je bila torej $19,3 \pm 2,3$ %.

Glede na rezultate je bila povprečna vsebnost učinkovine v filmih manjša od teoretične, a je bila v obeh paralelah istega filma pri obeh proučevanih vzorcih podobna. Vsebnost učinkovine pa je variirala med filmi z različno vsebnostjo poloksamerov. Glede na rezultate lahko sklepamo, da za neuporabne rezultate testa določevanja vsebnosti učinkovine (poglavje 4.7) ne moremo kriviti nehomogenosti filmov.

4.9 HIDRODINAMSKI PREMIER DELCEV KARVEDILOLA PO REDISPERGIRANJU NANOVLAKEN IN FILMOV, IZDELANIH IZ NANOSUSPENZIJ KARVEDILOLA

Merjenje velikosti dispergiranih delcev karvedilola iz nanovlaken in filmov, pripravljenih iz nanosuspenzij, v nasičeni raztopini karvedilola, smo izvedli s fotonsko korelacijsko spektroskopijo na napravi Zetasizer Nano ZS. Zanimala sta nas povprečni hidrodinamski premer delcev (Z-Ave) in vrednost Pdl, ki predstavlja porazdelitev velikosti delcev. Ker so bili vsi proučevani vzorci polidisperzni, povprečna vrednost premera vseh delcev v vzorcu,

ki jo poda aparatura, ni reprezentativen podatek, zato smo o velikosti delcev sklepali predvsem na podlagi povprečnih velikosti premera delcev v vrhu z največjo intenziteto sipanja svetlobe. Testa žal nismo izvedli za vzorec z masnim razmerjem poloksamerov 1 : 1, ker ga je zmanjkalo.

4.9.1 Polimerni filmi iz nanosuspenzij karvedilola

Rezultati določanja velikosti delcev po redispergiranju filmov, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzij karvedilola, so predstavljeni v preglednici V. Pdl-vzorcev po redispergiranju polimernih filmov znaša od 0,39–0,92, kar pomeni, da vsi vzorci predstavljajo polidisperzni sistem in zato povprečna vrednost velikosti delcev, ki jo poda naprava, ne odraža realne vrednosti povprečne velikosti delcev v vzorcu. Glede na povprečno velikost delcev, ki največ prispevajo k celokupnemu sipanju (vrh 1, preglednica V), so bili najmanjši delci v vzorcu NS 407, in sicer 265,0 nm, sledi vzorec NS 2:3, kjer so imeli največjo intenziteto sipanja svetlobe delci s povprečno velikostjo 311,5 nm. Pri teh dveh vzorcih analiza ni pokazala prisotnosti populacije delcev s povprečno velikostjo v mikrometrskem območju (vrh 3, preglednica V) kot pri ostalih vzorcih. Prav tako smo pri teh dveh vzorcih določili najnižji Pdl, ki je pri vzorcu NS 407 znašal 0,39 in pri vzorcu NS 2 : 3 0,47. Gre torej za najbolj homogeno porazdelitev velikosti delcev karvedilola. Primerjava rezultatov testa sproščanja (poglavje 4.5) in merjenja velikosti delcev je potrdila, da je bilo sproščanje učinkovine iz vzorcev, kjer smo izmerili najmanjše delce, tj. NS 407 in NS 2 : 3, v začetnih točkah najhitrejše (če vzorca NS 1 : 1 ne upoštevamo, saj zanj nismo izvedli tega testa) v primerjavi z ostalimi vzorci. V vzorcu NS 188 je bila povprečna velikost delcev v populaciji z največjo intenziteto sipanja svetlobe največja glede na vzorce z ostalimi razmerji poloksamerov, in sicer 399,2 nm. Ta vzorec je bil tudi najbolj polidisperzen s Pdl – kar 0,92. Test sproščanja (poglavje 4.5) je pokazal, da je sproščanje učinkovine iz vzorca NS 188 najpočasnejše. Tukaj je bil tudi končni odstotek sproščene učinkovine (po 330 min) najmanjši, kar je lahko posledica večjih delcev. S tem lahko potrdimo, da se majhni delci hitreje raztapljajo, zato je sproščanje učinkovine hitrejša. Pri vzorcih NS 5 : 0, 3 : 2, 4 : 1 in 1 : 4 so bili po redispergiranju prisotni tudi delci, ki so večji od nanoobmočja (preglednica V). Le-ti so lahko nastali zaradi združevanja delcev učinkovine med izdelavo filmov ali pa so se večji delci učinkovine oborili že med izdelavo nanosuspenzij.

Preglednica V: Povprečna velikost in Pdl-delcev učinkovine ter delež intenzitete sipane svetlobe posameznega vrha po redispergiranju vzorcev filmov v nasičeni vodni raztopini karvedilola

Vzorec	Z-Ave (nm)	Pdl	Vrh 1 (nm)	Vrh 2 (nm)	Vrh 3 (nm)	Inten. vrh 1 (%)	Inten. vrh 2 (%)	Inten. vrh 3 (%)
NS 3 : 2 v raztopini karvedilola	255,8	0,51	334,2	37,7	4823,0	88,0	9,4	2,6
NS 188 v raztopini karvedilola	220,8	0,93	399,2	47,3	5184	70,4	24,7	4,9
NS 407 v raztopini karvedilola	228,1	0,40	265	48,9	0	78,3	21,7	0
NS 1 : 4 v raztopini karvedilola	259,9	0,49	358,0	53,4	5488	71,6	26,4	2,0
NS 2 : 3 v raztopini karvedilola	182,4	0,47	311,5	71,47	20,3	68,5	27,1	4,0
NS 4 : 1 v raztopini karvedilola	230,0	0,77	387,7	61,3	5223	74,8	19,9	5,3

4.9.2 Nanovlakna iz nanosuspenzij karvedilola

Rezultati določanja hidrodinamske velikosti delcev po redispergiranju nanovlaken, pripravljenih iz nanosuspenzij karvedilola, so predstavljeni v preglednici VI. Prav tako kot pri filmih je tudi pri teh vzorcih Pdl visok, kar pomeni, da so disperzije polidisperzne. Pdl znaša od 0,33 do 0,66. Povprečna velikost populacije delcev z največjim deležem intenzitete sipanja svetlobe (vrh 1, preglednica IV) je najmanjša v vzorcu nanovlaken z NS 2 : 3, in sicer 203,7 nm, sledi vzorec nanovlaken NS 4 : 1 z 267,6 nm. Sproščanje karvedilola (poglavje 4.5) je najhitrejše iz nanovlaken NS 2 : 3 (z neupoštevanjem razmerja NS 1 : 1); sledijo nanovlakna NS 4 : 1. Prisotnost populacije mikrometrskih delcev smo zaznali le v vzorcu, ki smo ga dobili z redispergiranjem nanovlaken NS 188 (vrh 3, preglednica IV). Prav tako je bila v tem vzorcu povprečna velikost delcev v vrhu 1 (preglednica IV) največja in je znašala 434,8 nm. To lahko povežemo z najpočasnejšim profilom sproščanja karvedilola iz nanovlaken NS 188. Primerjava rezultatov z redispergiranjem nanovlaken in filmov iz nanosuspenzij kaže, da so bili mikrometrski delci prisotni v vzorcih kar štirih redispergiranih filmov (vrh 3, preglednica V). Vzrok za to je

morda dejstvo, da so med procesom priprave nanovlaken večji delci padli na podlago in niso dosegli kovinskega zbirala ali pa so v času sušenja filma nastali večji delci (sušenje vzorca pri izdelavi nanovlaken poteče zelo hitro in zato delci nimajo časa, da bi zrastle ali se združili v skupke).

Preglednica VI: Povprečna velikost in Pdl delcev učinkovine ter delež intenzitete sipane svetlobe posameznega vrha po redispersgiranju vzorcev nanovlaken v nasičeni vodni raztopini karvedilola

Vzorec	Z-Ave (nm)	Pdl	Vrh 1 (nm)	Vrh 2 (nm)	Vrh 3 (nm)	Inten. vrh 1 (%)	Inten. vrh 2 (%)	Inten. vrh 3 (%)
NS 188 v raztopini karvedilola	289,0	0,504	434,8	59,1	5156	80,7	16,1	3,2
NS 2 : 3 v raztopini karvedilola	231,2	0,461	203,7	43,1	15,1	70,0	26,0	4,0
NS 407 v raztopini karvedilola	129,9	0,661	332,8	65,7	36,8	64,3	23,9	11,8
NS 1 : 4 v raztopini karvedilola	156,1	0,565	394,7	65,7	16,1	66,6	26,8	4,0
NS 3 : 2 v raztopini karvedilola	199,7	0,539	311,0	44,5	0	75,5	24,5	0
NS 4 : 1 v raztopini karvedilola	246,8	0,328	267,6	42,9	0	73,9	26,1	0

5 SKLEP

V magistrski nalogi smo uspešno izdelali hidrofilna polimerna nanovlakna s karvedilolom. Ugotovili smo, da je pri skoraj vseh vzorcih, razen dveh izjem, profil sproščanja karvedilola iz filma in nanovlaken, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzij, podoben. Z izdelavo nanovlaken iz suspenzij karvedilola se je pospešilo sproščanje karvedilola glede na filme enake sestave. Počasno raztapljanje učinkovine iz fizikalne zmesi je glede na hitrost sproščanja iz nanovlaken in filmov prav tako pričakovan rezultat. Primerjava profilov sproščanja kaže, da je sproščanje učinkovine iz nanovlaken in filmov, ki smo jih pripravili iz suspenzij karvedilola, počasnejše v primerjavi s sproščanjem iz nanovlaken in filmov, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzij iste učinkovine. Na podlagi rezultatov sproščanja karvedilola iz vzorcev nanovlaken in filmov z različno vsebnostjo poloksamerov ne moremo narediti nedvoumnih zaključkov o vplivu različne sestave polimerov na hitrost sproščanja karvedilola, saj so bile razlike v profilih sproščanja majhne. Vzrok je lahko velik vpliv potencialne napake pri sproščanju in analizi vzorcev, ki so posledica izgub karvedilola zaradi njegove lipofilnosti in posledično vezave na površine (steklo in plastični pribor) in potencialnih napak pri spektroskopskih meritvah. Določali smo namreč zelo nizke koncentracije karvedilola, zato se vsaka najmanjša napaka močno pozna na rezultatu meritve. Napake zaradi izgube karvedilola so vplivale tudi na rezultate določanja vsebnosti karvedilola v vzorcih.

V nalogi smo analizirali in primerjali tudi morfologijo vzorcev. Razlike med polimernimi filmi so: pri filmih iz suspenzij so prisotni večji delci karvedilola, ki niso prekriti s polimeri, pri filmih iz nanosuspenzij pa so prisotni manjši delci karvedilola v značilni karo obliki z zaobljenimi oglišči, prekriti s polimeri. Na podlagi manjše velikosti delcev karvedilola in njihove prekritosti s polimernim filmom lahko pojasnimo hitrejše sproščanje učinkovine iz filmov iz nanosuspenzij glede na filme iz suspenzije pri vseh vzorcih filmov. Rezultati SEM-analize nanovlaken so pokazali, da smo uspešno pripravili gladka nanovlakna. Razlike med nanovlakni, pripravljenimi iz suspenzij in nanosuspenzij, so: povprečni premer nanovlaken, pripravljenih iz suspenzij, je nekoliko večji (358 nm) od nanovlaken iz nanosuspenzij (328 nm). Opazili smo tudi manjšo velikost delcev učinkovine in posebno karo obliko delcev karvedilola pri vzorcih, ki so bili pripravljeni iz nanosuspenzij.

Potrdili smo, da z redispergiranjem nanovlaken in filmov, ki smo jih pripravili iz nanosuspenzij, nastanejo disperzije, v katerih prevladujejo nanometrski delci. Primerjava rezultatov povprečne velikosti delcev po redispergiranju kaže, da je povprečna velikost delcev iz nanovlaken z največjo intenziteto sipanja svetlobe (vrh 1, preglednici V, IV) nekoliko manjša v primerjavi s filmi, a razlika ni velika. Delci, ki po velikosti ne spadajo v nanoobmočje, so bili prisotni pri štirih vzorcih filmov, pri nanovlaknih pa le pri enem. Vzrok za to je morda dejstvo, da so med procesom priprave nanovlaken večji delci padli na podlago in niso dosegli kovinskega zbirala ali pa so v času sušenja filma nastali večji delci (sušenje vzorca pri izdelavi nanovlaken poteče zelo hitro in zato delci nimajo časa, da bi zrasli ali se združili v skupke).

Zaključimo lahko, da z načinom priprave suspenzije/nanosuspenzije karvedilola v raztopini PEO in poloksamerov ter z izdelavo nanovlaken izboljšamo raztapljanje karvedilola. Za prihodnje preučevanje vpliva različne vsebnosti poloksamerov na sproščanje karvedilola iz nanovlaken je treba najti rešitve za zmanjšanje vpliva potencialne napake pri sproščanju in analizi vzorcev, kot je na primer uporaba drugih analitskih metod.

6 LITERATURA

- 1 Rošic R, Kocbek P, Pelipenko J, Kristl J, Baumgartner S: Nanofibers and their biomedical use. *Acta Pharmaceutica* 2013; 63: 295–304
- 2 Huang ZM, Zang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S: A review on polymer nanofiber by electrospinning and their application in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 2003; 63: 2223–2253
- 3 Schiffman JD, Schauer D: A review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews* 2008; 48: 317–352
- 4 Bognitzki M, Czado W, Frese T, Schaper A, Hellwig M, Steinhart M, Greiner A, Wendorff JH: Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials* 2001; 13: 70–72
- 5 Greiner A, Wendorf JH: Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition* 2007; 46: 5670–5703
- 6 Shema naprave za elektrostatsko sukanje: : http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Oprema/Naprava_za_elektrostatsko_sukanje.pdf (Dostop: 30. 11. 2015).
- 7 Frenot A, Chronakis I S: Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2003; 8: 64–75
- 8 Angammana CJ, Jayaram SH: Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology. *IEEE Trans Ind Appl* 2011; 47: 1109–1117
- 9 Vrbata P, Berka P, Stránská D, Doležal P, Lázniček M: Electrospinning of diosmin from aqueous solutions for improved dissolution and oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 473: 407–413
- 10 Ramakrishna S, Fujihara R, Teo WE, Lim TC, Ma Z: An introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapur, 2005: 17–18
- 11 Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Tan NCB: The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001; 42: 261–272
- 12 Beachley V, Wen Xuejun: Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering C* 2009; 29: 663–668

- 13 Ramakrishna S, Fujihara R, Teo WE, Lim TC, Ma Z: An introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapur, 2005: 96–98
- 14 Širc J, Hobzova R, Kostina N, Munzarova M, Jukličkova M, Lhotka M, Kubinova Š, Zajickova A, Michalek J: Morphological Characterization of Nanofibers Methods and Application in Practice. *Journal of Nanomaterials* 2012: 1–14
- 15 Jayaraman K, Kotaki M, Zhang Z, Mo X, Ramakrishna S: Recent Advances in Polymer Nanofibers. *Journal of Nanoscience and nanotechnology* 2004; 4: 52–65
- 16 Saje V, Kristl J: Nanosuspensions as a new approach for the formulation of the poorly soluble drugs. *Farmacevtski vestnik* 2001; 2: 145–152
- 17 Yu D G, Zhu LM, White K, Branford-White C: Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. *Health* 2009; 1: 67–75
- 18 Madhaiyan K, Sridhar R, Sundarrajan S, Venugopal J, Ramakrishna S: Vitamin B12 loaded polycarbonate nanofibers: A novel transdermal route for the water soluble energy supplement delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 444: 70–76
- 19 Farmacevtske oblike Ph. Eu. In: *Formularium Slovenicum, slovenski dodatek k Evropski farmakopeji 3.0, tretja izdaja*. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje , Javna Agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, 2011: 106–107
- 20 Uhrich K, Cannizzaro C, Langer R, Sokesheff K: Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem. Rev.* 1999; 99: 3181–3198
- 21 Singh R., Lillard JW: Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* 2009; 3: 215–223
- 22 Taepaiboon P, Rungsardthong, U, Supaphol: Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibers and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* 2006; 17: 2317–2329
- 23 Potrč T, Baumgartner S, Roškar R, Planinšek O, Lavrič Z, Kristl J, Kocbek P: Electrospun polycaprolactone nanofibers as a potential oromucosal delivery system for poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 30: 928–987
- 24 Chen H, Khemtong C, Yang X, Chang X, Gao J: Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Discovery Today* 2010: 1–7
- 25 Papdiwal A, Pande V, Sagar K: Design and characterization of zaltoprofen nanosuspension by precipitation method. *Der Pharma Chemica* 2014; 3: 161–168

- 26 Liu D, Xu H, Tian B, Yuan K, Pan H, Ma S, Yang X, Pan W: Fabrication of carvedilol nanosuspensions through the anti-solvent precipitation-ultrasonication method for the improvement of dissolution rate and oral bioavailability. *AAPS PharmaSciTech* 2012; 13: 295–304
- 27 Karvedilol:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvedilol#section=Depositor-Supplied-Synonyms> (Dostop 3. 8. 2015)
- 28 Karvedilol: <http://www.drugs.com/ppa/carvedilol.html> (Dostop 3. 8. 2015)
- 29 Alves JMV, Prado LD, Rocha HVA: Evaluation and correlation of the physicochemical properties of carvedilol. *Pharmaceutical development and technology* 2015: 1–11
- 30 Prado LD, Rocha HVA, Resende JALC, Ferreira GB, Teixeira AMRF: An insight into carvedilol solid forms: effect of supramolecular interaction on the dissolution profiles. *CrystEngComm* 2014: 3168-3179
- 31 Dilatrend SmPC:
[http://www.cbz.si/ZZZS/pao/bazazdr2.nsf/o/9195F309A4D8F906C12579C2003F501B/\\$File/s-014440.pdf](http://www.cbz.si/ZZZS/pao/bazazdr2.nsf/o/9195F309A4D8F906C12579C2003F501B/$File/s-014440.pdf) (Dostop: 10. 1. 2016)
- 32 Weber MA, Sica DA, Tarka EA, Fleck R, Bakris GL: Controlled-Release Carvedilol in the Treatment of Essential Hypertension. *American Journal of Cardiology* 2006; 98: 32–38
- 33 Bailey FE, Koleske JV: *Poly (Ethylene Oxide)*, Academic Press, New York, 1976: 3
- 34 PEO:<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=20204110> (Dostop 4. 8. 2015)
- 35 Son WK, Youk JH, Lee TS, Park WH: The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* 2004; 45: 2959–2966
- 36 Bhattaraia N, Edmondson D, Veisheh O, Matsen FA, Zhang M: Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005; 26: 6176–6184
- 37 Dumortier G, Grossiord JL, Angely F, Chaumeil JC: A review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharmaceutical Research* 2006; 23: 2709–2726

- 38 Buckton G: Interfacial phenomena in drug delivery and targenting, Harwood Academic Publishers, Švica, 1995: 136–138
- 39 Technical information, BASF 2010, Luterol® L and Luterol F-Grades: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_100102e_Lutrol%20L%20and%20Lutrol%20F-Grades.pdf (Dostop: 12. 12. 2015)
- 40 Patel HR, Patel RP, Patel MM: Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. International Journal of PharmTech Research 2009; 2: 299–303
- 41 Sancheti PP, Sahah VM, Karekar P, Pore YV: Development and characterization of bicalutamide-poloxamer F68 solid dispersion systems. Pharmazie 2008; 63: 571–575
- 42 Medarečić DP, Kachrimanis K, Mitrič M, Djuriš J, Djurić Z, Ibrić S: Dissolution rate enhancemant and physcochemical characterization of carbamazepime-poloxamer solid dispersions. Pharmaceutical Development and Technology 2015: 1–9
- 43 Liao JB, Liang YZ, Chen YL, Xie JH, Liu WH, Chen JN, Lai XP, Su ZR: Novel Patchouli Alcohol Ternary Solid Dispersion Pellets Prepared by Poloxamers. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2015; 14: 15–26
- 44 Obreza A, Bevc B, Baumgartner S, Sollner Dolenc M, Humar M: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015: 209–210
- 45 European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed., Concil of Europe, Strasbourg, 2013: 288–295