

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA ŠTRAVS

# MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



**NINA ŠTRAUS**

NAČRTOVANJE IN OPTIMIRANJE ELEKTROSTATSKEGA RAZPRŠEVANJA ZA  
IZDELAVO POLIMERNIH MIKRODELCEV S PROTIBAKTERIJSKO UČINKOVINO

DESIGN AND OPTIMIZATION OF ELECTROSPRAYING PROCESS FOR THE  
PREPARATION OF POLYMERIC MICROPARTICLES WITH LOADED ANTIBIOTIC

Ljubljana, 2016

*Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Zorana Lavriča, mag. farm.*

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Julijani Kristl za ponujeno priložnost, vse spodbudne besede in usmeritve tekom raziskovanja. To delo ne bi nastalo brez izjemne pomoči somentorja asist. dr. Zorana Lavriča. Iskreno se zahvaljujem za vse strokovne diskusije, nasvete in znanja, ki mi jih je predal. Posebno zahvalo namenjam družini, ki mi je vedno stala ob strani. Hvala podjetju Krka d.d., Novo mesto, ki mi je s podelitvijo štipendije omogočilo kvaliteten študij.*

*Izjavljam, da je magistrska naloga rezultat mojega samostojnega dela v laboratoriju Univerze v Ljubljani, Fakultete za farmacijo ob nasvetih in usmerjanju mentorice prof. dr. Julijane Kristl in somentorja asist. dr. Zorana Lavriča.*

*Nina Štravs*

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	III
GRAFIČNI POVZETEK.....	IV
ABSTRACT .....	V
GRAPHICAL ABSTRACT .....	VI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 POLIMERNI MIKRO- IN NANODELCI .....	2
1.2 ELEKTROSTATSKO RAZPRŠEVANJE .....	3
1.2.1 Teoretične osnove elektrostatskega razprševanja .....	3
1.2.2 Naprave za elektrostatsko razprševanje .....	7
1.2.3 Prednosti elektrostatskega razprševanja .....	8
1.2.4 Vpliv parametrov na proces ter posredno na velikost in morfolgijo delcev .....	8
1.2.5 Elektrostatsko razprševanje in vgrajevanje učinkovin.....	12
1.3 VREDNOTENJE VELIKOSTI IN MORFOLOGIJE MIKRODELCEV .....	13
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>14</b>
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>15</b>
3.1 MATERIALI .....	15
3.2 NAPRAVE .....	15
3.3 METODE .....	16
3.3.1 Sestava in priprava polimernih raztopin brez učinkovine in z njo.....	16
3.3.2 Predstavitev naprave za elektrostatsko razprševanje .....	20
3.3.3 Določanje velikosti in morfolgije delcev .....	21
3.3.4 Analiza podatkov in načrtovanje eksperimentov .....	21
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>22</b>
<b>I. Začetni poskusi in načrtovanje procesnih parametrov .....</b>	<b>22</b>
4.1 PREVERJANJE POGOJEV V NAPRAVI FLUIDNATEK LE-100 .....	22
4.2 VPLIV PARAMETROV NA STABILNOST PROCESA IN VELIKOST DELCEV .....	22
<b>II. Proučevanje in postavitve parametrskega prostora ER .....</b>	<b>24</b>
4.3 VELIKOST IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI DELCEV POMOŽNIH SNOVI .....	24
4.3.1 Lastnosti polikaprolaktonskih mikrodcelcev, izdelanih z ER .....	24
4.3.2 Lastnosti polivinilpirolidonskih mikrodcelcev, izdelanih z ER.....	26
4.3.3 Lastnosti mikrodcelcev laktoze, izdelanih z ER.....	29
4.4 VELIKOST IN MORFOLOGIJA MIKRODELCEV ANTIBIOTIČNIH UČINKOVIN .....	31
4.4.1 Lastnosti mikrodcelcev klaritromicina, izdelanih z ER.....	31
4.4.2 Lastnosti mikrodcelcev ciprofloksacina, izdelanih z ER.....	36
4.4.3 Lastnosti mikrodcelcev metronidazola, izdelanih z ER .....	39

4.5	IZDELAVA POLIMERNIH MIKRODELCEV Z UČINKOVINO.....	40
4.5.1	Lastnosti polivinilpirolidonskih mikrodelcev s klaritromicinom.....	40
4.5.2	Lastnosti polivinilpirolidonskih mikrodelcev s ciprofloksacinom.....	45
	<b>III. Proučevanje ER delcev ciprofloksacina z metodo načrtovanja eksperimentov .....</b>	<b>46</b>
4.6	POSTAVITEV MODELA ZA IZDELAVO MIKRODELCEV CIPROFLOKSACINA NA OSNOVI EKSPERIMENTOV .....	46
4.6.1	Vpliv različnih parametrov na morfologijo delcev CIP.....	49
4.6.2	Vpliv različnih parametrov na velikost delcev CIP .....	51
4.7	OPTIMIZIRANJE IN PREVERJANJE MODELA NA PRIMERU CIPROFLOKSACINA .....	55
<b>5</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>PRILOGE.....</b>	<b>62</b>

## POVZETEK

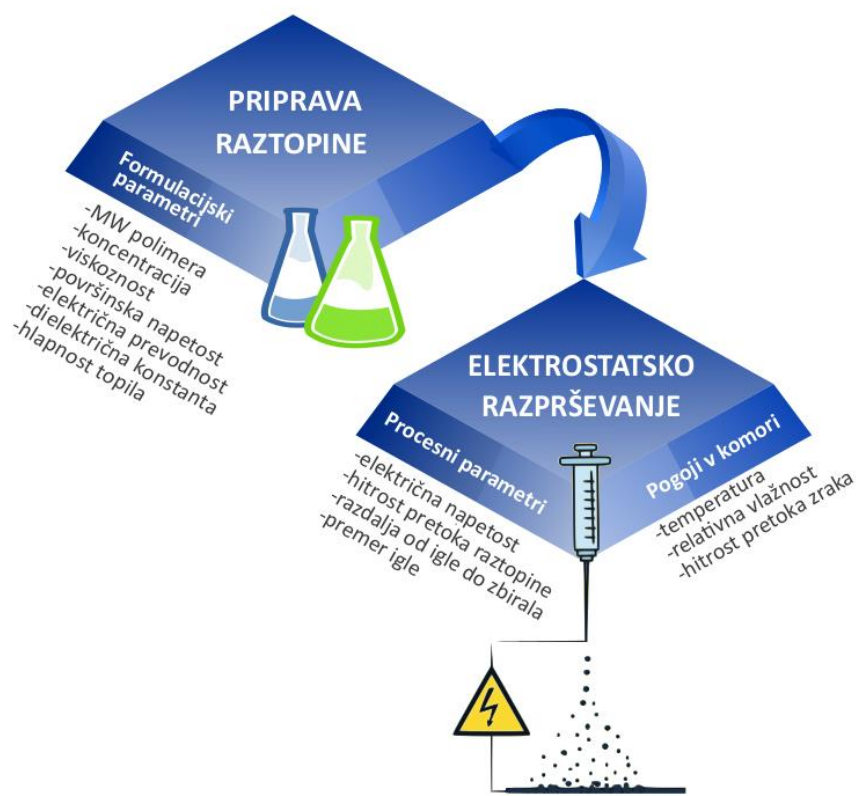
Za izdelavo učinkovitega in stabilnega zdravila je pri načrtovanju potrebna skrbna izbira fizikalnih lastnosti zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi za vse vrste farmacevtskih oblik. Velikost, porazdelitev velikosti in oblika delcev lahko pomembno vplivajo na lastnosti formulacije kot tudi izvedljivost procesa, končno kakovost, stabilnost in izgled izdelanega zdravila. Danes vemo, da razvoj novega izdelka kritično omejuje majhna topnost učinkovin v vodi, kar se posledično lahko izkaže v nezadostni hitrosti raztapljanja in biološki uporabnosti. Med številnimi razpoložljivimi tehnikami za izdelavo nano- in mikrodelcev predstavlja elektrostatsko razprševanje inovativno in obetavno tehnologijo za elektrohodinamsko atomizacijo raztopin.

V raziskovalnem delu magistrske naloge smo načrtovali in razvili proces elektrostatskega razprševanja za izdelavo polimernih nano- in mikrodelcev polikaprolaktona, polivinilpirolidona in laktoze ter učinkovin klaritromicina, ciprofloksacina in metronidazola ter kombinacije polimera in učinkovine. Rezultati kažejo, da pri optimiziranem procesu nastanejo kapljice z ozko porazdelitvijo velikosti, kar po izhlapevanju topila vodi do nastanka trdnih delcev z definirano velikostjo, ozko porazdelitvijo in specifično morfologijo. Ne glede na uporabljeno vrsto polimera so izdelani polimerni nano- in mikrodelci sferični. Nasprotno je morfologija delcev učinkovin odvisna v največji meri od učinkovine same: nastali delci klaritromicina so v obliki okroglih, nagubanih ploščic ali votlih delcev, medtem ko dajejo raztopine ciprofloksacina sferične mikrodelce s homogeno površino. Enako morfologijo delcev dobimo po elektrostatskem razprševanju raztopin polimera in učinkovine pri razmerju 1 : 1. Najustreznejše preliminarne rezultate smo uporabili za načrtovanje eksperimentov in pri tem statistično ovrednotili vpliv procesnih in formulacijskih parametrov na velikost mikrodelcev, izdelali model in ga tudi preverili.

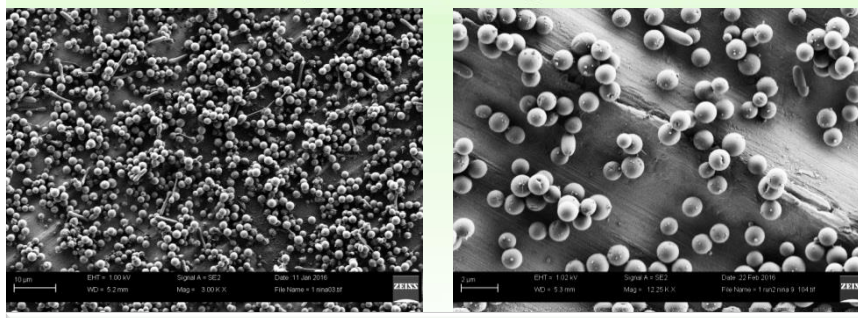
Elektrostatsko razprševanje omogoča enostavno izdelavo nano- in mikrodelcev z definirano velikostjo in ozko porazdelitvijo velikosti delcev ter visokim deležem vgrajene učinkovine, kar je izjemnega pomena za ustrezno porazdelitev učinkovine v organizmu in pričakovan terapevtski učinek zdravila.

*Ključne besede: elektrostatsko razprševanje • inženiring delcev • mikrodelci • protibakterijske učinkovine • polikaprolakton • polivinil pirolidon*

# GRAFIČNI POVZETEK



## MIKRODELCI z ozko porazdelitvijo velikosti



## VGRAJEVANJE V FARMACEVTSKE OBLIKE



## ABSTRACT

To produce an effective and stable medicine, a careful selection of physical properties of active pharmaceutical ingredients (API) and excipients is required for each type of dosage forms. The size, distribution and shape of the particles can affect bulk properties, processability, product performance, stability and appearance of the final product. It is now generally recognized that poorly water-soluble drugs represent a rate-limiting step in dissolution and subsequent bioavailability. Among a number of techniques, available for the formulation of defined micro- or nanosized particles, electrospraying is rapidly emerging as an innovative technology for electrohydrodynamic atomization of solutions.

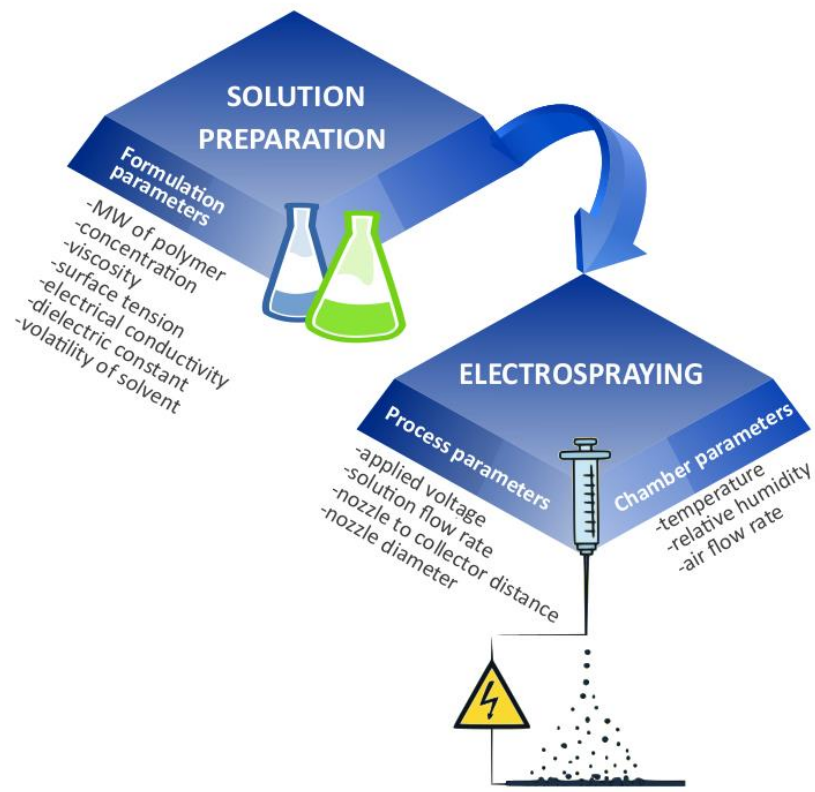
In the present study, an electrospraying process for preparation of nano- and microparticles, comprising pure excipients polycaprolactone, polyvinylpyrrolidone and lactose, pure active ingredients (ciprofloxacin, clarithromycin, metronidazole), or mixtures of polymer and API, was designed and developed. As evident from the results, solvent evaporation from droplets with narrow size distribution led to particle formation with a defined size, distribution and morphology. Irrespective to the molecular properties, polymer solutions resulted in spherical particles. In contrast, API particle morphology depended mainly on its type: clarithromycin formed wrinkled, round platelets or hollow spheres, while solutions of ciprofloxacin produced spherical particles with homogeneous surfaces. The described morphology was preserved when the API and polymer were present in the ratio of 1 : 1. Further on, the obtained formulation and process parameters were chosen for the design of experiments, where the importance of electrohydrodynamic process parameters on particle properties was evaluated, and the process optimized with regard to the desired particle properties.

Electrospraying represents a method that enables high drug-loading efficiency, a control over particle size, and consequently narrow size distribution. These attributes are extremely important for appropriate biodistribution and a predictable therapeutic effect.

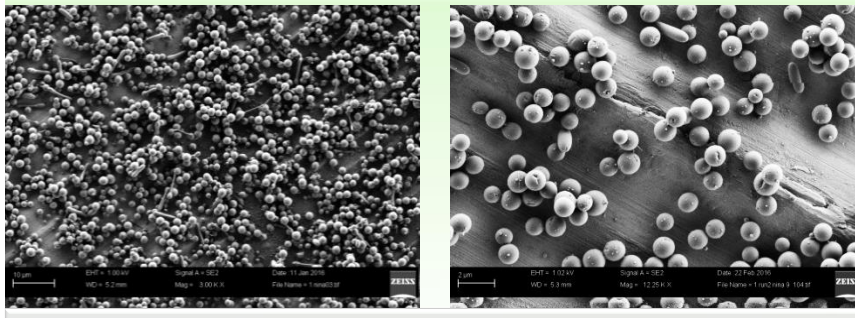
*Keywords: electrospraying • particle engineering • microparticles • antibiotics • polycaprolacton • polyvinylpyrrolidone*



# GRAPHICAL ABSTRACT



## MICROPARTICLES with narrow size distribution



## INCORPORATION INTO DRUG DELIVERY SYSTEMS



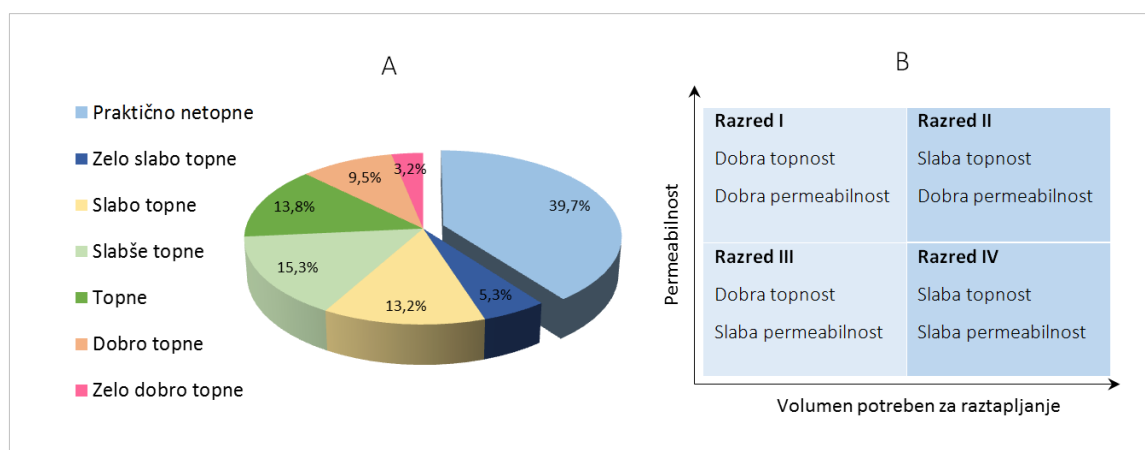
## SEZNAM OKRAJŠAV

CIP	ciprofloksacin
ER	elektrostatsko razprševanje
KMC	klaritromicin
MNZ	metronidazol
PCL	polikaprolakton
PVP	polivinil pirolidon
ZU	zdravilna učinkovina

# 1 UVOD

Razvoj sodobnih farmacevtskih oblik je usmerjen v doseganje velike biološke uporabnosti zdravilnih učinkovin (ZU) na mestu delovanja ter s tem pri enakem odmerku boljši terapevtski odziv in manjše tveganje za neželene učinke.

Danes vemo, da so številne znane in mnoge nove ZU v vodi in fizioloških tekočinah težko topne (približno 40 % le-teh, slika 1 A), kar omejuje njihovo biološko uporabnost in jih zato pogosto opustijo ali zavržejo že v zgodnjih fazah razvoja (1, 2). Pristop za ugotavljanje kritičnega koraka pri absorpciji ZU na podlagi topnosti v vodi in permeabilnosti je biofarmacevtski klasifikacijski sistem (BCS) (slika 1 B). Topnost v vodi ključno vpliva na farmakinetiko in tudi farmakodinamiko ZU (1). Posledično se nam postavi vprašanje, kako povečati topnost in kako doseči mesto delovanja?



Slika 1: A – Topnost prvih 200 učinkovin registriranih na evropskem in ameriškem trgu za peroralno aplikacijo (2006, povzeto po 2) in B – biofarmacevtski klasifikacijski sistem (1).

Povečanje topnosti predstavlja aktualen problem in velik izziv za farmacevtske tehnologe. Posledica težke topnosti ZU je nepredvidljiva in nepopolna absorpcija z mesta aplikacije. Za povečanje topnosti poznamo vrsto tehnoloških pristopov, kot so mikronizacija, uporaba sotopil, solubilizacija s površinsko aktivnimi snovmi, priprava trdnih disperzij ali kokristalov, vgrajevanje ZU v ciklodekstrine ali v različne nosilne sisteme, kot so miceli, mikroemulzije, samoemulgirajoči sistemi, lipidni in polimerni nanodelci in drugi koloidni nosilci učinkovin, ali pa s kemijsko modifikacijo učinkovin ali pripravo predzdravil. Mnogi raziskovalni rezultati kažejo, da so se navedene metode izkazale kot izredno specifične, niso uporabne univerzalno in kar je najpomembnejše, imajo majhno sposobnost vgrajevanja ZU (3, 4, 5). Vse večji tehnološki izziv v farmacevtski industriji predstavljajo

tudi ZU biološkega izvora, ki so nagnjene k denaturaciji in s tem izgubi terapevtskega učinka. Živimo v dobi nanotehnologije, zato so v ospredju zlasti različni nanotehnološki pristopi, ki omogočajo izdelavo delcev učinkovin nanometrskih velikosti. Njihove prednosti, ki so odraz povečane specifične površine delcev, so večja topnost, večja hitrost raztapljanja in boljša adhezivnost v primerjavi z delci iste učinkovine mikrometerske ali večje velikosti. Posledično so spremenjene biofarmaceutske lastnosti in farmakološki učinek po vnosu v organizem. Primerni so za vse poti vnosa težko topnih učinkovin v organizem.

Raziskovalci in proizvajalci opreme in zdravil iščejo idealno rešitev, s katero bi lahko dosegli ustrezno biološko uporabnost katere koli učinkovine. Obetavne so tehnologije s superkritičnimi tekočinami, »Spray Freeze Drying«, mikrokristalizacija in razprševalno sušenje. Tehnika, ki je danes dokaj malo poznana, obeta pa veliko, je elektrostatsko razprševanje. Prav slednja je središče te magistrske naloge.

## **1.1 POLIMERNI MIKRO- IN NANODELCI**

*»There is plenty of room at the bottom.« R. Feynman*

Znan govor fizika in Nobelovega nagrajenca Richarda Feynmana v letu 1959, ko je postregel z izjavo, da je »na dnu še več kot dovolj prostora«, je bila prelomnica za raziskovanje na ravni atomov in molekul ter predstavlja iztočnico v zgodovini za razvoj nanoznanosti in nanotehnologije. Nanotehnologija predstavlja multidisciplinarno področje načrtovanja, izdelave, vrednotenja in uporabe različnih materialov, naprav in sistemov, kjer so snovi prisotne v nano merilu (6, 7). Kljub temu, da predpono nano uporabljamo, ko je struktura vsaj v eni dimenziji v območju do 100 nm, lahko nanozdravila predstavljajo kompleksne sisteme z velikostjo do 1000 nm (7). Delci, ki imajo velikost v območju med  $10^{-6}$  in  $10^{-3}$  m, so mikrodelci in jih v farmaciji že dlje uporabljamo (8). Primerni so za vgrajevanje v kapsule ali tablete, injekcije ali mazila, kot prašek jih lahko vgradimo v farmacevtske oblike za inhaliranje in med drugim jih uporabljamo tudi kot obloge vsadkov.

Prednosti mikro- in nanodelcev pred konvencionalnimi zdravili kažejo velik potencial za zdravljenje. Povečana specifična površina delcev vpliva na izboljšanje topnosti ter posledično vodi do večje biološke uporabnosti. Nadzorovano sproščanje ZU in zaščita pred

encimsko razgradnjo omogočata podaljšati razpolovni čas ZU, manjše število odmerkov in preprečujeta prezgodnje medsebojno delovanje ZU z biološkim okoljem. Večja permeabilnost nanodelcev do tarčnih tkiv pa izkazuje možnost pasivnega in aktivnega ciljanja specifičnih celic ter s tem tudi zmožnost vstopa v težko dostopna tarčna mesta (npr. tumorji, pljučni alveoli, mukozna sluznica, limfni vodi in drugje) (8, 9, 10, 11).

Z zmanjševanjem velikosti delcev se povečuje Gibbsova prosta energija. Osnovna enačba termodinamike, ki velja za makroskopski sistem, opisuje spremembo energije kot vsoto med toploto in opravljenim delom. Pri mikrosistemih je potrebno upoštevati raznolikost sistema in površinsko energijo. Da se kompenzira Gibbsova prosta energija, se uporabljata dva splošna principa: termodinamičen in kinetičen. Slednji izkorišča vnos zunanje energije, npr. uporabo ultrazvoka, homogenizatorja, električnega polja. Električno polje je tudi osnova metode elektrostatskega razprševanja.

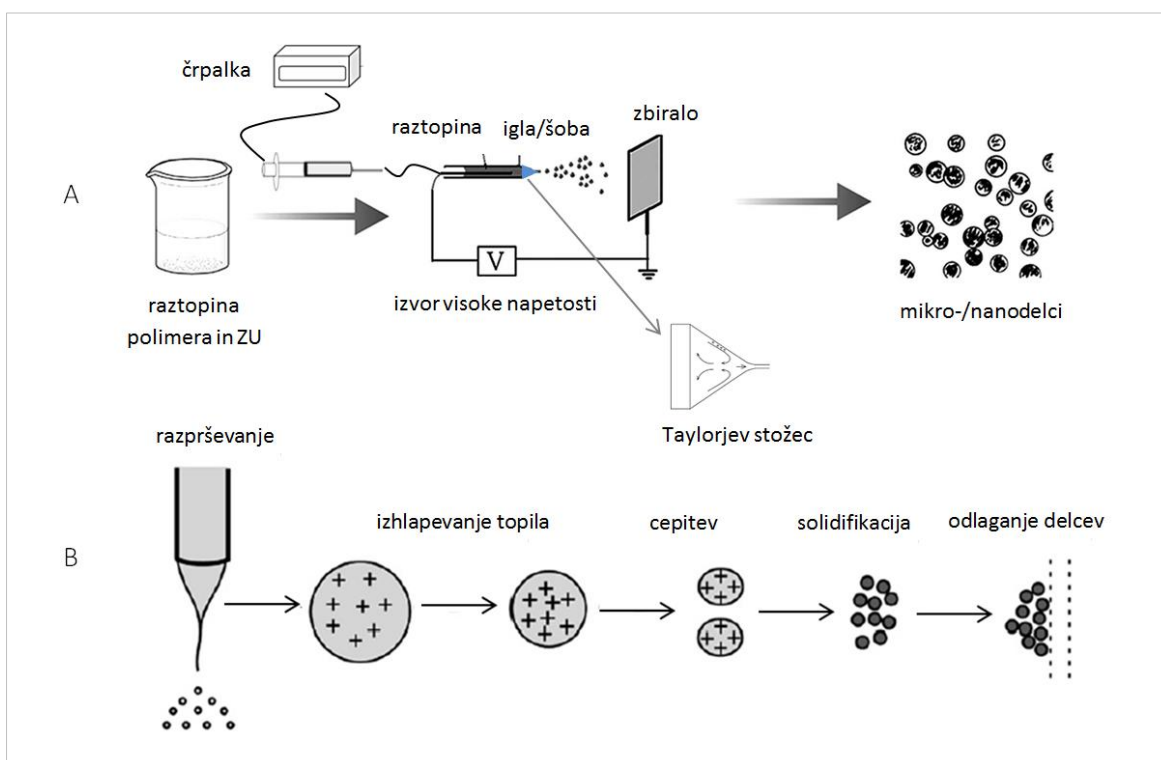
## **1.2 ELEKTROSTATSKO RAZPRŠEVANJE**

Elektrostatsko razprševanje (ER) predstavlja eno izmed najnovejših metod za izdelavo mikro- in nanodelcev iz raztopin ali talin (12, 13). Začetki segajo v konec 16. stoletja, ko je W. Gilbert opisal pojav, kako se kapljica vode pod vplivom nabitega koščka jantarja spremeni v stožec. Med letoma 1964 in 1969 je britanski fizik in matematik G. I. Taylor utemeljil teoretične osnove ER. Po njem se imenuje stožčast curek, ki se izoblikuje iz kapljice ob prisotnosti električnega polja. ER je že uveljavljen pristop na področju analitike, na primer masne spektrometrije in tiskarstva (brizgalni tiskalniki). V farmacevtsko tehnologijo je ER vstopilo pred približno 25 leti, ko so pričeli metodo uporabljati v raziskovalne namene za vgrajevanje prvih učinkovin. Še vedno pa se nahajamo v začetni fazi razumevanja in optimizacije procesa (12).

### **1.2.1 Teoretične osnove elektrostatskega razprševanja**

ER je metoda, ki omogoča razprševanje tekočin, znana tudi kot elektrohidrodinamska atomizacija tekočin (12, 14). Temelji na teoriji nabitih kapljic, ki navaja, da je električno polje, aplicirano na kapljico v izvodilu kapilare, sposobno deformirati njeno mejno površino. Električni naboj generira elektrostatske sile, ki premagajo površinsko napetost tekočin in omogočijo razprševanje (12). Na površino kapljic ima električni naboj velik

učinek in pripomore k večji stabilnosti sistema, ker se le-te med seboj odbijajo in se ne združujejo med procesom (15).



Slika 2: A – Elementi naprave za elektrostatsko razprševanje in B – stopnje, ki vodijo do nastanka mikro- in nanodelcev (13, 16).

Slika 2 A prikazuje proces elektrostatskega razprševanja, ki obsega rezervoar z raztopino za razprševanje, črpalko, injekcijsko brizgo z raztopino, kovinsko iglo, zbiralo in izvor visoke napetosti. Brizga je povezana s črpalko, ki omogoča polnjenje šobe iz rezervoarja in zagotavlja želeno hitrost pretoka raztopine. Na ustrezni razdalji od šobe imamo kovinsko zbiralo (12, 17). S pomočjo elektrod zagotovimo razliko v električnem potencialu med šobo in zbiralom. Elektrostatske sile, ki pri tem nastanejo, omogočijo raztegnitev meniskusa raztopine na konici šobe, oblikovanje Taylorjevega stožca in razpršitev kapljic (8, 12, 17, 18, 19). Med potovanjem kapljic topilo izhlapeva, kapljice se cepijo, polimerne verige se postopno krčijo in strjujejo. Ob ustreznih pogojih dobimo na zbiralu suhe delce (slika 2 B) (12, 13).

Velikost nastalih kapljic določa končno velikost delcev in se manjša v odvisnosti od jakosti električnega polja oz. od količine naboja na kapljici. Če na tekočino ne deluje električno polje, le-ta skozi konico igle kaplja, ker na kapljico delujeta le dve sili: sila površinske

napetosti in sila teže. Iz ravnovesja omenjenih sil so izpeljali enačbo 1, iz katere so razvidni fizikalni parametri, ki vplivajo na polmer kapljice ( $r$ );

Enačba 1 
$$r^2 = \frac{3\gamma}{2g\rho}$$

kjer je  $\gamma$  površinska napetost,  $g$  gravitacijski pospešek in  $\rho$  gostota raztopine. Ob prisotnosti in naraščanju jakosti električnega polja narašča naboj na površini kapljice. Površinska napetost kapljice se temu naboju upira, kar vodi do izoblikovanja stožca. Presežek naboja, ki nastane na Taylorjevem stožcu se mora razporediti in zato nastane curek ter razprševanje v večje kapljice in nato v manjše (slika 2 B). S tem se zmanjša električni naboj kapljic, ne da bi se pri tem značilno spremenila masa (12).

Nastanek nabitega curka s premerom  $r_j$  je prvi opisal Rayleigh, leta 1882, z enačbo 2;

Enačba 2 
$$r_j = \left(\frac{9\varepsilon\gamma}{2\pi^2}\right)^{1/3} \left(\frac{Q}{I}\right)^{2/3}$$

kjer je  $\varepsilon$  dielektrična konstanta,  $Q$  hitrost pretoka raztopine in  $I$  električni tok med ER (12, 19). Električni tok se povečuje sorazmerno z večanjem napetosti. Če v osnovno Rayleighovo enačbo vstavimo enačbi za električni tok (enačba 3) in hitrost pretoka (enačba 4), dobimo enačbo 5 (12). Enačba 5 kaže, da na premer nabitega curka vplivajo dielektrična konstanta, površinska napetost, gostota in prevodnost raztopine ( $K$ ).

Enačba 3 
$$I = \left(\frac{\varepsilon\gamma^2}{\rho}\right)^{1/2}$$

Enačba 4 
$$Q = \frac{\varepsilon_0\gamma}{\rho K}$$

Enačba 5 
$$r_j = \left(\frac{9\varepsilon\gamma\varepsilon_0^2}{2\pi^2\rho K}\right)^{1/3}$$

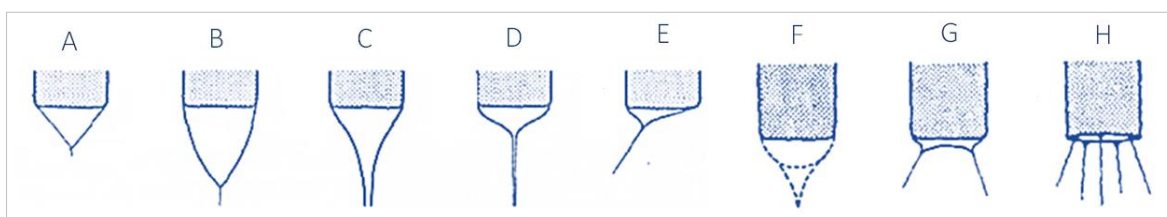
Električni naboj ( $q$ ) predstavlja poleg velikosti kapljic drugi pomemben parameter, ki določa lastnosti nastalih delcev. Zgornja meja jakosti električnega naboja na kapljici (»Rayleigh Limit«,  $L_R$ ), ki omogoča razpršitev (fisijsko) kapljice opisuje enačba 6. Med ER so nastale kapljice visoko nabite, saj njihov naboj znaša približno polovico  $L_R$  (12, 14).

Enačba 6 
$$L_R = q(64 \pi^2 \varepsilon \gamma r^3)$$

Specifična površina kapljic se z zmanjševanjem njihove velikosti povečuje. To povzroči hitro izhlapevanje topila in posledično zgoščevanje električnega naboja. Na površini kapljice je poleg tlaka površinske napetosti prisoten tudi tlak, ki je posledica električnega

naboja. Lahko se zgodi, da se ob doseženem kritičnem naboju tlaka na površini kapljice izenačita. Takrat nastane t. i. Coulombova eksplozija, ko kapljica razpade v zelo majhne, nanometrskke kapljice, ki potujejo do zbirala (12).

V odvisnosti od ravnovesja sil, ki delujejo na meniskusu šobe, se izoblikujejo različni curki oz. načini razprševanja. Najbolj želena oblika, da dobimo enakomerno in ponovljivo ER, je stabilen stožčast curek («cone-jet mode») (slika 3 A), ki nastane le pri določenih pogojih. Stožec, ki se oblikuje, je namreč lahko tudi drugačnih oblik (slika 3 B do E) in njegovo gibanje je lahko različno (npr. lahko niha ali se vrti okoli kapilarne osi) (12, 13, 14).



Slika 3: Različni načini oblikovanja stožca (A – E) in razprševanja (F – H) (20).

Na način razprševanja vplivajo tako lastnosti tekočine, kot tudi aplicirana napetost in hitrost pretoka raztopine (19). Če vlada med šobo in zbiralom prenizka napetost, se ne vzpostavi stabilen curek in dobimo pulzirajoči oz. kapljajoči curek (slika 3 F), ki spreminja obliko. Z večanjem razlike v električnem potencialu nad točko, kjer se oblikuje stabilen stožec, se lahko oblikujeta dva ali več curkov, ki razpršujejo v različne smeri («multi-jet mode») (slika 3 G, H) (12, 13, 14).

Za ER, kjer imamo oblikovan stabilen stožec («cone-jet mode»), velja enačba 7. Iz enačbe, kjer je  $\alpha$  konstanta, je moč razbrati, da je premer kapljic ( $d$ ) odvisen od gostote raztopine, hitrosti pretoka raztopine in električnega toka. Na slednjega pa vplivajo površinska napetost, prevodnost in hitrost pretoka raztopine (enačba 8) (12, 21).

Enačba 7 
$$d = \alpha \left( \frac{\rho \epsilon_0 Q^4}{I^2} \right)^{1/6}$$

Enačba 8 
$$I \propto (\gamma K Q)^{1/2}$$

Raziskovalci so nato z rezultati raziskav postavili enačbi, da je velikost kapljic pri ER s stabilnim stožcem odvisna od električne prevodnosti raztopine ( $d \propto \left(\frac{1}{K}\right)^{1/6}$ ) in hitrosti pretoka raztopine ( $d \propto Q^{1/2}$ ). Po zakonu o ohranitvi mas velikost kapljic neposredno določa velikost delcev (12, 21).



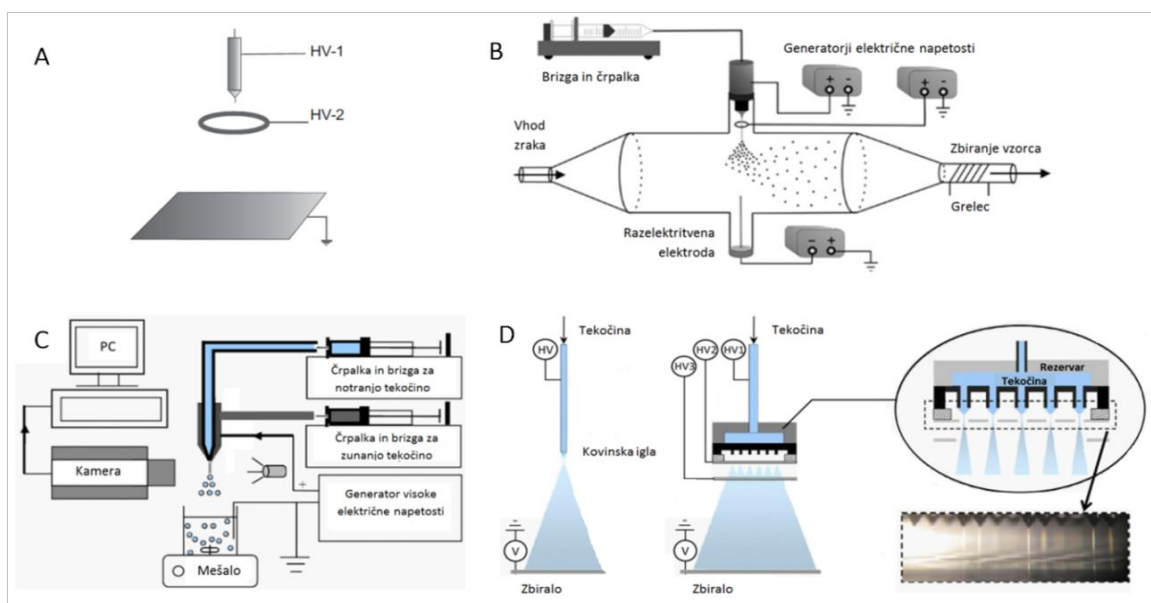
## 1.2.2 Naprave za elektrostatsko razprševanje

Konfiguracije naprav za ER so lahko različne. Glavne dele, ki jih vsebujejo vse laboratorijske naprave, prikazuje slika 2 A.

Poseben tip naprave »Delft«, ki so ga razvili na Tehnični univerzi v Delftu, Nizozemska, ima med šobo in zbiralom nameščen kovinski obroček (slika 4 A, B). Le-ta se nahaja v stekleni komori in je podvržen toku zraka ali tekočega dušika in izpostavljen napetosti. Obroček dodatno stabilizira stožec in proces ER ter posledično omogoči izdelavo sistema delcev z ozko porazdelitvijo velikosti. Njegova uporaba je priporočljiva, ko se kot topilo uporablja voda, s katero težko zagotovimo stožec in stabilen curek (12, 17).

Naprava za ER lahko namesto kovinskega zbirala vsebuje čašo z ustreznim medijem (slika 4 C). Vzorec v tem primeru zbiramo v tekočino. Mediji so lahko različni (destilirana voda, metanol, etanol) in velikokrat so jim dodane tudi različne površinsko aktivne snovi. Pri takšnem ER sta potrebna še dodatna koraka – filtriranje in sušenje vzorca (12).

Uporaba sistema z več šobami (»multi-nozzle electro spray system«) je primerna za prenos ER iz laboratorija na industrijski nivo (slika 4 D). Takšna naprava mora vsebovati ekstraktor, ki lokalizira električno polje in minimizira interference med izvori električne napetosti (12). Raziskovalci so ugotovili, da se morfologija in velikost mikrodelcev ob prenosu pogojev z ene igle na 19 paralelnih igel ne razlikuje bistveno (22).



Slika 4: Naprave za elektrostatsko razprševanje: A – shema naprave tipa »Delft« z nameščenim kovinskim obročkom (17), B – »Delft« v stekleni komori, C – ER s koaksialno šobo (zbiralo: čaša s tekočino), D – ER z eno iglo ali več iglami hkrati (12).

### **1.2.3 Prednosti elektrostatskega razprševanja**

Elektrostatsko razprševanje, kjer lahko enostavno, s prilagajanjem različnih parametrov med procesom, vplivamo na velikost in morfologijo delcev, izkazuje pomembne prednosti pred drugimi metodami izdelave mikro- in nanodelcev. Pri ER ni potrebna povišana temperatura, kot npr. pri sušenju z razprševanjem, in ni potrebno dodatno sušenje, saj se delci med procesom izdelave posušijo. Zaradi istovrstnega naboja na površini kapljic ni težav z aglomeriranjem. Metoda ER omogoča izdelavo sistema z ozko porazdelitvijo velikosti, ki je pomemben za porazdelitev v biološkem okolju in nadzorovanje sproščanja ZU. Majhna hitrost pretoka raztopine skozi eno šobo daje majhno količino vzorca, kar lahko multipliciramo z uporabo več šob naenkrat. Prenos ER iz laboratorija na industrijski nivo je enostaven. Pomemben doprinos ER predstavlja možnost razprševanja s koaksialno šobo, ki v enem koraku omogoča izdelavo obloženih mikro- in nanodelcev (11, 15).

### **1.2.4 Vpliv parametrov na proces ter posredno na velikost in morfologijo delcev**

Številni parametri in njihova medsebojna povezanost predstavljajo kljub na pogled enostavnemu postopku velik izziv za izdelavo ponovljivega vzorca in izdelka z ozko porazdelitvijo velikosti.

#### **A) Parametri raztopine za elektrostatsko razprševanje**

##### **Vrsta, molekulska masa in porazdelitev molekulske mase polimera**

Za ER lahko uporabljamo različne sintezne ali naravne polimere, biti pa morajo biokompatibilni in biorazgradljivi. Biorazgradljivost je lahko posledica encimske ali hidrolitične razgradnje polimera v telesu. Najbolj proučevan hidrofoben polimer za ER je poliester mlečne in glikolne kisline (PLGA), sledita mu polikaprolakton (PCL) in poliglikolna kislina (PGA). Primerni sintezni hidrofilni polimeri za ER so polivinil pirolidon (PVP), polivinil alkohol (PVA) in polietilenglikol (PEG). Hidrofilni naravni polimeri, kot so npr. hitosan, kolagen, alginat, celuloza, želatina, so tudi ustrezni kandidati za ER (12, 23).

Molekulska masa (MW) in porazdelitev molekulske mase polimera, zaradi sočasnega vpliva na viskoznost, vplivata na kritično koncentracijo ( $c_{ov}$ ), ki je potrebna za prekrivanje polimernih verig. Ugotovili so, da večja molekulska masa povzroči zmanjšanje razmerja

$c/c_{ov}$  (razmerje koncentracije raztopine in kritične koncentracije za preplet verig) ter tako omeji območje primernih koncentracij za zadovoljivo prepletanje polimernih verig in s tem ponovljivo ER. Po drugi strani pa povečanje porazdelitve molekulske mase omogoči višjo mejo  $c/c_{ov}$  (nad faktor 3) in posredno širše koncentracijsko območje za doseganje zadostnega prepletanja verig polimera (12).

### **Dielektrična konstantna, električna prevodnost in parni tlak topila**

Dielektrična konstanta ( $\epsilon$ ) nam pove, koliko naboja lahko zadrži raztopina. Ugotovili so, da raztopine z večjo dielektrično konstanto omogočajo nastanek manjših delcev (12, 23).

Električna prevodnost raztopine ( $K$ ) vpliva na stabilizacijo curka in velikost delcev. Večja prevodnost raztopine povzroči, da se več električnega naboja prenese skozi šobo. To se kaže v večji moči elektrostatskih odbojnih sil in s tem tanjšem curku, kar posledično pomeni manjše delce. Hkrati pa se ob večji prevodnosti raztopine poveča nestabilnost in nihanje curka, kar vodi do širše porazdelitve velikosti delcev. Z zamenjavo topila ali dodatkom sotopil lahko raztopini spreminjamo prevodnost. Na splošno so organska topila manj prevodna kot vodna, jim pa prevodnost lahko povečamo z dodatkom elektrolitov. S povečevanjem prevodnosti zagotovimo tudi lažje pretrganje curka v kapljice (12, 24).

Parni tlak topila ( $p_0$ ) vpliva na izhlapevanje topila in s tem na osušenost delcev ter posledično na velikost in morfologijo. Pri uporabi slabo hlapnih topil z nizkim parnim tlakom (in visoko temperaturo vrelišča –  $T_v$ ) se polimerne verige med seboj lahko bolj prepletejo in skrčijo. Kot rezultat dobimo manjšo velikost in bolj gladko površino delcev (npr. DMF,  $T_v = 146$  °C). Obratno so ugotovili, da z uporabo dobro hlapnih topil (npr.  $\text{CHCl}_3$ ,  $T_v = 61$  °C) dobimo večje delce in bolj hrapavo površino. To je povezano s hitrejšim izhlapevanjem in posledično krajšim časom, da se polimerne verige, ki so izpostavljene visoki električni napetosti, skrčijo in ustrezno prerazporedijo. Hitrejše izhlapevanje lahko pomembno vpliva tudi na poroznost ali nastanek votlih delcev (12, 18, 24).

Za ER izberemo topila, v katerih sta želena učinkovina in polimer topna. Preglednica I prikazuje fizikalno-kemijske lastnosti topil, ki smo jih uporabili pri našem raziskovanju.

Preglednica I: Fizikalno-kemijske lastnosti topil (25).

TOPILO	Formula	MW (g/mol)	T vrelišča (°C)	T tališča (°C)	Gostota (g/mL)	Viskoznost (mPa s) (25 °C)	Dielektrična konstanta (20 °C)	Električna prevodnost (μS/cm)	Površinska napetost (mN/m; 20 °C)
Aceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58	56	-95	0,79	0,3	20,6	5*10 <sup>-3</sup>	23
Dimetilformamid	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	73	153	-61	0,95	0,8	36,7	6*10 <sup>-2</sup>	35
Dioksan	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88	101	12	1,03	1,3	2,2	5*10 <sup>-9</sup>	40
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46	78	-114	0,79	1,1	22,4	1,4*10 <sup>-3</sup>	22
Etilacetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88	77	-84	0,90	0,5	6,0	1*10 <sup>-3</sup>	24
Izopropanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60	82	-88	0,79	2,0	18,3	6*10 <sup>-2</sup>	22
Kloroform	CHCl <sub>3</sub>	119	61	-23	1,48	0,6	4,8	1*10 <sup>-4</sup>	27
Tetrahidrofuran	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72	66	-109	0,88	0,6	7,6	45	28
Voda	H <sub>2</sub> O	18	100	0	1,00	0,9	79,7	5*10 <sup>-2</sup>	73

### Koncentracija, viskoznost in površinska napetost raztopine polimera

Koncentracija raztopine ( $c$ ) in viskoznost ( $\eta$ ) igrata pomembno vlogo pri povezovanju (prepletanju) polimernih verig in posredno pri oblikovanju delcev. Kritična koncentracija za medsebojno prekrivanje verig ( $c_{ov}$ ) je točka, pri kateri je koncentracija raztopine enaka koncentraciji znotraj radija vrtenja posamične polimerne verige in je obratno sorazmerna intrinzični viskoznosti ( $\eta_i$ ). Da dobimo zadosti goste, sferične in trdne delce z ustrezno ponovljivostjo procesa je priporočljivo, da je koncentracija raztopine večja od  $c_{ent}$  – koncentracije, kjer se oblikuje značilna stopnja medsebojnega prepletanja («entanglement») verig. Hkrati mora biti razmerje  $c/c_{ov}$  manjše od 3, saj je v primeru večjega razmerja kohezija med posameznimi polimernimi verigami prevelika (močno prepletene verige polimera) in lahko nastanejo nanovlakna. Potrebna je torej zadosti majhna koncentracija in s tem majhna viskoznost, ki curku omogoča, da se prekine in razprši na kapljice (12, 23, 26).

Površinska napetost raztopine ( $\gamma$ ) ustvarja sile, ki vlečejo površino kapljice navznoter. Pri ER električna napetost zagotovi potreben električni naboj in ustvarja elektrostatske sile, ki premagujejo sile površinske napetosti in omogočijo razprševanje. Pri večji površinski napetosti lahko izdelamo manjše delce. Ugotovili pa so tudi, da mora biti površinska napetost tekočine manjša od 50 mN/m, sicer tekočina ne bo podlegla elektrohidrodinamski atomizaciji (12, 24).

## **B) Procesni parametri**

**Električna napetost** ( $\Delta U$ ) pomembno vpliva na obliko stožca, ki se oblikuje na konici šobe. Z naraščanjem napetosti sorazmerno narašča električni tok in naboj na kapljicah ter v skladu z Rayleighovo enačbo pada premer nastalega curka (19). Ko imamo en stabilen curek, povečanje napetosti malo vpliva na zmanjšanje velikosti delcev. Z večanjem napetosti se lahko spremeni morfologija delcev; iz sferičnih delcev pridemo do raztegnjenih delcev ali celo nanovlaken (seveda ob zadostni koncentraciji polimera) (12).

**Hitrost pretoka raztopine** ( $Q$ ) odločilno vpliva tako na morfologijo kot tudi na velikost delcev. Splošno pravilo je, da mora biti hitrost pretoka dovolj majhna, da omogoča popolno izhlapevanje topila med procesom ER, saj v primeru le delnega izhlapevanja dobimo na zbiralu nesuhe, deformirane delce. Poleg tega s povečevanjem hitrosti pretoka narašča velikost nastalih delcev in hkrati nastanejo tudi spremljajoče, sekundarne kapljice, ki povzročijo širšo porazdelitev velikosti delcev (12, 24).

**Premer igle** ( $R$ ) ne vpliva značilno na morfologijo in velikost delcev, so pa ugotovili, da se z večanjem premera lahko zmanjša porazdelitev velikosti delcev (12).

**Razdalja od igle** (»injection«) **do zbirala** (»collector«) ( $IC$ ) je dejavnik, ki vpliva na izhlapevanje topila. Če je razdalja prekratka, topilo ne izhlapi popolnoma in pride do nabiranja kapljic ali neposušeni delcev na zbiralu ter široke porazdelitve velikosti. Povečanje razdalje lahko omogoči nastanek sferičnih delcev z ožjo porazdelitvijo velikosti, saj imajo polimerne verige več časa, da se enakomerno prepletejo po volumnu kapljice. Pri konstantni električni napetosti skrajšanje razdalje pomeni povečanje moči električnega polja, kar vodi do zmanjšanja velikosti delcev (12, 24).

**Temperatura** ( $T$ ), ki jo vzdržujemo med procesom ER, vpliva na hitrost izhlapevanja topila in viskoznost polimerne raztopine. Višja kot je temperatura, hitreje je izhlapevanje topila, kar se kaže v večjih delcih. Vpliv temperature na viskoznost raztopine je obraten, saj je viskoznost pri višji temperaturi običajno nižja (formiranje manjših delcev) (23).

**Relativna vlažnost** ( $RH$ ) vpliva na hitrost izhlapevanja topila in posledično na morfologijo in velikost delcev. V primeru hidrofobnih polimerov (npr. PCL, PGA, PLGA), raztopljenih v organskem topilu, višja relativna vlažnost povzroči, da vlaga kondenzira na površini in vodi do nastanka porozne strukture delcev. V primeru vodnih raztopin hidrofilnih polimerov (npr. PVP, PVA, PEG, hitosan) je pri nizki relativni vlažnosti izhlapevanje

topila hitrejša, kar povzroči, da se delci strdijo v krajšem času in so izpostavljeni visoki napetosti krajši čas, kar vodi do večjih delcev. Ali nasprotno, solidifikacija je pri višji relativni vlažnosti počasnejša, saj je izhlapevanje počasnejše in na voljo je več časa, da se kapljice pod vplivom električnega polja izoblikujejo. To lahko zagotovi manjšo velikost nastalih delcev, a po drugi strani tudi večjo verjetnost, da na zbiralu dobimo mokre delce, ki so med seboj zlepljeni (23).

**Hitrost pretoka zraka** v komori, kjer poteka ER mora biti čim bolj konstantna, da omogočimo stabilno ER in da se čim več nastalega produkta zbere na želenem mestu (zbiralu). Nekatere naprave za ER imajo pretok zraka usmerjen v posebne filtre, kjer se zbira vzorec. Ugotovili so, da se s kontrolo nad pretokom zraka zmanjša hitrost izhlapevanja topila, in ob tem lažje nastanejo gladki in tudi manjši delci. Pri ER vodnih raztopin, kjer je značilen in pogost pojav razelektritve (korona), priporočajo inertno atmosfero (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar) ali vakuum (21).

### **1.2.5 Elektrostatsko razprševanje in vgrajevanje učinkovin**

ER z enokanalno šobo je primerno za izdelavo mikro- in nanosfer. ZU pred začetkom razprševanja raztopimo v raztopini polimera. Med procesom ER in potovanja kapljic raztopine do zbirala, se kapljice razpršijo, topilo izhlapi in nastanejo delci z enakomerno porazdeljeno ZU po polimernem ogrodju (24).

ER s koaksialno šobo omogoča izdelavo obloženih mikro- in nanokapsul. Za proces potrebujemo dve igli (ena v drugi) ter povezavo z dovodom raztopine ZU z notranjo in polimerne raztopine za ovojnico z zunanjo iglo (27). Pri ER s koaksialno šobo nastanejo delci z rezervoarjem ZU v notranjosti in oblogo v zunanosti. Za uspešen nastanek kapsul mora biti hitrost pretoka v zunanji igli, ki kontrolira nastanek lupine, večja kakor hitrost pretoka skozi notranjo iglo (23). Ugotovili so tudi, da ima ER s koaksialno šobo zadovoljivo visoke izkoristke vgrajevanja učinkovin (12, 13, 24).

### 1.3 VREDNOTENJE VELIKOSTI IN MORFOLOGIJE MIKRODELCEV

Glavni cilji inženiringa delcev ZU so izdelati delce z ustrezno velikostjo in ozko porazdelitvijo velikosti, izboljšati njihovo topnost in s tem povečati biološko uporabnost, izboljšati stabilnost in kontrolirati sproščanje ali tarčno ciljati na mesto delovanja ZU (28). Pri tem je ključnega pomena vrednotenje velikosti in morfologije delcev (12). V preglednici II so zbrane najpogosteje uporabljane analizne metode, s katerimi lahko ovrednotimo velikost ter morfološke in kemijske lastnosti mikro- in nanodelcev.

*Preglednica II: Analizne metode za vrednotenje mikro- in nanodelcev (23).*

Okrajšava	Angleško in slovensko poimenovanje	Uporaba
SEM	<b>Scanning Electron Microscopy</b> Vrstična elektronska mikroskopija	
FI-SEM	<b>Field Emission Scanning Electron Microscopy</b> Vrstična elektronska mikroskopija s hladnim virom elektronov na poljsko emisijo	
TEM	<b>Transmission Electron Microscopy</b> Presevna elektronska mikroskopija	Premer delcev, morfološke lastnosti, prisotnost por, hrapavost površine delcev
AFM	<b>Atomic Force Microscopy</b> Mikroskopija na atomsko silo	
SWLI	<b>Scanning White Light Interferometry</b> Vrstična interferometrija z belo svetlobo	
PALS	<b>Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy</b> Pozitronska anihilacijska spektroskopija	Določitev poroznosti delcev
BET	<b>Brunauer-Emmet-Teller Surface Area Analysis</b> BET analiza površine	
ATR IR	<b>Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy</b> Infrardeča spektroskopija z oslavljenim odbojem	
FT IR	<b>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</b> Analiza z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo	Kemijska in fizikalna struktura, določanje intermolekularnih interakcij
NMR	<b>Nuclear Magnetic Resonance</b> Jedrska magnetna resonanca	
DSC	<b>Differential Scanning Calorimetry</b> Dinamična diferenčna kalorimetrija	Določanje kristaliničnosti, natančna analiza molekulske strukture (oblika makromolekul)
WAXS/SAXS	<b>Wide-angle (Small-angle) X-ray Scattering</b> Optična dvojna refrakcija s širokokotnim (ozkokotnim) rentgenskim sipanjem	

## 2 NAMEN DELA

Majhna ponovljivost že znanih in proučevanih metod za izdelavo mikro- in nanodelcev se velikokrat izrazi v variabilnosti velikosti in morfologije, kar se pogosto odraža v neustreznih biofarmaceutskih lastnostih. Elektrostatsko razprševanje predstavlja inovativno tehnološko metodo za izdelavo mikrodelcev, zato smo si zastavili tri bistvene cilje:

- 1. spoznati elektrostatsko razprševanje teoretično in eksperimentalno,**
- 2. uporabiti metodo načrtovanja eksperimentov (»DoE – Design of Experiments«) za ovrednotenje vpliva različnih parametrov na velikost in morfologijo delcev,**
- 3. izdelati mikrodelce, ki bi bili primerni za nadaljnje vgrajevanje v farmacevtske oblike (npr. kapsule, tablete, praški za inhaliranje).**

Glavni cilj raziskovanja bo izdelava mikrodelcev z vgrajeno protibakterijsko učinkovino, ki bi jih zaradi velikosti od 1 do 5  $\mu\text{m}$  lahko vgradili v farmacevtske oblike za inhaliranje pri zdravljenju okužb dihal.

Prvi sklop bo obsegal preliminarne poskuse in literaturni pregled, katerih namen je spoznati osnove elektrostatskega razprševanja uporabljenih sistemov (topljenec – topilo). Pri tem bomo spreminjali procesne parametre in določili razmere, pri katerih bo možno izdelovati delce. Delcem bomo vrednotili velikost in preverjali morfološko zgradbo z optičnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom ter retrogradno optimizirali parametre.

V drugem sklopu bomo proučevali formulacijske parametre in v povezavi s procesnimi spremenljivkami ugotavljali velikost in morfologijo delcev. V tem delu bomo pridobili informacijo o mejah parametrskega prostora, ki jih bomo potrebovali v tretjem sklopu. Kot pomožne snovi bomo v raziskavo vključili hidrofobni polikaprolakton in hidrofilni polivinil piroolidon, ki sta biorazgradljiva in biokompatibilna polimera ter laktozo. Kot modelne učinkovine bomo vgrajevali v vodi slabo topna klaritromicin in ciprofloksacin ter metronidazol. S spreminjanjem parametrov se bomo lotili inženiringa delcev.

V tretjem sklopu bomo naredili serijo eksperimentov po metodi načrtovanja eksperimentov, kjer bomo uporabili polni faktorski načrt. Za zasnovano eksperimentov in obdelavo podatkov bomo uporabili programski paket MiniTab<sup>®</sup> 17 (»DoE – Design of Experiments«), kjer bomo na podlagi variiranja procesnih in formulacijskih parametrov in obdelave odzivov postavili matematični model ter ocenili vpliv parametrov na končne mikrodelce. Postavljeni model bomo uporabili kot pomoč pri iskanju optimalnih razmer ER za nastanek zelenih delcev.



### **3 EKSPERIMENTALNI DEL**

#### **3.1 MATERIALI**

- Aceton ( $C_2H_6CO$ ), Merck KGaA, Nemčija
- Dimetilformamid ( $C_3H_7NO$ ), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Dioksan ( $C_4H_8O_2$ ), Merck KGaA, Nemčija
- Etanol ( $C_2H_5OH$ , 96 %, ustreza Ph. Eur), Kefo, Slovenija
- Etilacetat ( $CH_3COOC_2H_5$ ), Merck KGaA, Nemčija
- Izopropanol ( $C_3H_7OH$ ), Merck KGaA, Nemčija
- Kloroform ( $CHCl_3$ ), Merck KGaA, Nemčija
- Klorovodikova kislina (1M HCl), titrival Merck KGaA, Nemčija
- Ocetna kislina ( $CH_3COOH$ ,  $\geq 99,8\%$ ), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Prečiščena voda, pripravljena na UL-Fakulteti za farmacijo
- Tetrahidrofuran ( $C_4H_8O$ ), Carlo Erba Reagents, Francija
  
- Ciprofloksacin ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Klaritromicin ( $C_{38}H_{69}NO_{13}$ ), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Laktoza NF 200 MESH ( $C_{12}H_{24}O_{12}$ ), Lek d.d., Slovenija
- Metronidazol ( $C_6H_9N_3O_3$ ), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Polikaprolakton (MW  $\approx 80000$  g/mol), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemčija
- Polivinil pirolidon K25 (MW  $\approx 24000$  g/mol), Lek d.d., Slovenija
  
- Aluminijska folija (0,030 x 300 mm), Labor
- Filter papir (debelina 0,28 mm)
- Injekcijske brizge (5 mL), B. Braun Melsungen AG, Nemčija
- Prevodni ogljikov trak (premer 12 mm) Oxon, Oxford Instruments, Velika Britanija

#### **3.2 NAPRAVE**

- Digitalna tehtnica, Sartorius CP3202S, Nemčija
- Invertni svetlobni mikroskop, CKX41 Olympus, Japonska
- Magnetno mešalo, IKA GmbH, Nemčija
- Merilnik temperature in vlažnosti zraka, Testo 608-H1, Velika Britanija

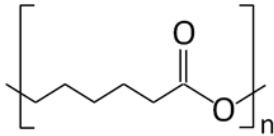
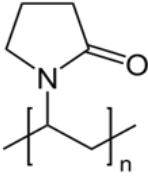
- Naprava za elektrostatsko razprševanje, FluidnaTek E100, Španija
- Naprava za merjenje električne prevodnosti, Mettler Toledo MC226, Švica
- Vrstični elektronski mikroskop, SEM Supra 35 VP, Nemčija

### 3.3 METODE

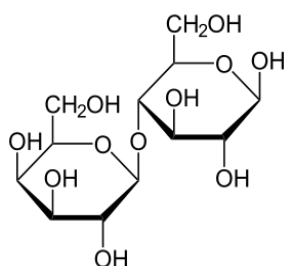
#### 3.3.1 Sestava in priprava polimernih raztopin brez učinkovine in z njo

V raziskovalno delo smo vključili dva polimera, in sicer polikaprolakton (PCL) in polivinil pirolidon (PVP). Njune značilnosti so prikazane v preglednici III.

*Preglednica III: Lastnosti uporabljenih polimerov (24, 29, 30, 31).*

	POLIKAPROLAKTON (PCL)	POLIVINIL PIROLIDON (PVP)
STRUKTURNA FORMULA		
POVPREČNA MOLEKULSKA MASA (g/mol)	3000–80000	2500–2500000
POVRŠINSKE LASTNOSTI	<b>Hidrofoben</b> , semikristaliničen	<b>Hidrofilen</b> , higroskopen, amorfen
MEHANSKA ODPORNOST	Velika	Majhna
GOSTOTA (g/cm <sup>3</sup> )	1,1	1,2
TOPNOST	Dobro topen: kloroform, diklorometan, toluen, benzen, cikloheksanon; Slabo topen: aceton, etilacetat, 2-butanon, dimetilformamid, acetonitril; Netopen: alkoholi, dietileter, voda	Dobro topen: voda, alkoholi, diklorometan, cikloheksanol, etilendiamin, očetna kislina; Slabo topen: aceton; Netopen: etilacetat, dietileter, pentan, cikloheksan, toluen, ksilen
UPORABA V FARMACIJI	Tkivno inženirstvo, izdelava dostavnih sistemov za nadzorovano sproščanje proteinov in peptidov	Vezivo, razgrajevalo, stabilizator, adsorbent
BIOLOŠKA RAZGRADNJA	Počasna hidrolitična in encimska razgradnja	Hidrolitična razgradnja
BIOKOMPATIBILNOST	✓	✓

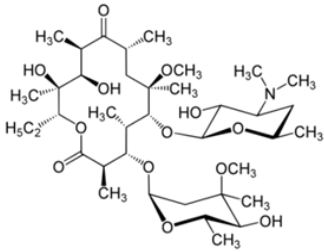
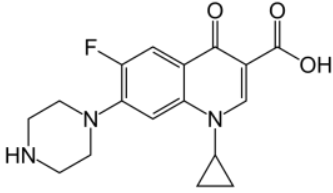
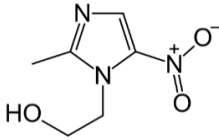
Preskušali bomo tudi ER raztopin laktoze. Laktoza ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) je disaharid z molekulsko maso 342,3 g/mol. Tvorita jo glukoza in galaktoza, ki sta povezani z glikozidno vezjo  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 (slika 5). Je nizko higroskopsna snov, ki je dobro topna v vodi. Zaradi dobrih pretočnih lastnosti je  $\alpha$ -laktoza monohidrat najpogostejša pomožna snov, ki jo uporabljamo kot nosilec za ZU in polnilo pri izdelavi suhih praškov za inhaliranje, saj izboljša hidrodinamske lastnosti in zmanjša nastanek aglomeratov. Druge prednosti laktoze so: dobro raziskan toksični profil, fizikalna in kemijska stabilnost, kompatibilnost z učinkovinami, široka dostopnost in nizka cena (28, 32).



Slika 5: Strukturna formula laktoze.

V načrtovanje in izdelavo delcev smo vključili tudi protibakterijske učinkovine klaritromicin (KMC), ciprofloksacin (CIP) in metronidazol (MNZ) (preglednica IV). Za prvi dve je značilno, da imata izredno nizko topnost v vodi (KMC je v razredu II po BCS, CIP pa v razredu IV). Metronidazol je v razredu I po BCS.

Preglednica IV: Strukturne formule proučevanih antibiotikov.

KLARITROMICIN	CIPROFLOKSACIN	METRONIDAZOL
		
<p>Makrolidni antibiotik MW: 748 g/mol</p>	<p>Fluorokinolon MW: 331 g/mol</p>	<p>Derivat nitroimidazola MW: 171 g/mol</p>

**Klaritromicin** ( $C_{38}H_{69}NO_{13}$ ) je bel kristalen prah, ki je dobro topen v acetonu in diklorometanu, slabo v metanolu in praktično netopen je v vodi (1,7 mg/L, 25 °C (32)). Uporabljamo ga za zdravljenje okužb dihal, kože in podkožnega tkiva. Spekter delovanja

KMC zajema grampozitivne bakterije (*S. pneumoniae*), gramnegativne bakterije (*N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*), spirohete in klamidije, *Mycoplasma*, *Legionella*, *M. avium*, *M. leprae* ter nekatere atipične mikobakterije. Deluje bakteriostatično, saj se veže na podenoto 50S bakterijskih ribosomov, kar onemogoča sintezo beljakovin ter posledično rast bakterij. Na nekatere mikroorganizme pa ima baktericiden učinek. Biološka uporabnost KMC po peroralni aplikaciji je **približno 50 %**. Presnavlja se pretežno v jetrih in izrazit je učinek prvega prehoda. Razpolovni čas znaša 3 do 7 h (34).

**Ciprofloksacin** ( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ) je bel do blede rumen kristalen prah, ki se raztoplja v alkoholih in diklorometanu. Praktično ni topen v vodi (30,0 mg/L, 20 °C (35)). Pri nevtralnem pH je namreč najslabše topen (izoelektrična točka pri pH 7,42). V kislih in bazičnih raztopinah pa je dobro topen. Najpogostejša sol za peroralno aplikacijo je ciprofloksacinijev klorid. CIP je najširše uporaben fluorokinolon druge generacije, saj ima širok spekter delovanja. Aktiven je tako proti grampozitivnim, kot tudi gramnegativnim bakterijam. Uporabljamo ga predvsem za zdravljenje okužb dihal (npr. pljučnice, ki jo povzročijo *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Branhamella*, *Legionella*, *Staphylococcus*), srednjega ušesa in sinusov, oči, ledvic, kože in mehkih tkiv, trebušne votline, kosti, sklepov. Deluje tako, da inhibira DNA girazo in topoizomerozo IV ter posledično zavira delitev bakterijskih celic. Biološka uporabnost po peroralni aplikaciji znaša **približno 70 %**, razpolovni čas pa približno 4 h (36).

**Metronidazol** ( $C_6H_9N_3O_3$ ) kot protimikrobno učinkovino uporabljamo v terapiji že več kot 45 let. Na pogled gre za bele kristale, brez vonja, ki so slabo topni v vodi, alkoholu, acetonu in diklorometanu. Antibiotik je primeren za zdravljenje anaerobnih bakterijskih okužb (npr. periodontalne in respiratorne okužbe, ginekološke in abdominalne okužbe, okužbe osrednjega živčnega sistema, bakteriemija, sepsa, endokarditis, okužbe kosti, sklepov, kože in mehkih tkiv), ki jih povzročajo različne gram pozitivne ali gram negativne bakterije (npr. *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*). MNZ je predzdravilo in sicer se nitro skupina po vstopu v celico anaerobnih bakterij reducira in nastanejo radikali, ki poškodujejo DNA bakterij. Biološka uporabnost po per os aplikaciji je **dobra (90 do 100 %)**, presnavlja se v jetrih in razpolovni čas znaša 8 h (37).

## **Priprava raztopin za elektrostatsko razprševanje**

Raztopine pomožnih snovi (PCL, PVP, laktoza) in učinkovin (KMC, CIP, MNZ) smo pripravili tako, da smo znano količino pomožne snovi natehtali (Sartorius CP3202S, Nemčija) v bučko z obrusom in dodali potrebno količino izbranega topila, pokrili s pokrovčkom in mešali na magnetnem mešalu, dokler nismo dobili bistre raztopine. Za hitrejše raztapljanje polimera smo temperaturo mešanja povišali na 40 do 50 °C. Če smo v raztopini opazili kakršnekoli delce, ki bi lahko zamašili iglo in vplivali na spreminjanje pretoka raztopine, smo raztopino pred injiciranjem filtrirali skozi filter papir (debelina papirja: 0,28 mm).

Za pripravo raztopin smo izbrali topila na podlagi topnosti ZU ali pomožne snovi. V prvi vrsti smo skušali izbrati dovolj dobro hlapna organska topila, da bi se izognili možnim nadaljnjim težavam pri ER (nezadostno izhlapevanje topila namreč ne daje trdnih delcev). Podatke za topnost snovi v določenem topilu smo na začetku poiskali v različnih literarnih virih. Če podatka nismo našli, smo določili topnost sami, tako da smo majhno, a znano količino ZU dali v izbrana topila, mešali, včasih tudi segrevali (npr. pri raztapljanju PCL v acetonu) in po 24 urah pregledali vzorec. Če se učinkovina ali polimer ni raztopil, smo raztopini dodali topilo, v katerem je ZU ali polimer dobro topen (npr. PVP je v acetonu slabo topen, zato smo acetonski raztopini dodali nekaj mL etanola, v katerem se ta polimer dobro raztaplja; ali npr. CIP ni topen pri nevtralnem pH, zato smo morali dodati nekaj mL kisline, da smo tvorili sol in omogočili raztapljanje). Kjer je bilo s stališča topnosti sprejemljivo, smo za ER uporabili različna topila ali mešanico topil.

Sestava raztopin je podana v utežno-volumskih odstotkih, ki podajajo maso polimera ali maso ZU (v g) na 100 mL topila. Pri nekaterih raztopinah so bili, kot že omenjeno, za zagotovitev topnosti PS ali ZU potrebni dodatki. Za zagotovitev topnosti PVP v acetonu smo raztopini dodali 96-odstotni etanol. Da se je CIP raztopil v vodi, smo raztopini dodali klorovodikovo kislino (1M), v kloroformne raztopine CIP pa očetno kislino. Dodatke smo dodali po kapljicah naknadno, ko smo opazili, da se snov ni popolnoma raztopila v izbranem topilu. Posledično se je zmanjšal volumski delež PS ali ZU. Preglednice, kjer so navedene sestave raztopin, podajajo tudi celokupni volumen (končne) raztopine ( $V_R$ ).

### 3.3.2 Predstavitev naprave za elektrostatsko razprševanje

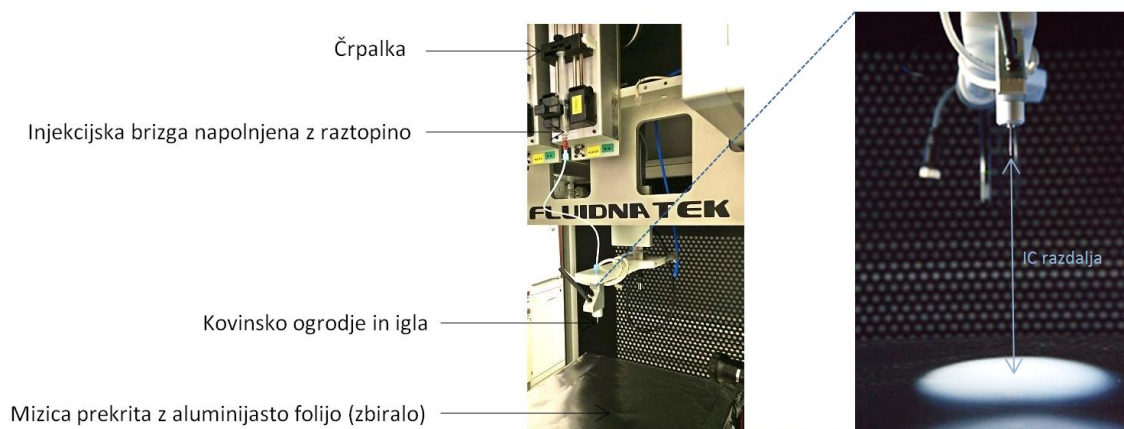
Naprava FLUIDNATEK LE-100 je namenjena izdelavi delcev z metodo ER. Sestavljata jo komora za razprševanje in računalniško vodena krmilna enota (slika 6).



Slika 6: Naprava FLUIDNATEK LE-100 za elektrostatsko razprševanje.

Komora omogoča konstantne pogoje dela (temperatura, relativna vlažnost, hitrost pretoka zraka) in preprečuje kontaminacijo vzorca. Dejanske vrednosti procesnih parametrov sproti preverjamo na zaslonu.

Slika 7 prikazuje ključne dele naprave za ER: črpalko in injekcijsko brizgo, ki je s cevko povezana z ogrodjem, v katerega je privita kovinska igla. Ogrodje je nameščeno na nosilec, s pomočjo katerega smo prilagajali oddaljenost šobe od kovinske mizice (IC razdalja). Pripravljenim raztopinam smo pri procesu ER spreminjali in ponastavljali različne procesne parametre: temperaturo, relativno vlažnost, premer igle, oddaljenost igle od zbirala, hitrost pretoka raztopine in električno napetost.



Slika 7: Ključni deli naprave za elektrostatsko razprševanje.

## **Delo na napravi za elektrostatsko razprševanje**

Pred začetkom procesa ER smo na kovinsko mizico položili aluminijasto folijo po vsej površini (negativno nabito zbiralo). Ogrodje, v katerega smo privili kovinsko iglo, smo s cevko povezali z brizgo, napolnjeno brizgo pa namestili na črpalko. Naprava omogoča uporabo igel različnih premerov. V ogrodje šobe smo vstavili kabel, ki je bil povezan z generatorjem pozitivne napetosti. V komori je nameščena tudi kamera, ki omogoča, da lahko na ekranu opazujemo stožec, ki se oblikuje na konici igle, in s tem stabilnost procesa. Na zbiralu smo po nekaj minutnem ER opazili prisotnost lise (vzorec delcev). *Prilogi I in II* predstavljata seznam procesnih nastavitvev, ki smo jih uporabili za pripravljene raztopine.

### **3.3.3 Določanje velikosti in morfologije delcev**

Na začetku raziskovanja smo vzorce pregledovali z optičnim mikroskopom, da smo grobo ocenili vzorec na zbiralu (ali so delci ali kapljice) in po potrebi modificirali formulacijske in procesne parametre. Na videz primerne vzorce smo ovrednotili še z elektronskim vrstičnim mikroskopom. Vzorce za analizo smo pripravili tako, da smo iz aluminijaste folije z vzorcem izrezali kvadratke velikosti  $5 \times 5$  mm in jih z obojestranskim ogljikovim lepilnim trakom pričvrstili na nosilce. SEM slike smo posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35 VP, z uporabo sekundarnega detektorja pri pospeševalni napetosti 1,00 kV, in jih analizirali z računalniškim programom ImageJ 1.44p.

### **3.3.4 Analiza podatkov in načrtovanje eksperimentov**

Z računalniškim programskim paketom MiniTab<sup>®</sup> 17, ki ga uporabljamo za statistično analizo podatkov, smo želeli preveriti, kako procesne in formulacijske spremenljivke vplivajo na velikost mikrodelcev CIP, izdelanih z ER kloroformnih raztopin CIP. Preliminarne rezultate, ki so nam omogočili izdelavo sferičnih delcev velikosti 1 do 5  $\mu\text{m}$ , smo vnesli v program in obdelali podatke. Na podlagi 16 vzorcev, ki smo jim spreminjali koncentracijo raztopine, temperaturo v komori, oddaljenost igle od zbirala in hitrost pretoka raztopine, smo postavili model za izdelavo mikrodelcev ciprofloksacina in ob tem preverili, kako omenjeni dejavniki vplivajo na povprečni premer delcev ( $\gg$ DoE, Full Factorial 2-Level Analysis $\ll$ ). Program je določil zanesljivost modela ( $R^2$ ) in izrisal grafe za predstavitev rezultatov. Model smo na koncu še optimizirali in preverili.

## **4 REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **I. Začetni poskusi in načrtovanje procesnih parametrov**

#### **4.1 PREVERJANJE POGOJEV V NAPRAVI FLUIDNATEK LE-100**

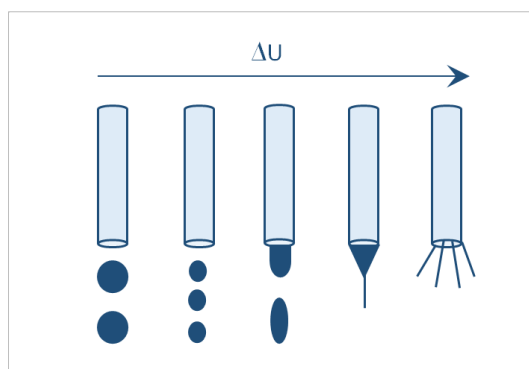
Ker smo bili na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo prvi, ki smo uvajali novo napravo za elektrostatsko razprševanje, FLUIDNATEK LE-100, smo na začetku preverili njeno delovanje v smislu zagotavljanja ustrezne temperature in relativne vlažnosti, saj lahko ta dva dejavnika pomembno vplivata na sam proces in njegovo ponovljivost. Na napravi za elektrostatsko razprševanje smo nastavili želeni vrednosti za temperaturo (25 °C) in relativno vlažnost (45 %) v procesni komori. V komoro smo postavili kalibriran merilnik temperature in vlažnosti zraka Testo 608-H1 (Testo Limited). Ko so se pogoji ustalili, smo primerjali vrednosti na zaslonu naprave in termo-higrometru. Stabilnost pogojev smo preverili s postavitvijo termo-higrometra na različna mesta v procesni komori. Tako smo se prepričali, da naprava zagotavlja nastavljene pogoje in zaslon kaže vrednosti s predvidenim odstopanjem proizvajalca ( $T \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $\text{RH} \pm 5 \text{ } \%$ ).

#### **4.2 VPLIV PARAMETROV NA STABILNOST PROCESA IN VELIKOST DELCEV**

Velikost delcev, izdelanih z ER, lahko variira od nekaj deset  $\mu\text{m}$  do nekaj deset nm. Z ustrezno nastavitvijo parametrov lahko zagotovimo tudi ozko porazdelitev velikosti (oz. relativni standardni odklik (RSD) 2 do 27 % od povprečne velikosti delcev) (12).

Da dobimo stabilno ER moramo zagotoviti Taylorjev stožec. Z razprševanjem raztopin smo med opazovanjem procesa ugotovili, da se s povečevanjem električne napetosti (od 0 kV do približno 15 kV za organska topila) med iglo in zbiralom, ob konstantnem pretoku, spreminja oblika curka, kot prikazuje slika 8. Če ni električne napetosti, raztopina iz šobe kaplja. Ko so elektrostatske sile dovolj velike, se izoblikuje curek in nato stožec. Pri previsoki električni napetosti lahko nastane več tankih curkov, ki oscilirajo v različne smeri. Podobne izkušnje so objavili Cloupeau et al. 1994; Jaworek and Krupa 1999; Chen et al. 2005; Yurteri et al. 2010 (12, 17).





Slika 8: Spreminjanje curka raztopine ob povečevanju električne napetosti.

Na stabilnost oblikovanega stožca vplivata hitrost pretoka raztopin in razdalja igle od zbirala. Za vsako raztopino posebej je potrebno poiskati ustrezne nastavitve, ki zagotavljajo stabilnost curka. Hitrost pretoka smo pri večini raztopin spreminjali in opazili, da je pri manjših pretokih (do 1 mL/h) proces splošno bolj stabilen. Ugotovili smo tudi, da potrebujemo pri daljši razdalji med iglo in zbiralom in pri enaki hitrosti pretoka višjo električno napetost, da zagotovimo enako moč električnega polja in s tem stabilen proces. Temperatura in relativna vlažnost ne vplivata bistveno na oblikovanje stožca.

Na osnovi dobljenih meritev in podatkov iz literature, smo v preglednici V razvrstili parametre, ki prispevajo k zmanjšanju velikosti delcev potem, ko že imamo stabilen curek. Če lahko pri določenem parametru tako večanje kot tudi manjšanje vrednosti pripelje do zmanjšanja velikosti delcev, sta v preglednici V prikazani puščici v obe smeri.

Preglednica V: Spreminjanje parametrov, ko želimo manjšo velikost delcev (12, 24).

LASTNOSTI RAZTOPINE		PROCESNI PARAMETRI		RAZMERE V KOMORI	
Vrsta polimera	↑↓	Premer šobe	↑↓	Hitrost pretoka zraka	↑↓
Koncentracija raztopine	↓	Aplicirana napetost	↑	Temperatura	↑↓
Molekulska masa polimera	↓	Hitrost pretoka raztopine	↓	Relativna vlažnost	↑↓
Viskoznost raztopine	↓	Razdalja od šobe do zbirala	↑		
Prevodnost raztopine	↑				
Površinska napetost raztopine	↑				
Dielektrična konstanta topila	↑				
Hlapnost topila	↓				

## II. Proučevanje in postavitve parametrskega prostora ER

### 4.3 VELIKOST IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI DELCEV POMOŽNIH SNOVI

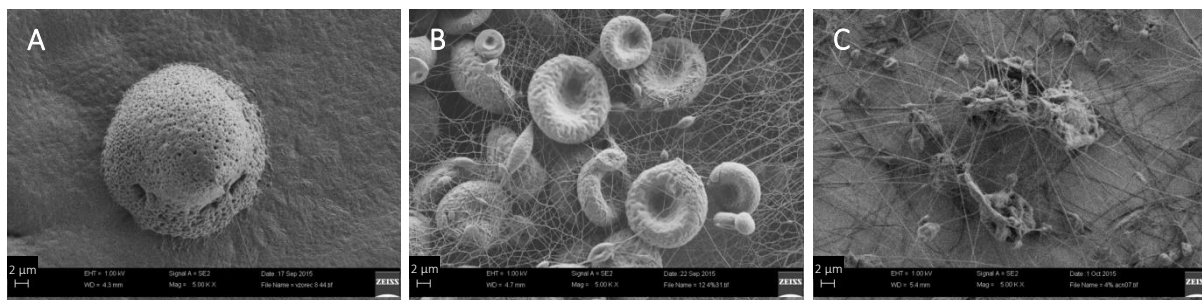
#### 4.3.1 Lastnosti polikaprolaktonskih mikrodolcev, izdelanih z ER

Da smo ugotovili, pod kakšnimi pogoji ER nastanejo PCL mikrodolci, smo v proučevanje vključili različno koncentrirane raztopine PCL v različnih topilih (preglednica VI).

*Preglednica VI Sestava proučevanih raztopin PCL za ER (✓ – da, × – ne).*

Oznake raztopin	TOPILO	PS	m/V (%)	Izdelava mikrodolcev
PCL1	kloroform	PCL	0,5	×
PCL2	kloroform	PCL	1	×
PCL3	kloroform	PCL	2	×
PCL4	kloroform	PCL	4	✓
PCL 5	acetone	PCL	0,5	×
PCL6	acetone	PCL	1	×
PCL7	acetone	PCL	2	×
PCL8	acetone	PCL	4	×
PCL9	kloroform/acetone (1 : 1)	PCL	0,5	×
PCL10	kloroform/acetone (1 : 1)	PCL	1	×
PCL11	kloroform/acetone (1 : 1)	PCL	2	×
PCL12	kloroform/acetone (1 : 1)	PCL	4	×

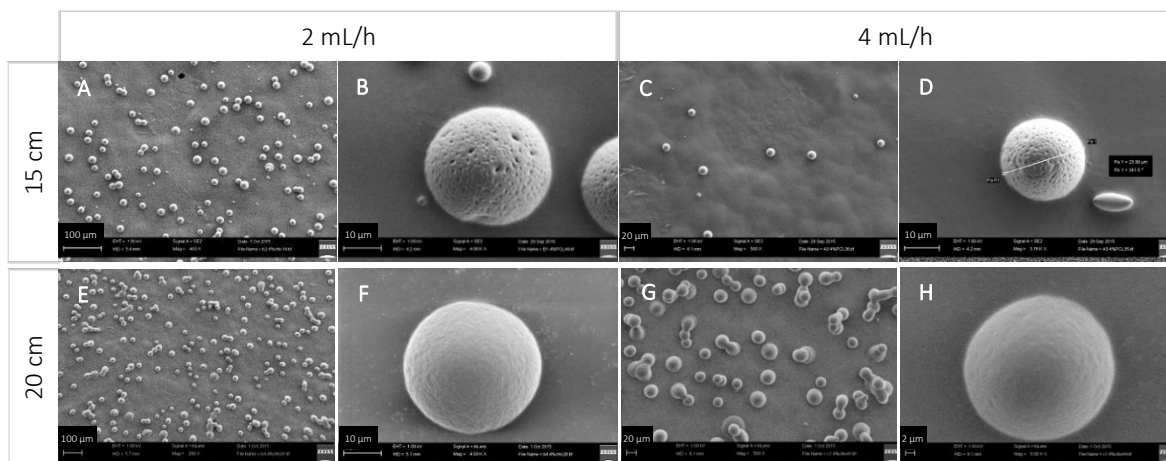
Pri ER 4-odstotne raztopine PCL ima topilo odločilno vlogo. PCL, raztopljen v kloroformu, daje sferične, porozne delce (slika 9 A), medtem ko je dodatek acetona povzročil nastanek stanjšanih delcev in hkrati tanke mreže (slika 9 B). Z uporabo samega acetona pa so nastala tanka vlakna z vozli nepravilnih oblik (slika 9 C).



*Slika 9: Produkt ER 4-odstotne raztopine PCL;  $T = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 30\%$ ,  $IC = 15\text{ cm}$ , uporabljeno topilo: A – kloroform ( $Q = 6\text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 11\text{ kV}$ ), B – kloroform/acetone (1 : 1) ( $Q = 6\text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 13\text{ kV}$ ), C – acetone ( $Q = 4\text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 14\text{ kV}$ ).*

Yao J. s sodelavci je v raziskavi dokazal, da za pripravo sferičnih polimernih mikrodelcev z metodo elektrostatskega razprševanja izhlapevanje topila ne sme biti prehitro (38). Kloroform izhlapeva malo počasneje kot aceton in je omogočil nastanek sferičnih delcev. Aceton, ki ima nižjo temperaturo vrelišča, izhlapeva hitreje in daje delce nepravilnih oblik. Z uporabo acetona tudi pri povišani temperaturi (45 °C) ER 0,5-odstotne raztopine PCL ni bilo uspešno, saj je bil proces zelo nestabilen.

Na nastanek delcev vpliva tudi koncentracija polimera PCL, saj z ER 0,5-, 1- in 2- odstotne kloroformske raztopine PCL nismo izdelali mikrodelcev, pač pa so bile na zbiralu prisotne posamezne in zlite kapljice. Pri 4-odstotni raztopini PCL (PCL4) smo spreminjali različne procesne parametre. Pri razdalji 15 cm smo pri najmanjšem preizkušanem pretoku (2 mL/h) pri različnih napetostih (7/8,5/11 kV) izdelali sferične delce (slika 10). Hitrost pretoka je vplivala na zahtevano električno napetost, saj smo pri večjem pretoku (4 mL/h) za stabilen curek in izdelavo delcev potrebovali višjo električno napetost (11 kV). Ko smo povečali razdaljo igle od zbirala na 20 cm, smo pri enakem pretoku potrebovali večjo električno napetost (tako pri 2 mL/h, kot tudi 4 mL/h je bilo potrebnih vsaj 11 kV). Pri obeh razdaljah je bila hitrost 6 mL/h prevelika za nastanek delcev.



Slika 10: Delci PCL, izdelani z ER 4-odstotne kloroformske raztopine pri  $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 25 % RH, IC razdalji 15 cm in 20 cm, pri hitrosti pretoka 2 mL/h in 4 mL/h,  $\Delta U = 11\text{ kV}$  (A, C, D), 7 kV (B), 13 kV (E, F, G, H).

Iz 4-odstotne raztopine PCL smo izdelali sferične delce PCL (velikost 15 do 25  $\mu\text{m}$ ), za kar je bila primerna temperatura 24 °C (30 % RH) ali 45 °C (25 % RH), razdalja igle od zbirala 15 do 20 cm, hitrost pretoka 2 do 4 mL/h in električna napetost 7 do 13 kV.

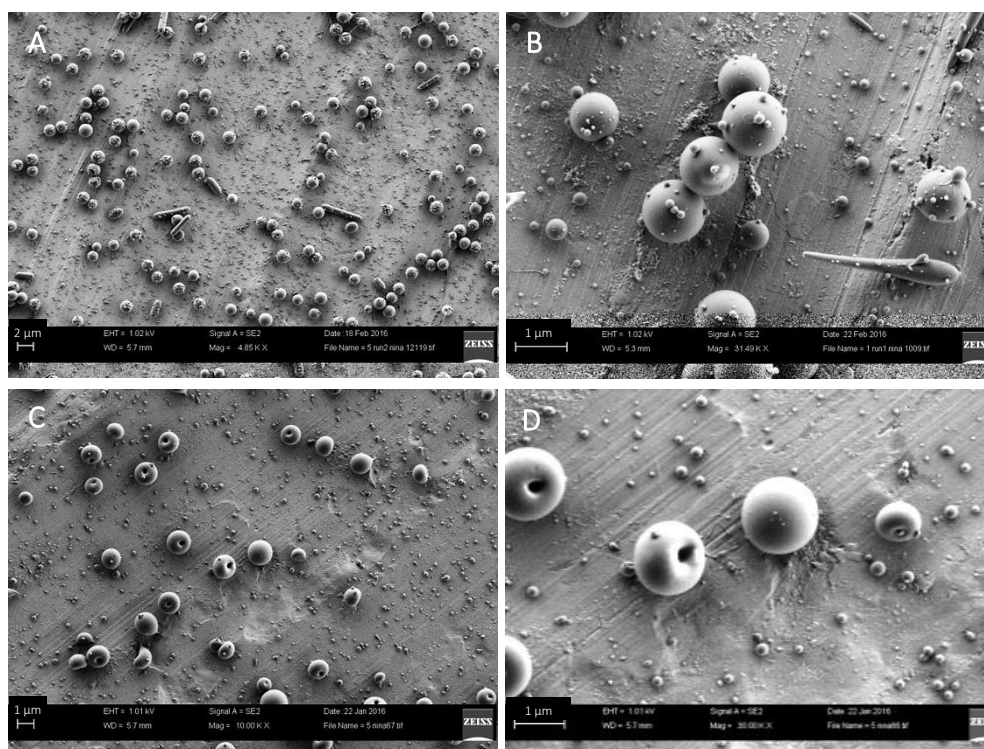
### 4.3.2 Lastnosti polivinilpirolidonskih mikrodelcev, izdelanih z ER

Drugi polimer, ki smo ga proučevali, je bil PVP. Za razliko od hidrofobnega PCL, gre v tem primeru za hidrofilen polimer, zato smo kot topilo uporabili aceton in dodatek etanola.

Preglednica VII: Sestava proučevanih raztopin PVP za ER (✓ – da, ✗ – ne).

Oznake raztopin	TOPILO	PS	m/V (%)	Dodatek	V <sub>R</sub> (mL)	Izdelava mikrodelcev
PVP1	aceton	PVP K25	1	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP2	aceton	PVP K25	4	1 mL EtOH (96 %)	51	✓

Ugotovili smo, da ima temperatura zelo pomemben vpliv na proces ER enoodstotne acetonske raztopine PVP (PVP1). Pri 25 °C in pri 35 °C je bil stožec na igli lepo oblikovan, ni pulziral, na zbiralu pa so nastajali mikrodelci (slika 11). Pri previsoki temperaturi (45 °C) je ER težavno, ker se polimer zaradi hitrejšega izhlapevanja topila hitro obarja na konici igle, curek je posledično nestabilen in na zbiralu nastajajo kapljice.



Slika 11: Delci, izdelani iz enoodstotne acetonske raztopine PVP, pri 25 °C, 45 % RH, IC = 15 cm; A – Q = 1 mL/h,  $\Delta U = 8,9$  kV, B – Q = 0,5 mL/h,  $\Delta U = 8,8$  kV in pri 35 °C, 21 % RH; C, D – Q = 1 mL/h,  $\Delta U = 8,5$  kV.

Izdelani delci so sferični, a se morfologija malo razlikuje glede na nastavljeno temperaturo, saj smo pri 25 °C izdelali popolnoma sferične mikrodelce z vmesnimi mikrometrskimi

paličicami, medtem ko pri delcih, izdelanih pri 35 °C, opazimo na sredini ugreznjeno luknjico, kar bi bilo lahko povezano s hitrejšim izhlapevanjem acetona pri povišani temperaturi. Opazimo tudi izrazito bimodalno porazdelitev velikosti delcev (slika 11). Izračunana povprečna velikost delcev in velik RSD sta primerljiva za obe nastavljeni temperaturi (preglednica VIII).

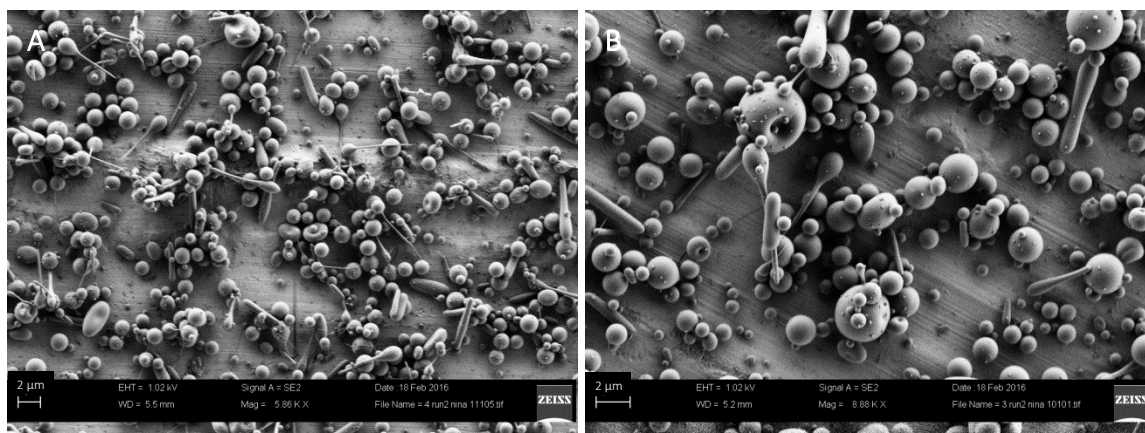
*Preglednica VIII: Povprečna velikost delcev, izdelanih iz enoodstotnega PVP v acetonu.*

Temperatura	Povprečna velikost delcev ( $d_{100}$ ) (nm)	RSD (%)	Povprečna velikost večjih delcev ( $d_{50}$ ) (nm)	RSD (%)	Povprečna velikost manjših delcev ( $d_{50}$ ) (nm)	RSD (%)
25°C	791,7	85,6	1443,2	17,2	140,3	23,6
35°C	719,1	81,3	1270,1	20,9	168,1	22,3

Če vrednotimo povprečno velikost manjših in večjih delcev posebej, se RSD zelo zmanjša, kar dodatno potrjuje bimodalno porazdelitev velikosti. Takšna porazdelitev je lahko posledica Coulombove eksplozije (razpad kapljic med potovanjem v nanometriške visoko nabite – sekundarne kapljice) (12, 39, 40, 41). Eksplozija primarnih kapljic na manjše nastopi, ko so sile, ki sodelujejo pri prepletanju polimernih verig, prešibke. To je lahko posledica dodatka sotopil, ki znižajo parni tlak raztopini (12). Raztopinam PVP v acetonu smo dodali majhen delež etanola, ki ima v primerjavi z acetonom zelo nizek parni tlak. Vzrok za fisijo kapljic je lahko tudi premajhna koncentracija polimera (12) ali prevelik električni tok. Na slednjega lahko vplivamo, če znižamo električno napetost ali zmanjšamo hitrost pretoka (41). Pri 25 °C smo enoodstotno raztopino PVP razprševali tudi pri manjši hitrosti pretoka ( $Q = 0,5 \text{ mL/h}$ ), kjer pa smo prav tako dobili bimodalno porazdelitev velikosti.

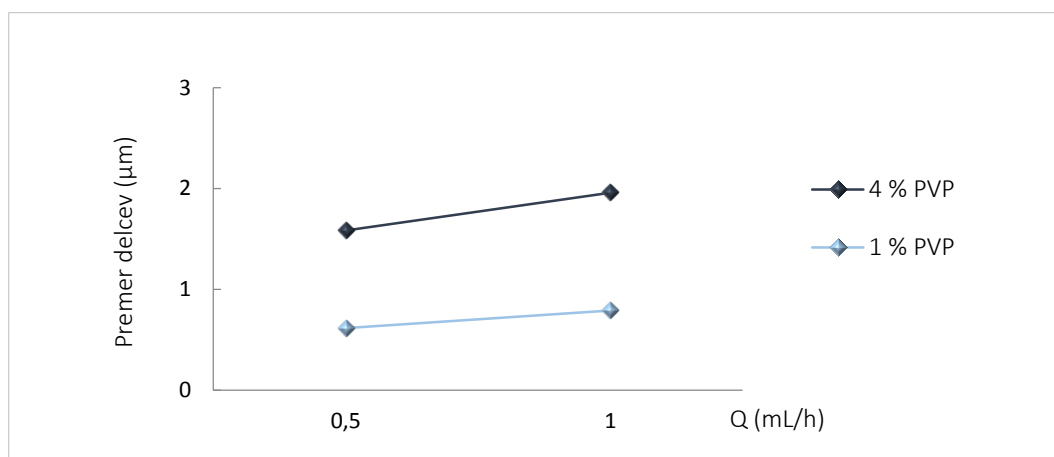
Z ER 4-odstotne raztopine PVP (PVP2) smo pri 25 °C pri hitrosti pretoka 0,5 mL/h in 1 mL/h izdelali sferične delce s prisotnimi paličastimi strukturami (slika 12). Večja koncentracija PVP daje večjo viskoznost raztopine, kar lahko onemogoči popolno pretrganje in razprševanje curka. Kot rezultat nastanejo tanka, kratka vlakna. Izdelani delci imajo relativno široko porazdelitev velikosti ( $RSD > 30 \%$ ), vendar pa le-ta ni tako izrazito bimodalna, kot pri delcih iz enoodstotne raztopine PVP ( $RSD > 80 \%$ ). Hogan in sodelavci so raziskovali ER raztopin PVP (topilo je bilo voda/etanol) različnih molekulskih mas (39). Ugotovitve so podobne – večja volumska frakcija polimera lahko zoži porazdelitev

velikosti delcev, a hkrati večja vsebnost polimera lahko pripelje do oblikovanja tankih paličastih struktur.



Slika 12: Delci, izdelani iz 4-odstotne acetonske raztopine PVP, pri  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 45 % RH, IC = 15 cm; A –  $Q = 0,5\text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 10\text{ kV}$  in B –  $Q = 1\text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 10,8\text{ kV}$ .

Koncentracija raztopine ima bistveno večji vpliv kot hitrost pretoka na velikost delcev PVP. 4-odstotne raztopina PVP daje bistveno večje delce kot enoodstotna, malenkostno pa se poveča velikost tudi pri večji hitrosti pretoka raztopine (slika 13).



Slika 13: Vpliv koncentracije raztopine in hitrosti pretoka na premer delcev PVP.

Sferične mikrodolge PVP s prisotnostjo nanodelcev smo izdelali iz eno- in-odstotne acetonske raztopine PVP, pri temperaturi v komori  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (45 % RH) –  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  (21 % RH). Razdalja igle od zbirala je bila 15 cm in hitrost pretoka 0,5 do 1 mL/h (električna napetost 8 do 11 kV).

Dosedanje študije kažejo, da je morfologija polimernih delcev v največji meri odvisna od koncentracije raztopine in hitrosti izhlapevanja topila. Posledično je ključnega pomena

izbira polimera in topila. Na morfologijo delcev vpliva tudi hitrost pretoka raztopine, saj vpliva na proces izhlapevanja topila in volumski delež polimerne frakcije v kapljicah. Pri prevelikem pretoku namreč ni zadovoljivega prepletanja verig polimera in lahko nastanejo delci nepravilnih oblik. Velja pa, da v primeru bolj koncentriranih polimernih raztopin lahko za doseganje sferičnosti uporabimo večje pretoke raztopine (12). Podobno lahko zaključimo tudi za ER raztopin PCL, saj v primerih, kjer smo uporabljali relativno velike pretoke nismo uspeli izdelati sferičnih delcev.

Za izdelavo sferičnih delcev se morajo verige polimera med seboj zadosti preplesti, preden se prične razprševanje. Na to v največji meri vpliva koncentracija raztopine (12). V našem primeru so bile 4-odstotne raztopine PCL zadostne za ustrezno prepletanje verig in nastanek sferičnih delcev. Obratno smo opazili pri razprševanju 4-odstotne raztopine PVP, kjer je bila raztopina polimera preveč koncentrirana, kar je botrovalo nastanku velikega števila paličastih struktur (razpotegnjenih delcev).

Z uporabo kloroformskih raztopin PCL smo izdelali porozne mikrosfere. Oblikovanje porozne mikrostrukture je posledica ločitve faz, kjer nastaneta s polimerom koncentrirana faza in druga s polimerom razredčena. Gonilo za ločitev faz je izparevanje topila ali hladilen učinek, kar pripelje do pojava podhlajene superkoncentrirane raztopine. V primeru izparevanja topila se faza, ki je bogata s polimerom, hitro strdi in tako oblikuje ogrodje delca, medtem ko je faza, revna s polimerom, ključna za nastanek por. Hladilen učinek, ki nastane na površini curka kot posledica nenadnega izparevanja topila, je drugi možen mehanizem oblikovanja por. Med sušenjem delcev nastale pore v tem primeru predstavljajo volumen, ki ga je pred sušenjem zasedala voda (18).

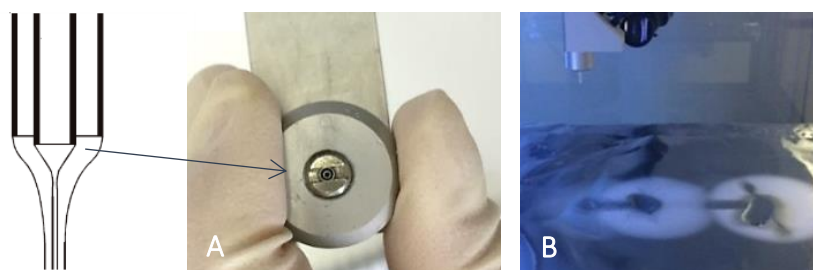
### 4.3.3 Lastnosti mikrodelcev laktoze, izdelanih z ER

Preskusili smo ER raztopin laktoze v bidestilirani vodi (preglednica IX). Preskušane procesne nastavitve za raztopine laktoze so predstavljene v *prilogi II*.

Preglednica IX: Sestava proučevanih raztopin laktoze za ER (✓ – da, ✗ – ne).

Oznake raztopin	TOPILO	PS	m/V (%)	Izdelava mikrodelcev
LAK1	voda	LAKTOZA	19	✓
LAK2	voda	LAKTOZA	25	✓
LAK3	voda	LAKTOZA	37	✓

Pričeli smo z eksperimenti 19-odstotne raztopine laktoze pri 25 °C (30 % RH). Pri določenih eksperimentih smo prilagodili šobo za ER, in sicer tako, da smo namestili koaksialno šobo (slika 14 A) in v zunanjo iglo dovajali 96-odstotni etanol. Z dodajanjem etanola se zmanjša površinska napetost raztopini, kar omogoči stabilnejši stožec in hkrati je za razprševanje potrebna nižja električna napetost. Tekočine z veliko površinsko napetostjo, kot je čista voda, so namreč težavne za ER, saj so potrebne visoke električne napetosti. Etanol povzroči tudi znižanje temperature vrelišča in s tem hitrejšo izhlapevanje topila.



Slika 14: Koaksialna šoba (A) (17) in prikaz močenja zbirala (B).

Kljub raznolikemu spreminjanju parametrov smo imeli konstantno težavo zaradi prisotnosti kapljic na zbiralu (slika 14 B). Da smo pospešili izhlapevanje topila, smo temperaturo v komori povišali na 35 °C in iz vseh raztopin pri ustreznih nastavitvah izdelali mikrodcelce, ki so v velikostnem razredu 50 do 150  $\mu\text{m}$  (slika 15).



Slika 15: Mikrodcelci laktoze, izdelani pri 35 °C, 25 % RH iz A – 19-odstotne raztopine ( $\Delta h$ : 4 mm, IC: 10 cm,  $Q$  notranje igle: 3 mL/h,  $Q$  zunanje igle: 3 mL/h,  $\Delta U$  10,1 kV), B – 25-odstotne raztopine ( $\Delta h$ : 8 mm, IC: 15 cm,  $Q$  notranje igle: 5 mL/h,  $Q$  zunanje igle: 5 mL/h,  $\Delta U$ : 16,5 kV), C – 37-odstotne raztopine ( $\Delta h$ : 8 mm, IC: 15 cm,  $Q$  notranje igle: 2 mL/h,  $Q$  zunanje igle: 2 mL/h,  $\Delta U$ : 10,5 kV).



## 4.4 VELIKOST IN MORFOLOGIJA MIKRODELCEV ANTIBIOTIČNIH UČINKOVIN

### 4.4.1 Lastnosti mikrodelcev klaritromicina, izdelanih z ER

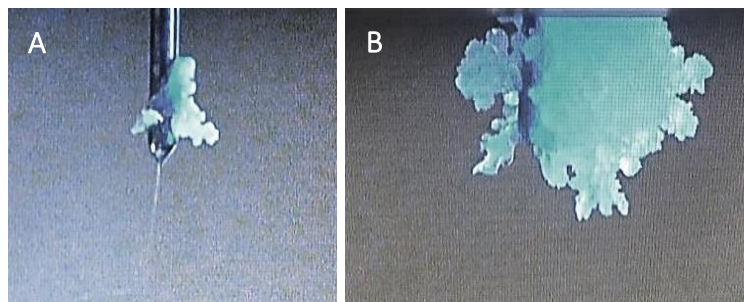
Klaritromicin je topen v različnih organskih topilih, zato smo preverili, kako sprememba topila vpliva na morfologijo nastalih delcev, izdelanih z uporabo različnih topil in z različno koncentracijo učinkovine v raztopinah (preglednica X).

Preglednica X: Sestava proučevanih raztopin KMC za ER (✓ – da, ✗ – ne).

Oznake raztopin	TOPILO	ZU	m/V (%)	Izdelava mikrodelcev
KMC1	acetone	KMC	0,5	✓
KMC2	acetone	KMC	1	✓
KMC3	acetone	KMC	4	✓
KMC4	dimetilformamid	KMC	1	✗
KMC5	dimetilformamid	KMC	4	✓
KMC6	etilacetat	KMC	1	✓
KMC7	etilacetat	KMC	4	✓
KMC8	kloroform	KMC	1	✓
KMC9	kloroform	KMC	4	✓
KMC10	tetrahidrofuran	KMC	1	✓
KMC11	tetrahidrofuran	KMC	4	✓
KMC12	dioksan	KMC	1	✗
KMC13	dioksan	KMC	4	✗
KMC14	etanol (96 %)	KMC	1	✗
KMC15	kloroform/acetone (2 : 1)	KMC	1	✓
KMC16	kloroform/acetone (1 : 1)	KMC	0,5	✓
KMC17	kloroform/acetone (1 : 2)	KMC	0,5	✓

### Vpliv topila in koncentracije raztopine na morfologijo delcev KMC

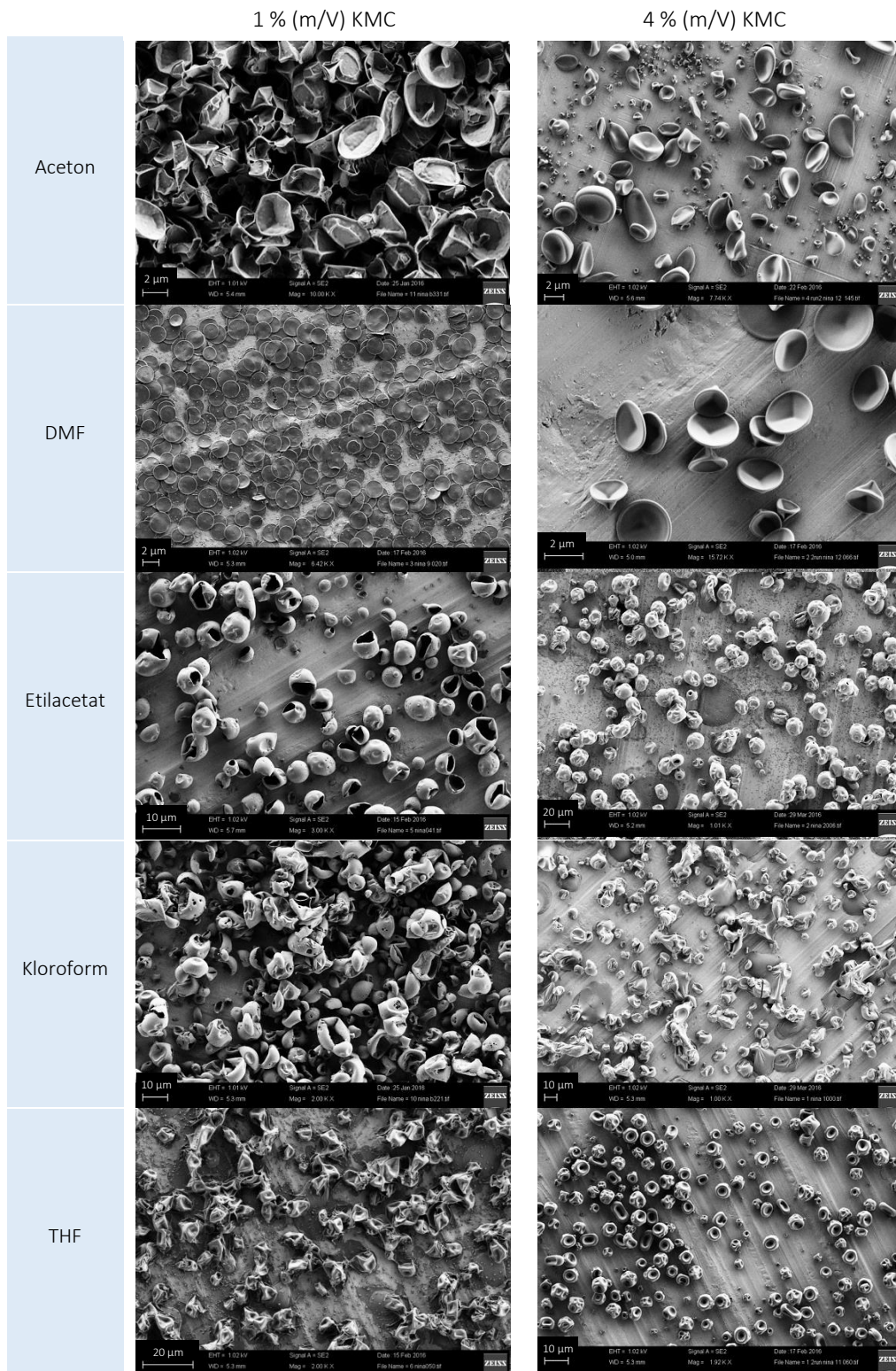
Pri ER raztopin KMC je bilo pogosto prisotno obarjanje na konici igle. Predvsem je bilo to izrazito ob uporabi dobro hlapnih topil. Tega nismo opazili ob uporabi dioksana in DMF, ki imata v primerjavi z ostalimi uporabljenimi topili precej višjo  $T_v$ . Slika 16 A prikazuje obarjanje na konici igle ob uporabi kloroforma, kljub oblikovanju lepega stožca. Zasuševanje vpliva na stabilnost curka, saj ga lahko čez čas popolnoma destabilizira (slika 16 B, topilo: zmes kloroform/acetone (2 : 1)). V takšnih primerih smo morali šobo med razprševanjem večkrat obrisati.



Slika 16: Težava pri ER raztopin KMC – obarjanje na igli.

Delci iste učinkovine (KMC), izdelani iz raztopin različnih topil in koncentracij, se razlikujejo v morfologiji (slika 17). Morfološke spremembe v našem primeru pogojuje variiranje topil in različne fizikalno-kemijske lastnosti le-teh, saj so procesni parametri zelo podobni. Aceton, kloroform, THF in etilacetat imajo relativno nizke  $T_v$  in izdelani delci so tanki, votli in nagubani. Ob hitrem izhlapevanju topila topljenec ne more dovolj hitro difundirati proti centru kapljice, na površini nastane superkoncentrirana raztopina, ki omogoči formiranje skorjice topljenca tik ob površini kapljice. Ob nadaljnjem izhlapevanju topila nastala skorjica čez čas kolabira, kar se lahko izkaže v končni nepravilni, nagubani ali votli strukturi delcev.

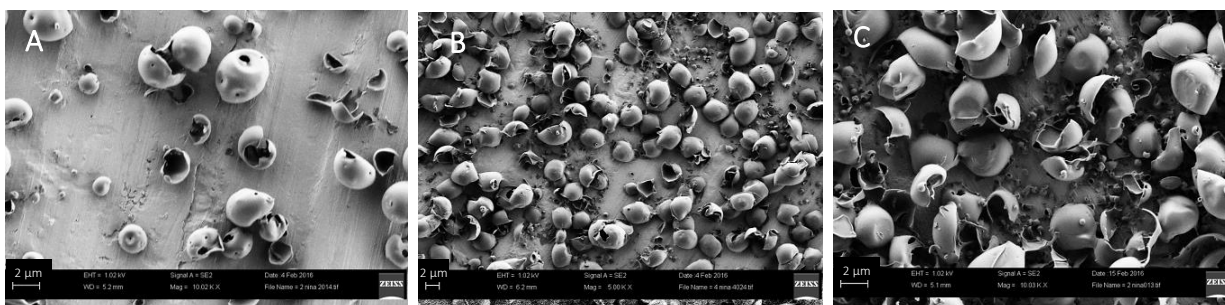
Tudi koncentracija raztopine pomembno vpliva na morfološke lastnosti delcev. Večja koncentracija KMC (4 %) daje bolj polne (kompaktne) delce. Ob večji vsebnosti ZU se namreč na površini kapljice tvori debelejša skorjica, kar po solidifikaciji rezultira v večji trdnosti in polnosti delcev. Podobno so ugotovili tudi Yao J. (38), Xie J. (40), Hong Y (41) in Almeria B. (42). Enoodstotna koncentracija in hkrati uporaba zelo slabo hlapnega topila (DMF,  $T_v = 153\text{ °C}$ ) lahko povzroči, da se delci ne oblikujejo, ampak se neposušeni nabirajo na zbiralu. Z uporabo dioksana (KMC12, KMC13) nismo izdelali delcev, prav tako ER ni bilo upešno z uporabo etanola (KMC14), saj se delci niso popolnoma posušili.



Slika 17: Vpliv koncentracije raztopine in vrste topila na morfologijo delcev KMC.

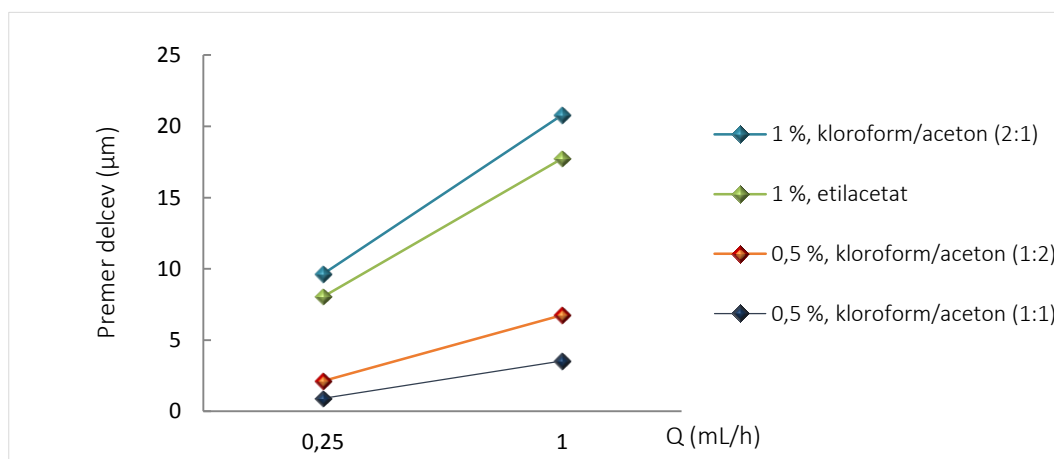
## Vpliv koncentracije raztopine, hitrosti pretoka in napetosti na velikost delcev KMC

Enoodstotno raztopino KMC v etilacetatu (KMC6) in mešanici kloroform/aceton (2 : 1) (KMC15) ter 0,5-odstotno raztopino KMC v mešanici kloroform/aceton (1 : 1) (KMC16) in kloroform/aceton (1 : 2) (KMC17) smo razprševali pri hitrosti pretoka 0,25 mL/h in 1 mL/h. V vseh primerih smo izdelali delce, ki so lupinaste (votle) oblike (slika 18).



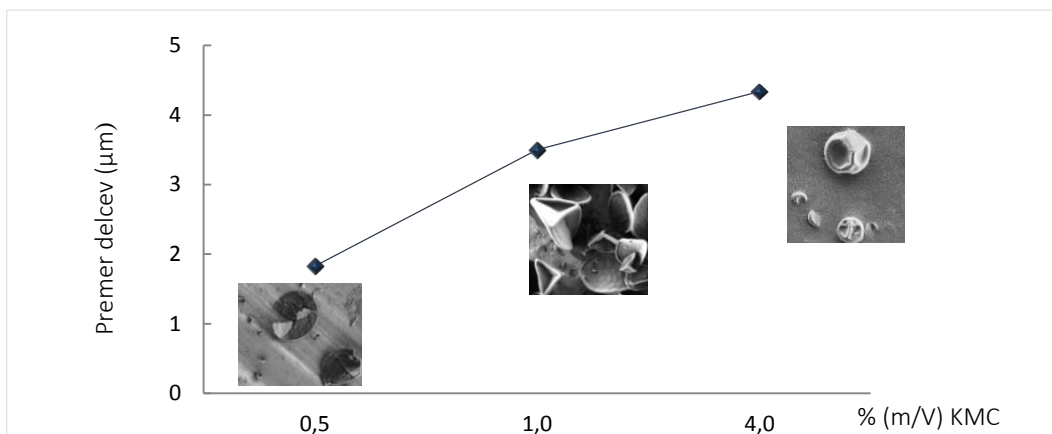
Slika 18: Delci KMC, izdelani pri 25 °C, 45 % RH, IC = 15 cm iz enoodstotne raztopine v A – zmesi kloroform/aceton (2 : 1),  $Q = 1$  mL/h,  $\Delta U = 7,5$  kV in iz 0,5-odstotne raztopine v B – zmesi kloroform/aceton (1 : 1),  $Q = 1$  mL/h,  $\Delta U = 8$  kV, C – zmesi kloroform/aceton (1 : 2),  $Q = 1$  mL/h,  $\Delta U = 8,3$  kV.

S povečanjem koncentracije raztopine se izrazito poveča premer delcev. Tudi večja hitrost pretoka vpliva na večjo velikost delcev (slika 19).



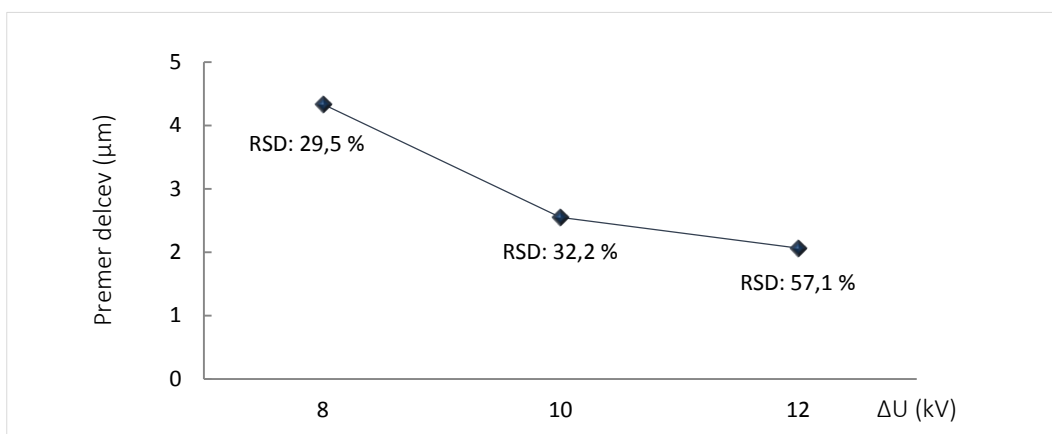
Slika 19: Vpliv koncentracije raztopine in hitrosti pretoka na premer delcev KMC.

Ker predstavlja aceton s stališča toksičnosti in dostopnosti najprimernejše topilo smo poleg eno- in 4-odstotne pripravili tudi 0,5-odstotno raztopino KMC v acetonu (KMC1). Izvajali smo ER vseh raztopin pri hitrosti pretoka 1 mL/h. Zopet smo ugotovili, da večja koncentracija raztopine daje večje delce (slika 20). Še dodatno lahko potrdimo, da se trdnost delcev poveča s povečanjem koncentracije raztopine.



Slika 20: Vpliv koncentracije raztopine (acetona) na premer in morfologijo delcev KMC.

Ugotovili smo, da s povečevanjem električne napetosti pri ER 4-odstotne raztopine KMC v acetonu ( $Q = 1 \text{ mL/h}$ ) pada premer delcev (slika 21). Večja električna napetost dovaja več električnega naboja in ustvarja močnejše elektrostatske sile, ki premagujejo sile površinske napetosti. To povzroči nastanek manjših kapljic, kar se posledično izkaže v manjši velikosti delcev. Pri električni napetosti 12 kV je bilo prisotnih več curkov (»multi-jet mode«). RSD se značilno poveča. Visoka električna napetost zaradi prisotnih nestabilnosti curka pripelje do širše porazdelitve velikosti delcev (40, 43).



Slika 21: Vpliv električne napetosti na premer in RSD delcev iz 4-odstotne acetonske raztopine KMC.

Bolj okroglo, votlo in hkrati nagubano morfologijo delcev KMC dajejo topila etilacetat, kloroform, THF in različne zmesi kloroforma in acetona. Uporaba samega acetona ali DMF daje tanjše in bolj lupinaste delce (oblika ploščic). Tudi koncentracija raztopine izrazito vpliva na trdnost oz. kompaktnost delcev. Pri majhni koncentraciji KMC ( $< 1 \%$ ) nastanejo pretežno luske in pri večji kompaktniji, trdni delci.

#### 4.4.2 Lastnosti mikrodelcev ciprofloksacina, izdelanih z ER

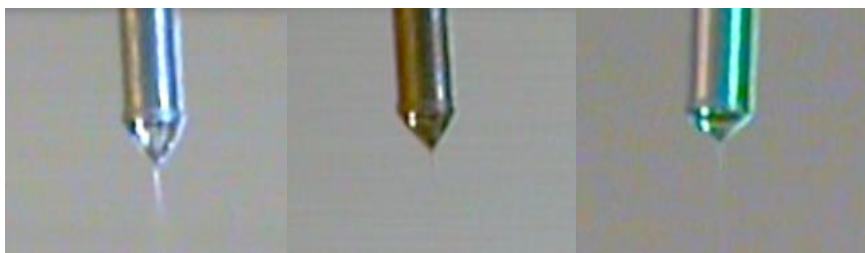
ER raztopin CIP smo izvajali z uporabo kloroforma. Pripravili smo različno koncentrirane raztopine: 0,5, 1, 2 in 4 % (CIP1-CIP4). Preskusili smo tudi ER, kjer smo kot topilo uporabili zmes z vodo (CIP6-CIP10), vendar je bilo v teh primerih ER neuspešno (prisotnost kapljic na zbiralu).

Preglednica XI: Sestava proučevanih raztopin CIP za ER (✓ – da, ✗ – ne).

Oznake raztopin	TOPILO	ZU	m/V (%)	Dodatek	V <sub>R</sub> (mL)	Izdelava mikrodelcev
CIP1	kloroform	CIP	0,5	1 mL CH <sub>3</sub> COOH	51	✗
CIP2	kloroform	CIP	1	2 mL CH <sub>3</sub> COOH	52	✓
CIP3	kloroform	CIP	2	2 mL CH <sub>3</sub> COOH	52	✓
CIP4	kloroform	CIP	4	4 mL CH <sub>3</sub> COOH	54	✓
CIP5	kloroform/aceton (2 : 1)	CIP	1	2 mL CH <sub>3</sub> COOH	52	✓
CIP6	dioksan/voda (2 : 1)	CIP	1	2 mL CH <sub>3</sub> COOH	52	✗
CIP7	dioksan/voda (2 : 1)	CIP	4	4 mL CH <sub>3</sub> COOH	54	✗
CIP8	dioksan/voda (1 : 2)	CIP	1	2 mL CH <sub>3</sub> COOH	52	✗
CIP9	etanol/voda (1 : 5,7)	CIP	1	1,5 mL 1M HCl	51,5	✗
CIP10	izopropanol/voda (1 : 11,5)	CIP	1	1,5 mL 1M HCl	51,5	✗

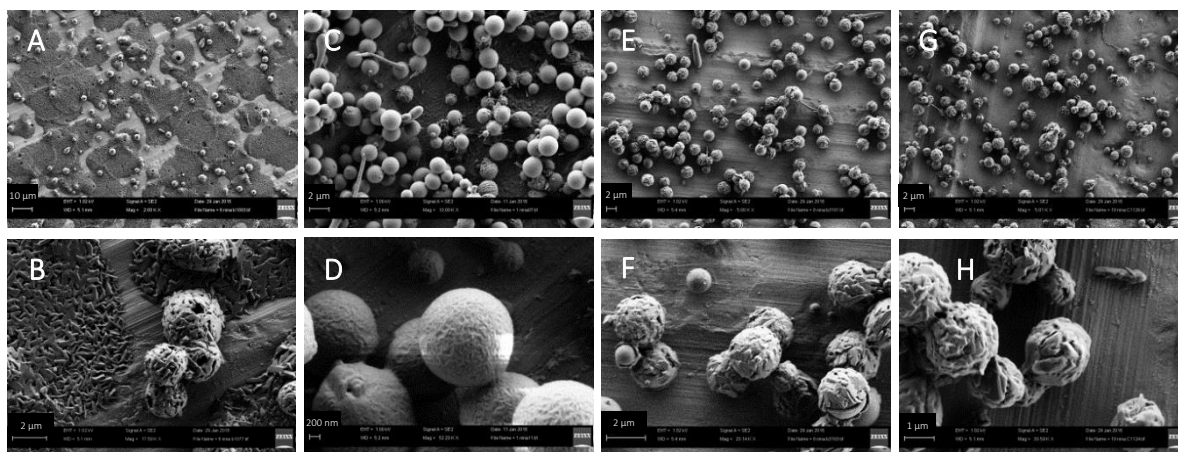
#### Vpliv koncentracije kloroformne raztopine, hitrosti pretoka in topila na morfologijo delcev CIP

Težav s stabilnostjo procesa pri ER kloroformskih raztopin CIP nismo imeli (slika 22).



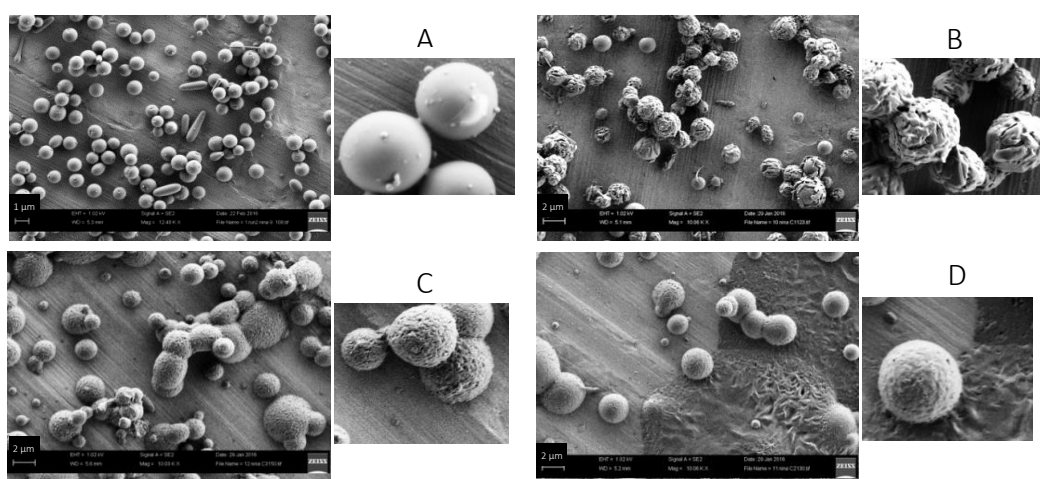
Slika 22: Primeri oblikovanja Taylorjevega stožca pri ER raztopin CIP.

Koncentracija raztopine CIP vpliva na morfologijo delcev. Mikrodelci, izdelani z ER raztopine najmanjše koncentracije (0,5 % CIP), se neposušeni nabirajo na zbiralu (slika 23 A, B), bolj koncentrirane raztopine pa dajejo sferične delce. Z enoodstotno raztopino smo izdelali gladke delce (slika 23 C, D). Delci, izdelani iz 2-odstotne (slika 23 E, F) in 4-odstotne raztopine (slika 23 G, H) pa imajo večplastno površino.



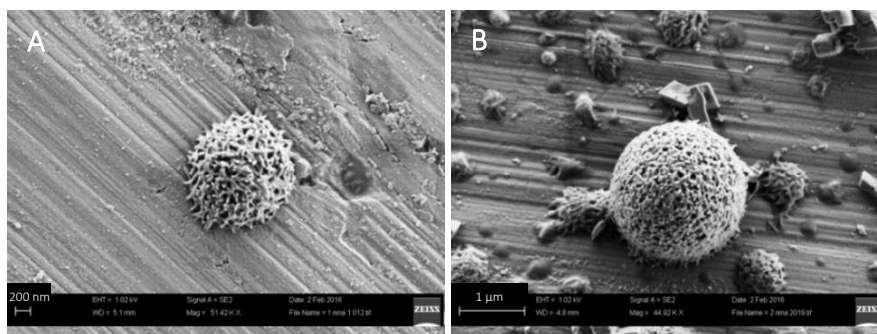
Slika 23: Morfologija mikrodlecev pri različnih koncentracijah CIP v kloroformu: 0,5 % (A, B), 1 % (C, D), 2% (E, F) in 4% (G, H) CIP pri manjši (zgoraj) in večji (spodaj) povečavi, izdelani pri 25 °C, 45 % RH, IC = 15 cm, Q = 1 mL/h,  $\Delta U = 7/10,5/9/9,5$  kV.

S 4-odstotno raztopino CIP v kloroformu (CIP4) smo pri 25°C izvajali ER pri različnih hitrostih pretoka raztopine. Ugotovili smo, da pri nespremenjenih ostalih parametrih pretok vpliva na morfologijo delcev (slika 24). Delce s popolnoma gladko površino smo izdelali pri najmanjši hitrosti pretoka (0,25 mL/h). Večji pretok (1 mL/h) je povzročil večplastnost površine. Z uporabo še večjih hitrosti pretoka (1,5 mL/h in 2 mL/h) pa smo dobili delce, ki so se združevali med seboj na zbiralu, kar nakazuje, da se zaradi prevelike hitrosti niso uspeli popolnoma posušiti. Pri manjši hitrosti pretoka je na voljo več časa, da ZU difundira enakomerno po celotnem volumnu kapljice in poteče solidifikacija, pri kateri se oblikuje končna morfologija delcev. Rezultati kažejo v smer, da moramo za gladkost površine delcev CIP zagotoviti minimalno hitrost pretoka kloroformne raztopine, ki to še omogoča.



Slika 24: Vpliv hitrosti pretoka raztopine CIP na morfologijo delcev, izdelanih pri 25 °C, 45 % RH, IC = 15 cm, Q = A: 0,25 mL/h (9,8 kV), B: 1 mL/h (9,5 kV), C: 1,5 mL/h (10,4 kV), D: 2 mL/h (10,5 kV).

Nadalje smo preskusili tudi, kaj se zgodi, če kloroformu dodamo aceton. Izvajali smo ER enoodstotnega CIP v kloroform/aceton (2 : 1) (CIP5) pri 25 °C, pri razdalji igle od zbirala 15 cm in 20 cm. Delci so izjemno porozni (»ježki«) in sferični (slika 25). Dodatek acetona v raztopino očitno povzroči izrazito porozno strukturo.

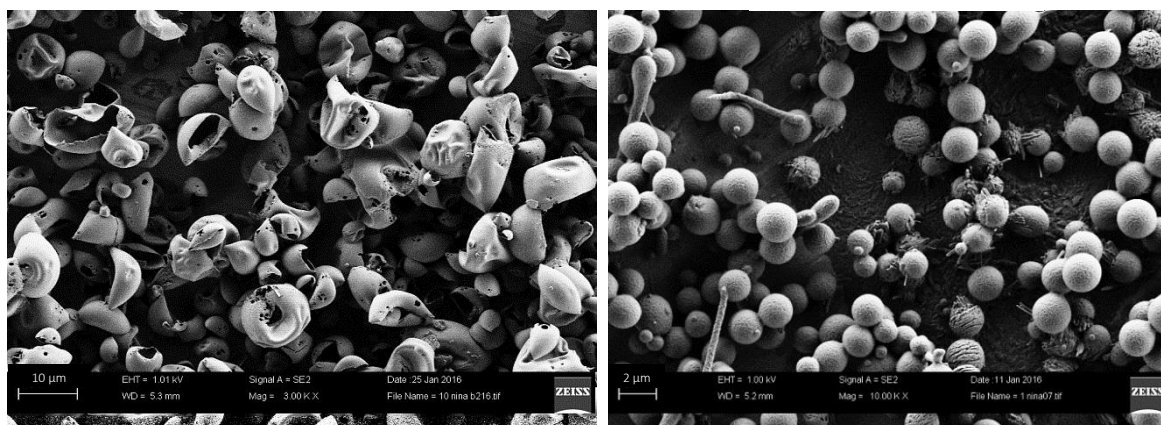


Slika 25: Delci CIP iz enoodstotne raztopine CIP (kloroform/aceton = 2 : 1), izdelani pri 25 °C, 45 % RH in IC razdalji 15 cm,  $Q = 0,5 \text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 11 \text{ kV}$  (A) in 20 cm,  $Q = 0,5 \text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 12,5 \text{ kV}$  (B).

Pri ER raztopin učinkovin gre v splošnem za obarjanje učinkovin med sušenjem in nastanek različnih delcev po velikosti in obliki. Primerjava mikrodelcev KMC in CIP kaže, da so si v primeru enakega topila in koncentracije (kloroform in 1 % ZU) izdelani delci zelo različni med seboj, tako v morfologiji kot tudi po velikosti (slika 26). S KMC nismo izdelali sferičnih in polnih delcev, kakor je bilo to možno s CIP, temveč je njihova morfologija votla in nagubana. Izdelani delci KMC so malo večji kakor delci CIP.

A - KLARITROMICIN

B - CIPROFLOKSACIN



$d_{100}$ : 9,360 µm (RSD: 34,5 %)

$d_{100}$ : 1,542 µm (RSD: 22,3 %)

Slika 26: Mikrodelci iz enoodstotnega KMC (A) in CIP (B) v kloroformu, pri enakih procesnih pogojih: 25 °C, 45 % RH, IC = 15 cm,  $Q = 1 \text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 10,5 \text{ kV}$  (A), 7,5 kV (B).



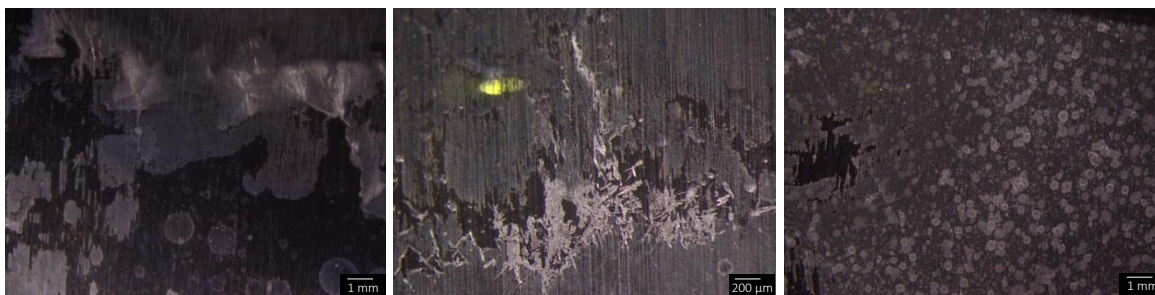
### 4.4.3 Lastnosti mikrodelcev metronidazola, izdelanih z ER

Preizkusili smo razprševati tudi raztopine antibiotika metronidazola (preglednica XII).

*Preglednica XII: Sestava proučevanih raztopin MNZ za ER (✓ – da, ✗ – ne).*

Oznake raztopin	TOPILO	ZU	m/V (%)	Izdelava mikrodelcev
MNZ1	acetone	MNZ	0,5	✗
MNZ2	acetone	MNZ	1	✗
MNZ3	etanol/acetone (1 : 1)	MNZ	0,5	✗
MNZ4	izopropanol/acetone (1 : 1)	MNZ	0,5	✗

Pri ER 0,5-odstotne (pri 25 °C) ali enoodstotne (pri 45 °C) raztopine MNZ v acetone nismo opazili pomembnih razlik. Oblikovan curek je bil namreč zelo nestabilen. Težave bi lahko pripisali premajhni viskoznosti raztopine, ki jo pogojuje relativno majhna molekulska masa MNZ. Pod optičnim mikroskopom smo pri večini vzorcev opazili nastanek kapljic, oblikovanje filma in tudi kristalne strukture (slika 27). Tudi z raztopino 0,5-odstotnega MNZ v zmesi acetone/etanol (96 %) (1 : 1) ali acetone/izopropanol (1 : 1) nismo uspeli izdelati delcev.



*Slika 27: Težave pri ER raztopine MNZ v acetone (nastanek filma, kristalov, kapljice).*

## 4.5 IZDELAVA POLIMERNIH MIKRODELCEV Z UČINKOVINO

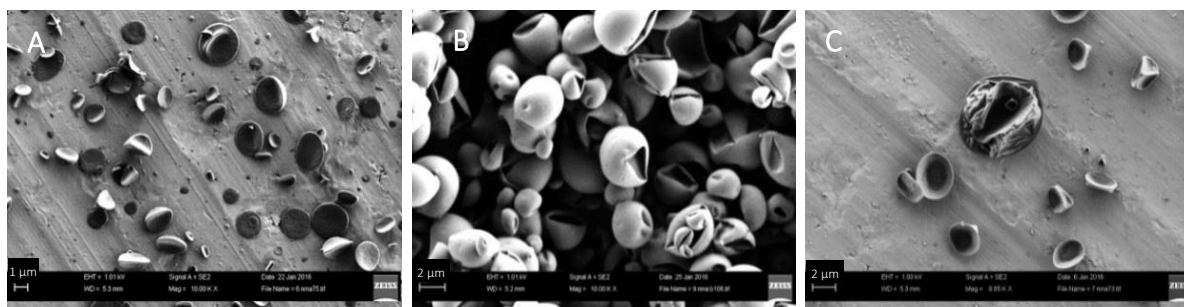
Potreba po enakomerni velikosti delcev in nadzorovanem sproščanju ZU je bila eden ključnih vzvodov za številne raziskave na področju polimernih delcev, ki predstavljajo pomembna ogrodja dostavnih sistemov ZU. Polimerno ogrodje preprečuje spremembe vgrajene ZU in lahko ključno vpliva na sproščanje (12).

### 4.5.1 Lastnosti polivinilpirolidonskih mikrodelcev s klaritromicinom

*Preglednica XIII: Sestava proučevanih raztopin KMC in PVP za ER (✓ – da, × – ne).*

Oznake raztopin	TOPILO	PS	m/V (%)	ZU	m/V (%)	Dodatek	V <sub>R</sub> (mL)	Izdelava mikrodelcev
PVP_K1	etanol (96 %)	PVP K25	1	KMC	1			×
PVP_K2	kloroform	PVP K25	1	KMC	1			✓
PVP_K3	acetone	PVP K25	1	KMC	1	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K4	acetone	PVP K25	3	KMC	1	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K5	acetone	PVP K25	2	KMC	1	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K6	acetone	PVP K25	2,67	KMC	1,33	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K7	acetone	PVP K25	0,5	KMC	0,5	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K8	acetone	PVP K25	2	KMC	2	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K9	acetone	PVP K25	1	KMC	2	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K10	acetone	PVP K25	1,33	KMC	2,67	1 mL EtOH (96 %)	51	✓
PVP_K11	acetone	PVP K25	1	KMC	3	1 mL EtOH (96 %)	51	✓

Na začetku smo izvajali ER raztopine enoodstotnega KMC in enoodstotnega PVP v različnih topilih (PVP\_K1-PVP\_K3). Pri vseh je bil proces stabilen. Delci, izdelani iz raztopine etanola, so zelo tanki in opazimo zlivanje na zbiralu (slika 28 A). Kloroformna raztopina da votle in kroglasto upognjene mikrodelce (slika 28 B) in iz acetonske raztopine smo izdelali tanke, lupinaste delce (slika 28 C). V nadaljevanju so predstavljeni rezultati kloroformne in acetonske raztopine, kjer nismo opazili kapljic in zlivanja na zbiralu.



*Slika 28: Delci, izdelani iz raztopine enoodstotnega KMC in enoodstotnega PVP, pri 35 °C, 26 % RH, 15 cm, 1 mL/h; A – etanol (9,8 kV) in B – kloroform (7,6 kV) in pri 25 °C, 45 % RH, 15 cm, 1 mL/h, 9 kV za C – acetone.*

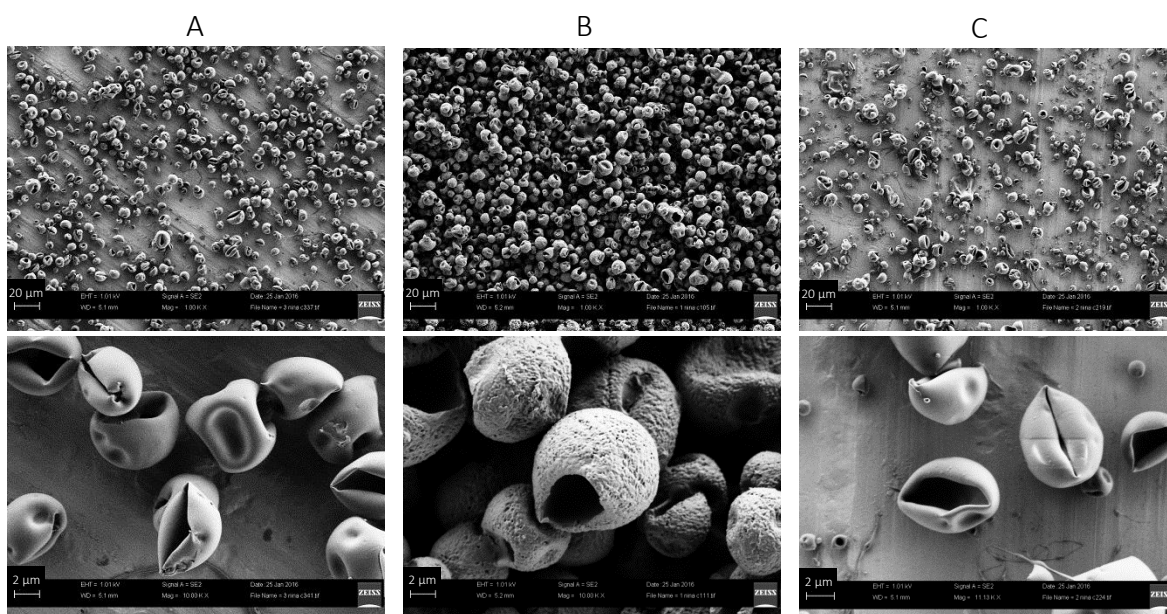
## Lastnosti mikrodolcev, izdelanih z ER kloroformske raztopine KMC in PVP

Raztopino enoodstotnega KMC in enoodstotnega PVP v kloroformu (PVP\_K2) smo razprševali pri 25 °C in 35 °C. Proces je bil stabilen in oblikoval se je pravilen stožec. Temperatura vpliva na velikost delcev, saj smo pri višji temperaturi izdelali značilno večje delce (preglednica XIV).

Preglednica XIV: Vpliv temperature na povprečno velikost delcev KMC in PVP.

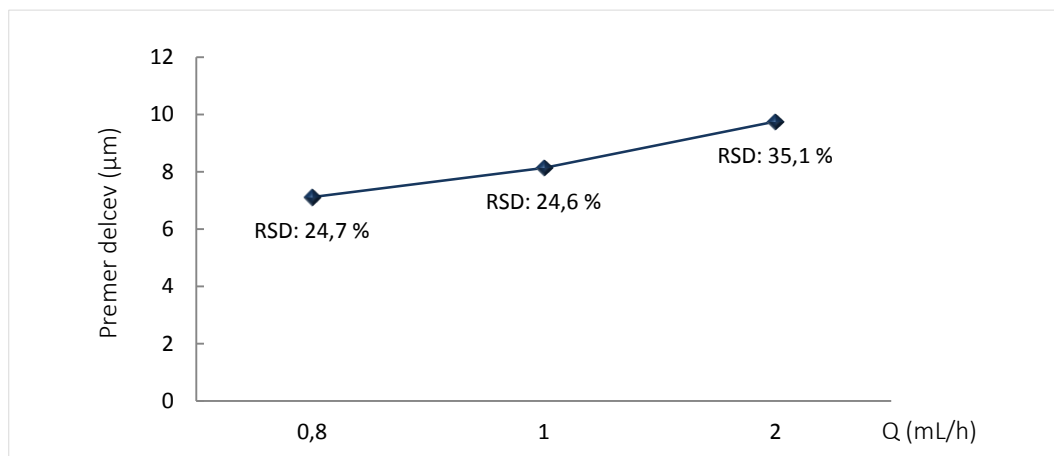
Temperatura	Povprečna velikost delcev ( $d_{100}$ ) ( $\mu\text{m}$ )	RSD (%)
25°C	3,631	37,3
35°C	8,138	24,6

Pri temperaturi 35 °C smo ER izvajali z različnimi hitrostmi pretoka raztopine (slika 29). Morfološko gre za votle, nagubane delce, ki so po popolnem izhlapevanju kloroforma kolapsirali in tvorili omenjeno morfologijo.



Slika 29: Delci KMC in PVP, izdelani iz kloroformne raztopine pri  $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 26 % RH, IC = 15 cm, pri A: 0,8 mL/h (7,6 kV), B: 1 mL/h (7,6 kV) in C: 2 mL/h (7,9 kV).

Povprečna velikost delcev narašča z večanjem hitrosti pretoka (slika 30). Delci so v velikostnem razredu 7  $\mu\text{m}$  do 10  $\mu\text{m}$ .



Slika 30: Vpliv hitrosti pretoka kloroformne raztopine na premer delcev KMC in PVP.

### Lastnosti mikrodelcev, izdelanih z ER acetonskih raztopin KMC in PVP

Izvajali smo ER različnih acetonskih raztopin PVP in KMC, in sicer smo spreminjali odstotke ZU in polimera ter tudi celotno koncentracijo raztopine (PVP\_K3-PVP\_K11). ER smo izvajali pri 25 °C (45 % RH) in izdelali delce, kot prikazuje preglednica XV.

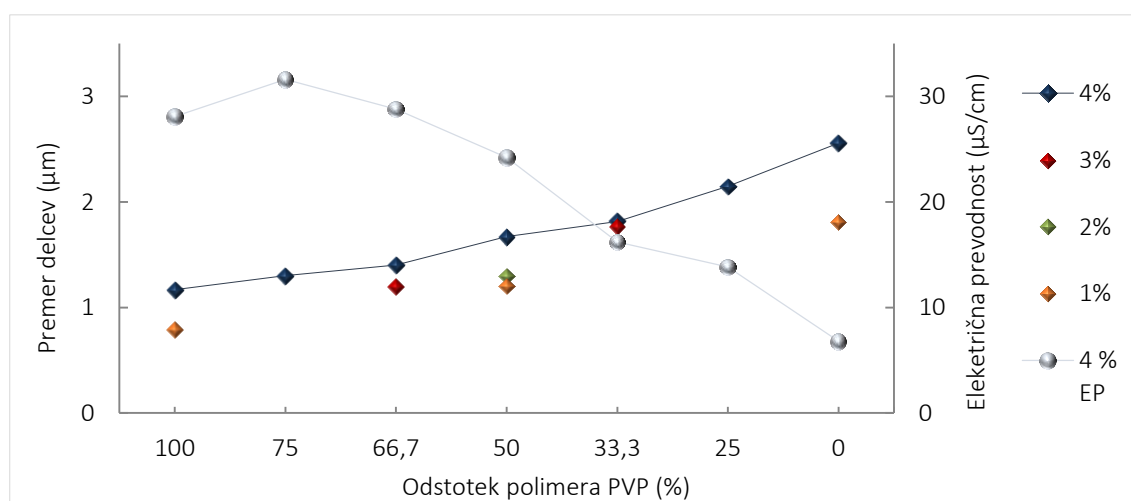
S spreminjanjem razmerja med polimerom in KMC se spreminja tudi morfologija izdelanih delcev. Delci samega KMC imajo, kot smo že predstavili, sploščeno morfologijo. Ob prisotnosti polimera v raztopini so nastali bolj polni in bolj nagubani delci kakor delci samega KMC. S povečevanjem deleža PVP se povečuje debelina delcev. Vsi delci, izdelani iz raztopin, kjer sta bila prisotna tako KMC kot tudi PVP imajo torej obliko ploščic in rahlo nagubano površino. Nasprotno so delci, izdelani iz raztopine samega PVP, sferični. Glede na posnetke lahko predvidevamo, da dodatek KMC v raztopino PVP vpliva na spremembo morfologije – iz sferične v ploščato.

Tudi Hong Y. in sodelavci so ugotovili, da večja vsebnost rifampicina, ki ima podobno molekulsko maso kot klaritromicin, povzroči večjo nagubanost polimernih delcev PLGA. Male molekule imajo drugačno difuzijsko potovanje kot polimerne makromolekule. Če je koncentracija rifampicina nad kritično koncentracijo, je difuzija ZU počasnejša kakor difuzija polimera in ZU se nalaga v obliki skorjice na enem delu kapljice. Medmolekulsko prepletanje polimernih verig ustvarja silo, ki ob nadaljnjem izhlapevanju topila potegne skorjico ZU proti centru kapljice, povzroči njeno kolapsiranje in nagubanost površine (41). Podoben mehanizem bi lahko veljal tudi za naše delce.

Preglednica XV: Vpliv razmerja med PVP in KMC ter koncentracije na morfologijo.

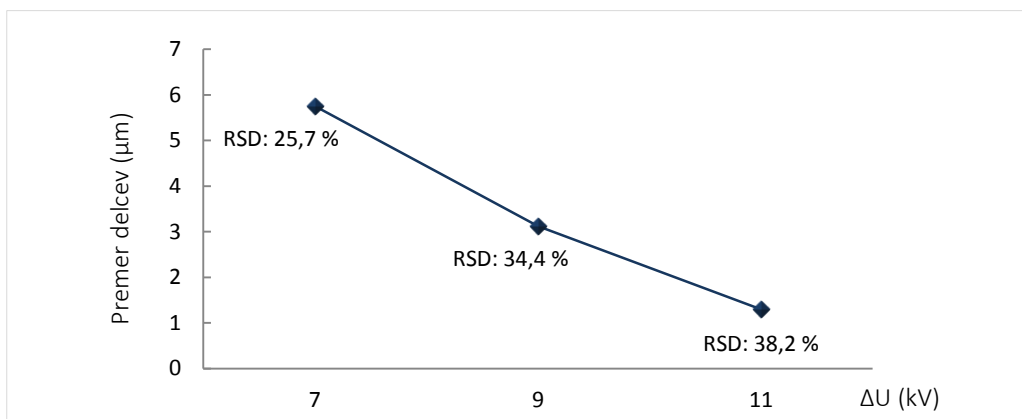
Celotna koncentracija:	1 m/V %	2 m/V %	3 m/V %	4 m/V %
0 % KMC 100 % PVP		/	/	
25 % KMC 75 % PVP	/	/	/	
33,3 % KMC 66,7 % PVP	/	/		
50 % KMC 50 % PVP			/	
66,7 % KMC 33,3 % PVP	/	/		
75 % KMC 25 % PVP	/	/	/	
100 % KMC 0 % PVP		/	/	

Povprečni premer delcev pada s povečevanjem deleža polimera PVP v raztopini (in s tem manjšanjem KMC), in sicer za 1,5  $\mu\text{m}$  (pri 4-odstotni raztopini), variiranje znotraj koncentracij pa je približno 0,75  $\mu\text{m}$  (slika 31). Raztopinam smo pred ER izmerili električno prevodnost. Ugotovili smo, da večji dodatek polimera PVP, povzroči povečanje prevodnosti raztopine (slika 31, oznaka 4 % EP). Rezultati predhodnih raziskav pojasnjujejo, da se velikost kapljic pri ER zmanjšuje z večanjem električne prevodnosti (38, 42, 43). Manjša velikost kapljic po izhlapevanju topila vodi do manjših delcev. Tudi manjša celotna koncentracija daje manjše delce, saj je manj polimera in ZU na voljo za formiranje delcev.



Slika 31: Premer delcev in električna prevodnost v odvisnosti od odstotka polimera PVP in celotne koncentracije raztopine.

Za raztopino PVP\_K3 (enoodstotni KMC in PVP v acetonu) smo imeli pri treh različnih električnih napetostih stabilen sistem za ER. Ugotovili smo, da povečanje električne napetosti povzroči zmanjšanje končne velikosti polimernih delcev z ZU (slika 32).



Slika 32: Vpliv električne napetosti na velikost in RSD delcev KMC in PVP.

## 4.5.2 Lastnosti polivinilpirolidonskih mikrodelcev s ciprofloksacinom

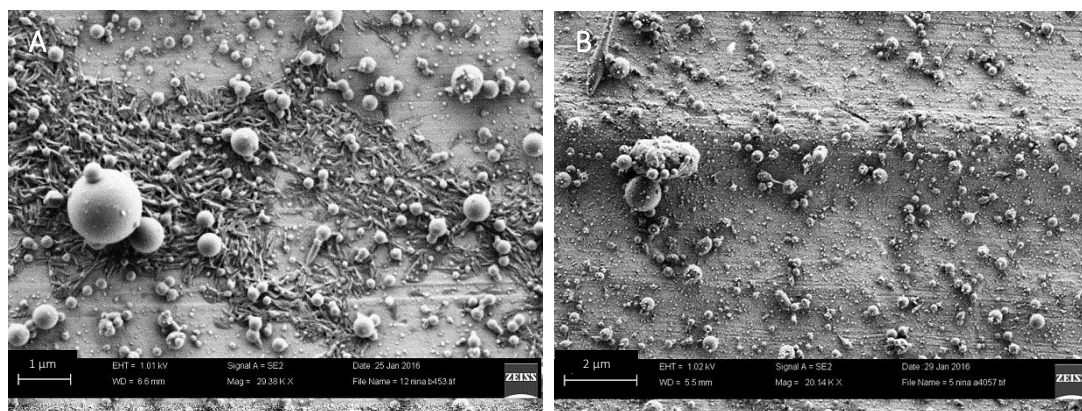
Ker je bilo ER samega CIP v zmesi vode in alkohola neuspešno, smo preskusili enoodstotni raztopini CIP dodati še polimer PVP (preglednica XVI).

Preglednica XVI: Sestava proučevanih raztopin PVP in CIP za ER (✓ – da, ✗ – ne).

Oznake raztopin	TOPILO	PS	m/V (%)	ZU	m/V (%)	Dodatek	V <sub>R</sub> (mL)	Izdelava mikrodelcev
PVP_C1	etanol (96 %)/voda (1 : 5,7)	PVP K25	1	CIP	1	1,5 mL 1M HCl	51,5	✗
PVP_C2	izopropanol/voda (1 : 11,5)	PVP K25	1	CIP	1	1,5 mL 1M HCl	51,5	✗
PVP_C3	etanol (96 %)/voda (1 : 5,7)	PVP K25	4	CIP	1	1,5 mL 1M HCl	51,5	✓
PVP_C4	izopropanol/voda (1 : 11,5)	PVP K25	4	CIP	1	1,5 mL 1M HCl	51,5	✓

Etanolno/vodni (1 : 5,7) in izopropanolno/vodni (1 : 11,5) raztopini smo najprej dodali le 1 % PVP (PVP\_C1 in PVP\_C2), vendar je bil proces zelo nestabilen (pulziranje, osciliranje curka in močenje zbirala).

Nato smo dodali skupno 4 % PVP (PVP\_C3 in PVP\_C4) in razprševali pri 25 °C pri pretoku 0,5 mL/h. Razprševalo je več curkov in nastali so nanodelci (slika 33). Povprečna velikost delcev, izdelanih iz etanolno/vodne raztopine, znaša 292 nm (RSD: 39,4 %).



Slika 33: Nanodelci, izdelani iz raztopine CIP (1 %) in PVP (4 %) pri 25 °C, 45 % RH,  $Q = 0,5$  mL/h, topilo: A – etanol/voda, IC = 15 cm,  $\Delta U = 21$  kV in B – izopropanol/voda, IC = 20 cm,  $\Delta U = 23$  kV.

### III. Proučevanje ER delcev ciprofloksacina z metodo načrtovanja eksperimentov

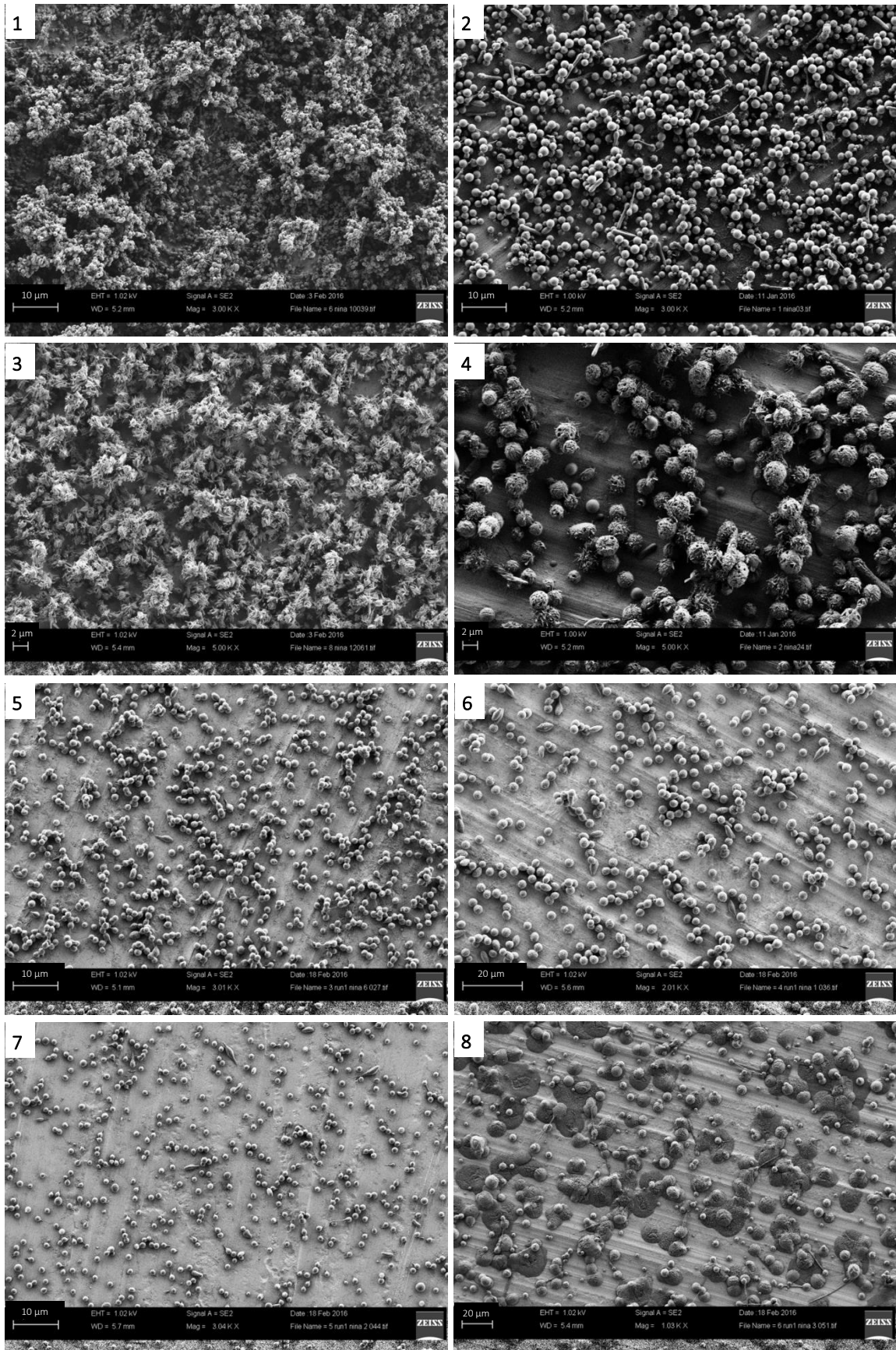
#### 4.6 POSTAVITEV MODELA ZA IZDELAVO MIKRODELCEV CIPROFLOKSACINA NA OSNOVI EKSPERIMENTOV

Eno- in-odstotno raztopino CIP v kloroformu (CIP2, CIP4) smo razprševali pri različnih pogojih, in sicer smo spreminjali temperaturo v komori in ob tem relativno vlažnost, razdaljo igle od zbirala in hitrost pretoka raztopine. Električno napetost smo nastavili tako, da se je na konici šobe oblikoval lep stožec. Izdelali smo 16 preliminarnih vzorcev. Parametri raztopin in izmerjena velikost delcev so predstavljeni v preglednici XVII. V nadaljevanju (sliki 34 in 35) pa so predstavljeni tudi SEM posnetki izdelanih vzorcev.

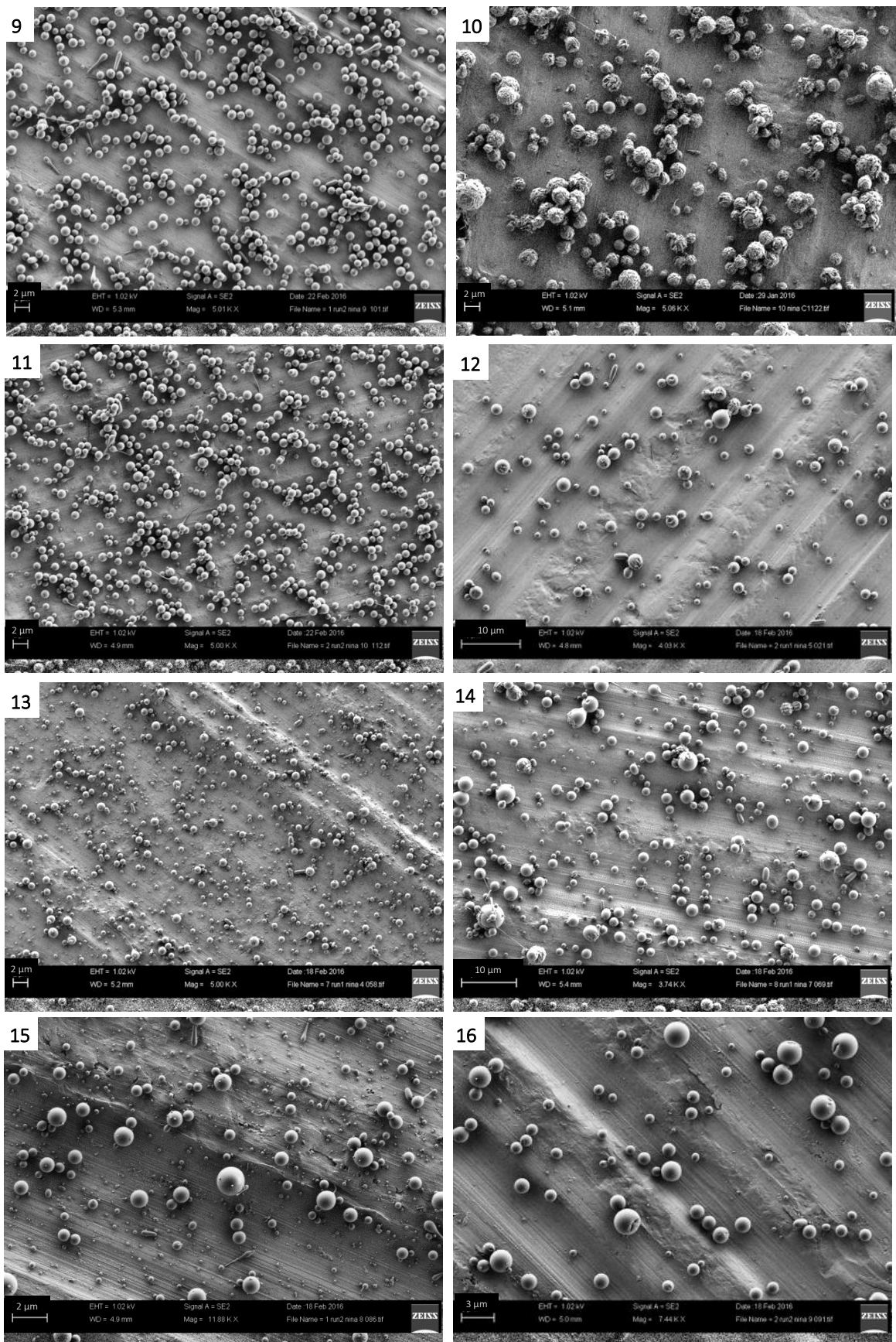
*Preglednica XVII: Procesni parametri za postavitev matematičnega modela.*

Št. vzorca	m/V % CIP	IC razdalja (cm)	Temperatura (°C)	Relativna vlažnost (%)	Pretok (mL/h)	Električna napetost (kV)	Povprečni premer (μM)	SD (μM)	RSD
1	1	15	25	45	0,25	9,5	<b>0,871</b>	0,140	16,1 %
2	1	15	25	45	1,00	10,5	<b>1,542</b>	0,344	22,3 %
3	1	20	25	45	0,25	10,0	<b>1,022</b>	0,235	23,0 %
4	1	20	25	45	1,00	10,5	<b>2,484</b>	0,529	21,3 %
5	1	15	35	28	0,25	8,6	<b>1,339</b>	0,168	12,5 %
6	1	15	35	28	1,00	9,0	<b>2,583</b>	0,314	12,1 %
7	1	20	35	28	0,25	9,5	<b>1,130</b>	0,164	14,5 %
8	1	20	35	28	1,00	9,2	<b>4,562</b>	1,732	38,0 %
9	4	15	25	45	0,25	9,8	<b>1,048</b>	0,136	13,0 %
10	4	15	25	45	1,00	9,5	<b>2,682</b>	0,868	32,4 %
11	4	20	25	45	0,25	11,0	<b>0,929</b>	0,182	19,6 %
12	4	20	25	45	1,00	11,0	<b>1,546</b>	0,588	38,0 %
13	4	15	35	28	0,25	9,6	<b>0,460</b>	0,264	57,4 %
14	4	15	35	28	1,00	10,1	<b>1,482</b>	0,640	43,1 %
15	4	20	35	28	0,25	10,8	<b>0,567</b>	0,309	54,5 %
16	4	20	35	28	1,00	11,1	<b>1,348</b>	0,603	44,8 %





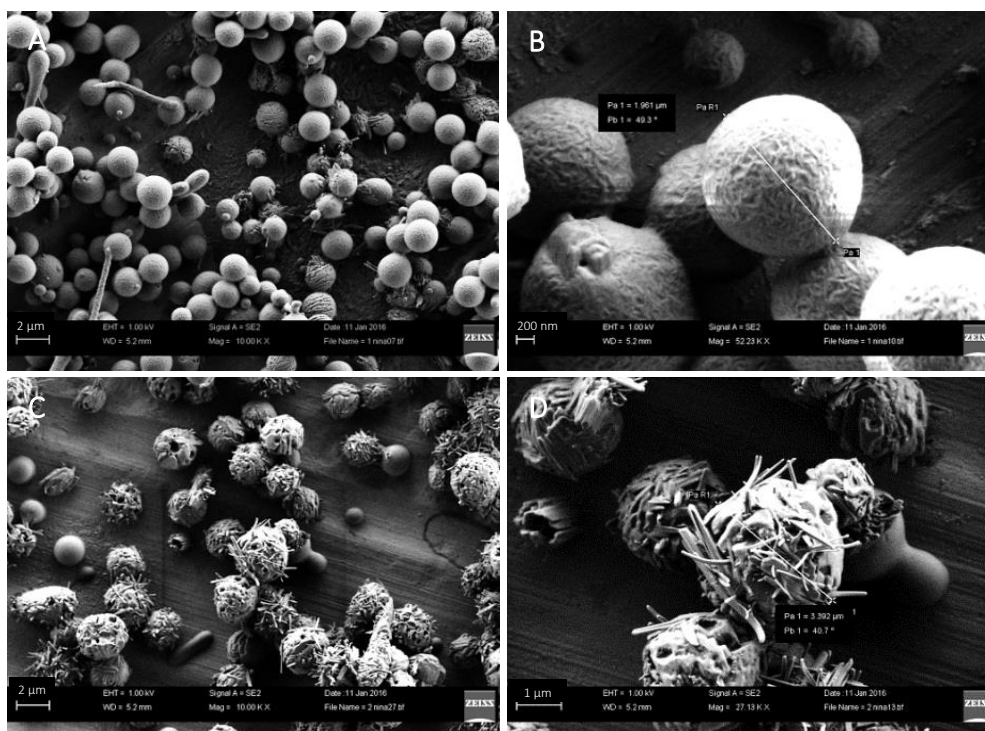
Slika 34: Mikrodenci, izdelani iz enoodstotne kloroformne raztopine CIP (vzorci št. 1 do 8).



Slika 35: Mikrodenci, izdelani iz 4-odstotne kloroformne raztopine CIP (vzorci št. 9 do 16).

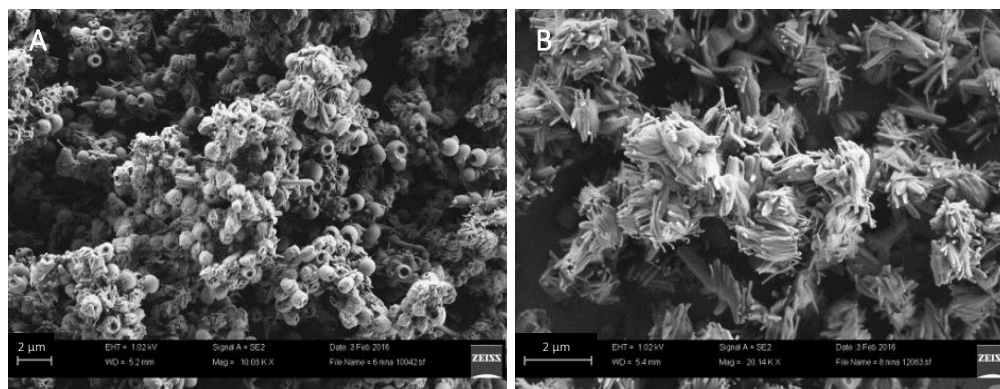
#### 4.6.1 Vpliv različnih parametrov na morfologijo delcev CIP

Z ER enoodstotne raztopine CIP pri 25 °C smo edino pri hitrosti pretoka raztopine 1 mL/h in pri IC razdalji 15 cm izdelali popolnoma gladke sferične mikrodelce (slika 36 A, B). Pri enaki hitrosti pretoka in daljši razdalji (20 cm) imajo delci po celotni površini igličaste tvorbe (slika 36 C, D).



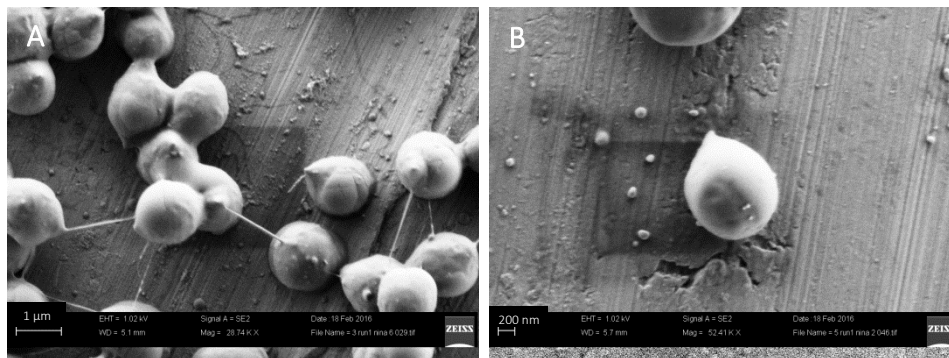
Slika 36: Mikrodelci, izdelani iz enoodstotne raztopine CIP pri 25 °C, 45 % RH,  $Q = 1$  mL/h, pri IC razdalji 15 cm (A, B) in 20 cm (C, D).

Vsi delci, izdelani pri 25 °C in manjšem pretoku (0,25 mL/h), imajo izrastke (tako delci, izdelani pri razdalji 15 cm (slika 37 A), kot tudi pri razdalji 20 cm (slika 37 B)).



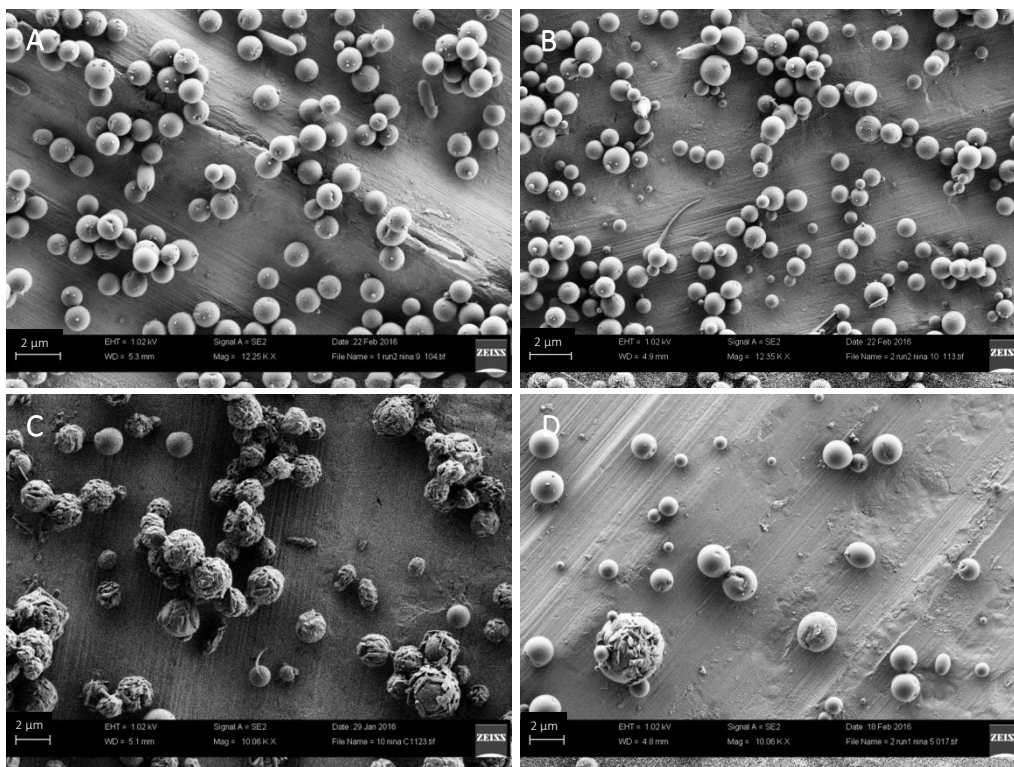
Slika 37: Mikrodelci, izdelani iz enoodstotne raztopine CIP pri 25 °C, 45 % RH,  $Q = 0,25$  mL/h, pri IC razdalji 15 cm (A) in 20 cm (B).

Če povzamemo, ER enoodstotne raztopine CIP pri temperaturi 35°C, smo pri manjšem pretoku raztopine (0,25 mL/h) izdelali mikrodolge, ki imajo obliko solz. Delci, izdelani pri krajši razdalji (15 cm), so na nekaterih območjih med seboj povezani s tankimi vlakni (slika 38 A). Tega ni pri delcih, izdelanih pri 20 cm (slika 38 B), kar lahko povežemo z dejstvom, da ima curek dalj časa, da se popolnoma pretrga in da topilo izhlapi.



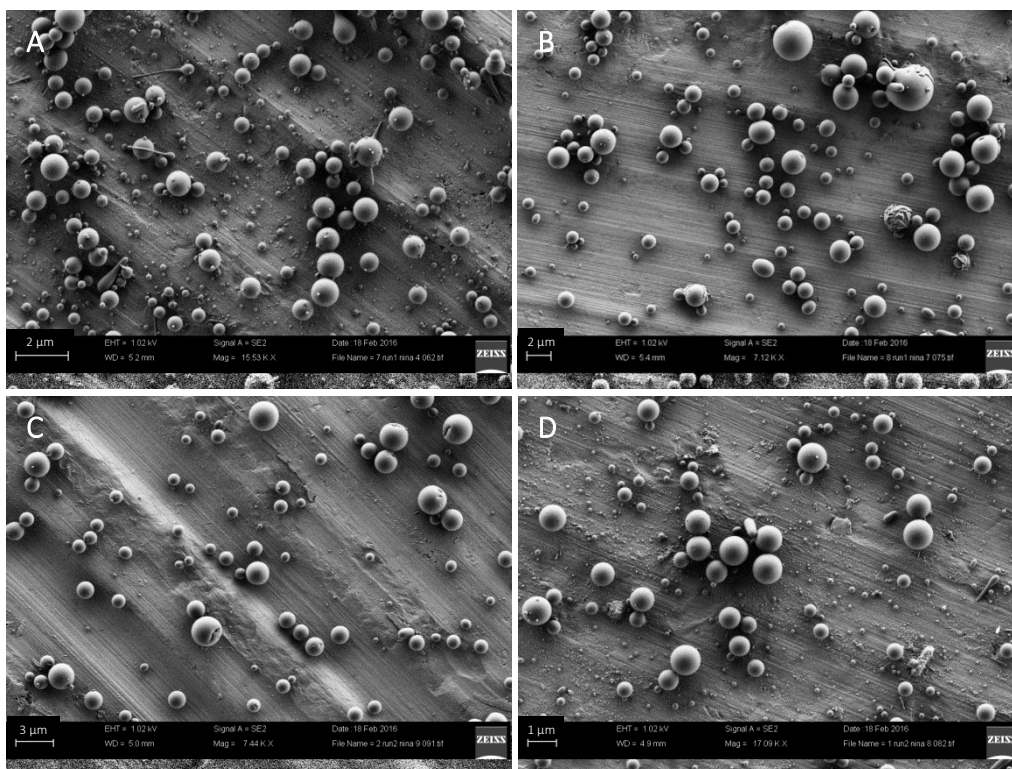
Slika 38: Mikrodolge CIP, izdelani iz enoodstotne raztopine pri 35 °C, 28 % RH,  $Q = 0,25$  mL/h, pri IC razdalji 15 cm (A) in 20 cm (B).

Bolj koncentrirana raztopina (4 % CIP) daje pri 25°C sferične delce. Delci, izdelani pri manjšem pretoku (0,25 mL/h), so popolnoma gladki (slika 39 A, B). Posledica večje hitrosti pretoka (1 ml/h) je bolj hrapava oz. večplastna površina (slika 39 C, D).



Slika 39: Mikrodolge, izdelani iz 4-odstotne raztopine, pri 25 °C, 45 % RH,  $Q = 0,25$  mL/h (IC = 15 cm (A) in 20 cm (B)) in  $Q = 1$  mL/h (IC = 15 cm (C) in 20 cm (D)).

Če primerjamo delce, izdelane iz 4-odstotne raztopine CIP pri različnih temperaturah, opazimo, da smo pri 25 °C (slika 39) izdelali delce z ožjo porazdelitvijo velikosti. Delci, izdelani pri temperaturi 35 °C, so prav tako sferični in gladki, vendar je njihova porazdelitev velikosti širša (slika 40). V nasprotju z nižjo temperaturo so delci, izdelani pri višji temperaturi, gladki tudi pri večji hitrosti pretoka raztopine (1 mL/h).



Slika 40: Mikrodelci, izdelani iz 4-odstotne raztopine pri 35 °C, 28 % RH,  $Q = 0,25$  mL/h (IC = 15 cm (A) in 20 cm (B)) in pri 1 mL/h (IC = 15 cm (C) in 20 cm (D)).

Zaključimo lahko, da bolj koncentrirana raztopina (4 % CIP) daje v splošnem bolj gladke in sferične mikrodelce CIP in če uporabimo temperaturo 25 °C, je njihova porazdelitev velikosti relativno ozka (RSD je v območju od 16 do 25 %).

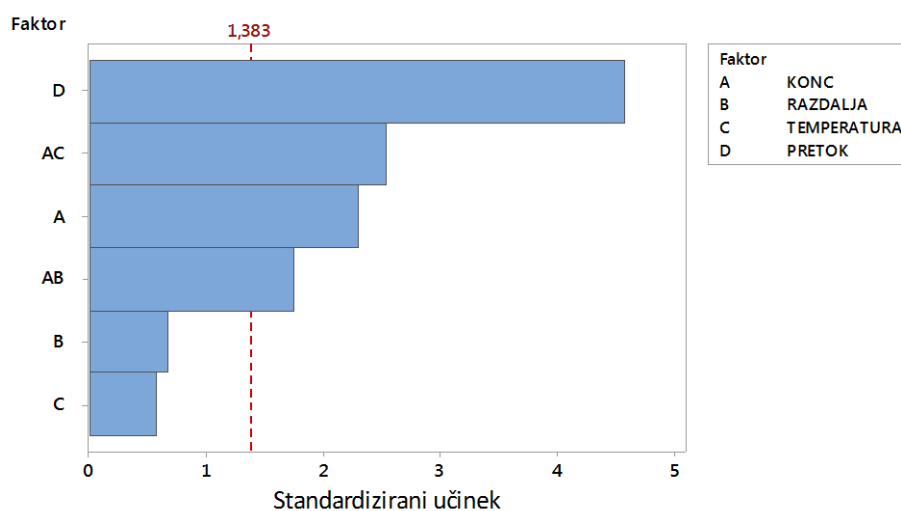
#### 4.6.2 Vpliv različnih parametrov na velikost delcev CIP

V programski paket MiniTab® 17 smo vnesli vse najmanjše in največje vrednosti za posamezne faktorje 16 preliminarnih raztopin in izvedli analizo (»Design of Experiments, Full Factorial Analysis«). Tako smo postavili model za proces izdelave sferičnih mikrodelcev antibiotika CIP. Program nam je podal enačbo 9, ki opisuje povezanost faktorjev (c – koncentracija raztopine CIP, IC – razdalja igle od zbirala, T – temperatura v komori, Q – hitrost pretoka raztopine) in povprečnega premera izdelanih delcev (d).

## Enačba 9

$$d = -6,96 + 2,492 c + 0,212 IC + 0,1427 T + 1,811 Q - 0,0691 c * IC - 0,0504 c * T$$

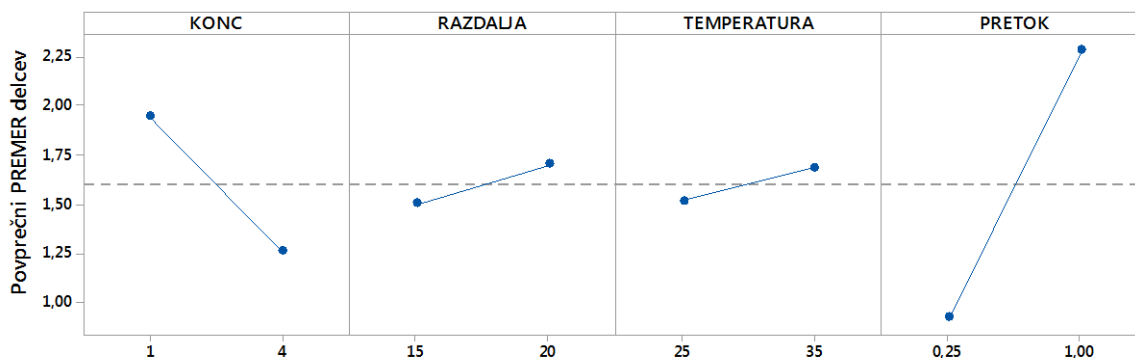
S slike 41, ki prikazuje vpliv faktorjev, ugotovimo, da imajo hitrost pretoka raztopine, koncentracija raztopine v povezavi s temperaturo, sama koncentracija raztopine in koncentracija v povezavi z razdaljo igle od zbirala značilen vpliv na premer delcev. Na premer delcev ima največji vpliv hitrost pretoka raztopine. Razdalja med iglo in zbiralom ter temperatura v komori imata majhen vpliv, pod mejo značilnosti/pomembnosti (rdeča črtkana črta na sliki 41).



Slika 41: Učinek faktorjev na premer delcev CIP.

Glede na postavljen model poda program vrednost S, ki ponazarja kakšno je odstopanje podatkov od regresijske krivulje. Nižji kot je S, boljše enačba opisuje model. V našem primeru je znašala S vrednost 0,594415.  $R^2$  je determinacijski koeficient, ki meri delež variance odvisnih spremenljivk (faktorjev) in opisuje zanesljivost modela pri enakem številu faktorjev. Večji kot je  $R^2$ , bolj je model zanesljiv, saj pojasnjuje večjo variabilnost faktorjev.  $R^2$  (pred) ponazarja napovedno moč modela, pove namreč, kako zanesljivo lahko model napove velikost delcev, v primeru spremenjenih faktorjev. Zanesljivost našega modela je 80,19 %, napovedna moč pa 37,39 %.

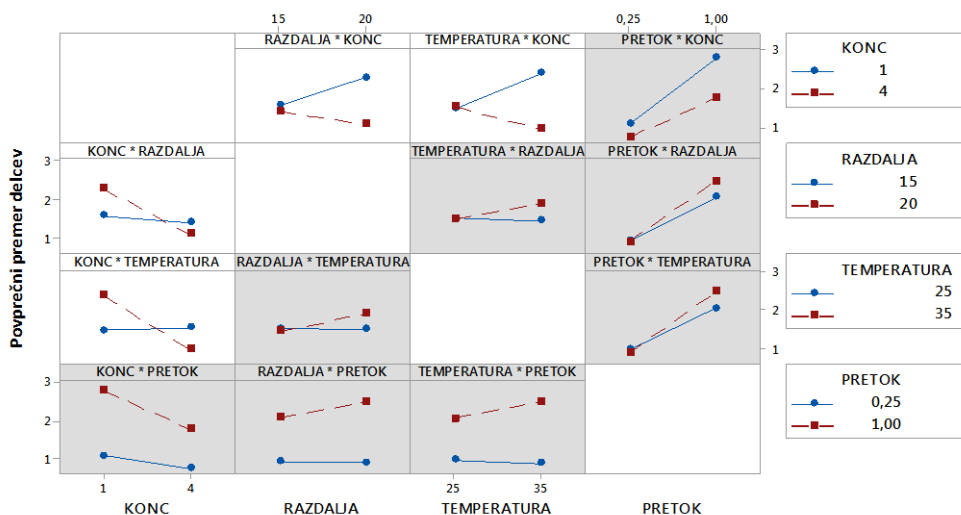
Z modelom lahko ovrednotimo tudi, v katero smer in kako močno vpliva spreminjanje faktorjev na povprečni premer delcev CIP. Večja koncentracija, krajša razdalja od igle do zbirala, nižja temperatura in manjša hitrost pretoka raztopine vodijo do zmanjšanja povprečnega premera delcev v našem primeru (slika 42).



Slika 42: Ovrednotenje učinka faktorjev na premer delcev CIP.

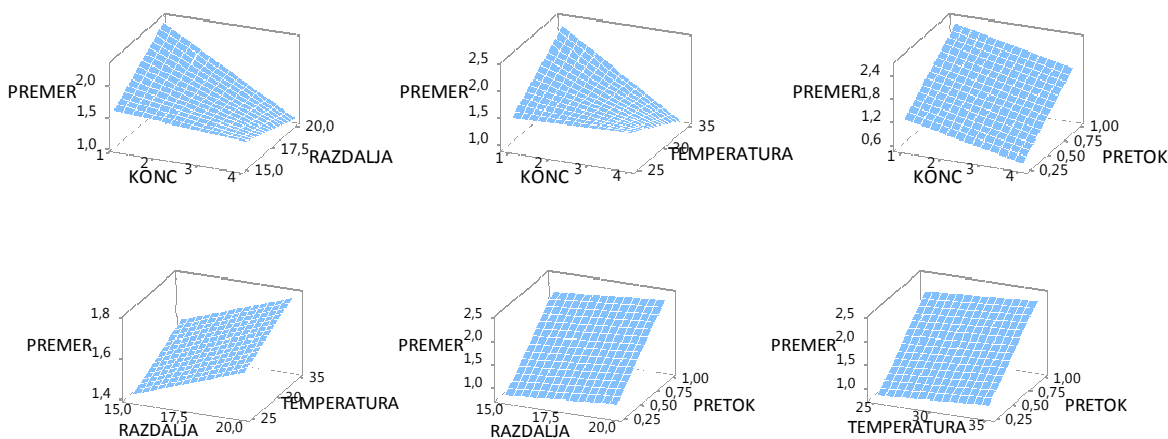
Glede na dosedanje rezultate, kjer so raziskovali predvsem vpliv različnih faktorjev na velikost polimernih delcev, so naši rezultati za delce učinkovine CIP do določene meje podobni. Večina študij podaja ugotovitve, da večja hitrost pretoka rezultira v večji velikosti delcev, izdelanih z ER (38, 40, 41, 42, 44). Takšni rezultati so popolnoma v skladu z našimi ugotovitvami. Od dosedanjih rezultatov odstopa vpliv koncentracije raztopine na premer delcev. Polimerni delci, izdelani iz bolj koncentriranih raztopin, so imeli pri dosedanjih objavljenih študijah večji premer (22, 42). Naš model kaže, da je za večji premer potrebna manjša koncentracija CIP v raztopini. Možen vzrok za to je lahko v izrazito široki porazdelitvi velikosti delcev ( $RSD > 40\%$ ), izdelanih iz 4 % CIP pri temperaturi 35 °C. Izmerjeni majhni premeri rezultirajo v majhnem povprečnem premeru omenjenih delcev in ti delci predstavljajo kar 50 % meritev za bolj koncentrirano (4 %) raztopino. Temperatura je dejavnik, ki je na splošno niso veliko proučevali. Vpliv povečanja razdalje igle od zbirala se je v raziskavah splošno izkazal v povečanju velikosti delcev, ker se ob konstanti električni napetosti zmanjša moč električnega polja (44). Pri našem raziskovanju smo spreminjali električno napetost do takšne točke, ko smo s pomočjo kamere opazili lep stožec in stabilno razprševanje in verjetno zato vpliv razdalje ni tako izrazit.

Naš model kaže, da imajo statistično pomemben vpliv nekateri faktorji v povezavi z drugimi (belo ozadje na sliki 43). Tako na zmanjšanje povprečnega premera vplivata hkrati večja koncentracija raztopine in krajša razdalja igle do zbirala ali večja koncentracija in nižja temperatura. Povezav faktorjev, ki so predstavljeni na diagramih na sivem ozadju, naš model ne zajema.



Slika 43: Odvisnost interakcij dveh faktorjev na premer delcev CIP.

Iz površinskih diagramov (slika 44) lahko razberemo hkraten vpliv dveh faktorjev na premer delcev, pri konstantnih vrednostih preostalih dveh faktorjev. Večja koncentracija in hkrati krajša razdalja igle od zbirala (ali nižja temperatura) pri konstantni hitrosti pretoka in temperaturi (ali razdalji igle do zbirala) povzročita zmanjšanje velikosti delcev. Večja koncentracija in hkrati majhna hitrost pretoka prav tako povzročita skupaj manjšo velikost delcev, pri konstantni temperaturi in razdalji. Krajša razdalja igle od zbirala in nizka temperatura (ali majhna hitrost pretoka raztopine) povzročita manjši premer delcev. Prav tako nizka temperatura in majhna hitrost pretoka omogočita zmanjšanje premera delcev.



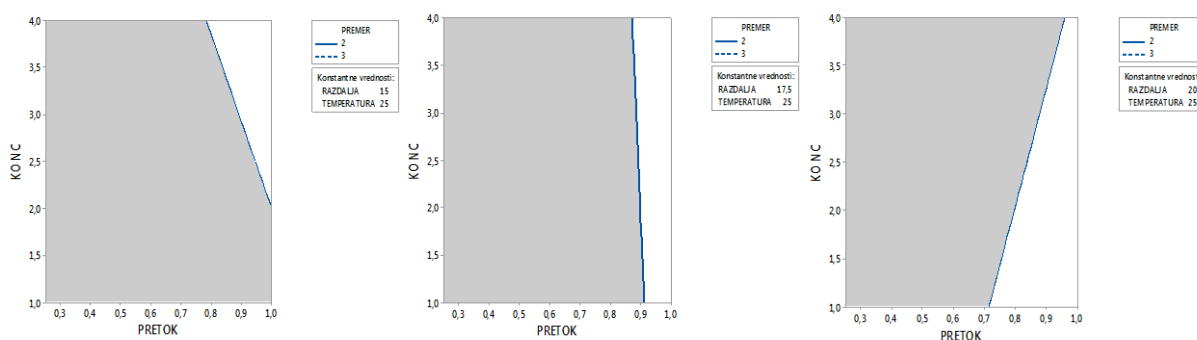
Konstante: KONC 2,5, RAZDALJA 17,5, TEMPERATURA 30, PRETOK 0,625

Slika 44: Površinski diagrami za premer delcev CIP.



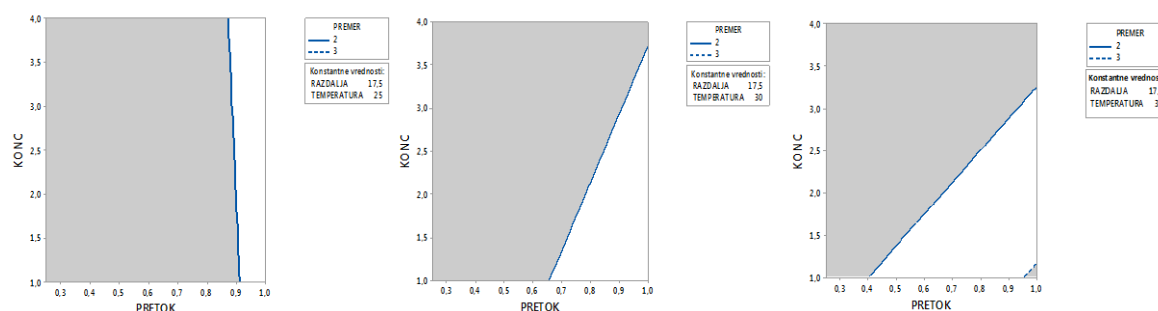
## 4.7 OPTIMIZIRANJE IN PREVERJANJE MODELA NA PRIMERU CIPROFLOKSACINA

Postavljen model (poglavje 4.6) smo optimizirali v smeri skrčenja intervala za povprečni premer delcev CIP med 2 in 3  $\mu\text{m}$ , saj so takšni delci optimalni za pulmonalno dostavo (45). Program nam je podal diagrame, ki ponazarjajo vrednosti faktorjev za izdelavo delcev v zelenemu intervalu. Belo področje (sliki 45, 46) predstavlja območje, kjer so delci večji od 2  $\mu\text{m}$  (polna črta) in manjši od 3  $\mu\text{m}$  (črtkana črta). Slika 45 prikazuje odvisnost premera delcev od koncentracije in hitrosti pretoka raztopine pri konstantni temperaturi (25  $^{\circ}\text{C}$ ). S povečevanjem razdalje igle od zbirala se manjša zahtevana hitrost pretoka pri določeni koncentraciji. Npr. pri razdalji 15 cm moramo imeti pri 2-odstotni koncentraciji 1 mL/h hitrost pretoka, da bo velikost delcev »v belem področju«.



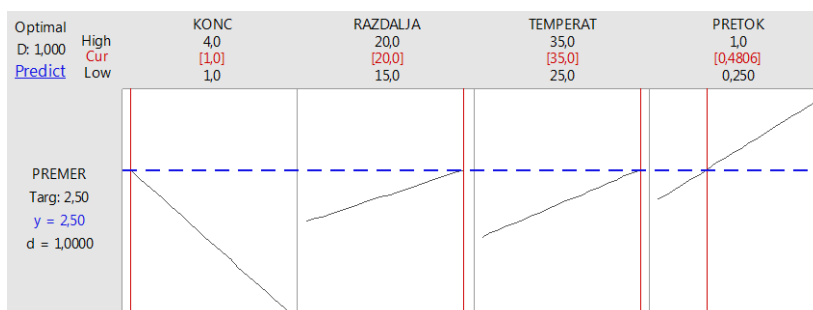
Slika 45: Optimizacija modela pri konstantni temperaturi.

V primeru konstantne razdalje igle od zbirala (17,5 cm) (slika 46) se z povečevanjem temperature prav tako manjša zahtevana hitrost pretoka raztopine. Pri temperaturi 35  $^{\circ}\text{C}$  in omenjeni razdalji moramo za želeno velikost delcev omogočiti hitrost pretoka med 0,4 in 0,9 mL/h in skladno s tem tudi koncentracijo raztopine, kot kažejo diagrami.



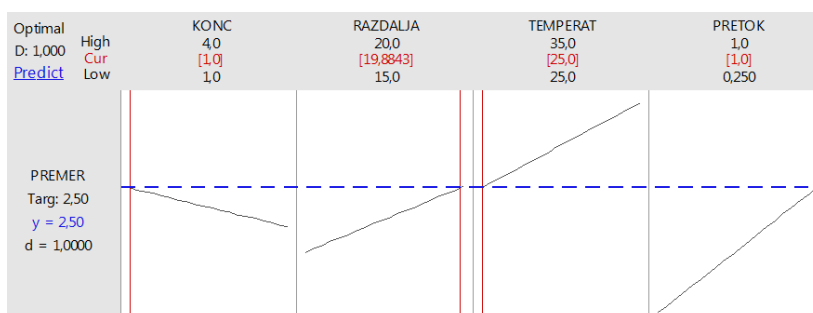
Slika 46: Optimizacija modela pri konstantni razdalji igle od zbirala.

Model lahko optimiziramo tudi tako, da nastavimo točno želeno vrednost za premer delcev. Hoteli smo izvedeti, kakšne pogoje potrebujemo, da izdelamo delce, velike 2,5  $\mu\text{m}$ . Program nam je podal diagram (slika 47) in naslednje podatke: koncentracija raztopine 1 %, razdalja igle od zbirala 20 cm, temperatura 35 °C in hitrost pretoka 0,48 mL/h.



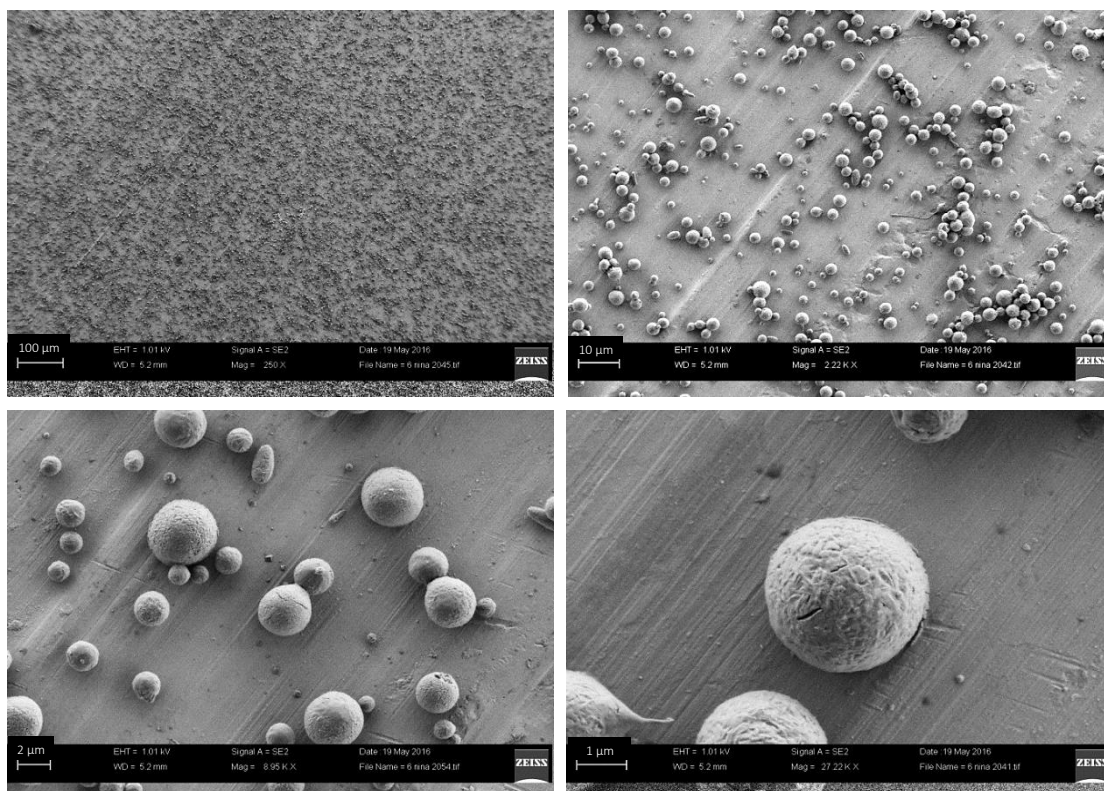
Slika 47: Optimizacija modela za premer delcev 2,5  $\mu\text{m}$ .

Ker smo pri preliminarnih eksperimentih opazili, da je proces ER pri temperaturi 25 °C in koncentraciji raztopine 1 % CIP bolj stabilen, smo »fiksirali« vrednosti za temperaturo in koncentracijo raztopine (slika 48). Program je podal vrednosti za razdaljo igle od zbirala 19,9 cm in hitrost pretoka raztopine 1 mL/h.



Slika 48: Optimizacija modela za premer delcev 2,5  $\mu\text{m}$  pri fiksni temperaturi in koncentraciji.

Zadnjo predpostavko modela smo preverili. Pripravili smo enoodstotno raztopino CIP in izvajali ER pri 25 °C in razdalji igle od zbirala 20 cm. Nastavili smo hitrosti pretoka raztopine na 1 mL/h in električno napetost takšno, ki je omogočila nastanek lepega stožca in stabilnega razprševanja (9,1 kV). Rezultat ER je predstavljen na sliki 49.



Slika 49: Preverjanje zanesljivosti modela – mikrodenci CIP, izdelani iz enoodstotne kloroformne raztopine CIP,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $45\text{ \% RH}$ ,  $IC = 20\text{ cm}$ ,  $Q = 1\text{ mL/h}$ ,  $\Delta U = 9,1\text{ kV}$ .

Povprečni premer delcev ( $d_{100}$ ) znaša  $2,235 \pm 0,581\text{ }\mu\text{m}$  (RSD: 26,0 %). Ker smo s ponovnim preskusom izdelali delce v želenem velikostnem razredu, lahko zaključimo, da je proces ER ponovljiv na preverjenih točkah. Odvisnosti med različnimi parametri in velikostjo delcev iz v uvodu predstavljenih enačb sodeč niso linearne, zato bi bilo smiselno model še dodelati v smislu izvajanja večjega števila eksperimentov.

## 5 SKLEP

V sklopu te raziskovalne naloge smo se soočili z inženiringom mikrodelcev, za kar smo uporabili nov tehnološki pristop, ki ga omogoča metoda elektrostatskega razprševanja. Iz polimernih raztopin, raztopin samih učinkovin ali zmesi obeh smo pod vplivom električnega polja izdelali nano- in mikrodelce. Pri tem smo ugotovili, da različni formulacijski in procesni parametri vplivajo na velikost in morfologijo delcev.

Polimera PCL in PVP dajeta pod ustreznimi pogoji elektrostatskega razprševanja sferične delce v nano in mikro območju, in sicer PCL z ozko porazdelitvijo velikosti ter PVP z izrazito bimodalno porazdelitvijo. Mikrodelci PCL so porozni, medtem ko imajo delci PVP gladko površino. Z laktozo smo izdelali delce v velikostnem razredu 50 do 150  $\mu\text{m}$ .

Elektrostatsko razprševanje eno- do štiriodstotne raztopine klaritromicina rezultira v suhih mikrodelcih, v obliki okroglih, nagubanih ploščic ali votlih kroglic (1 do 30  $\mu\text{m}$ ), odvisno od uporabljenega topila. Raztopina ciprofloksacina v enakih koncentracijah daje po elektrostatskem razprševanju okrogle, polne mikrodelce z želeno velikostjo (1 do 5  $\mu\text{m}$ ).

Izdelani polimerni mikrodelci PVP, v katere smo vgradili antibiotik klaritromicin niso sferični, temveč imajo obliko ploščic in nagubano površino (1 do 10  $\mu\text{m}$ ). Nanodelci PVP in ciprofloksacina pa so majhni (300 nm) in sferični. Z antibiotikom metronidazolom nismo uspeli izdelati mikrodelcev.

Za proces, ki daje sferične ter po velikosti in porazdelitvi velikosti primerne delce, smo izvedli načrtovanje eksperimentov in postavili matematični model. Pri tem smo ugotovili, da na premer delcev značilno vplivajo parametri po vrstnem redu: hitrost pretoka, koncentracija v povezavi s temperaturo, koncentracija in koncentracija v povezi z razdaljo med iglo in zbiralom. Sferični delci se razlikujejo tudi v površinskih lastnostih. Za gladko površino je pomembno, da zagotovimo ustrezno koncentracijo, dovolj majhen pretok, ustrezno temperaturo in razdaljo med iglo in zbiralom.

Elektrostatsko razprševanje obeta rešitev dveh ključnih izzivov tehnologije, in sicer predstavlja robustno metodo za izdelavo delcev z velikimi deleži vgrajene učinkovine in hkrati v eni stopnji nastanek suhih delcev z enakomerno velikostjo. V sklopu raziskovanja smo izdelali različne delce, tako po sestavi, velikosti, kot tudi morfologiji. Takšni mikro- in nanodelci v obliki praška in s povečano hitrostjo raztapljanja so dobrodošla formulacija za pulmonalno dostavo, kot tudi za vgrajevanje v druge farmacevtske oblike, kot so kapsule, tablete, mazila, in celo za v parenteralne farmacevtske oblike.

## 6 LITERATURA

1. Rodriguez-Aller M, Guillarme D, Veuthey JL, Gurny R. Strategies for formulating and delivering poorly water-soluble drugs. *J Drug Del Sci Technol* 2015; 30: 342-351.
2. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Mol Pharm* 2006; 3: 631-643.
3. Lit Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm* 2010; 399 (1–2): 129-139.
4. Kocbek P, Baumgartner S, Kristl J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int J Pharm* 2006; 312 (1–2): 179-186.
5. Saje V, Kristl J. Nanosuspenzije kot obetaven pristop za oblikovanje težko topnih zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn* 2001; 52 (2): 145-152.
6. Peterson CL. Nanotechnology: from Feynman to the Grand Challenge of Molecular Manufacturing. *IEEE Technol Soc Mag* 2004; 23 (4): 9-15.
7. National Nanotechnology Initiative: <http://www.nano.gov> (1. 10. 2015)
8. Sridhar R, Ramakrishna S. Electrospayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications. *Biomater* 2013; 3 (3): e24281.
9. Hock SC, Ying YM, Wah CL. A Review of the Current Scientific and Regulatory Status of Nanomedicines and the Challenges Ahead. *PDA J Pharm Sci Technol* 2011; 65 (2): 177-195.
10. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 2950–2962.
11. Vauthier C, Couvreur P. Nanomedicines: A New Approach for the Treatment of Serious Diseases. *J Biomed Nanotechnol* 2007; 3 (3): 223-234.
12. Bock N, Dargaville TR, Woodruff MA. Electrospaying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Prog Polym Sci* 2012; 37: 1510–1551.
13. Jaworek A, Sobczyk. Electrospaying route to nanotechnology: an overview. *J electrostat* 2008; 66:197-219.
14. Jaworek A. Electrostatic micro- and nanoencapsulation and electroemulsification: A brief review. *J Microencapsul* 2008; 25(7): 443–468.
15. Salata VO. Tools of Nanotechnology: Electrospay. *Curr Nanosci* 2005; 1: 25-33.
16. Lu, J, Hou, R, Yang, Z, Tang, Z. Development and characterization of drug-loaded biodegradable PLA microcarriers prepared by the electrospaying technique. *Int J Mol Med* 2015; 36, 249-254.
17. Ciach T. Application of electro-hydro-dynamic atomization in drug delivery. *J Drug Del Sci Tech*; 2007; 17: 367-375.

18. Wu Y, Clark RL. Controllable porous polymer particles generated by electrospraying. *J Colloid Interface Sci.* 2007; 3100: 529–535.
19. Speranza A, Ghadiri M, Newman M, Osseo L S, Ferrari G. Electro-spraying of a highly conductive and viscous liquid. *J Electrostat* 2001; 51-52: 494-501.
20. Shema načinov razprševanja: <http://www.yflow.com/electrospray/> (1.10.2015)
21. Xie J, et al. Electrohydrodynamic atomization: A two-decade effort to produce and process micro-/nanoparticulate materials. *Chem Eng Sci* 2015; 125: 32-75.
22. Almeria B, Deng WW, Fahmy TM, Gomez A. Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery. *J Colloid Interface Sci* 2010; 343:125–33.
23. Polipenko J, Kocbek P, Kristl J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *Int J Pharm* 2015; 484: 57–74.
24. Chakraborty S, et al. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 1043-1054.
25. Smallwood IM. *Handbook of organic solvent properties.* Elsevier 1996.
26. Jaworek A. Micro- and nanoparticle production by electrospraying. *Adv Powder Technol* 2007; 176:18-35.
27. Enayati M et al. Electrohydrodynamic properties of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 2011; 382: 154-164.
28. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2010; 392: 1-19.
29. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. *Progn Polym Sci* 2010; 35:1217–1256.
30. Sinha VR, et al. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* 2004; 278: 1–23.
31. Haaf F, et al. *Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and Uses.* *Polym J* 1985; 17: 143-152.
32. Rahimpour Y, Hamishehkar H. Lactose Engineering for Better Performance in Dry Powder Inhalers. *Adv Pharm Bull* 2012; 2(2):183-187.
33. Clarithromycin OpenChemistry Database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/84029#section=Color> (US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.1. Jan, 2010) (6. 6. 2016)
34. SmPC klaritromicin: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/30852> (9. 1. 2016)
35. Nowara A, et al. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *J Agric Food Chem* 1997; 45 (4): 1459–1463.
36. SmPC ciprofloksacin: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20343> (9. 1. 2016)
37. SmPC metronidazol: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/23050> (9.1.2016)
38. Yao J, et al. Characterization of electrospraying process for polymeric particle formation. *J Aerosol Sci* 2008; 39: 987-1002.

39. Hogan CJ, et al. Controlled size polymer particle production via electrohydrodynamic atomization. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 2007; 311: 67-76.
40. Xie J et al. Electrohydrodynamic atomization for biodegradable polymeric particle production. *J Colloid Interf Sci* 2006; 302: 103-112.
41. Hong Y, et al. Electrohydrodynamic atomization of quasi-monodisperse drug-loaded spherical/wrinkled microparticles. *J Aerosol Sci* 2008; 39: 525-536.
42. Almeria B, Gomez A. Electrospray synthesis of monodisperse polymer particles in a broad (60 nm-2 $\mu$ m) diameter range: guiding principles and formulation recipes. *J Colloid Interf Sci* 2014; 417: 121-130.
43. Tang K, Gomez A. Monodisperse electrospray of low conductivity liquids in the cone-jet mode. *Journal of Colloid and Interface Science*; 1996; 184: 500-511.
44. Hu JF, et al. Predicting chitosan particle size produced by electrohydrodynamic atomization. *Chem Eng Sci* 2012; 82: 159-165.
45. Ijsebaert JC et al. Electro-hydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purposes. *J Appl Physiol* 2001; 91: 2735-2741.

## 7 PRILOGE

### Priloga I – procesni parametri za ER raztopin polimerov in ZU.

Oznaka raztopine	T (°C)	RH (%)	R (µm)	IC (cm)	Q (mL/h)	ΔU (kV)
PCL1	24	30	600	15	6	8,5
	45	25	260	15	2-4	7/9/11-7/9/11
PCL2	24	30	600	15	6	9,4
	45	25	260	15	1-2-4-6	5/7/9-7/9/11-7/9/11-7/9/11
PCL3	24	30	600	15	6	12
PCL4	24	30	600	10	2	10
				15	4-6	11-11,2
	45	25	260	15	2-4-6	7/8,5/11-7/9/11-7/8,5/11
				20	2-4-6	7/8,5/11-7/9/11-7/8,5/11
PCL5	24	30	600	15	4	15,3
	45	25	260	15	2-4	7/9/11-7/9/11
PCL6	24	30	600	15	5	12,6
PCL7	24	30	600	15	4	14
PCL8	24	30	600	15	4-20	Do 20
PCL9	24	30	600	15	7	12,8
PCL10	24	30	600	15	6	15,5
PCL11	24	30	600	15	3	12,4
PCL12	24	30	600	15	6	13
PVP1	25	45	260	15	0,5-1-2	8,8-8,9-8,9
	35	26	260	15	1	8,5
	45	26	260	15	1	10,1
PVP2	25	45	260	15	0,5-1	10-10,8
KMC1	17	65	260	15	1	7/8/9/9,5
	25	30	260	15	1-2	6,5/7/9/10-7/9/11
KMC2	25	45	260	15	0,8	8,2
	35	26	260	15	0,8-1-2	7,5-8-8,2
KMC3	17	65	260	15	1	11
	45	25	260	15	1-2	8/10/12/14/16-10/12/14/16
KMC4	25	45	260	15	0,25-1	8,6-10,5
KMC5	25	45	260	18	0,25-1	10,2-11,3
KMC6	25	45	260	15	0,25-1	6,1-6,8
KMC7	25	45	260	15	0,5-1	6,3-7,3
				18	1	6,9
KMC8	25	45	260	15	1	7,5
	35	26	260	15	0,8-1-2	7,6-8,4-8,4
KMC9	25	45	260	15	1	8,7
KMC10	25	45	260	15	0,5-1	6,7-7,5
KMC11	25	45	260	18	0,25-0,5-1	7,5-7,5-8,1
KMC12	25	45	260	15	0,25-0,5-1	10,2
KMC13	25	45	260	18	0,25-0,5-1	8,1-8,3-8,5
KMC14	25	45	260	15	0,25	8,8



	35	26	260	15	1-1,5-2	9,2
KMC15	25	45	260	15	0,25-1	7,5
KMC16	25	45	260	15	0,25-1	7-8
KMC17	25	45	260	15	0,25-1	7,5-8,3
CIP1	25	45	260	15	1-1,5	7-7,5
CIP2	25	45	260	15	0,25-1	9,5-10,5
				20	0,25-1	10-10,5
	35	28	260	15	0,25-1	8,6-9
				20	0,25-1	9,5-9,2
CIP3	25	45	260	15	1-1,5-2	9-9-9
CIP4	25	45	260	15	0,25-1-1,5-2	9,8-9,5-10,4-10,5
				20	0,25-1	11-11
	35	28	260	15	0,25-1	9,6-10,1
				20	0,25-1	10,8-11,1
CIP5	25	45	260	15	0,3-0,5-1	13,5-11-9,5
				20	0,5	12,5
CIP6	25	45	260	15	0,5-1	10,8
				20	0,18-0,25-0,5	12,8-12,8-12
CIP7	25	45	260	15	0,5-1	10,8
				20	0,5	12
CIP8	25	45	260	15	0,5-1	13,4
				20	0,15-0,25	13,6
CIP9	25	45	260	15	0,5-0,8-1	Δ
CIP10	25	45	260	15	0,5-0,8-1	Δ
MNZ1	25	30	260	15	1-2	6/7/9-7/9/11
MNZ2	45	25	260	15	1-2	1/9/11-7/9/11
MNZ3	45	25	260	15	1-2	6,5/7/9/11-6,5/7/9/11
MNZ4	45	25	15	15	1-2	7/9/11-7/9/11
PVP_K1	35	26	260	15	1-2	9,8-10,1
PVP_K2	25	45	260	15	1	8
	35	26	260	15	0,8-1-2	7,6-7,6-7,9
PVP_K3	25	45	260	15	1-2-4	7/9/11-7/9/11-9/11/13
PVP_K4	25	45	260	15	0,5-1	10,6-11,4
PVP_K5	25	45	260	15	1-2	7/9/10/11-7/9/10/11
PVP_K6	25	45	260	15	0,5-1	10,9-12
PVP_K7	25	45	260	15	1-2	7/9/11-7/9/11
PVP_K8	25	45	260	15	1-2-4	7/9/10/11-7/9/10/11-9/11/13
PVP_K9	25	45	260	15	1-2	7/9/11-7/9/11
PVP_K10	25	45	260	15	0,5-1	10,2-10,3
PVP_K11	25	45	260	15	0,5-1	9,5-10,4
PVP_C1	25	45	260	15	0,5	Do 20
				15	0,5-1	13,4-14
PVP_C2	25	45	260	20	0,5	15
				15	0,5	21
PVP_C3	25	45	260	20	0,5	23
				20	0,5-1	23-17
PVP_C4	25	45	260	20	0,5-1	23-17

**Priloga II – procesni parametri za ER raztopin laktoze.**

	Mono/ko-aksialno ER	T (°C)	RH (%)	IC (cm)	$\Delta h$ (mm)	Q notr (mL/h)	Q zun (mL/h)	$\Delta U$ (kV)	
LAK1	mono	25	30	10		1/2/2,5/3/5		13-15	
	mono	25	30	15		0,5/1,5/2,5/3		14-19	
	mono	25	30	18		1/3		15,6/18	
	ko	25	30	18	0	3/1/1/2/1/0,	2/2,5/1,5/3/	11-13	
	ko	25	30	15	0	3	3		
	ko	25	30	15	2	3/2/1	3/3/3	10-11	
	ko	25	30	20	2	3/2/2,5	3/3/3	11,5	
	ko	25	30	20	4	3	3	11,5	
	ko	25	30	15	4	3/2	3/2	9,4	
	ko	25	30	10	4	3/2/1	3/2/1	9-10	
	ko	25	30	10	5	3/2/1	3/2/1	9,5	
	ko	25	30	15	5	3/2/1	3/2/1	10	
	ko	25	30	20	5	3/2/1	3/2/3	9-11	
	ko	35	25	20	4	3/2/1/5/1	3/2/1/3/3	11-12	
	ko	35	25	15	4	3	3	13	
	ko	35	25	10	4	3	3	10,1	
	ko	35	25	10	8	3	3	10,5	
	LAK2	ko	35	25	15	8	3	3	11,2
		ko	35	25	20	8	3	3	12
ko		35	25	20	8	3/2/2/5/5	3/3/2/5/3	12-14	
ko		35	25	15	8	3/2/2/4/5	3/3/2/4/5	12-17	
LAK3	ko	35	25	15	0	4/3/2/1	4/3/2/1	12-16	
	ko	35	25	20	0	3/4/2	3/4/2	15-16	
	ko	35	25	20	0	4/3/2	4/3/2	14-17	
	ko	35	25	15	0	4/3/2	4/3/2	13-14	
	ko	35	25	15	8	3/4/2	3/4/2	10-11	
	ko	35	25	20	8	3/4/2	3/4/2	12	

**Legenda:**

*T* – temperatura

*RH* – relativna vlažnost

*R* – premer igle

*IC* – razdalja med iglo in zbiralom

*Q* – hitrost pretoka raztopine

*Q notr* – hitrost pretoka v notranji igli

*Q zun* – hitrost pretoka v zunanji igli

$\Delta U$  – aplicirana električna napetost

$\Delta h$  – razlika v višini notranje in zunanje igle pri koaksialnem ER