

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA JERAJ

VPLIV TOPIL NA IZDELAVO POLIKAPROLAKTONSKIH NANOVLAKNEN Z
ELEKTROSTATSKIM SUKANJEM

EFFECT OF SOLVENTS ON THE FORMATION OF POLYCAPROLACTONE
NANOFIBERS PRODUCED BY ELECTROSPINNING

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm.

Zahvala

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Julijani Kristl mag. farm. in delovni mentorici dr. Romani Rošic, mag. farm. za strokovno vodstvo, hitro odzivnost, dosegljivost in razumevanje pri izdelavi diplomskega dela.

Hvala Janu Pelipenku mag. farm. za uvajanje v laboratorij in doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm. za izdelavo SEM posnetkov.

Rad bi se zahvalil staršema, da sta mi omogočila šolanje, verjela vame, me tekom šolanja podpirala in me vzgajala v duhu, da je v znanju moč. Hvala tudi sestrama za podporo tekom študija.

Rad bi se zahvalil tudi svoji puncici, ki mi je poleg izkazane podpore kazala tudi pot od razumskosti k človeškosti.

Na koncu pa bi se rad zahvalil še vsem prijateljem in sošolcem za vsa skupna doživetja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Julijane Kristl, mag. farm.

Žiga Jeraj

Diplomska komisija:

1. Predsednica: prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem.
2. Mentorica: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.
3. Član: doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	III
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO GRAFOV	VII
POVZETEK	VIII
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XII
1 UVOD	1
1.1 Nanovlakna	1
1.2 Uporabnost nanovlaken.....	2
1.2.1 Tkivno inženirstvo	2
1.2.2 Celjenje ran.....	3
1.2.3 Dostava zdravilnih učinkovin.....	3
1.2.4 Imobilizacija encimov	4
1.2.5 Filtracija.....	5
1.3 Metode za izdelavo nanovlaken.....	5
1.3.1 Ločitev faz	5
1.3.2 Samozdruževanje.....	6
1.3.3 Elektrostatsko sukanje	6
1.4 Polimeri za izdelavo nanovlaken	9
1.4.1 Poli (ϵ - kapro) lakton (PCL)	10
1.4.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti	10
1.4.1.2 Biorazgradljivost in biokompatibilnost.....	10
1.4.1.3 Uporabnost nanovlaken iz PCL	10
1.5 Uporaba organskih topil za izdelavo nanovlaken	11
1.5.1 Izbor ustreznega organskega topila	13
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17

3.2	Naprave	17
3.3	Postopki in metode.....	18
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	22
4.1	Izdelava in lastnosti nanovlaken iz PCL raztopin v acetonu.....	22
4.1.1	Vpliv molske mase polimera na morfologijo izdelanih nanovlaken	22
4.1.2	Vpliv napetosti na morfologijo izdelanih nanovlaken	23
4.1.3	Vpliv masnega deleža PCL na morfologijo izdelanih nanovlaken.....	25
4.1.4	Vpliv pretoka na morfologijo izdelanih nanovlaken	28
4.1.5	Vpliv prevodnosti na morfologijo izdelanih nanovlaken	29
4.1.5.1	Vpliv masnega deleža NaI na morfologijo izdelanih nanovlaken	29
4.1.5.2	Vpliv napetosti in pretoka na morfologijo gladkih nanovlaken	31
4.1.6	Prevodnost polimernih raztopin.....	33
4.2	Izdelava in lastnosti nanovlaken iz PCL raztopin v etil acetatu.....	35
4.2.1	Vpliv masnega deleža PCL na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken	35
4.2.2	Vpliv napetosti na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken	36
4.2.3	Vpliv pretoka in razdalje na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken	37
4.2.4	Dvig dielektrične konstante EtOAc raztopinam in njen vpliv na sukljivost.....	37
4.2.5	Vpliv prevodnosti na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken	39
4.2.5.1	Dodatek NaI EtOAc raztopinam.....	39
4.2.5.2	Dodatek acetona in NaI EtOAc raztopinam.....	40
4.2.5.3	Vpliv masnega deleža NaI na morfologijo izdelanih nanovlaken	43
4.2.5.4	Vpliv masnega deleža PCL in uporabljene napetosti na morfologijo gladkih nanovlaken	45
4.2.5.5	Prevodnost raztopin pripravljenih z mešanico topil EtOAc in aceton v razmerju 2 : 1	48
4.3	Osnovna analiza izdelanih nanovlaken	51
4.3.1	Zaostanek topil v procesu elektrostatskega sukanja	51
4.3.2	Stabilnost nanovlaken pri fizioloških pogojih	51
4.4	Vgradnja učinkovin v PCL nanovlakna	53
5	ZAKLJUČEK	56
6	LITERATURA.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Nanovlakna slikana z vrstičnim elektronskim mikroskopom (1).	1
Slika 2: Področja uporabe nanovlaken (1).	2
Slika 3: Učinkovitost filtra z manjšanjem premera (6).	5
Slika 4: Diagram postopka ločitev faz (prirejeno po (7)).	6
Slika 5: Shema naprave za elektrostatsko sukanje (povzeto po (1)).	7
Slika 6: Shema brizge za koaksialno elektrostatsko sukanje (prirejeno po (14)).	8
Slika 7: Urejena nanovlakna (4).	8
Slika 8: Nanovlakna z vozli.	9
Slika 9: Strukturna formula PCL.	10
Slika 10: Naprava za elektrostatsko sukanje.	18
Slika 11: SEM slika: Produkt elektrostatskega sukanja iz 20 % raztopine PCL različnih molskih mas: 14 000 g/mol (levo) in 65 000 g/mol (desno) pri $U = 20$ kV in $Q = 7,07$ mL/h.	22
Slika 12: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz 20 % raztopine PCL pri različnih uporabljenih napetostih. Zgoraj levo 10 kV, desno 15 kV in spodaj 20 kV; $Q = 7,07$ mL/h.	24
Slika 13: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopin z različnim masnim deležem PCL pri $U = 20$ kV, $Q = 7,07$ mL/h.	26
Slika 14: Strjen curek na konici igle.	28
Slika 15: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z 18 % masnim deležem PCL in različnimi masnimi deleži NaI (označeno na sliki) $U = 25$ kV, $Q = 4,24$ mL/h.	30
Slika 16: SEM slika: Produkt elektrostatskega sukanja pri uporabi EtOAc za topilo: masni delež PCL do 25 % (levo) in nad 25 % (desno).	35
Slika 17: Razbita kapljica na konici igle in njena zamašitev.	36
Slika 18: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z vol. razmerjem 1 : 3 pri $U = 10$ kV in $Q = 4,95$ mL/h in razdalji do zbirala 10 cm.	38
Slika 19: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz EtOAc raztopine z 18 % masnim deležem PCL in 0,164 % masnim deležem NaI; $U = 15$ kV, $Q = 2,83$ mL/h.	40
Slika 20: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z 16 % masnim deležem PCL in različnimi masnimi deleži NaI (označeno na sliki) $U = 25$ kV, $Q = 1,41$ mL/h.	44
Slika 21: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z različnimi masnimi deleži PCL (označeno na sliki) in 0,67 % masnim deležem NaI; $U = 25$ kV, $Q = 1,41$ mL/h.	48
Slika 22: Krpica iz polikaprolaktonskih nanovlaken.	52
Slika 23: SEM slika: Nanovlakna z vgrajenima učinkovinama.	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nanovlakna izdelana iz organskih topil	12
Preglednica 2: Fizikalno-kemijske lastnosti uporabljenih topil	14
Preglednica 3: Razvrstitev topil v skupine po smernici ICH Q3C.....	15
Preglednica 4: Parametri raztopine in elektrostatskega sukanja	22
Preglednica 5: Premer nanovlaken in vozlov v odvisnosti od napetosti	24
Preglednica 6: Premeri nanovlaken in vozlov v odvisnosti od masnega deleža polimera	27
Preglednica 7: Premeri nanovlaken in vozlov v odvisnosti od masnega deleža NaI	31
Preglednica 8: Parametri raztopine in pogojev elektrostatskega sukanja.....	35
Preglednica 9: PCL raztopine različnih dielektričnih konstant in različnih masnih deležih PCL.....	37
Preglednica 10: Parametri elektrostatskega sukanja	38
Preglednica 11: Prevodnost PCL raztopin v EtOAc ob dodatku NaI	39
Preglednica 12: Parametri elektrostatskega sukanja	39
Preglednica 13: Prevodnost EtOAc raztopine NaI v odvisnosti od vol. deleža acetona	41
Preglednica 14: Raztopine različnih masnih deležev PCL in NaI pripravljene v mešanici topil EtOAc in acetona v razmerju 2 : 1 uporabljene v procesu elektrostatskega sukanja	42
Preglednica 15: Premeri vlaken in vozlov v odvisnosti od masnega deleža NaI	43
Preglednica 16: Uporabljeni pogoji in raztopine pri elektrostatskem sukanju.....	46
Preglednica 17: Prevodnost PCL raztopin uporabljenih pri postopku elektrostatskega sukanja	49
Preglednica 18: Rezultati testa izguba pri sušenju (pri sobnih pogojih, 2 dni).....	51
Preglednica 19: Fizikalne-kemijske lastnosti modelnih učinkovin.....	53
Preglednica 20: Parametri raztopine in elektrostatskega sukanja	53

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Premer izdelanih nanovlaken (levo) in vozlov (desno) v odvisnosti od uporabljene napetosti	25
Graf 2: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža PCL.....	27
Graf 3: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža NaI	31
Graf 4: Premer nanovlaken v odvisnosti od uporabljene napetosti pri različnih pretokih.....	32
Graf 5: Premer nanovlaken v odvisnosti od uporabljenih pretokih pri različnih napetostih.	32
Graf 6: Prevodnost 18 % PCL raztopine v odvisnosti od masnega deleža NaI.....	33
Graf 7: Prevodnost EtOAc raztopine NaI v odvisnosti od vol. deleža acetona	41
Graf 8: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža NaI izdelanih iz 16 % PCL raztopine v mešanici topil EtOAc aceton (2 : 1)	43
Graf 9: Prevodnost (na grafu predstavljena s kvadrati) in premer vozlov (na grafu predstavljen s stolpci) v odvisnosti od masnega deleža NaI	44
Graf 10: Premer nanovlaken v odvisnosti od uporabljene napetosti	46
Graf 11: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža PCL.....	47
Graf 12: Prevodnost polimernih raztopin v odvisnosti od masnega deleža NaI.....	49

POVZETEK

Nanovlakna so vlaknaste strukture, ki imajo premer v nanometerskem velikostnem razredu, njihova dolžina pa je teoretično neomejena. V zadnjih letih so zaradi njihove uporabe na različnih področjih predmet številnih raziskav.

Namen diplomskega dela je bil izdelati nanovlakna iz polimera poli (ϵ -kapro) laktona (PCL) s postopkom elektrostatskega sukanja, ovrednotiti vpliv uporabljenih topil, lastnosti raztopine in procesnih parametrov elektrostatskega sukanja na njihov nastanek ter opraviti osnovne analize na izdelanih nanovlaknih in preveriti možnost vgradnje zdravilne učinkovine v njih.

PCL je sintezni polimer, ki ima mnoge dobre lastnosti, kot so necitotoksičnost, neimunogenost, nekancerogenost in netrombogenost, poleg tega pa je tudi biorazgradljiv. Zaradi svoje strukture je hidrofoben, zato smo za izdelavo nanovlaken morali uporabiti organska topila. Izbrali smo aceton in etil acetat (EtOAc), ki sta s toksikološkega vidika najbolj primerna in se razlikujeta v fizikalno-kemijskih lastnostih. Najpomembnejša je razlika v vrednosti dielektrične konstante, ki je pomemben dejavnik pri elektrostatskem sukanju. Rezultati so pokazali, da je za izdelavo nanovlaken primeren PCL z molsko maso 65 000 g/mol. Ko smo za topilo uporabili aceton, so nastala nanovlakna z vozlasto morfologijo, ki je ni odpravilo ne spreminjanje procesnih parametrov elektrostatskega sukanja (uporabljena napetost in pretok), ne spreminjanje masnega deleža PCL (sprememba viskoznosti raztopine). Vozle smo odpravili z dodatkom natrijevega jodida (NaI) v raztopino za elektrostatsko sukanje. Ta ji je povečal prevodnost in gostoto električnega naboja, kar je privedlo do večjega raztezanja polimernih verig med elektrostatskim sukanjem in odprave vozlov.

Ko smo za topilo uporabili samo EtOAc nanovlakna niso nastala, ob uporabi kombinacije topil EtOAc in aceton v volumskem razmerju 2 : 1 v prid prvega in dodatku NaI, pa so nastala nanovlakna brez vozlov. Ta kombinacija je zagotovila zadostno gostoto električnega naboja v curku.

Ugotovili smo, da je najbolj kritični parameter pri elektrostatskem sukanju raztopin iz organskih topil količina naboja v curku, ki ga kontroliramo z dielektrično konstanto in s prevodnostjo raztopine. Večja kot je dielektrična konstanta, manjša je potrebna prevodnost za nastanek gladkih nanovlaken.

Dokazali smo tudi, da vsebujejo nanovlakna takoj po izdelavi še približno 2 % hlapnih snovi ter da so nanovlakna izdelana iz PCL obstojna pri fizioloških pogojih vsaj pet dni.

V nanovlakna smo vgradili tudi dve modelni učinkovini, resveratrol in ibuprofen, vendar se je pri tem morfologija nanovlaken spremenila. Vgradnja bi potrebovala optimizacijo, prav tako pa bi bilo smiselno preveriti kinetiko sproščanja učinkovine iz nanovlaken.

Ključne besede: nanovlakna, polikaprolakton, elektrostatsko sukanje, organska topila, dielektrična konstanta, prevodnost

ABSTRACT

Nanofibers are fibrous structure which have diameter in the nanometer size range and their length is theoretically unlimited. Due to their potential applications in various areas are subject of numerous studies.

The aim of our work was to produce poli (ϵ -capro) lactone (PCL) nanofibers by electrospinning and to evaluate the influence of solvent, solution's properties and process parameters on nanofibers' morphology and furthermore to perform basic analysis of nanofibers and to evaluate the possibility of active ingredient incorporation.

PCL is a synthetic polymer which is non-cytotoxic, non-immunogenic, non-carcinogenic, non-thrombogenic and also biodegradable. Because of its structure it is hydrophobic, so it was necessary to use organic solvent for the production of nanofibers. We have chosen acetone and ethyl acetate (EtOAc), which are the most acceptable from a toxicological point of view. Selected solvents differ in physic-chemical properties. The most important is the difference in the value of the dielectric constant, which is an important factor in electrospinning. A suitable molar weight of PCL for the production of nanofibers is 65 000 g/mol as has been found. When acetone was used as a solvent, the produced nanofibers showed beads. Beads remained present at different process parameters of electrospinning (applied voltage and flow rate) and different mass fractions of PCL (change in viscosity of the solution). Beads were removed by addition of sodium iodide (NaI) in the solution for electrospinning. This addition increased conductivity and density of electric charge in a solution which led to greater stretching of polymer chains during electrospinning.

PCL dissolved only in EtOAc do not form nanofibers when electrospinned. Smooth nanofibers have been produced by dissolving PCL in mixture of EtOAc and acetone in the volume ratio 2:1 and by addition of NaI. This combination provided a sufficient density of electric charge in a jet.

It has been found that the most critical parameter of electrospinning is a density of electric charge in a jet, which is controlled by dielectric constant of a solvent and by conductivity of the solution. When using solvent with higher dielectric constant, lower conductivity of solution is needed for formation of smooth nanofibers.

We have showed that nanofibers immediately after the production contain about 2 % of volatile matter and that nanofibers produced from PCL are stable under physiological conditions.

In nanofibers two model active ingredient, ibuprofen and resveratrol were incorporated, which changed the morphology of nanofibers. Incorporation of active ingredient would require optimization, and also it would be necessary to investigate the kinetics of drug release.

Keywords: nanofibres, polycaprolactone, electrospinning, organic solvents, dielectric constant, conductivity

SEZNAM OKRAJŠAV

BSA – goveji serumski albumin

c_p – specifična toplotna kapaciteta

DNA – deoksiribonukleinska kislina

EtOAc – etil acetat

ICH – The International Conference on Harmonisation

M_r – molekulska masa

M_w – molska masa

NaI – natrijev jodid

p – polarizacija na enoto volumna

PCL – poli (ϵ – kapro) lakton

PEG – polietilen glikol

PGA – poliglikolna kislina

PGLA – kopolimer poliglikolne in polimlečne kisline

Ph. Eur. – Evropska farmakopeja

PLA – polimlečna kislina

PLA-CL – kopolimer polimlečne kisline in polikaprolaktona

p_t – parni tlak

PU – poliuretan

PVA – polivinil alkohol

Q – pretok

RH – relativna vlažnost

SD – standardna deviacija

SEM – vrstični elektronski mikroskop (*ang. Scanning Electron Microscope*)

T_b – temperatura vrelišča

T_g – temperatura steklastega prehoda

T_m – temperatura tališča

U – napetost

x – molski ulomek

μ – dipolni moment

ϵ – dielektrična konstanta

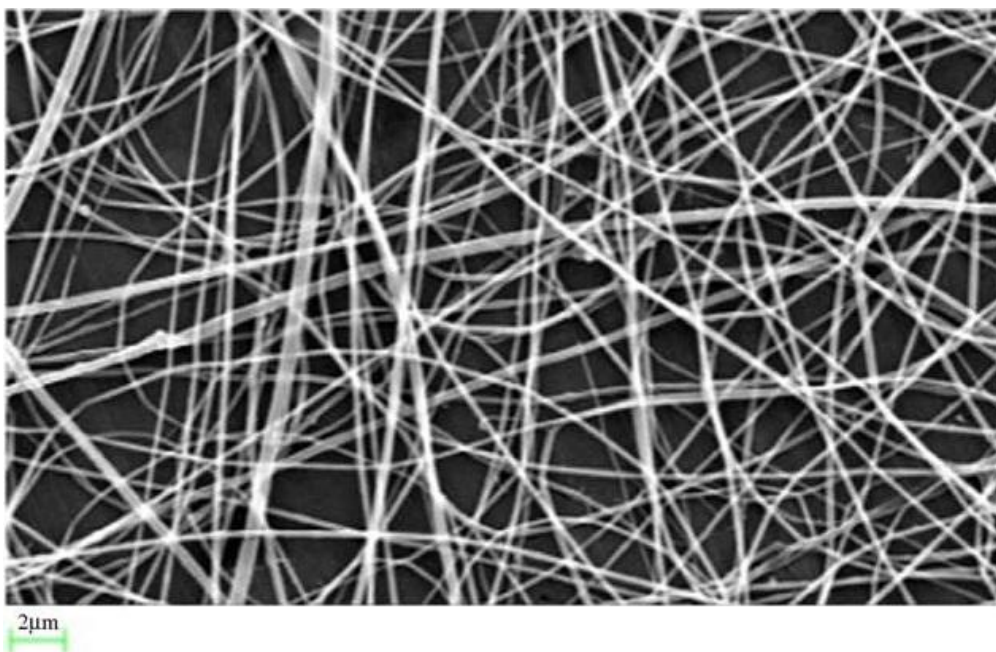
ρ – gostota

1 UVOD

Razmah nanotehnologije v zadnjem desetletju je spodbudil razvoj novih nanosistemov, med katerimi so tudi nanovlakna. O tem priča podatek, da svetovno znani iskalnik znanstvene literature ScienceDirect do vključno leta 2000 z iskalnim poljem »nanofibers« najde le 111 zadetkov, v primerjavi z leti 2001–2012 ko najde 13 136 zadetkov. Nanovlakna nam prinašajo na biomedicinskem področju nove možnosti, med katerimi so najpomembnejše tiste v tkivnem inženirstvu, celjenju ran in dostavi učinkovin.

1.1 Nanovlakna

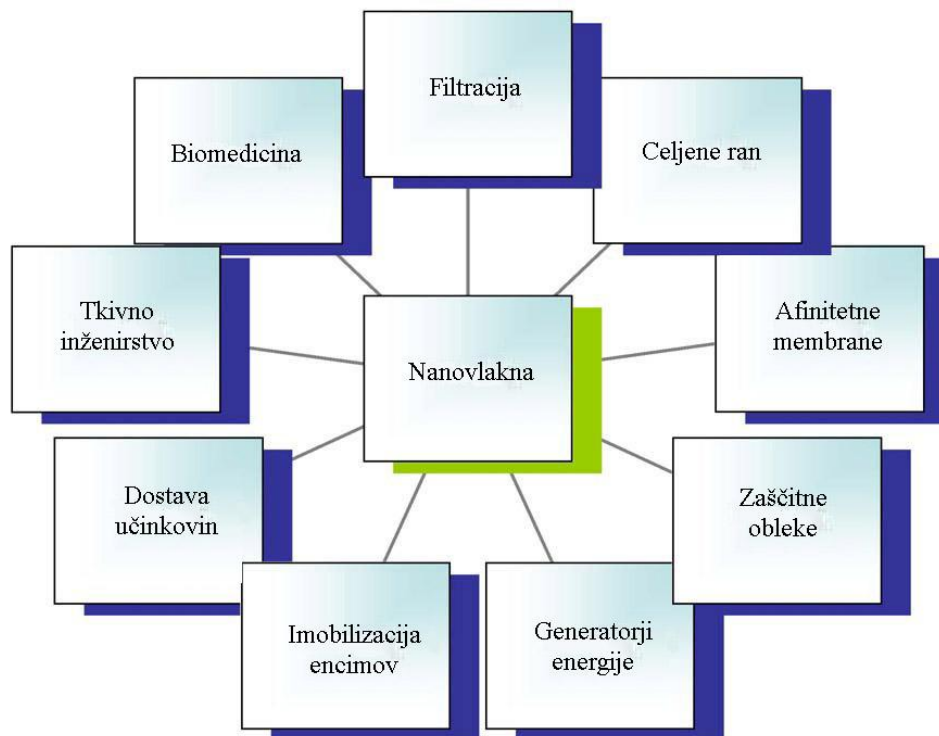
Izraz nanovlakna označuje vlakna, ki imajo premer v nanometrskem velikostnem razredu (slika 1) in teoretično neomejeno dolžino, ki je v praksi odvisna od načina izdelave. Zaradi tako majhnega premera izkazujejo značilne lastnosti, kot so velika površina na enoto mase (tudi do 1000-krat večja v primerjavi z mikrovlakni), majhna velikost por (nanovlakna so lahko zelo porozna) in izboljšane mehanske lastnosti snovi (trdnost, prožnost). Te lastnosti lahko spreminjajmo z uporabo različnih polimerov in procesnih parametrov. Zaradi teh edinstvenih značilnosti imajo zelo široko možnost uporabe, tudi v farmaciji in biomedicini (1–7).



Slika 1: Nanovlakna slikana z vrstičnim elektronskim mikroskopom (1).

1.2 Uporabnost nanovlaken

Nanovlakna se zaradi svojih posebnih lastnosti lahko uporabljajo na številnih področjih, kar prikazuje slika 2.



Slika 2: Področja uporabe nanovlaken (1).

1.2.1 Tkivno inženirstvo

Tkivno inženirstvo je multidisciplinarna veda, ki se ukvarja z razvojem bioloških nadomestkov z namenom ohranitve, obnovitve ali izboljšanjem funkcije tkiv oziroma organov (1, 4, 5). Že od začetka je bil koncept združiti celice, tridimenzionalni nosilec (umetno zunajcelično ogrodje) in tehnologijo bioreaktorjev za izdelavo novih tkiv/organov. To je logično, saj je vsako tkivo oziroma organ v našem telesu sestavljeno iz parenhimskih celic (funkcionalne celice), mezenhimskih celic (oporne celice) in zunajceličnega ogrodja (4).

Za vzgojitev in presaditev živega tkiva je torej nujno potrebno tridimenzionalno ogrodje, ki podpira celično adhezijo in proliferacijo ter se po presaditvi v organizem tudi razgradi in nadomesti z nativnim zunajceličnim ogrodjem (1, 4, 5). Ugotovili so, da ogrodje iz nanovlaken podpira interakcije med samimi celicami in prav tako med celicami in zunajceličnim ogrodjem. Premer nanovlaken od 50 do 500 nm je podoben vlaknom, ki jih najdemo v zunajceličnem ogrodju in tako posnemajo naravno okolje tkiva (1, 4, 5). Zaradi teh pozitivnih lastnosti se nanovlakna lahko uporabljajo kot ogrodje v tkivnem inženirstvu.

1.2.2 Celjenje ran

Idealna obloga za celjenje ran bi morala biti zmožna hemostaze in absorpcije odvečnega izločka, biti učinkovita kot bakterijska bariera in imeti primerno prepustnost za vodno paro, zadostno zmožnost izmenjave plinov in funkcionalno adhezijo, bila naj bi neboleča za paciente, lahko odstranljiva in cenovno ugodna (9).

Nanovlakna so se s svojo strukturo izkazala kot zelo primerna obloga za celjenje ran. Svoj učinek dosegajo po dveh dopolnjujočih poteh: po eni zagotavljajo vlažno okolje, po drugi pa nudijo mehansko oporo celicam in spodbujajo njihovo adhezijo in celično proliferacijo (1, 10).

Khil in ostali so v *in vivo* študiji ugotovili, da obloga iz nanovlaken izdelanih iz poliuretana zagotavlja nadzorovano izgubo vlage in odlično prepustnost za kisik. Ima tudi odlično drenažno sposobnost, ki je posledica velike poroznosti in samih lastnosti poliuretana. Obloga ni prepustila nobenega mikroorganizma in se ni izkazala kot toksična. Histološki pregled je pokazal, da se je hitrost epitelizacije povečala v primerjavi s kontrolo, ki je bila komercialna kontaktna mrežica Tegaderm™ (11).

Novejše raziskave gredo v smeri pripenjanja oziroma adsorpcije različnih snovi na nanovlakna ali vgradnje snovi v njih in s tem izboljšanje določenih lastnosti (1). Tako so na primer Jia in ostali pripravili protibakterijsko membrano iz nanovlaken iz polivinil alkohola (PVA). V vodno raztopino PVA-ja so dodali nanodelce iz cirkonijevega fosfata napolnjene z Ag⁺ ioni in nato nanovlakna izdelali s postopkom elektrostatskega sukanja. Izkazalo se je, da taka membrana deluje protibakterijsko proti testiranim sevom (12).

Choi in sodelavci so izdelali nanovlakna iz mešanice polikaprolaktona in kopolimera PCL-PEG na katerega so kovalentno vezali rekombinantni človeški epidermalni rastni dejavnik. *In vivo* študija celjenja diabetične razjede na miših je pokazala, da je taka obloga povečala ekspresijo keratinocitov in da se je rana hitreje celila kot v ostalih testnih skupinah (13).

1.2.3 Dostava zdravilnih učinkovin

Nanovlakna se zaradi svojih funkcionalnih značilnosti uporabljajo kot dostavni sistemi za zdravilne učinkovine. Odvisno od polimera, velikosti por in morfologije izdelanih nanovlaken lahko pripravimo farmacevtsko obliko s hitrim, zakasnenim ali nadzorovanim sproščanjem (1, 5). Znano je, da se hitrost raztapljanja učinkovine povečuje s povečevanjem površine učinkovine in nosilca, iz katerega se učinkovina sprošča. Elektrostatsko sukanje, kot metoda priprave nanovlaken, omogoča hitro in učinkovito odparevanje topila med izdelavo, kar

zagotavlja zelo kratek čas, ki je na voljo za rekristalizacijo vgrajene učinkovine. Na ta način lahko izdelamo trdne disperzije učinkovin v nanovlaknih in s tem izboljšamo hitrost raztapljanja težko topnih učinkovin (1).

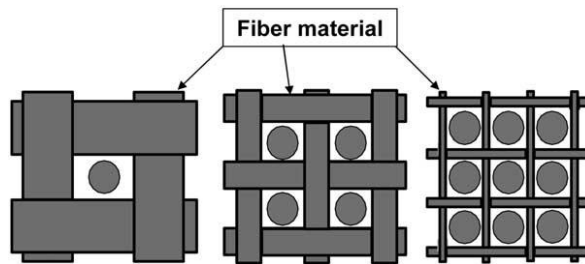
Uporabljajo se tako biorazgradljivi kot bionerazgradljivi materiali, odvisno ali hočemo nadzorovati sproščanje samo z difuzijo učinkovine ali z difuzijo učinkovine in razgradnjo nosilca (3). Zaradi velike fleksibilnosti, ki jo imamo pri izbiri materiala, lahko ta dostavni sistem uporabljamo za veliko število učinkovin: tako male molekule, ki so lahko lipofilne (v literaturi najdemo npr. ibuprofen, cefazolin, rafampin, paclitaksel, itrakonazol, ki so že bile vgrajene v nanovlakna) ali hidrofilne (npr. mefoksin, sol tetraciklina) (1), kot tudi večje in bolj občutljive molekule kot so peptidi, proteini in DNA (3, 8). Tako so Jiang in sodelavci z metodo koaksialnega elektrostatskega sukanja pripravili nanovlakna tipa jedro-ovojnica, v katera so vgradili protein, v nekatera so vgradili BSA, v druga lizosim. Z *in vitro* testi so dokazali konstantno sproščanje proteina iz strukture in ohranitev native konformacije proteina (8).

1.2.4 Imobilizacija encimov

Imobilizacija encimov na inerten ne vodotopen nosilec je predmet številnih raziskav, saj imajo imobilizirani encimi številne prednosti pred raztopljenimi, kot so ponovna uporabljivost, boljša kontrola reakcije in boljša stabilnost (1). Delovanje imobiliziranih encimov je v veliki meri odvisno od strukture in lastnosti nosilnega materiala. Poročni material se je izkazal za primernejšega, saj zagotavlja večjo vezavo encimov na nosilec, poleg tega pa je olajšana tudi difuzija substratov in produktov do in od encimov. Zaradi velike specifične površine je povečana tudi katalitska sposobnost encimov. Nanovlakna iz ustreznega polimera lahko predstavljajo prav tak porozen, inerten nosilec (1). Encime lahko na dva načina imobiliziramo na oziroma v nanovlakna; bodisi jih kovalentno vežemo na površino, bodisi jih vgradimo v notranjost z metodo koaksialnega elektrostatskega sukanja. Slednji način omogoča večjo vezavno kapaciteto za encim. Kljub številnim raziskavam pa uporabnost imobiliziranih encimov omejuje slaba katalitska učinkovitost in stabilnost encimov, težave pri izdelovanju večjih, ponovljivih serij, in majhno število metod s katerimi lahko ocenimo in preverjamo njihovo kakovost (1).

1.2.5 Filtracija

Filtracija je potrebna v številnih tehničnih panogah. Ocenjeno je, da bo do leta 2020 trg filtracije vreden 700 milijard ameriških dolarjev (6). Polimerna nanovlakna se že desetletja uporabljajo za filtracijo zraka (1). Vlaknast material, ki se uporablja za



Slika 3: Učinkovitost filtra z manjšanjem premera (6).

filtriranje, ima dve glavni prednosti: visoko učinkovitost filtriranja in majhen zračni upor (6). Za učinkovito filtracijo morajo biti pore in strukturni elementi filtra v velikostnem razredu delcev ali kapljic, ki jih želimo ujeti na filter (slika 3) (1, 6). Tako se že sama po sebi ponuja možnost, da lahko zelo učinkovite in efektivne filtre izdelamo iz nanovlaken. Zaradi velikega razmerja med površino in maso, kar rezultira v visoki površinski koheziji, se lahko na nanovlakanste filtre enostavno ujamejo delci $< 0,5\mu\text{m}$ (1, 6). Nekatere raziskovalne skupine so uspešno izdelale nanovlakanste strukture, ki vsebujejo različno število kvarternih aaminskih skupin. Taka vlakna so se izkazala kot učinkoviti protimikrobni filtri. Obstajajo pa tudi drugi primeri uporabe nanovlakanstih membran, kot na primer čiščenje velikih molekul DNA in proteinov (1).

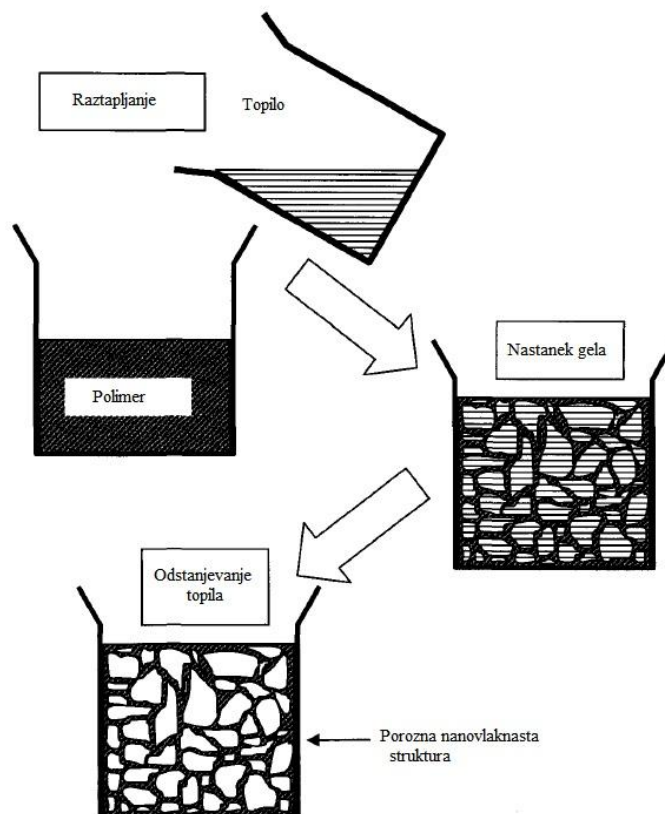
1.3 Metode za izdelavo nanovlaken

Obstaja več metod priprave nanovlaken (7), vendar pa se v biomedicinske namene uporabljajo predvsem tri: ločitev faz (*ang. Phase separation*), samozdruževanje (*ang. Self-assembly*) in elektrostatsko sukanje (*ang. Electrospinning*) (4). Zaradi enostavnosti, nizke cene, vsestranskosti in prenosljivosti na industrijski nivo se največ uporablja elektrostatsko sukanje (1, 2, 4, 6), ki ga bomo uporabljali tudi mi.

1.3.1 Ločitev faz

Ločitev faz je termodinamska ločitev raztopine polimera v dve fazi: v fazo bogato s polimerom in v fazo revno s polimerom, ki jo nato ekstrahirajo in tako ostane samo prva (4, 7). Postopek poteka v več stopnjah in je prikazan na sliki 4. Najprej raztopijo polimer v ustreznem topilu, nato inducirajo ločitev faz. To lahko storijo toplotno (najpogosteje) ali z dodatkom netopila, tako nastane gel. Voda se nato uporabi za ekstrakcijo topila iz gela in njegovo utrditev. Gel ohladijo na temperaturo, ki je nižja od temperature steklastega prehoda polimera in nato liofilizirajo v vakumu (4, 7). Na ta način dobijo nanovlakna, ki so lahko zelo porozna. Velikost in distribucijo por lahko kontrolirajo z dodatkom različnih porogenv

(npr. sladkor, anorganske soli, parafinske sfere) (4). Ločitev faz je enostavna tehnika, ki ne zahteva posebne specializirane opreme. Preprosto je doseči ponovljivost med serijami in spreminjati mehanske lastnosti in arhitekturo vlaken z variiranjem razmerja polimer/porogen (4). Omejitvena faktorja te metode sta, da je nanovlakna možno proizvesti samo z določenim (majhnim) številom polimerov in da je primerna izključno za laboratorijski nivo (4).



Slika 4: Diagram postopka ločitev faz (prirejeno po (7)).

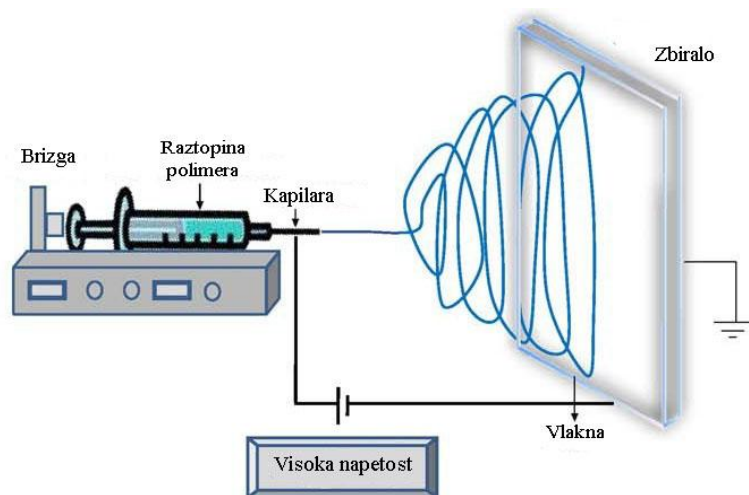
1.3.2 Samozdruževanje

Samozdruževanje je postopek pri katerem se komponente spontano orientirajo in med seboj povežejo z nekovalentnimi vezmi. To je zahteven laboratorijski postopek, ki je omejen na majhno število polimerov. Zaradi svoje kompleksnosti, časovne potratnosti in majhnega izkoristka je metoda omejena na laboratorijski nivo (4).

1.3.3 Elektrostatsko sukanje

Izraz elektrostatsko sukanje označuje najbolj široko uporabljeno tehniko za izdelavo nanovlaken (1). Prvi jo je raziskoval Zeleny že leta 1914 in ugotovil, da lahko s tem procesom izdelava polimerna vlakna majhnih premerov. Prvi je to tehniko patentiral Anton Formhals leta 1934 (2). Podroben opis samega dogajanja med sukanjem in mehanizem nastanka curka pa je leta 1969 opisal Sir Geoffrey Ingram Taylor (2) in ga bom navedel v nadaljevanju.

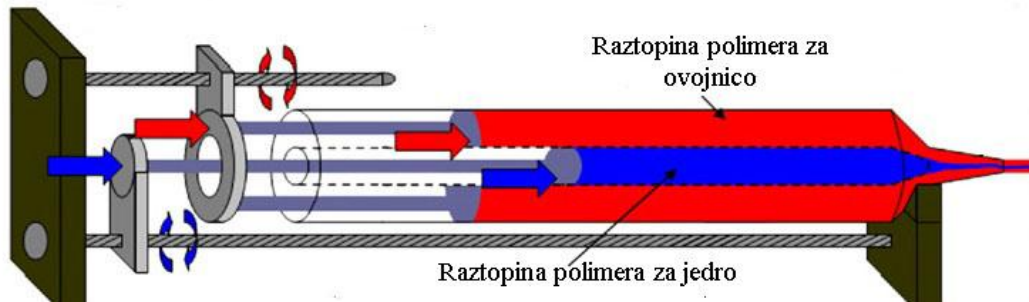
V najenostavnejši izvedbi je naprava za elektrostatsko sukanje sestavljena iz treh glavnih komponent: generatorja, ki lahko generira visoke napetosti (do 100 kV), majhne kovinske kapilare skozi katero je zagotovljen konstanten pretok raztopine/taline polimera in ozemljenega zbirala, na katerem se zbirajo nanovlakna (slika 5). Glede na tok raztopine skozi kapilaro ločimo dve izvedbi: horizontalno in vertikalno (1).



Slika 5: Shema naprave za elektrostatsko sukanje (povzeto po (1)).

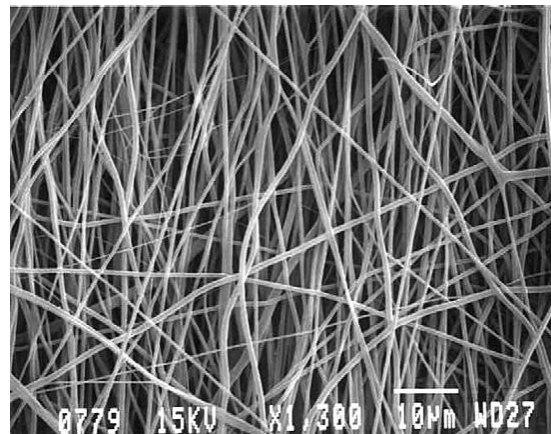
Ko električna napetost ni priključena, na koncu kapilare enakomerno kapljajo kapljice. Z njeno vključitvijo v raztopino polimera vnesemo električni naboj, ki se porazdeli po površini kapljice. Odbojne interakcije med istoznačnimi naboji v raztopini in privlačna sila med raztopino in ozemljenim zbiralom povzročita, da se kapljica začne podaljševati in raztezati v smeri proti zbiralu. Temu nasprotujeta površinska napetost in viskoelastične sile raztopine polimera, ki zadržujejo kapljico v sferični obliki. S povečevanjem napetosti bomo dosegli točko, v kateri bodo elektrostatske sile in površinska napetost raztopine v ravnovesju. Takrat se bo tvoril Taylorjev stožec. Če bomo napetost še povečali, se bo tvoril tanek curek iz vrha stožca in bo potoval proti ozemljenemu zbiralu. Na tej poti je curek podvržen nestabilnostim in se zato zvija, kar podaljša čas in pot potovanja do zbirala. Nestabilnost se pojavi zaradi odbojnih interakcij med istoznačnimi naboji v curku. Rezultat nestabilnosti je tanjšanje curka, raztezanje polimernih verig in izhlapevanje topila. Na zbiralu se zbirajo trdna in suha nanovlakna (1–4).

Obstaja več izvedb naprave za elektrostatsko sukanje. Pretok raztopine polimera skozi kapilarno običajno zagotavljamo z brizgo, katere bat enakomerno potiskamo naprej, lahko pa je pretok zagotovljen tudi z gravitacijsko silo ali pa s stisnjenim plinom (3). Tudi ostali deli naprave so doživeli različne modifikacije. Ena najnovejših in najzanimivejših je uporaba koaksialne šobe (slika 6), ki ima nameščeni dve kapilari eno znotraj druge, in s katero lahko naredimo vlakna vrste jedro-ovojnica, ki so primerna za prirejeno sproščanje učinkovin, tudi proteinskih, saj se pri izdelavi ne uniči njihova nativna zgradba (3, 8, 14).



Slika 6: Shema brizge za koaksialno elektrostatsko sukanje (prirejeno po (14)).

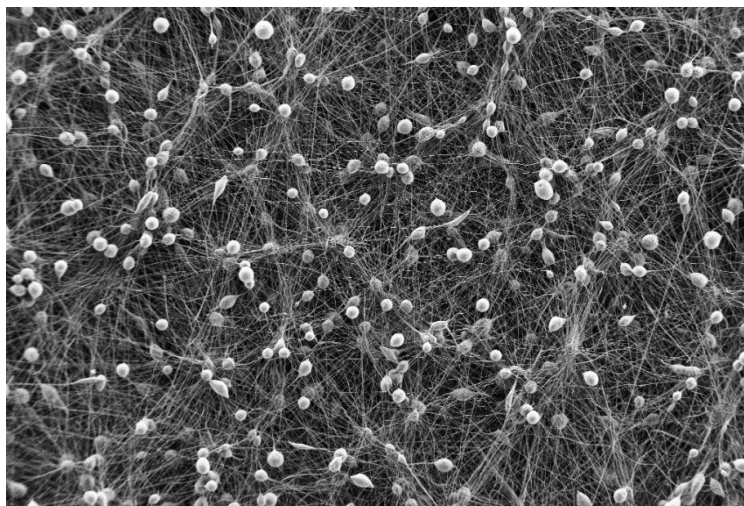
Različna so tudi zbirala. Najenostavnejše je stacionarna plošča, ki je običajno kar aluminijasta folija pritrjena na nosilec. Obstajajo tudi vrteči boben ali valj in dve vzporedni elektrodi. Pri stacionarni plošči dobimo nanovlakna naključno razporejena, pri vrtečih zbiralih in pri vzporednih elektrodah pa dobimo urejena nanovlakna (slika 7) (3).



Slika 7: Urejena nanovlakna (4).

Pri procesu elektrostatskega sukanja nastopa veliko spremenljivk:

- a) Procesne spremenljivke: uporabljena napetost, pretok raztopine polimera, razdalja od kapilare do zbirala, vrsta zbirala, pogoji okolja (temperatura, relativna vlažnost).
- b) Lastnosti raztopine polimera iz katerega želimo izdelati nanovlakna: koncentracija, viskoznost, površinska napetost, hlapnost topila, dielektrična konstanta in prevodnost raztopine. Če spremenljivke niso optimalno nastavljene in izbrane, nas proces ne bo vodil do gladkih vlaken nanometrskih debelin, ampak bomo dobili debelejša vlakna ali pa vlakna z vozli (slika 8) (1, 3).



Slika 8: Nanovlakna z vozli.

1.4 Polimeri za izdelavo nanovlaken

Obstaja velika paleta polimerov iz katerih so že izdelali in okarakterizirali nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja (1, 3). Glede na namen uporabe izberemo polimer z lastnostmi, ki jih potrebujemo. Tako obstaja že preko 200 polimerov, iz katerih se lahko uspešno in ponovljivo izdelajo nanovlakna, tako naravnih kot sinteznih ali pa mešanice obojih, kar vključuje tudi proteine, nukleinske kisline in polisaharide (1).

V biomedicinske namene se uporabljajo predvsem:

- a) naravni polimeri: kolagen, želatina, elastin, proteini svile, hitosan, celulozni acetat, hitin (1);
- b) sintezni polimeri: poliglikolna kislina (PGA), polimlečna kislina (PLA), poli (ϵ -kapro) lakton (PCL), poliuretani (PU), kopolimer poli (mlečna-ko-glikolna) kislina (PGLA), kopolimer poli (mlečna kislina-ko- ϵ -kaprolakton) (PLA-CL) (1, 3, 4).

Naravni polimeri izkazujejo boljšo biokompatibilnost in manjšo imunogenost v primerjavi s sintezni. Močan razlog za uporabo naravnih polimerov je tudi njihova »prirojena« lastnost, da se zaradi specifičnega zaporedja aminokislin (arginin, glicin, aspartat), ki ga nekateri izmed njih vsebujejo, nanje vežejo celice. Velika slabost naravnih polimerov je njihova zmožnost denaturacije. Pokazali so, da je z denaturiranjem kolagen izgubil vse svoje pozitivne lastnosti, ki jih ima kot naravni material. Izdelava nanovlaken je težja pri naravnih kot pri sinteznih polimerih (1, 7).

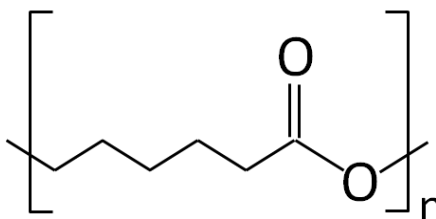
Sintezni polimeri imajo v primerjavi z naravnimi številne prednosti, saj jim lahko priročajemo različne lastnosti, kot so potrebne mehanske lastnosti (vizkoelastičnost in trdnost), hitrost razgrajevanja in poroznost (1). Poleg tega imajo tudi to prednost, da na njih lahko kovalentno vežemo različne molekule kot so npr. rastni dejavniki (3, 13).

1.4.1 Poli (ϵ - kapro) lakton (PCL)

Pri delu bomo za izdelavo nanovlaken uporabljali PCL, zato si ga oglejmo malo podrobneje.

1.4.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

PCL je sintezni, hidrofoben, semikristaliničen polimer s temperaturo steklastega prehoda (T_g) -60°C in s temperaturo tališča (T_m) med 59 in 64°C . Povprečna molekulska masa se giblje med 3000 in $80\,000$ g/mol (15). Njegovo strukturno formulo prikazuje slika 9.



Slika 9: Strukturna formula PCL.

Topen je v organskih topilih kot so kloroform, diklorometan, benzen, toluen, cikloheksanon in 2-nitropropan. Majhno topnost ima tudi v acetonu, 2-butanonu, etil acetatu, acetonitrilu in dimetilformamidu. Netopen je v etanolu, petrol etru in dietil etru. Zaradi svoje hidrofobnosti je netopen tudi v vodi (15).

PCL izkazuje kompatibilnost v mešanici z ostalimi polimeri, tako sinteznimi (PLA, PGLA, PGL) kot tudi naravnimi (hitosan, kolagen) (15–17). To je pomembno, saj ima taka mešanica drugačne lastnosti kot čisti polimer. Tako lahko nadzorujemo npr. hitrost biološke razgradnje in trdnost (15).

1.4.1.2 Biorazgradljivost in biokompatibilnost

PCL je biokompatibilni polimer, saj se je v številnih študijah izkazal kot necitotoksičen, neimunogen, nekancerogen in netrombogen (15). PCL je tudi biorazgradljiv, razgradnja naj bi potekala v dveh stopnjah. V prvi poteče neencimska hidroliza esterskih skupin, v drugi, ki se začne, ko je molska masa polimera zmanjšana pod 3000 g/mol, pa intracelularna razgradnja v makrofagih in fibroblastih. Tako se polimer popolnoma odstrani z mesta aplikacije. Pri homopolimeru PCL je čas razgradnje 2–4 let (odvisno od molekulske mase). Ta čas lahko skrajšamo s tvorbo kopolimerov (s PLA ali PGA) (15).

1.4.1.3 Uporabnost nanovlaken iz PCL

Zaradi zgoraj naštetih lastnosti se nanovlakna iz PCL uporabljajo na številnih področjih:

- Tkivno inženirstvo

Raziskujejo njihovo uporabnost za regeneracijo in obnovo različnih tkiv: kostnega, hrustančnega, mišičnega, živčnega (15). Jin San Choi je s svojo skupino izdelal urejena

nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja iz mešanice PCL/kolagen. S testi na celični kulturi človeških skeletnih mišičnih celic je ugotovil, da taka vlakna podpirajo celično adhezijo, proliferacijo in diferenciacijo. Pokazal je tudi, da z urejenimi vlakni lahko nadzorujemo usmerjenost celic in zvečamo tvorbo miotubulov. Tako lahko olajšamo organizacijo skeletnim mišičnim celicam kar lahko privede do izboljšane funkcije mišice (16).

- Celjenje ran

Ji Suk Choi je svojo skupino izdelal nanovlakna iz mešanice PCL in kopolimera PCL-PEG na katerega so kovalentno vezali rekombinantni človeški epidermalni rastni dejavnik. *In vivo* študija na miših, ki so imele inducirano sladkorno bolezen, je pokazala, da je taka obloga povečala ekspresijo keratinocitov in hitrejše celjenje ran kot v ostalih testnih skupinah (13). To kaže dobre obete za zdravljenje diabetičnih razjed, ki so pogoste pri sladkornih bolnikih.

- Dostava zdravilnih učinkovin

Luong – Van je s svojimi sodelavci izdelala nanovlakna iz PCL, v katera je bil vgrajen heparin. Izdelali so jih z metodo elektrostatskega sukanja iz raztopine, ki je vsebovala tako polimer kot heparin. V nanovlaknih je bil heparin enakomerno razporejen. Pokazali so, da so dosegli podaljšano sproščanje heparina iz vlaken v obdobju 14 dni in da je bilo sproščanje nadzorovano z difuzijo. Rezultati kažejo, da vlakna ne sprožijo provnetnega odziva in da je sproščeni heparin ohranil svojo aktivnost. Vse to kaže, da bi se taka vlakna lahko uporabila za lokalno dostavo heparina na mesto žilnega vsadka (17).

1.5 Uporaba organskih topil za izdelavo nanovlaken

V farmaciji je uporaba vodnih raztopin bolj zaželeno kot uporaba raztopin organskih topil, saj je zaostanek topil v farmacevtskem izdelku lahko toksičen. Zato so potrebni dodatni napor, da se znebimo topila iz izdelka in da zagotovimo, da je zaostanek pod dovoljenim limitom.

Pri izdelavi nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja se uporabi organskih topil ne moremo vedno izogniti, saj za izdelavo potrebujemo raztopino polimera. Dobro so znani sintezni polimeri (PCL, PGA, PLA, PLGA), ki so biokompatibilni in biorazgradljivi, zato so primerni za biomedicinsko uporabo. Zaradi svoje hidrofobnosti so netopni v vodi, zato so za izdelavo nanovlaken nujno potrebna organska topila. Prednost organskih topil je v boljši hlapnosti in so zato uporabljeni pretoki pri elektrostatskem sukanju lahko višji, kar pomeni, da v krajšem času dobimo več produkta, kot če uporabljamo vodne raztopine (1, 3, 4, 15, 18–35).

V preglednici 1 so zbrane uporabljene raztopine polimerov in pogoji elektrostatskega sukanja, pri katerih je različnim raziskovalcem uspelo izdelati nanovlakna iz organskih topil.

Preglednica 1: Nanovlakna izdelana iz organskih topil; U – uporabljena napetost, Q – uporabljen pretok, d – razdalja do zbirala, Φ – premer kapilare.

Polimer	Masni delež M_w ali M_n polimera	Topilo	U [kV]	Q [mL/h]	d [cm]	Φ [mm]	Vir
PCL	10 % $M_w = 80\,000$ g/mol	Kloroform	13	6	NP	1	(18)
	10 % $M_w = 80\,000$ g/mol	Kloroform: metanol = 1 : 1	12	6	NP	1	(19)
	0,14 g/mL NP	Tetrahidrofuran : dimetilformamid = 1 : 1	12	0,14	20	NP	(20) (21)
	8 % w/v $M_n = 80\,000$	Diklorometan : metanol = 7 : 3	0,8 kV/cm	0,5	NP	0,4	(17)
	14 % $M_w = 80\,000$ g/mol	Aceton	24	NP	20	NP	(22)
	9 % $M_w = 80\,000$ g/mol	Diklorometan : dimetilformamid = 80 : 20	22	NP	15	NP	(23)
	Različni masni deleži NP	Ocetna kislina in piridin v različnih razmerjih	Različni pogoji		15	0,1	(24)
PGA	90 mg/mL NP	Heksafluoroizopropanol	25	8	30	0,5	(25)
	100 mg/mL NP	Heksafluoroizopropanol	22	8 – 14	28	0,8	(26)
PLA	10 % 100 000–150 000 g/mol	Diklorometan	0,8 kV/cm	0,5	NP	NP	(27)
	7 %	Diklorometan : dimetilformamid = 70 : 30	14	0,6	13	NP	(28)
	5 % $M_n = 150\,000$ g/mol	Diklorometan	35 – 45	NP	20	0,5	(29)

Polimer	Masni delež M_w ali M_n polimera	Topilo	U [kV]	Q [mL/h]	d [cm]	Φ [mm]	Vir
	14 % w/v NP	Kloroform	15	3 – 21	30	NP	(30)
	Različni masni del. NP	Dimetilformamid	Različni pogoji			0,7	(31)
PLGA	Različne konc. $M_w = 56\ 000$ g/mol	Tetrahidrofuran : dimetilformamid = 75 : 25	Različni pogoji			Raz. Φ	(32)
	Različne konc. $M_w = 75\ 000$ g/mol	Heksafluoroizopropanol	30	6	15	NP	(33)
	0,05 g/mL NP	Tetrahidrofuran : dimetilformamid = 1 : 1	18	NP	20	0,8	(34)
	10 % NP	Dimetilformamid : diklorometan = 3 : 1	13	0,6	12,5	0,5	(35)

NP...ni podatka

1.5.1 Izbor ustreznega organskega topila

Izbira ustreznega organskega topila za izdelavo nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja je odločilen korak. Interakcije med topilom in polimerom kritično vplivajo na viskoelastične lastnosti raztopine in na najmanjšo potrebno koncentracijo polimera, pri kateri je elektrostatsko sukanje mogoče. Vplivajo tudi na premer, kristaliničnost, natezno trdnost in morfologijo izdelanih vlaken (36).

Kot dve najpomembnejši lastnosti pri izboru topila sta se v raziskavah izkazali topnost polimera v izbranem topilu in dielektrična konstanta topila (36). Oglejmo si ju podrobneje.

- Topnost polimera: topnost polimera v izbranem topilu mora biti dovolj velika, da dosežemo kritično koncentracijo (viskoznost), ki omogoča zadosten preplet polimernih verig in tako tvorbo stabilnega in neprekinjenega curka (1, 7, 36, 37). Če topilo ne raztaplja polimera, je neprimerno za uporabo, po drugi strani pa visoka topnost polimera v topilu še ne zagotavlja, da je topilo primerno. Cikloheksan, acetofenon, benzen in toluen so topila, ki odlično raztapljajo PCL, vendar iz nobenega od njih ni mogoče pripraviti nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja. Vsa topila izkazujejo vsaj eno izmed sledečih lastnosti: velika molska masa, nizka dielektrična konstanta, nizka temperatura vrelišča, močne disperzijske sile. Vse te lastnosti negativno vplivajo na možnost izvedbe elektrostatskega sukanja (36).

- Dielektrična konstanta: dielektrična konstanta je merilo, ki ocenjuje sposobnost materiala, da postane električno polariziran in hkrati merilo za količino shranjene električne energije. Z višanjem dielektrične konstante se pri enaki uporabljeni napetosti viša tudi količina shranjene električne energije, kar posledično vodi do večjega rezidualnega naboja v sistemu. Večji rezidualni naboj je odgovoren za večje in dalj časa trajajoče elektrostatske sile v curku, ki so odgovorne za raztezanje polimernih verig in tvorbo nanovlaken (36). Nekateri avtorji celo poročajo, da je za uspešno tvorbo vlaken potrebna dielektrična konstanta 19 (36). Obstaja več raziskovalcev, ki so z dvigom dielektrične konstante izboljšali sukljivost raztopinam (36, 38). Če dobro pogledamo preglednico 1 z začetka podpoglavja 1.5 vidimo, da se pogosto uporablja kombinacija topil z metanolom oziroma dimetilformamidom. Če pogledamo v preglednico 2, ki prikazuje fizikalno-kemijske lastnosti topil, ki so jih raziskovalci uporabili za izdelavo nanovlaken, vidimo, da imata obe topili visoko dielektrično konstanto in lahko domnevamo, da jih avtorji člankov ravno zato dodajajo v svoj sistem, četudi tega ne navajajo v svojem delu.

Preglednica 2: Fizikalno-kemijske lastnosti uporabljenih topil.

Topilo	Mr	T _b [°C]	ρ [g/mL]	η [mPas]	ε	μ [D]	c _p [J/gK]	P _t [kPa]	σ [μS/cm] x10 ⁻³
Aceton	58,1	56,05	0,785	0,306	21,01	2,88	2,175	30,8	5,0
Diklorometan	84,9	40	1,327	0,413	8,93	1,60	1,192	58,2	0,043
Dimetilformamid	73,1	153	0,945	0,794	38,25	3,82	2,060	0,439	60
Kloroform	119,4	61,17	1,479	0,537	4,81	1,04	0,957	26,2	< 0,1
Tetrahidrofuran	72,1	65	0,883	0,456	7,52	1,75	1,720	21,6	45000
Metanol	32,0	64,6	0,791	0,544	33,0	1,70	2,531	16,9	1,5
Ocetna kislina	60,1	117,9	1,045	1,056	6,20	1,70	2,053	2,07	6,0
Piridin	79,1	115,23	0,982	0,879	13,26	2,21	1,678	2,76	
Heksafluoroizo- propanol	168,0	59	1,46	/	16,7	/	/	/	/
<i>Etil acetat</i>	88,1	77,1	0,900	0,423	6,081	1,78	1,937	12,6	1,0
Vir	(39)								(36)

Mr – molekulska masa, *T_b* – temperatura vrelišča, *ρ* – gostota pri 25 °C, *η* – viskoznost pri 25 °C, *μ* – dipolni moment, *c_p* – specifična toplotna kapaciteta, *p_t* – parni tlak pri 25 °C, *σ* – el. prevodnost pri 25 °C

Na tem mestu velja omeniti, da je nekaterim avtorjem uspelo izdelati nanovlakna z uporabo »čistega« kloroforma (preglednica 1), ki pa ima nizko dielektrično konstanto (4, 81). Dielektrična konstanta je vsekakor pomemben parameter pri izboru topila, vendar kot kaže pravkar omenjeni primer, ni odločilen.

V farmaciji je uporaba nekaterih organskih topil bolj zaželena kot uporaba drugih. Pri svojem delu smo si za kriterij sprejemljivosti izbrali ICH smernico Q3C (40), ki govori o rezidualnih topilih v farmacevtskih izdelkih. Smernica razdeli topila v tri skupine:

- Skupina 1: topila, ki se jim izogibamo (znani humani kancerogeni, snovi za katere se močno sumi, da so humani kancerogeni in snovi, ki so nevarne za okolje);
- Skupina 2: topila, ki jih uporabljamo omejeno (negenotoksični živalski kancerogeni in snovi, ki so ireverzibilno toksične npr. nevrotoksične ali teratogene);
- Skupina 3: topila z nizkim toksičnim potencialom (snovi z nizkim toksičnim potencialom za človeka in je njihova dovoljena dnevna zaužita količina več kot 50 mg).

Topila, ki so jih različni raziskovalci uporabili pri izdelavi nanovlaken in so zbrana v preglednici 2, smo razdelili glede na njihovo toksičnost (preglednica 3).

Preglednica 3: Razvrstitev topil v skupine po smernici ICH Q3C.

Skupina	Topila
Skupina 1	/
Skupina 2	diklorometan, dimetilformamid, kloroform, tetrahidrofuran, metanol, piridin
Skupina 3	acetone, očetna kislina, <i>etil acetat</i>

Ugotovimo, da so vsa uporabljena topila razen acetona iz skupine 2 (očetna kislina se uporablja skupaj s piridinom).

Na podlagi te razvrstitve in pomena topnosti polimera ter dielektrične konstante topila smo se odločili, da bomo pri svojem delu za topila uporabili acetone in etil acetat. Topila se signifikantno razlikujeta v dielektrični konstanti. Iz raztopin v acetone so nanovlakna že bila izdelana, iz raztopin v etil acetata pa sodeč po pregledani literaturi nanovlakna še niso bila narejena.

2 NAMEN DELA

Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, so do našega dela izdelovali nanovlakna iz vodotopnih polimerov in so kot topilo za pripravo raztopin za elektrostatsko sukanje vedno uporabljali vodo. Najprej se torej želimo seznaniti in spoznati s polimernimi raztopinami v organskih topilih, načinom dela z njimi ter njihovo uporabo v postopku elektrostatskega sukanja.

Namen dela je izdelati polikaprolaktonska nanovlakna z elektrostatskim sukanjem z uporabo topil, ki jih ICH smernica Q3C uvršča v skupino 3 – snovi z nizkim toksičnim potencialom za človeka. Izbrali smo dve topili, v katerih ima PCL primerno topnost in se razlikujeta v vrednosti dielektrične konstante. Na ta način bomo preverili vpliv dielektrične konstante na proces elektrostatskega sukanja in na morfologijo nanovlaken. Na podlagi podatkov iz literature smo se odločili, da bomo za topili uporabili aceton in EtOAc.

Za topilo bomo na začetku izbrali aceton. Z njegovo uporabo bomo ovrednotili vpliv molske mase polimera na zmožnost raztopine, da se uporabi v elektrostatskem sukanju (sukljivost) in vpliv na morfologijo nanovlaken. Nadalje bomo vrednotili vpliv procesnih parametrov elektrostatskega sukanja (napetosti in pretoka) in parametrov raztopine (masni delež polimera in prevodnosti) na morfologijo nanovlaken. Naša naloga bo poiskati ustrezen način dviga prevodnosti raztopin in raziskati tudi odvisnost prevodnosti raztopine od količine dodanega prevodnega sredstva.

V nadaljevanju bomo za topilo uporabili EtOAc. Ovrednotili bomo vpliv nižje dielektrične konstante na sukljivost raztopine in vpliv procesnih parametrov ter parametrov raztopine na morfologijo nanovlaken. Preverili bomo tudi vpliv postopnega višanja dielektrične konstante ter vpliv prevodnosti na sukljivost raztopine in morfologijo nanovlaken.

Na izdelanih nanovlaknih bomo preverili količino zaostalih hlapnih komponent in obstojnost nanovlaken pri fizioloških pogojih.

Poskušali bomo določiti tudi možnost vgradnje zdravilnih učinkovin (ibuprofena in resveratrola) v polikaprolaktonska nanovlakna izdelana ob uporabi acetona in EtOAc.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Polimeri za izdelavo nanovlaken

- Polikaprolakton $M_w = 14\ 000$ g/mol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Polikaprolakton $M_w = 65\ 000$ g/mol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Polikaprolakton $M_w = 69\ 000$ g/mol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Topila za pripravo polimernih raztopin

- Aceton (reagent Ph. Eur.)
- Etil acetat (reagent Ph. Eur.)

Sredstvo za dvig prevodnosti polimernim raztopinam

- Natrijev jodid

Snovi za pripravo fosfatnega pufra

- Natrijev klorid
- Kalijev klorid
- Dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat
- Kalijev dihidrogenfosfat
- Destilirana voda

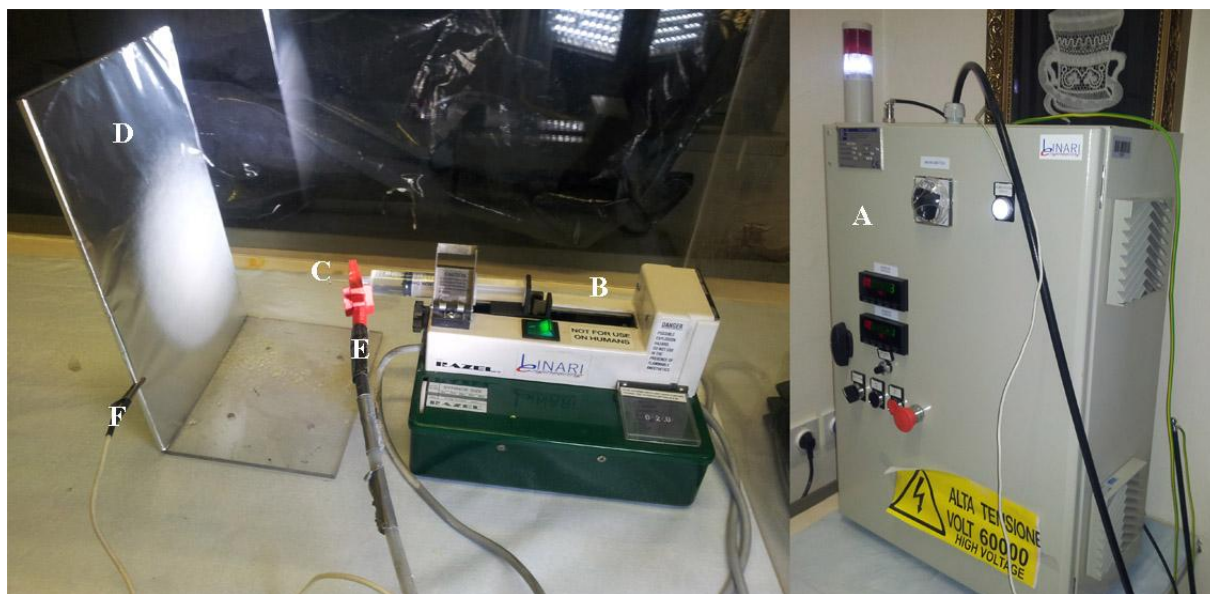
Učinkovini, ki smo jih vgrajevali v vlakna

- Ibuprofen: Krka, Novo mesto, Slovenija
- Resveratrol: Chromadex inc., Irvine, USA

3.2 Naprave

- Analitska tehtnica, Mettler toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- Magnetno mešalo, IKA WERKE, Nemčija
- Konduktometer, MA 5964; Iskra, Jugoslavija
- Invertni svetlobni mikroskop, Olympus CK40, Japonska
- Vrstični elektronski mikroskop, Supra 35 VP. Carl Zeiss, Oberkochen, Nemčija
- Naprava za elektrostatsko sukanje (posamezni deli so označeni na sliki 10)
 - Generator visoke električne napetosti, HVG-P50-R-EU, Linari Engineering s.r.l., Italija (A)
 - Mehanska črpalka, R-99E, Razel Scientific, ZDA (B)

- Kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm (C)
- Zbiralo: plastičen nosilec ovito v aluminijasto folijo (D)
- Kabel, ki vodi iz generatorja, za dovajanje visoke napetosti na kovinsko kapilaro (E)
- Kabel za ozemljitev zbirala (F)



Slika 10: Naprava za elektrostatsko sukanje.

3.3 Postopki in metode

Priprava polimernih raztopin

Polimerne raztopine smo pripravljali v različnih masnih deležih PCL (ut./ut %) in NaI (ut./ut %). Posamezni masni deleži so navedeni v poglavju Rezultati in diskusija.

Raztopine samega PCL smo pripravili tako, da smo natehtali ustrezno (preračunano) količino PCL v erlenmajerico in nato dodali topilo. Raztopino smo na magnetnem mešalu mešali pri 50 °C 1 uro, tako da se je PCL raztopil, nato pa raztopino pustili mešati pri sobnih pogojih čez noč, da se je izboljšala solvatacija polimernih verig.

Raztopine z NaI in raztopine z NaI in učinkovinama smo pripravili tako, da smo po dodatku PCL dodali še ustrezno (preračunano) količino NaI in ustrezno (preračunano) količino izbrane učinkovine ter nato dopolnili s topilom do ustrezne mase, nato pa postopali po enakem postopku.

Pomivanje steklovine

Erlenmajerico, v kateri smo pripravili polimerno raztopino, očistimo tako, da najprej v namenski odpad zlijemo ostanek raztopine. Vanjo nato natočimo vodo, s čimer nastane polimerni film, ki ga s prsti preprosto odstranimo.

Merjenje prevodnosti raztopin

15 mL raztopine, ki smo ji želeli izmeriti prevodnost, smo nalili v 20 mL čašo. Sondo konduktometra s konstanto celice $0,8079 \text{ cm}^{-1}$ smo primerno očistili (sprali najprej s prečiščeno vodo, nato še z acetonom), jo potopili v raztopino in počakali približno 30 sekund ter odčitali rezultat. Meritev smo ponovili trikrat pri sobni temperaturi ($20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$). Po končani meritvi smo sondo najprej sprali z acetonom, potem notranjost obrisali z vatirano palčko, še enkrat sprali z acetonom, na koncu pa smo jo sprali še s prečiščeno vodo.

Računanje dielektrične konstante mešanice topil

Dielektrično konstanto mešanice topil smo izračunali na podlagi dela Wanga in Anderka (42) z uporabo vrednosti dielektrične konstante (ϵ) iz preglednice 2. Polarizacija na enoto volumna tekočine (p) je povezana z dielektrično konstanto tekočine. Polarizacija na enoto volumna mešanice n tekočin (p_m) lahko izrazimo z molskim ulomkom (x_i), z molarnim volumnom (V_i) in s polarizacijo (p_i) posamezne komponente i :

$$p_m = \frac{\sum_{i=1}^n x_i V_i p_i}{\sum_{i=1}^n x_i V_i}$$

Dielektrično konstanto nato izračunamo s pomočjo spodnje zveze, ki povezuje polarizacijo in dielektrično konstanto.

$$p_m = \frac{(\epsilon - 1)(2\epsilon + 1)}{9\epsilon}$$

Postopek elektrostatskega sukanja

20 mL plastično brizgo smo napolnili z 10–15 mL polimerne raztopine in iz nje odstranili vse zračne mehurčke, da ne bi motili postopka sukanja. Na plastično brizgo smo po polnjenju privili kovinsko iglo z notranjim premerom 0,8 mm in jo nato postavili v mehansko črpalko. Na iglo smo potem pritrdili kabel, ki dovaja visoko napetost (0–50 kV) iz generatorja, na mehanski črpalki pa smo nastavili želen pretok raztopine skozi iglo. Na plastičen nosilec smo s pomočjo lepilnega traku namestili aluminijasto folijo, kar je predstavljalo naše zbiralo. Na aluminijasto folijo smo pritrdili krovno stekelce, na katerega se je nabral produkt sukanja z namenom opazovanja produkta pod svetlobnim mikroskopom. Aluminijasto folijo in krovno stekelce je bilo potrebno pri vsaki spremembi parametrov zamenjati. Na izbrani razdalji od

konice igle smo postavili zbiralo in nanj priključili kabel, ki je zbiralo ozemljil. Na generatorju visoke napetosti smo izbrali želeno napetost in ga vklopili. Tik pred vklopom smo iz konice igle odstranili kapljico, da ne bi motila procesa. Curek med iglo in zbiralom smo opazovali s pomočjo reflektorja in črnega ozadja, zbiranje produkta na zbiralu pa se je kazalo kot sprememba barve iz srebrne v belo. Proces elektrostatskega sukanja smo izvajali pri pogojih, ki so bili v prostoru v času izvajanja poskusa ($T = 20\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{RH} = 20\text{--}60\%$), saj naša izvedba naprave ne omogoča kontroliranja pogojev. Zaradi hlapnosti organskih topil je bil proces sukanja otežen, saj se je curek začel strjevati pri konici igle. Proces je zato potrebno občasno ustaviti, iglo obrisati in ga nato ponovno zagnati.

Vrednotenje izdelanih nanovlaken

Produkt elektrostatskega sukanja se običajno najprej ovrednoti pod svetlobnim mikroskopom, kar smo storili tudi mi. Krovno stekelce smo odstranili z aluminijaste folije in ga postavili na objektno stekelce. Produkt smo si ogledali pod 100-kratno povečavo. Pri takem mikroskopiranju lahko na vlaknih vidimo nepravilnosti kot so vozli in debelejša vlakna ali pa delce, če nastanejo namesto vlaken. Ta analiza nam je služila kot prvo sito z namenom zmanjšanja števila vzorcev za SEM slikanje, saj je SEM slikanje zahtevnejši in dolgotrajnejši postopek.

Izbrane vzorce smo si potem ogledali tudi na SEM-u. Vzorce za SEM smo pripravili tako, da smo znotraj področja na aluminijasti foliji, kjer so se nabrala nanovlakna, izrezali približno 8×8 mm veliko površino in jo s pomočjo prevodnega in dvostransko lepilnega traku premera 12 mm prilepili na nosilec za SEM slikanje. SEM slike nanovlaken smo analizirali z računalniškim programom ImageJ (1.46r, National Institutes of Health, ZDA). Premer nanovlaken smo določili na slikah posnetih pri 20 000-kratni povečavi in na vsaj 50-ih različnih nanovlaknih. Premer vozlov smo določili na slikah posnetih pri 5 000-kratni povečavi in na vsaj 20-ih različnih vozlih. Premer vozlov smo merili pravokotno glede na potek vlakna.

Izvajanje analize ostanka pri sušenju

Za pridobitev ustrezne količine vzorca za analizo, smo proces elektrostatskega sukanja izvajali 10 minut. Aluminijasto folijo smo zložili na velikost 10×10 cm in tako omejili površino, na katero se zbirajo vlakna. Poskus smo izvedli le z uporabo mešanice topil EtOAc in acetona (2 : 1), saj ta v primerjavi z uporabo samega acetonom, ki je bolj hlapen, predstavlja bolj kritičen primer. Folijo smo stehali pred in takoj po nanosu nanovlaken. Pri

sobnih pogojih smo jo pustili stati dva dni, da se je zaostanek topil odstranil, in jo potem ponovno stehali. Poskus smo izvajali v treh paralelah.

Obnašanje nanovlaken pri fizioloških pogojih

Tudi v tem primeru smo proces elektrostatskega sukanja izvajali 10 min in s tem pridobili ustrezno količino vzorca. Aluminijsko folijo smo zložili na velikost 10 x 10 cm, da bi omejili površino, na katero se zbirajo nanovlakna. Suha nanovlakna smo s potegom odstranili s folije in jih položili v veliko petrijevko napolnjeno s fosfatnim pufrom s pH 7,4, ter jo pokrili. Videz vlaken smo vizualno spremljali pet dni vsak dan. Poskus smo izvajali v treh paralelah.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Izdelava in lastnosti nanovlaken iz PCL raztopin v acetonu

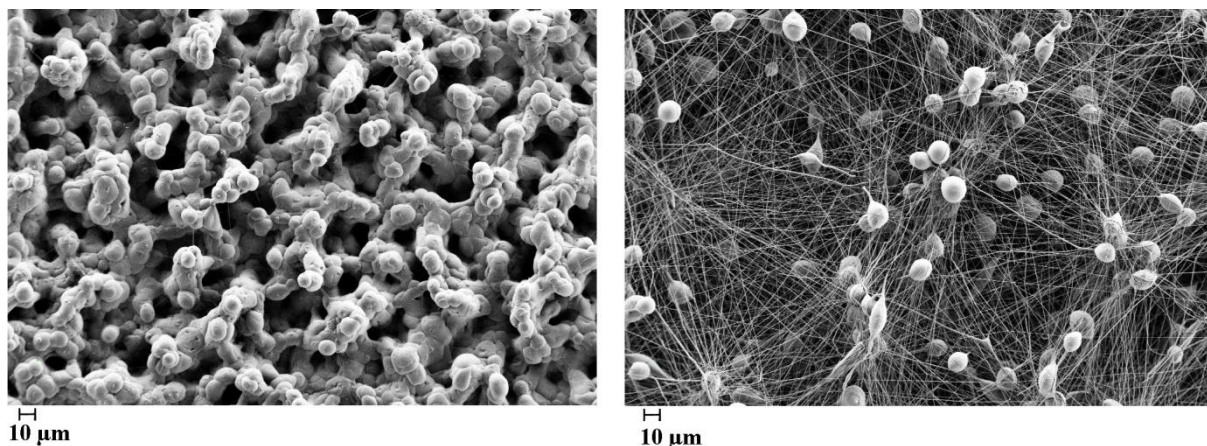
4.1.1 Vpliv molske mase polimera na morfologijo izdelanih nanovlaken

Na začetku svojega dela smo najprej preverili, katera molska masa polimera je primernejša za izdelavo nanovlaken, da bi nato delo nadaljevali s to molsko maso. V ta namen smo pripravili 20 % raztopini polimera. Pri prvi raztopini smo uporabili polimer s povprečno molsko maso 14 000 g/mol, pri drugi pa polimer s povprečno molsko maso 65 000 g/mol. V preglednici 4 so zbrani uporabljeni pogoji priprave nanovlaken iz teh raztopin.

Preglednica 4: Parametri raztopine in elektrostatskega sukanja.

Parameter	Vrednost
Molska masa	14 000 ali 65 000 g/mol
Masni delež PCL	20 %
Napetost	10, 15, 20 kV
Pretok	7,07 mL/h
Razdalja do zbirala	15 cm

Rezultati so pokazali, da pri nižji molski masi pri napetostih 10, 15 in 20 kV nastanejo delci, zaradi česar je PCL nižje molske mase neprimeren za izdelavo nanovlaken. Pri višji molski masi so nanovlakna nastala, vendar imajo neustrezno, vozlasto morfologijo, kar vidimo na sliki 11.



Slika 11: SEM slika: Produkt elektrostatskega sukanja iz 20 % raztopine PCL različnih molskih mas: 14 000 g/mol (levo) in 65 000 g/mol (desno) pri $U = 20$ kV in $Q = 7,07$ mL/h.

Dobljene rezultate pripisujemo lastnostim uporabljenih polimernih raztopin. Pri enakem masnem deležu polimera (20 %) ima raztopina s PCL višje molske mase višjo viskoznost in zato je prepletanje polimernih verig v raztopini večje. Pri polimeru nižje molske mase je prepletanja premajhno, zato se curek razbije na kapljice in namesto vlaken nastanejo delci. Prav tako pa so pri višji viskoznosti viskoelastične sile, ki nasprotujejo odbojnim elektrostatskim silam, višje in zadržujejo curek skupaj, tako se le-ta ne prekine in ne nastanejo kapljice ter posledično delci.

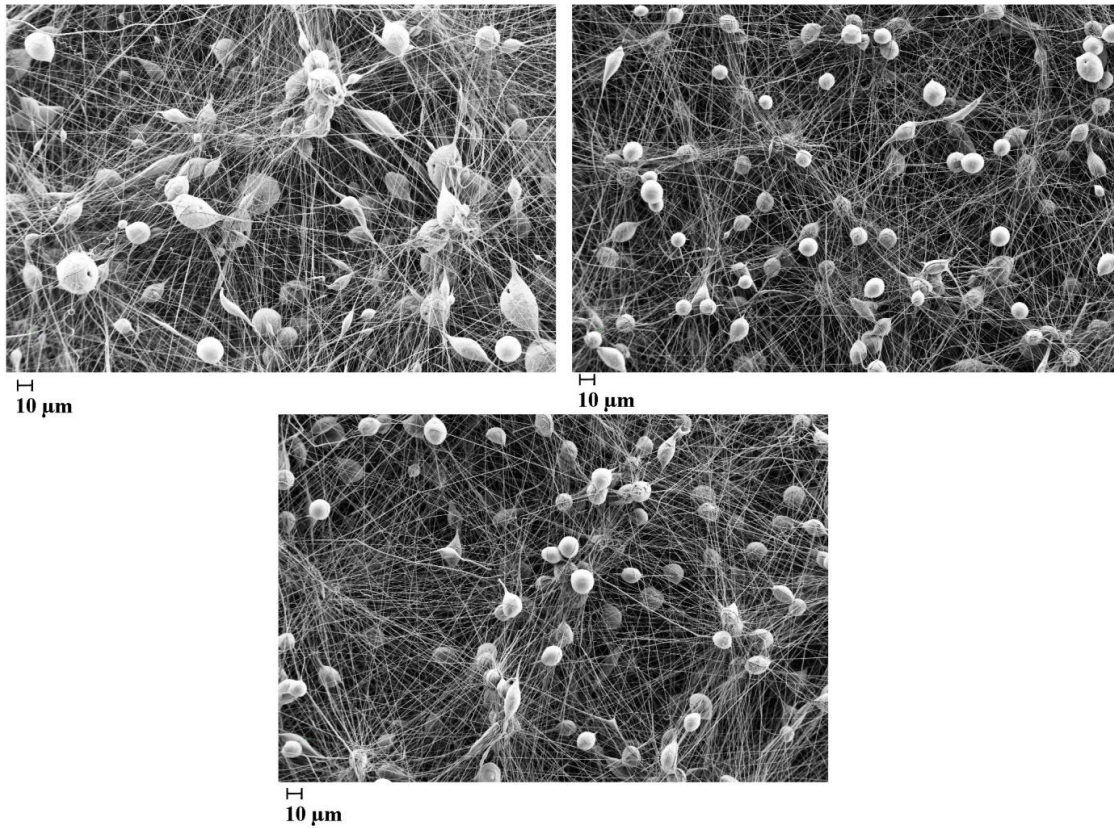
Na podlagi tega rezultata smo delo nadaljevali s polimerom višje molske mase. Na sliki 11 desno vidimo, da nastala nanovlakna vsebujejo vozle, ki niso zaželeni, in jih bomo v nadaljnjem delu poskusili odpraviti. O nastanku vozlov obstaja več različnih hipotez, kar je posledica še ne popolnoma pojasnjene mehanizma elektrostatskega sukanja. Ko curek potuje proti zbiralu lahko na nastanek vozlov vplivajo sile površinske napetosti v curku, ki manjšajo površino tekočine na enoto mase, saj je to termodinamsko bolj ugodno. Molekule topila in polimera se tako združujejo v sferične oblike, iz katerih nastanejo vozli. Večja je koncentracija prostih molekul topila v curku, večja je verjetnost, da bo prišlo do nastanka vozlov. Bolj kot je sistem viskozen, več je interakcij med molekulami topila in verigami polimera. Tako je gibanje molekul topila zmanjšano, kar zmanjša pojavnost vozlov (7). Po drugi strani je za nastanek vozlov lahko odgovorno premajhno raztezanje polimernih verig, ki je posledica premajhnih elektrostatskih sil v curku (37).

4.1.2 Vpliv napetosti na morfologijo izdelanih nanovlaken

Napetost ima med procesnimi parametri največji vpliv na morfologijo in nastanek nanovlaken (1). Z namenom njenega preverjanja smo pri pretoku 7,07 mL/h, razdalji do zbirala 15 cm in pri uporabi 20 % PCL raztopine spreminjali njeno vrednost. Uporabili smo napetosti 10, 15, 20 in 25 kV. Izbrani pretok (7,07 mL/h) je pri vseh uporabljenih napetostih zagotavljal neprekinjeno tvorbo curka. To je pomembno, saj se z višanjem napetosti večja jakost električnega polja, kar ima za posledico hitrejše odstranjevanje raztopine s konice kapilare (1). Če je pretok premajhen, pride do prekinitve curka.

Curek se je tvoril pri napetostih 10, 15 in 20 kV, pri 25 kV pa ne, ker se je zaradi previsoke napetosti kapljica na konici igle razpršila in zamašila iglo. Ta pojav razložimo z odbojno silo, ki je nastala v raztopini med isto značnimi naboji. Površinska napetost in viskoelastične sile v kapljici niso mogle nasprotovati odbojni sili, zato se je kapljica razpršila.

Pri napetostih pri katerih se je tvoril curek, so nastala nanovlakna z vozlasto morfologijo, kar je razvidno iz slike 12.

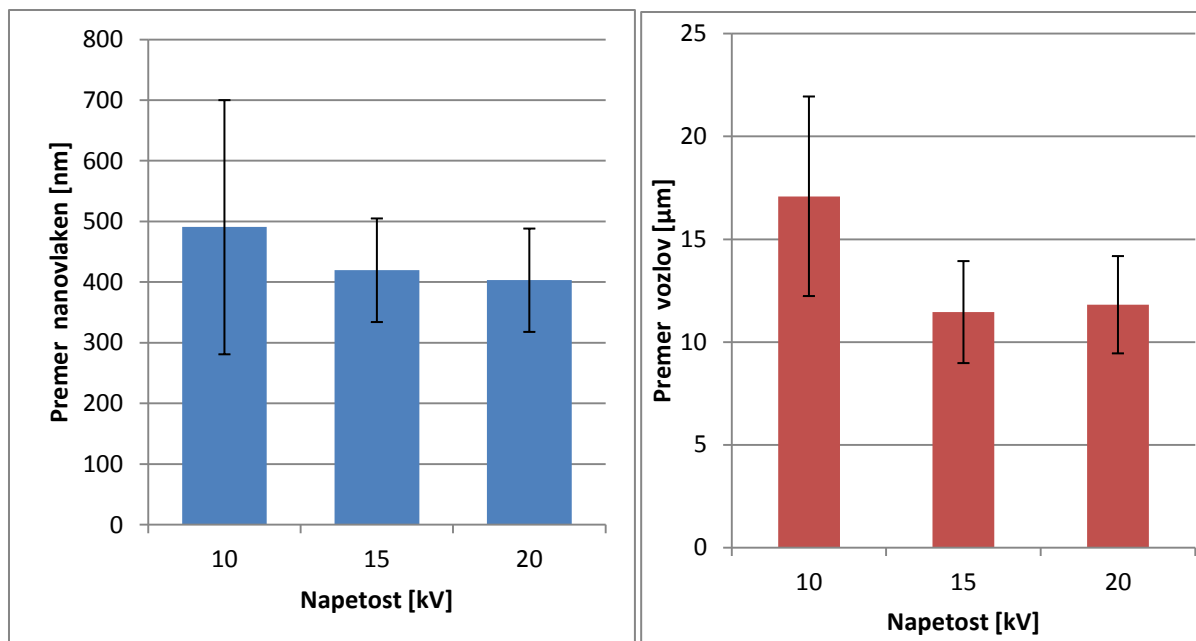


Slika 12: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz 20 % raztopine PCL pri različnih uporabljenih napetostih. Zgoraj levo 10 kV, desno 15 kV in spodaj 20 kV; $Q = 7,07 \text{ mL/h}$.

V preglednici 5 so zbrani izmerjeni premeri nanovlaken in vozlov pri različnih napetostih, na grafu 1 pa so podatki predstavljeni tudi grafično.

Preglednica 5: Premer nanovlaken in vozlov v odvisnosti od napetosti.

Napetost [kV]	Nanovlakna		Vozli	
	Premer [nm]	SD [nm]	Premer [μm]	SD [μm]
10	490,743	209,536	17,085	4,853
15	419,757	85,402	11,452	2,480
20	403,304	85,193	11,81	2,366



Graf 1: Premer izdelanih nanovlaken (levo) in vozlov (desno) v odvisnosti od uporabljene napetosti.

Vidimo lahko, da so pri uporabljeni napetosti 10 kV premeri vlaken in vozlov največji, največja je tudi njihova frekvenca pojavljanja in standardna deviacija, medtem ko so premeri pri 15 in 20 kV primerljivi. Manjši premer vlaken in vozlov pri večji napetosti lahko razložimo z večjim raztezanjem polimernih verig, ki so posledica večje napetosti. Z razliko od nekaterih ostalih študij, pri katerih so z večanjem napetosti vozle odpravili (7), nam to ni uspelo, zato smo še naprej iskali rešitev.

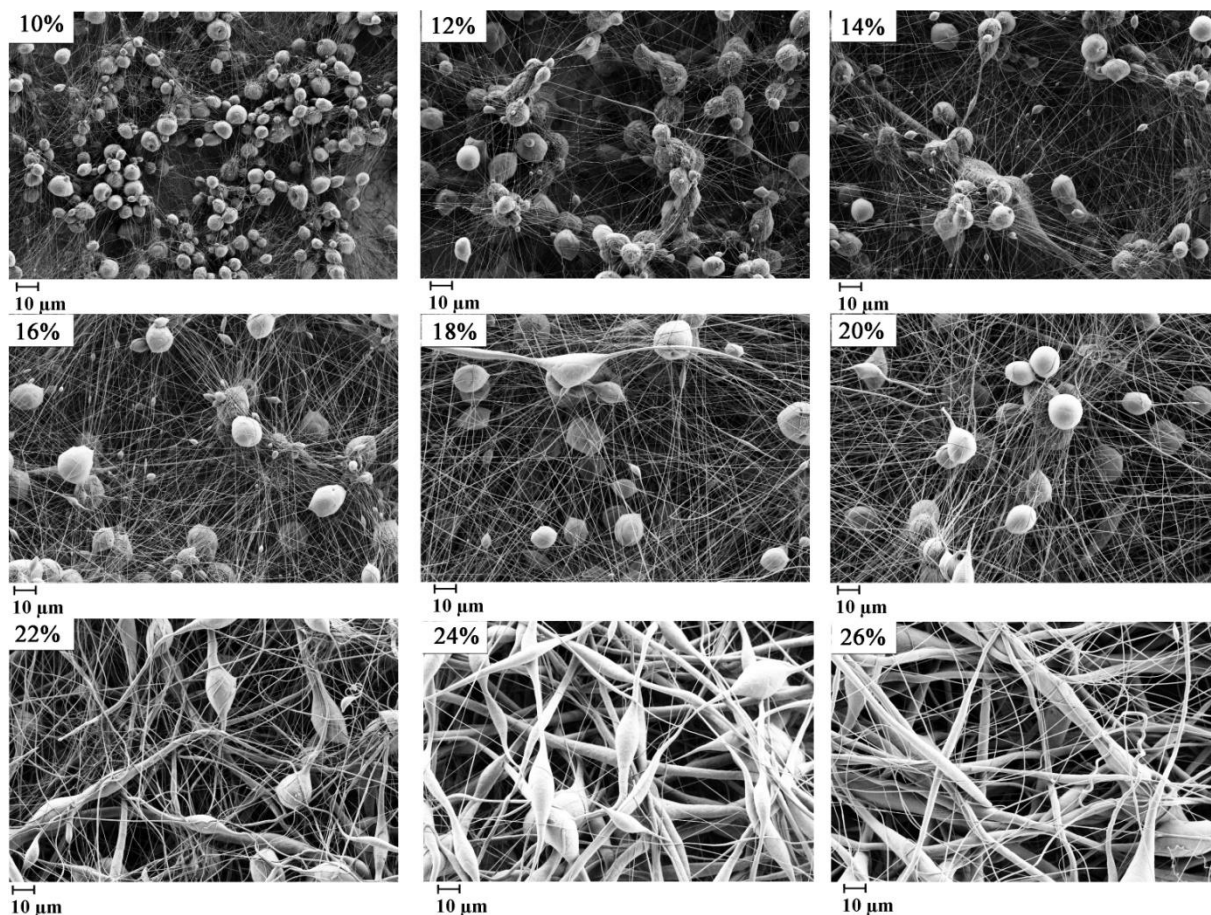
Kot optimalna se je izkazala napetost 20 kV.

4.1.3 Vpliv masnega deleža PCL na morfologijo izdelanih nanovlaken

Viskoznost je kritični parameter raztopine pri postopku elektrostatskega sukanja in je v tesni povezavi z masnim deležem polimera v raztopini. Večji je masni delež, višja je viskoznost. Za polimerno raztopino obstaja kritični masni delež polimera, ki zagotavlja zadostno viskoznost za tvorbo curka pod visoko napetostjo. Pod to vrednostjo je prepletanje polimernih verig premajhno, zato curek razpade na kapljice in nastanejo delci, nad to vrednostjo pa je prepletanje polimernih verig zadostno in zato nastanejo nanovlakna.(1, 7, 37).

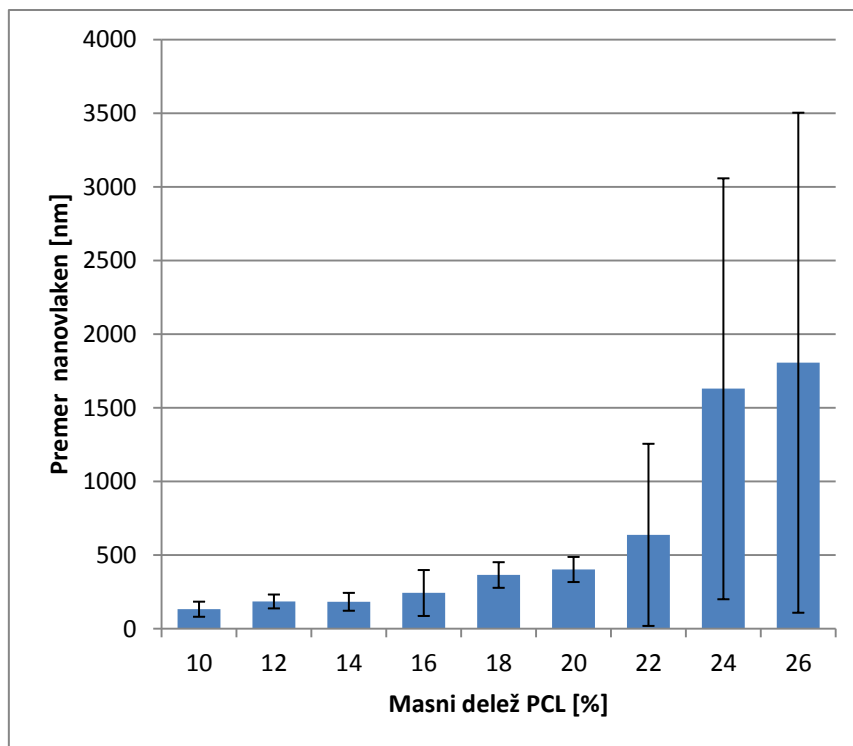
Z namenom preverjanja vpliva masnega deleža PCL na morfologijo izdelanih nanovlaken smo pripravili serijo raztopin: 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 18 %, 20 %, 22 %, 24 %, 26 %, 28 % in 30 %. Zadnji dve raztopini sta bili zaradi prevelike viskoznosti neprimerni za izdelavo nanovlaken. Dovod raztopine do konice igle namreč zaradi prevelike viskoznosti ni bil mogoč

in tako postopka elektrostatskega sukanje nismo mogli izvesti. Procesni parametri so bili pri vseh raztopinah enaki. Uporabljena napetost je bila 20 kV, pretok 7,07 mL/h in razdalja do zbirala 15 cm. Slika 13 prikazuje PCL nanovlakna izdelana iz raztopin z različnim masnim deležem polimera.



Slika 13: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopin z različnim masnim deležem PCL pri $U = 20$ kV, $Q = 7,07$ mL/h.

Ugotovili smo, da se z večanjem masnega deleža polimera v raztopini večja premer nanovlaken, upada število vozlov, oblika vozlov se spreminja iz okrogle v vretenasto, medtem ko njihov premer ostaja enak (slika 13). Od 22 % masnega deleža naprej se močno poveča standardna deviacija premera nanovlaken, pri 24 % pa povprečni premer preseže $1 \mu\text{m}$ (graf 2 in preglednica 6).



Graf 2: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža PCL.

Preglednica 6: Premeri nanovlaken in vozlov v odvisnosti od masnega deleža polimera.

Masni delež PCL [%]	Nanovlakna		Vozli	
	Premer [nm]	SD [nm]	Premer [μm]	SD [μm]
10	133,492	51,291	7,400	1,696
12	186,256	47,085	10,802	1,702
14	183,836	60,662	10,775	1,470
16	243,611	155,966	14,600	1,401
18	365,691	87,019	9,214	4,415
20	403,304	85,193	11,810	2,366
22	638,354	618,103	12,553	2,289
24	1629,765	1428,579	10,943	3,438
26	1806,739	1697,187	13,053	4,669

Povečan premer nanovlaken pripisujemo višji viskoznosti sistema. Prepletanje verig polimera med seboj je večje, zato je večja tudi odpornost proti elektrostatskim silam, kar vodi v manjše raztezanje verig in nastanek debelejših vlaken. Krajši je tudi čas delovanja teh sil, saj je curek bolj odporen na ukrivljajočo nestabilnost (*ang. bending instability*). Zaradi večjega števila

prepletov se zmanjša tudi število vozlov, saj je več tudi interakcij med molekulami topila in molekulami polimera, kar onemogoča združevanje molekulam topila med sabo in tvorbo vozlov (7, 43). Ne glede na uporabljen masni delež polimera, vozlov ne moremo povsem odpraviti.

Kot optimalen se je izkazal 18 % masni delež polimera v raztopini.

4.1.4 Vpliv pretoka na morfologijo izdelanih nanovlaken

Pretok raztopine skozi iglo je pomemben procesni parameter, vendar po pomembnosti zaostaja za napetostjo (1). Z namenom, da ocenimo njegov vpliv, smo parametre raztopine in ostale procesne parametre ohranili konstantne: masni delež PCL je bil 18 %, napetost 20 kV in razdalja do zbirala 15 cm; in izdelali PCL nanovlakna pri pretoku: 1,41; 2,83; 5,66; 7,07; 10,6; 14,9 in 20,5 mL/h. Ker smo že pod svetlobnim mikroskopom pri vseh opazili prisotno vozlasto morfologijo, smo se odločili, da nadaljnje SEM analize ne bomo izvajali.

Na tem mestu naj opozorim na težavo, ki se pojavi pri elektrostatskem sukanju raztopin iz organskih topil. Organska topila, ki smo jih uporabljali pri svojem delu, so v primerjavi z vodo veliko bolj hlapna. Večja hlapnost omogoča večje pretoke, vendar predstavlja tudi težavo. Pri delu smo namreč opazili, da topilo pri konici igle hitro izhlapi, kar ima za posledico strjen curek, ki ga vidimo na sliki 14. Želeli smo preveriti, ali je ta moteči dejavnik odgovoren za nastanek vozlov. Ugotovili smo, da strjen curek hitreje nastane pri nižjih pretokih. Skrajšali smo tudi čas sukanja, da se curek še ni strdil. Vozli so bili še vedno prisotni, zato sklepamo, da strjen curek ni glavni vzrok za njihov nastanek. Strjen curek predstavlja problem tudi s stališča kontinuiranega procesa elektrostatskega sukanja, saj ga omejuje. Po nekaj minutah namreč zamaši iglo, zato je potrebno proces ustaviti in iglo očistiti.



Slika 14: Strjen curek na konici igle.

Glede na pregled literature lahko potencialne rešitve problema iščemo v (27, 36, 38):

- uporabi posebne koaksialne šobe, ki skozi zunanji del šobe dovaja inerten plin (dušik) nasičen s parami uporabljenega topila;
- izvajanju procesa elektrostatskega sukanja pri nižani temperaturi;
- izvajanju procesa elektrostatskega sukanja v atmosferi nasičeni s parami topila.

Pri vseh treh rešitvah se zmanjša izhlapevanje topila. Naša izvedba naprave žal ne omogoča, da bi katerokoli od treh predlaganih rešitev lahko varno uporabili pri svojem delu.

4.1.5 Vpliv prevodnosti na morfologijo izdelanih nanovlaken

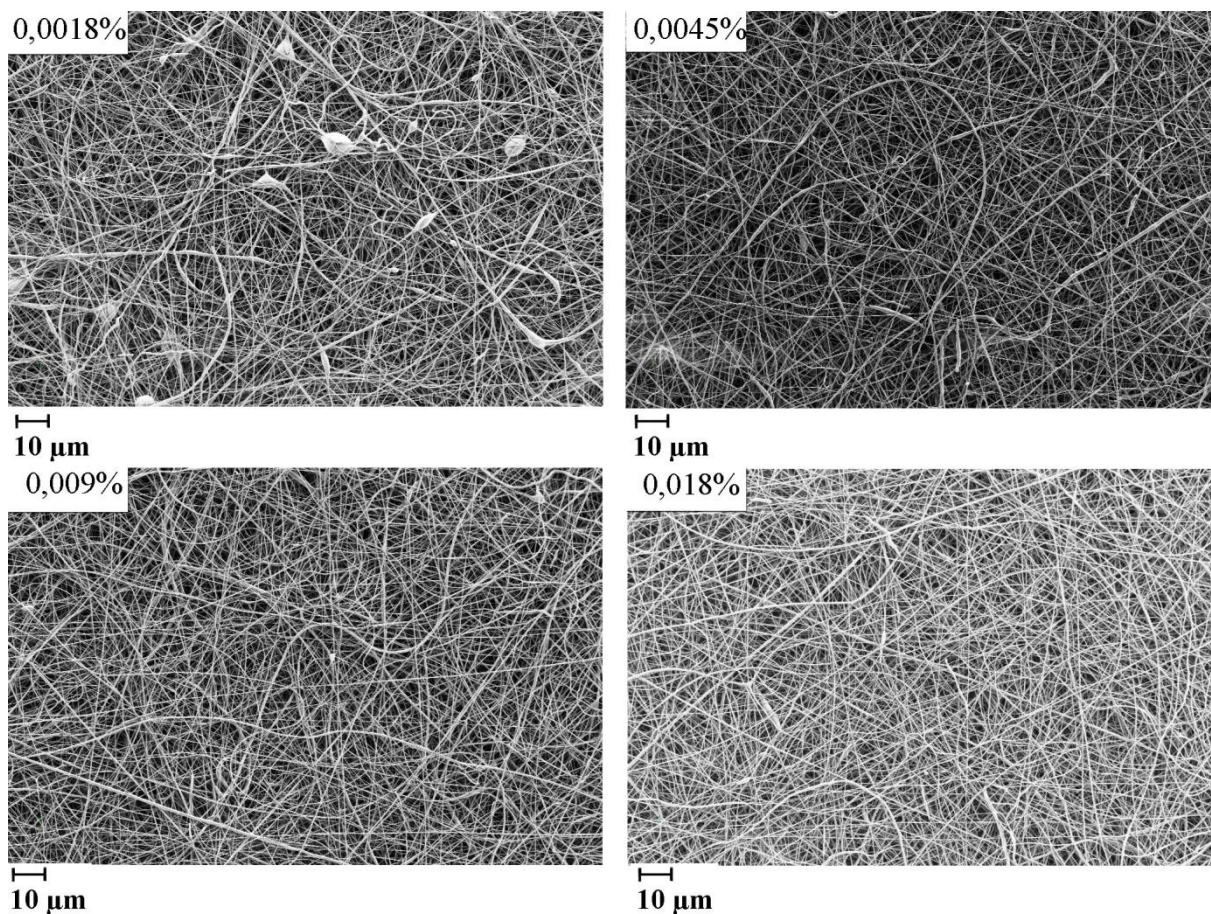
Do sedaj predstavljeni rezultati so pokazali, da se s spreminjanjem procesnih parametrov in viskoznosti raztopine, vozlov nismo uspeli znebiti. Ker sta tako PCL kot tudi aceton neelektrolita domnevamo, da se vozlov ne moremo znebiti zaradi premajhne prevodnosti. Odločili smo se, da bomo raztopini zvišali prevodnost in s tem povečali gostoto naboja v curku. Tako bomo povečali elektrostatske sile v curku, ki raztegujejo polimerne verige, in na ta način poskusili odpravili vozle. Ta prijem se je v preteklosti že obrestoval različnim raziskovalcem (1, 7, 24, 41). Dvig prevodnosti acetona lahko dosežemo z dodatkom topila, ki je bolj prevoden od acetona (npr. tetrahidrofuran), ali z dodatkom soli. Odločili smo se, da uporabimo nizko molekularno anorgansko sol. Sol v topilu razpade na ione, ti povečajo prevodnost in gostoto naboja. Vse soli niso primerne, saj se vse ne raztapljajo v acetonu. Poleg tega se moramo zavedati, da dodana sol ostane v nastalih nanovlaknih, zato vedno poleg masnega deleža soli v raztopini v preglednicah podajamo tudi masni delež soli glede na maso polimera. Takšno količino namreč lahko pričakujemo v končnih nanovlaknih. Zaradi tega in dejstva, da želimo pripraviti polikaprolaktonska nanovlakna iz materialov, ki so najbolj sprejemljivi s strani farmacije, smo uporabili natrijev jodid (NaI). NaI je sestavljen iz ionov, ki so fiziološko prisotni in nujno potrebni za normalno delovanje človeškega organizma, in kot taki ne predstavljajo toksičnega potenciala za človeka.

4.1.5.1 Vpliv masnega deleža NaI na morfologijo izdelanih nanovlaken

Da bi preverili vpliv različnih masnih deležev NaI (prevodnosti), smo pripravili 18 % raztopino PCL z različnimi masnimi deleži NaI (0,0018; 0,0045; 0,009 in 0,018 %). Pri prvi izbrani raztopini z 0,018 % masnim deležem NaI smo poskus elektrostatskega sukanja izvajali pri različnih napetostih in pretokih. Na podlagi obnašanja curka in pregleda dobljenega produkta pod svetlobnim mikroskopom smo določili procesne parametre, pri katerih smo

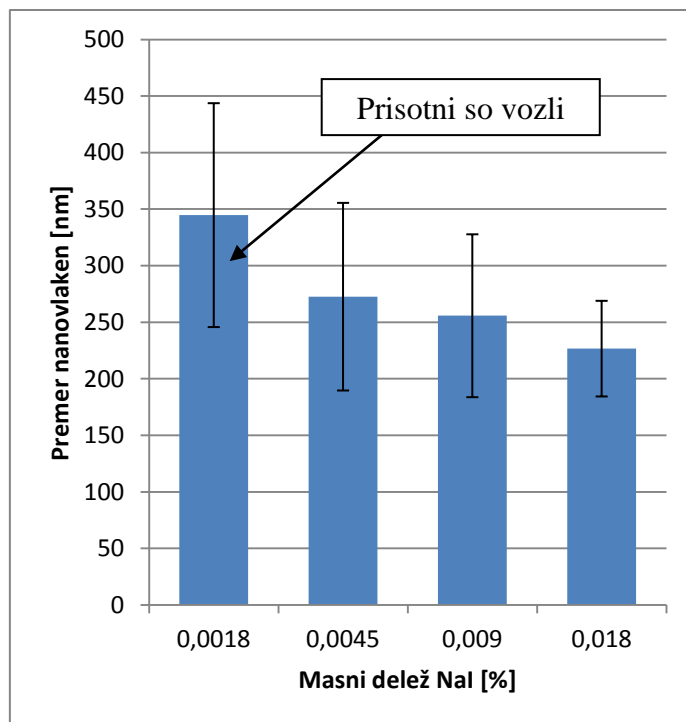
izvajali proces elektrostatskega sukanja vseh raztopin. Izbrali smo napetost 25 kV, pretok 4,24 mL/h in razdaljo do zbirala 15 cm. Pri teh pogojih se je tvoril stabilen curek, ki je vodil v nastanek nanovlaken.

Že pri rezultatih prve izbrane raztopine z 0,018 % NaI smo ugotovili, da je bila naša domneva pravilna. Vozli so izginili. Nato smo postopoma nižali masni delež NaI do kritičnega, kjer so se vozli ponovno pojavili. Masni delež soli smo nižali tudi zato, da bi dobili gladka nanovlakna s čim manj dodane soli. Kot kritični se je izkazal 0,0018 % masni delež (slika 15).



Slika 15: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z 18 % masnim deležem PCL in različnimi masnimi deleži NaI (označeno na sliki) $U = 25$ kV, $Q = 4,24$ mL/h.

Graf 3 prikazuje povprečni premer nanovlaken pri različnih masnih deležih NaI, v preglednici 7 pa so poleg premera nanovlaken zbrani tudi premeri nastalih vozlov. Vidimo lahko, da se povprečni premer nanovlaken manjša z večanjem masnega deleža NaI. To lahko pripišemo povečani prevodnosti raztopine, saj se, kot smo že omenili, z višanjem prevodnosti, večja tudi gostota naboja v curku, ta pa je odgovorna, da pri enaki uporabljeni napetosti, v curku delujejo večje elektrostatske sile, ki raztegujejo polimerne verige. Bolj kot so polimerne verige raztegnjene, manjši je premer nanovlaken.



Graf 3: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža NaI.

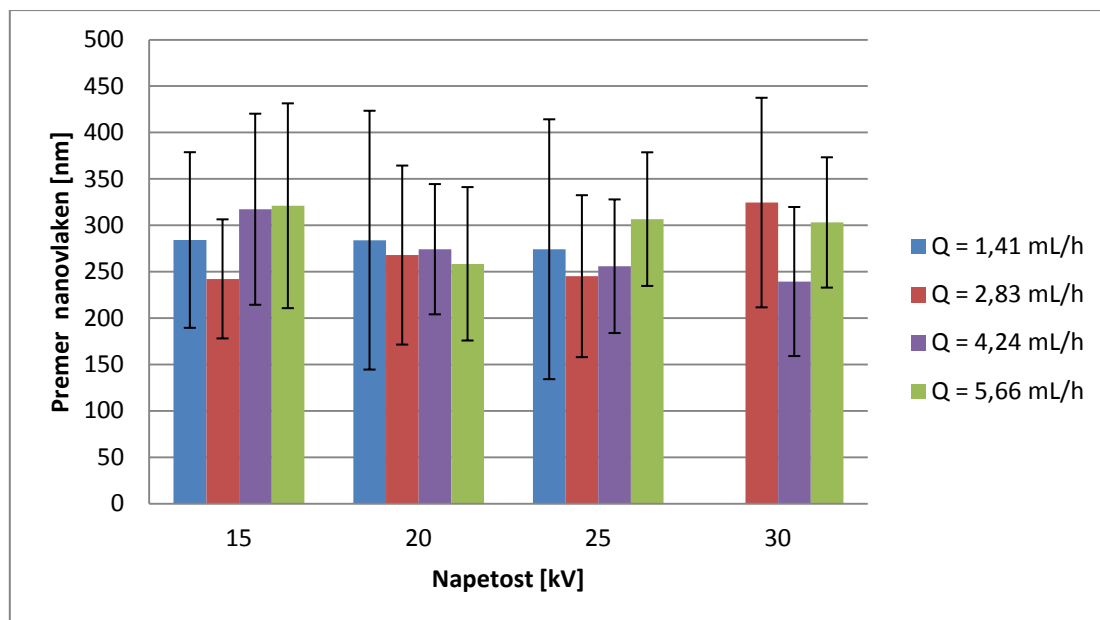
Preglednica 7: Premeri nanovlaken in vozlov v odvisnosti od masnega deleža NaI.

Masni delež PCL [%]	Masni delež NaI [%]	Masni delež NaI glede na maso PCL [%]	Nanovlakna		Vozli	
			Premer [nm]	SD [nm]	Premer [μm]	SD [μm]
18	0,0018	0,01	344,820	98,976	3,958	1,863
18	0,0045	0,025	272,711	82,938	/	/
18	0,009	0,05	255,851	72,013	/	/
18	0,018	0,1	226,753	42,281	/	/

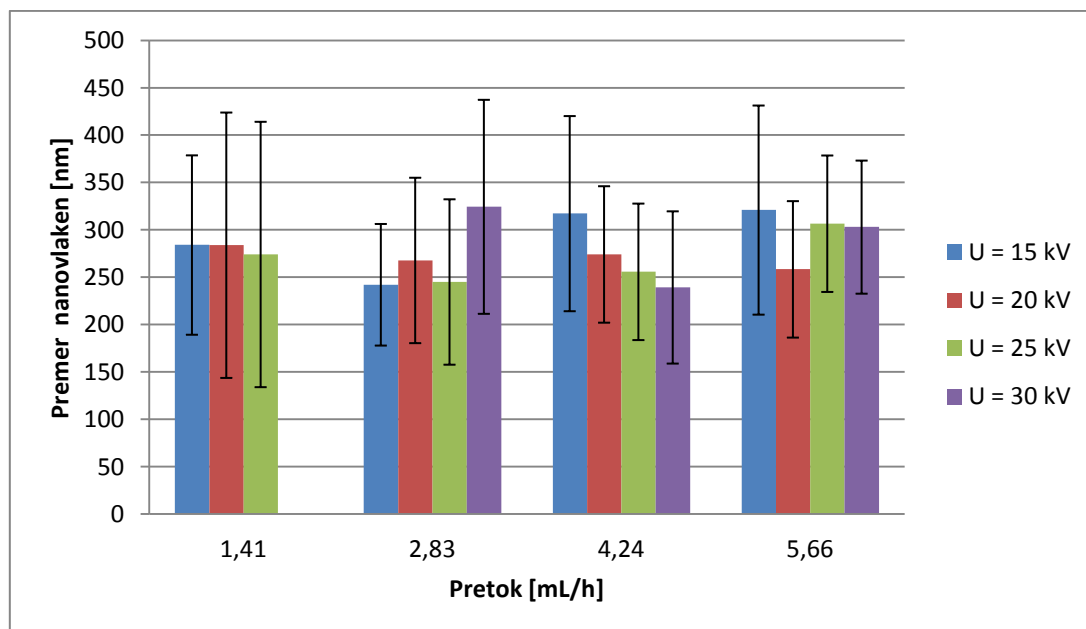
4.1.5.2 Vpliv napetosti in pretoka na morfologijo gladkih nanovlaken

Želeli smo preveriti tudi vpliv napetosti in pretoka na morfologijo in premer gladkih nanovlaken. V ta namen smo pripravili 18 % raztopino PCL z 0,009 % masnim deležem NaI. Raztopino smo uspešno sukali pod 15-imi različnimi pogoji. Uporabili smo kombinacije štirih različnih pretokov: 1,41; 2,83; 4,24; 5,66 mL/h in štirih različnih napetostih: 15, 20, 25, 30 kV. Pri kombinaciji najmanjšega pretoka in največje napetosti tvorba curka ni bila mogoča.

Pri pretokih 4,24 in 5,66 mL/h so se pri napetostih 15 in 20 kV tvorili vozli. Iz grafa 4 in grafa 5, ki prikazujeta premer nanovlaken v odvisnosti od uporabljene napetosti oziroma uporabljenega pretoka, lahko razberemo, da ne obstaja korelacija med premerom nanovlaken in uporabljeno napetostjo in pretokom.



Graf 4: Premer nanovlaken v odvisnosti od uporabljene napetosti pri različnih pretokih.



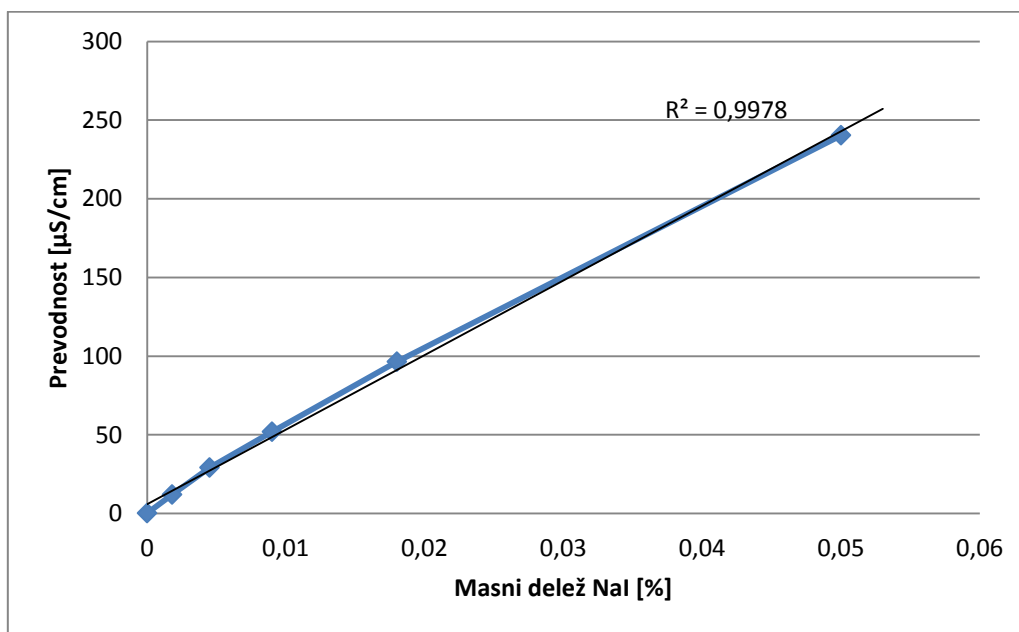
Graf 5: Premer nanovlaken v odvisnosti od uporabljenih pretokih pri različnih napetostih.

Slednje lahko razložimo na dva načina. Razlog je lahko hitro izhlapevanje acetona in strjevanja curka pri konici igle. Ta strjeni curek najverjetneje lahko do neke mere ovira

izhajanje curka in tako ustvarja nekontrolirane pogoje, ki zakrijejo vpliv napetosti in pretoka. Drugi razlog temelji na podatkih iz literature. Reneker je s sodelavci pri opazovanju curka med letom raztopine PCL v acetonu odkril, da ima zanimivo obliko. Pojavi se glavni, debelejši curek iz katerega izhajajo manjši in tanjši curki. Kot podobo za to si lahko predstavljamo izhajanje vej iz debla drevesa. Iz glavnega curka nastanejo debelejša, iz stranskih curkov pa nastanejo tanjša vlakna. Ta pojav zakrije vpliv napetosti in pretoka na debelino nanovlaken, poleg tega pa tudi razloži standardno deviacijo premera nanovlaken.

4.1.6 Prevodnost polimernih raztopin

Rezultati so pokazali, da se prevodnost raztopine zelo hitro dvigne že pri majhnem masnem deležu NaI. Že samo 0,0018 % dodatek NaI v raztopino je zvišal prevodnost za več kot 50-krat. Najmanjša prevodnost pri kateri smo izdelali nanovlakna brez vozlov je bila približno 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$, ki smo jo dosegli pri 0,0045 % masnem deležu NaI. Pripravili smo tudi polimerno raztopino z 0,1 % masnim deležem NaI, vendar je nismo uspeli sukati pod nobenimi pogoji. Za nastanek gladkih nanovlaken se je kot primerna izkazala prevodnost od 29 do 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Graf 6 prikazuje odvisnost med prevodnostjo raztopine in masnim deležem NaI.



Graf 6: Prevodnost 18 % PCL raztopine v odvisnosti od masnega deleža NaI.

Ugotovili smo, da med njima obstaja linearna zveza z R^2 0,9978, kar bi bilo uporabno, če bi v nanovlakna želeli vgraditi učinkovino, ki v acetonu ionizira. Polimerni raztopini z raztopljeno učinkovino bi izmerili prevodnost in v primeru prevodnosti izven ustreznega intervala, bi

obstajala velika verjetnost, da nanovlaken z vgrajeno učinkovino ne bi uspeli izdelati. Ker med količino soli in prevodnostjo obstaja linearna zveza, bi lahko preračunali količino učinkovine za doseg prevodnosti znotraj intervala 29–100 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

O izdelavi in lastnostih nanovlaken iz PCL raztopin v acetonu lahko torej povemo, da smo jih izdelali iz PCL z molsko maso 65 000 g/mol. Ko smo spreminjali le procesne parametre in masni delež PCL kot optimalni se je izkazal 18 % – so nastala le nanovlakna z vozli. Ko pa smo polimernim raztopinam z dodatkom NaI dvignili prevodnost na od 29 do 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ so nastala gladka nanovlakna. Napetost in pretok nista imela vpliva na premer gladkih nanovlaken.

4.2 Izdelava in lastnosti nanovlaken iz PCL raztopin v etil acetatu

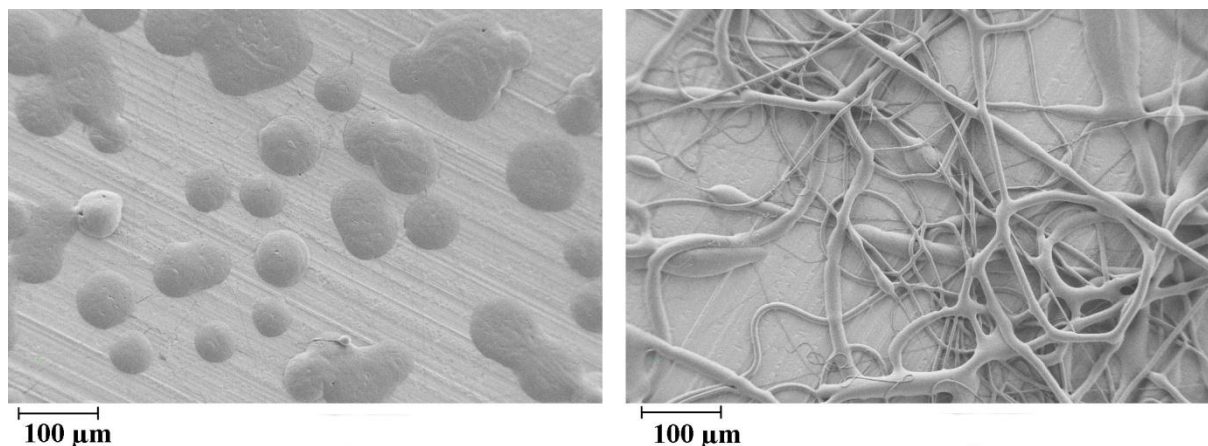
V literaturi ni opisanega primera izdelave PCL nanovlaken iz EtOAc, še več, nobenega primera izdelave nanovlaken iz kateregakoli polimera z uporabo EtOAc. Zato smo začeli z masnimi deleži PCL, ki smo jih uporabljali pri acetonskih raztopinah. Pripravili smo raztopine z različnimi masnimi deleži PCL v EtOAc in na njih izvedli elektrostatsko sukanje pri različnih pogojih. Vrednosti so zbrane v preglednici 8.

Preglednica 8: Parametri raztopine in pogojev elektrostatskega sukanja.

Parameter	Vrednost
Masni delež PCL	18 %; 20 %; 22,5 %; 25 %; 27,5 % in 30 %
Napetost	6–25 kV
Pretok	0,707–6,36 mL/h
Razdalja do zbirala	6–30 cm

4.2.1 Vpliv masnega deleža PCL na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken

V nobenem primeru se ni tvoril stabilen curek med konico igle in zbiralom. Pri masnih deležih do 25 % se je sicer tvoril lep curek, vendar je približno 6 cm od zbirala razpadel na kapljice. Na zbiralu so bili vidni delci (slika 16 levo).



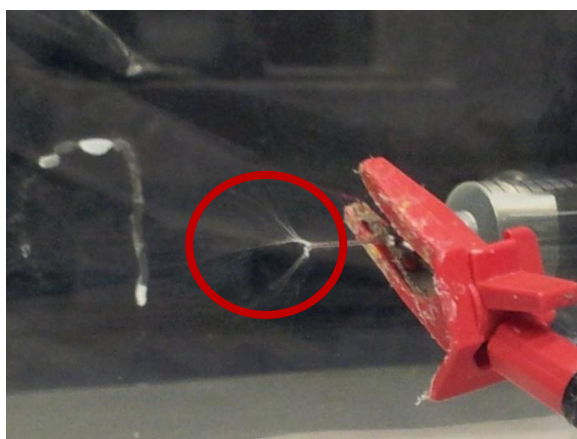
Slika 16: SEM slika: Produkt elektrostatskega sukanja pri uporabi EtOAc za topilo: masni delež PCL do 25 % (levo) in nad 25 % (desno).

Sklepali bi lahko, da je curek razpadel zaradi prevelikih elektrostatskih odbojnih sil, ki razbijejo curek na kapljice. Vendar je po našem mnenju curek razpadel zaradi premajhnih elektrostatskih sil, saj pri enaki količini raztopine Coulombove odbojne sile favorizirajo tvorbo curka, medtem ko sile površinske napetosti temu nasprotujejo. Tvorba curka namreč

predstavlja večanje mejne površine, kar je s termodinamskega vidika neugodno. Ker ima EtOAc relativno majhno dielektrično konstanto, lahko shrani malo električne energije, kar ima za posledico majhen rezidualni naboj in nizke elektrostatske sile. Te sile tako očitno niso zadostne, da bi curek potegnile do zbirala. Prevlada sila površinske napetosti, ki nasprotuje raztezanju curka, in le ta razpade na kapljice. Pri masnih deležih polimera nad 25 % se je tvoril curek od konice igle do zbirala, saj višja viskoznost in s tem višje viskoelastične sile dovolj nasprotujejo silam površinske napetosti. Na zbiralu je zato nastalo nekaj vlaken, vendar ta niso bila suha, niti niso imela premera v nanometrskem velikostnem razredu (slika 16 desno). Mokra nanovlakna običajno nakazujejo na premajhno razdaljo, v našem primeru pa tudi ekstremna razdalja 30 cm ni vodila do suhih nanovlaken. Elektrostatske sile, ki so gonilo tvorbe curka, so odgovorne tudi za pojav tako imenovane ukrivljajoče nestabilnosti (*ang. bending instability*), ki je odgovorna tudi za izhlapevanje topila. Zaradi premajhne ukrivljajoče nestabilnosti in visoke viskoznosti raztopine, ki zadržuje topilo v curku, izhlapevanje topila ni bilo ustrezno. Nenazadnje je bil curek tudi vidno pod vplivom gravitacije, saj je na zbiralo prišel pri dnu. Pri masnih deležih nad 25 % je viskoznost raztopine narasla do meje, ko je bilo elektrostatsko sukanje že zelo oteženo, saj se je igla pogosto mašila in dovajanje raztopine do konice igle je bilo moteno.

4.2.2 Vpliv napetosti na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken

Rezultati so pokazali, da se je pri napetostih do 10 kV in masnih deležih do 25 % tvoril »lep« curek, ki pa je na razdalji cca. 6 cm od konice igle razpadel. Po drugi strani se pri enakih napetostih in višjih masnih deležih curek sploh ni tvoril oziroma se ni posušil do zbirala. Pri napetostih od 20 do 25 kV in masnih deležih do 25 % se je kapljica na konici igle razpršila in na hitro posušila. Okoli igle so nastale posušene niti in igla se je zamašila (slika 17).



Slika 17: Razbita kapljica na konici igle in njena zamašitev.

Elektrostatsko sukanje ni bilo nemogoče. Pri višjih masnih deležih smo z uporabo višje napetosti hoteli doseči, da bi se curek posušil. Poskus ni bil uspešen. Tudi tu se je pri 25 kV igla zamašila.

4.2.3 Vpliv pretoka in razdalje na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken

Ugotovili smo, da je curek, ki je razpadel približno 6 cm od konice igle, pri višjih pretokih razpadel malo kasneje. Vendar ta povezava ni zelo pomembna, saj je premik majhen. Curek je skladno s teorijo o elektrostatskem sukanju kasneje razpršilo pri višjih pretokih.

Pri masnih deležih do 25 %, kjer se curek razbije, smo zbiralo postavili na mejo razbitja, 6 cm od konice igle. Ugotovili smo, da je ta razdalja prekratka, da bi topilo izhlapelo, saj se je na zbiralu pojavila mokra lisa. Pri višjih masnih deležih smo z ekstremno razdaljo 30 centimetrov poskušali doseči, da bi topilo izhlapelo, vendar ni. Za nepopolno izhlapevanje torej po našem mnenju ni kriva prekratka razdalja, temveč premajhne elektrostatske sile.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da nanovlaken iz PCL v samem EtOAc ni mogoče izdelati.

4.2.4 Dvig dielektrične konstante EtOAc raztopinam in njen vpliv na sukljivost

Lee s sodelavci je ugotovil, da ima dielektrična konstanta topila pri procesu elektrostatskega sukanje velik vpliv, saj se z njenim dvigovanjem izboljšuje možnost nastanka nanovlaken (38). Na podlagi dobljenih rezultatov in te trditve smo se odločili EtOAc dodati aceton, ki ima bistveno višjo dielektrično konstanto (preglednica 2 v Uvodu).

V preglednici 9 so zbrani podatki o raztopinah, ki smo jih v ta namen uporabili pri poskusu elektrostatskega sukanja.

Preglednica 9: PCL raztopine različnih dielektričnih konstant in različnih masnih deležih PCL.

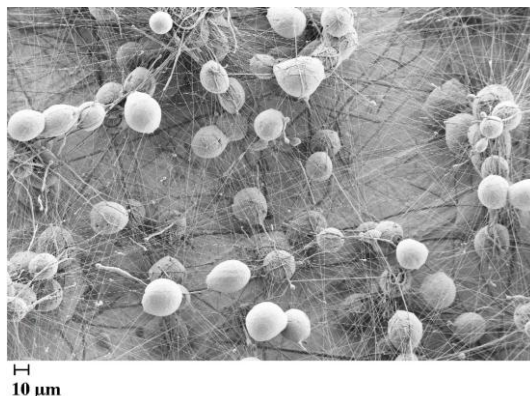
Vol. razmerje EtOAc : aceton	Izračunana ϵ	Masni delež PCL [%]
1 : 1	13,53	18
1 : 2	16,02	20
1 : 3	17,27	22

Pri raztopinah smo hkrati povečali delež acetona in masni delež polimera. Z večjo količino acetona smo še dodatno dvignili dielektrično konstanto, z dvigom masnega deleža PCL pa smo povečali viskoznost sistema v upanju povečane stabilnosti curka. V preglednici 10 so zbrani pogoji elektrostatskega sukanja.

Preglednica 10: Parametri elektrostatskega sukanja.

Parameter	Vrednost
Napetost	6–20 kV
Pretok	0,707–10,6 mL/h
Razdalja do zbirala	6–12 cm

Pri vseh treh raztopinah je bila najmanjša potrebna napetost za tvorbo curka 6 kV. Že pri tej napetosti se curek razbije, podobno kot pri samem EtOAc, približno 6 cm od igle. Na zbiralu nastanejo delci, ki so vidni pod svetlobnim mikroskopom. Z večanjem napetosti do 15 kV se obnašanje curka ne spreminja. Pri 20 kV se kapljica razprši in zamaši iglo. Elektrostatsko sukanje ni več mogoče. Pretok raztopine skozi iglo smo postopno povečevali. Pri višjem pretoku se curek razbije na malo večji razdalji od igle. Povečan pretok ne prinese velike izboljšave elektrostatskega sukanja. Zbiralo smo poskusili postaviti na mejo razbitja curka. Razdalja je bila prekratka, da bi topilo lahko izhlapelo. Na zbiralu je nastala mokra lisa. Pri zadnji raztopini v preglednici 9 smo pod svetlobnim mikroskopom lahko opazili tudi nekaj vlaken. SEM slika (slika 18) nam razkrije, da res nastanejo tudi nanovlakna, vendar so ta preozka (premer = $158,378 \pm 31,072$ nm), da bi jih pod svetlobnim mikroskopom lahko zaznali. Prevladujejo vozli s premerom $22,01 \pm 2,61$ μm , ki se pod svetlobnim mikroskopom vidijo kot delci.



Slika 18: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z vol. razmerjem 1 : 3 pri $U = 10\text{kV}$ in $Q = 4,95$ mL/h in razdalji do zbirala 10 cm.

Višanje deleža acetona se nam ni zdelo smotrno, saj bi tako dobili raztopino, ki bi imela že zelo podobne karakteristike kot sam aceton.

Sklenemo lahko, da z dodajanjem acetona in posledičnim dvigom dielektrične konstante ne dosežemo večje izboljšave elektrostatskega sukanja in tvorbe nanovlaken kot s samim EtOAc.

4.2.5 Vpliv prevodnosti na sukljivost in morfologijo izdelanih nanovlaken

Kot smo že zapisali, večja prevodnost raztopine pomeni večjo gostoto naboja v curku, ki pomeni večje elektrostatske sile. Ugotovili smo, da so tako pri samem EtOAc, kot tudi pri mešanici topil aceton EtOAc premajhne, da bi lahko prišlo do tvorbe stabilnega curka in nastanka gladkih nanovlaken. Z dodatkom NaI smo želeli dvigniti prevodnost raztopinam in tako povečati elektrostatske sile.

4.2.5.1 Dodatek NaI EtOAc raztopinam

Pripravili smo set raztopin in jim izmerili prevodnost (preglednica 11) in nato vsako od njih poskusili sukati pod različnimi pogoji (preglednica 12).

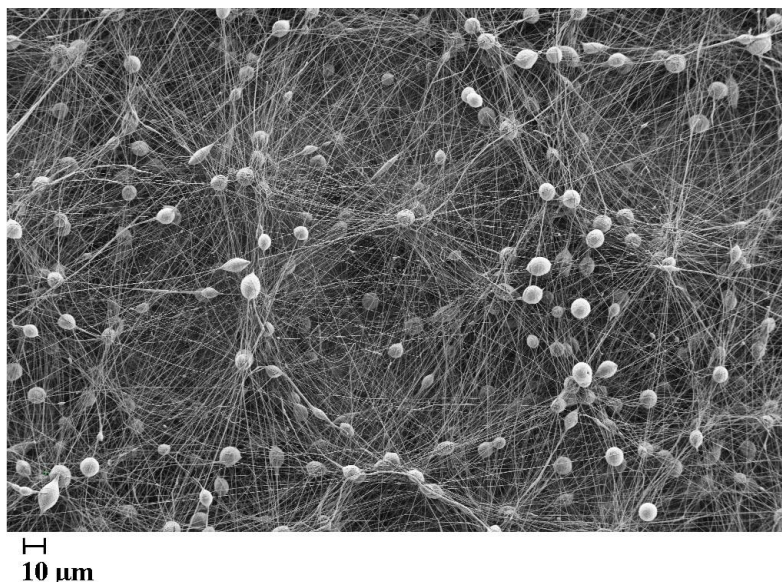
Preglednica 11: Prevodnost PCL raztopin v EtOAc ob dodatku NaI.

Mani delež PCL [%]	Masni delež NaI glede na maso PCL [%]	Masni delež NaI [%]	Prevodnost [$\mu\text{S}/\text{cm}$]
20	0,05	0,010	0,1923 \pm 0,0061
20	0,10	0,020	0,2622 \pm 0,0057
20	0,20	0,040	0,2956 \pm 0,0037
18	0,46	0,083	0,3902 \pm 0,0064
18	0,92	0,164	0,6165 \pm 0,0072

Preglednica 12: Parametri elektrostatskega sukanja

Parameter	Vrednost
Napetost	10–25 kV
Pretok	0,707–10,6 mL/h
Razdalja do zbirala	15 cm

Če primerjamo vrednosti prevodnosti EtOAc raztopin (preglednica 11) in vrednosti prevodnosti acetonskih raztopin vidimo, da se vrednosti EtOAc ob dodatku NaI niso bistveno zvišale v primerjavi z raztopinami brez NaI. Z namenom dodatnega dviga prevodnosti smo zmanjšali masni delež polimera iz 20 % na 18 %, saj viskoznost ovira gibanje ionov in s tem niža prevodnost sistema. Zaradi nizkega dviga prevodnosti nismo pričakovali, da se bo proces elektrostatskega sukanja bistveno izboljšal. Proces se res ni bistveno izboljšal, izboljšal pa se je toliko, da smo lahko pod elektronskim mikroskopom videli več nanovlaken, ki so vsebovala vozle (slika 19). Uvideli smo torej, da le z dodatkom NaI EtOAc raztopinam ne bomo dosegli prevodnosti, ki bi zagotavljala izdelavo gladkih nanovlaken, zato smo se odločili, da bomo poiskali drugo rešitev.



Slika 19: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz EtOAc raztopine z 18 % masnim deležem PCL in 0,164 % masnim deležem NaI; U = 15 kV, Q = 2,83 mL/h.

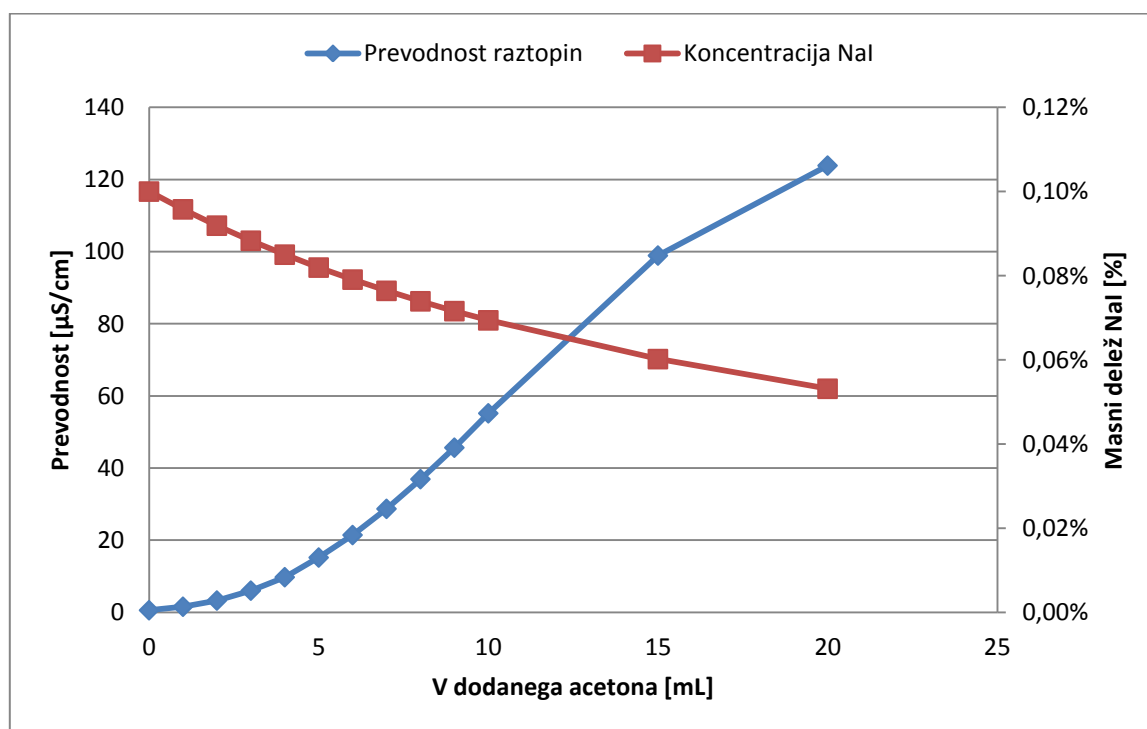
4.2.5.2 Dodatek acetona in NaI EtOAc raztopinam

Rešitev je bila tako dodatek acetona kot NaI EtOAc polimernim raztopinam. Ko primerjamo prevodnost polimernih raztopin acetona in polimernih raztopin EtOAc, ko jima dodamo NaI, vidimo, da imajo EtOAc raztopine bistveno nižjo prevodnost. Predvidevali smo, da je vzrok manjša dielektrična konstanta EtOAc in za potrditev domneve smo naredili poskus. Pripravili smo 0,1 % raztopino NaI v EtOAc (brez polimera), odpipetirali 20 mL raztopine in ji izmerili prevodnost. Nato smo po korakih dodajali 1 mL acetona in po vsakem koraku izmerili prevodnost. Rezultati so zbrani v preglednici 13.

Preglednica 13: Prevodnost EtOAc raztopine NaI v odvisnosti od vol. deleža acetona.

V (acetone) [mL]	Masni delež NaI [%]	Prevodnost [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	Vol. delež (acetone : EtOAc)	Izračunana ϵ
0	0,100	$0,60 \pm 0,01$	0	6,08
1	0,096	$1,58 \pm 0,04$	1 : 20	6,79
2	0,092	$3,29 \pm 0,01$	1 : 10	7,43
3	0,088	$6,04 \pm 0,01$	3 : 20	8,02
4	0,085	$9,76 \pm 0,02$	1 : 5	8,55
5	0,082	$15,22 \pm 0,12$	1 : 4	9,05
6	0,079	$21,45 \pm 0,04$	3 : 10	9,51
7	0,076	$28,71 \pm 0,24$	7 : 20	9,93
8	0,074	$36,94 \pm 0,16$	2 : 5	10,33
9	0,072	$45,67 \pm 0,09$	9 : 20	10,70
10	0,069	$55,19 \pm 0,33$	1 : 2	11,04
15	0,060	$98,93 \pm 0,23$	3 : 4	12,46
20	0,053	$123,9 \pm 0,68$	1 : 1	13,53

Graf 7 prikazuje prevodnost raztopine in masnega deleža NaI v odvisnosti od volumna dodanega acetona.



Graf 7: Prevodnost EtOAc raztopine NaI v odvisnosti od vol. deleža acetona.

Iz grafa lahko razberemo, da prevodnost narašča ob dodajanju acetona, kljub padanju masnega deleža NaI. Prevodnost je torej višja zaradi večje dielektrične konstante. Pri nižji dielektrični konstanti je delež ionskih parov, ki niso prevodni, večji. Z dodajanjem acetona se dielektrična konstanta povečuje, delež ionskih parov se zmanjšuje in je tako več prostih ionov, ki prispevajo k višji prevodnosti sistema.

Na podlagi tega poskusa smo se odločili, da delo nadaljujemo z raztopinami, v katerih bo volumsko razmerje med EtOAc in acetonom 2 : 1, saj je pri tem razmerju dvig prevodnosti ob dodatku NaI zadosten, dodatek acetona pa ni prevelik, da bi zakril vse lastnosti EtOAc.

Da bi preverili vpliv masnega deleža NaI, masnega deleža PCL in vpliv napetosti na tvorbo in morfologijo nanovlaken, smo izdelali set raztopin z uporabo mešanice topil EtOAc in aceton v volumskem razmerju 2 : 1. Zaradi rahlo spremenjenj molske mase uporabljenega polimera smo vpliv masnega deleža NaI preverjali pri stalnem 16 % masnem deležu PCL. PCL, ki smo ga uporabljali do sedaj, je imel povprečno molsko maso 65 000 g/mol. Pošel nam je in ugotovili smo, da ni več dobavljiv. Tako smo na tržišču poiskali najbolj primerljiv PCL in ta je imel povprečno molsko maso 69 000 g/mol. Tako smo masni delež PCL prilagodili, in ga iz 18 %, ki smo ga nazadnje uporabili pri elektrostatskem sukanju (preglednica 11), znižali na 16 %. Najprej smo spreminjali masni delež NaI in ko so nastala nanovlakna brez vozlov, smo pri konstantnem masnem deležu NaI spreminjali še masni delež PCL. Masni delež NaI smo najprej fiksirali glede na maso celotne raztopine, potem pa še glede na maso PCL. To smo storili, saj je prevodnost raztopine funkcija tudi njene viskoznost. Na ta način smo želeli najti ustrežnejši način ohranjanja masnega deleža NaI. Raztopine, ki smo jih uporabili v procesu elektrostatskega sukanja, so zbrane v preglednici 14.

Preglednica 14: Raztopine različnih masnih deležev PCL in NaI pripravljene v mešanici topil EtOAc in acetona v razmerju 2 : 1 uporabljene v procesu elektrostatskega sukanja.

Masni delež PCL [%]	Masni delež NaI [%]	Masni delež NaI glede na maso PCL [%]
16	0,08	0,5
16	0,17	1,1
16	0,42	2,6
16	0,67	4,3
18	0,67	3,8
18	0,77	4,3
20	0,67	3,4
20	0,85	4,3

4.2.5.3 Vpliv masnega deleža NaI na morfologijo izdelanih nanovlaken

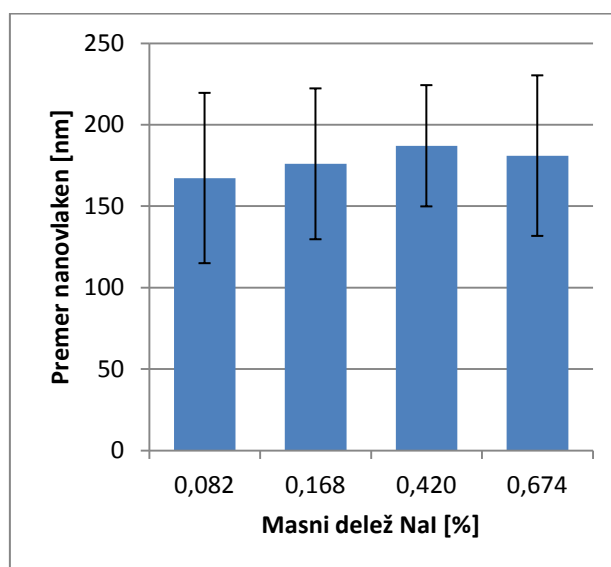
Naredili smo več poskusov pri različnih pogojih in produkt elektrostatskega sukanja opazovali pod svetlobnim mikroskopom. Kot najprimernejši parametri so se izkazali napetost 25 kV, pretok 1,41 mL/h in razdalja do zbirala 15 cm, ki smo jih uporabili pri elektrostatskem sukanju vseh raztopin.

Premeri nastalih nanovlaken in vozlov so zbrani v preglednici 15.

Preglednica 15: Premeri vlaken in vozlov v odvisnosti od masnega deleža NaI.

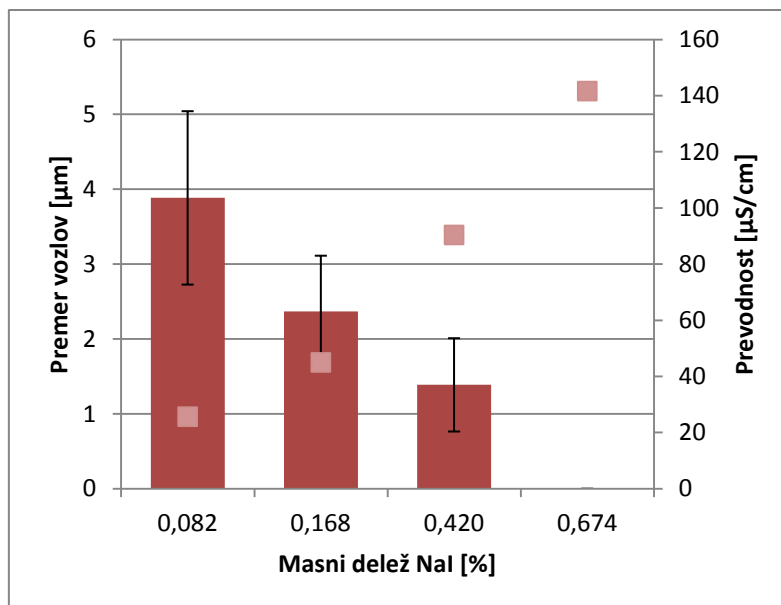
Masni delež PCL[%]	Masni delež NaI [%]	Masni delež NaI glede na maso PCL [%]	Nanovlakna		Vozli	
			Premer [nm]	SD [nm]	Premer [μm]	SD [μm]
16	0,08	0,51	167,204	52,285	3,886	1,158
16	0,17	1,06	175,924	46,309	2,367	0,747
16	0,42	2,63	187,011	37,217	1,389	0,623
16	0,67	4,30	180,954	49,294	/	/

Rezultati nam kažejo, da se premer nanovlaken z masnim deležem NaI signifikantno ne spreminja (graf 8).



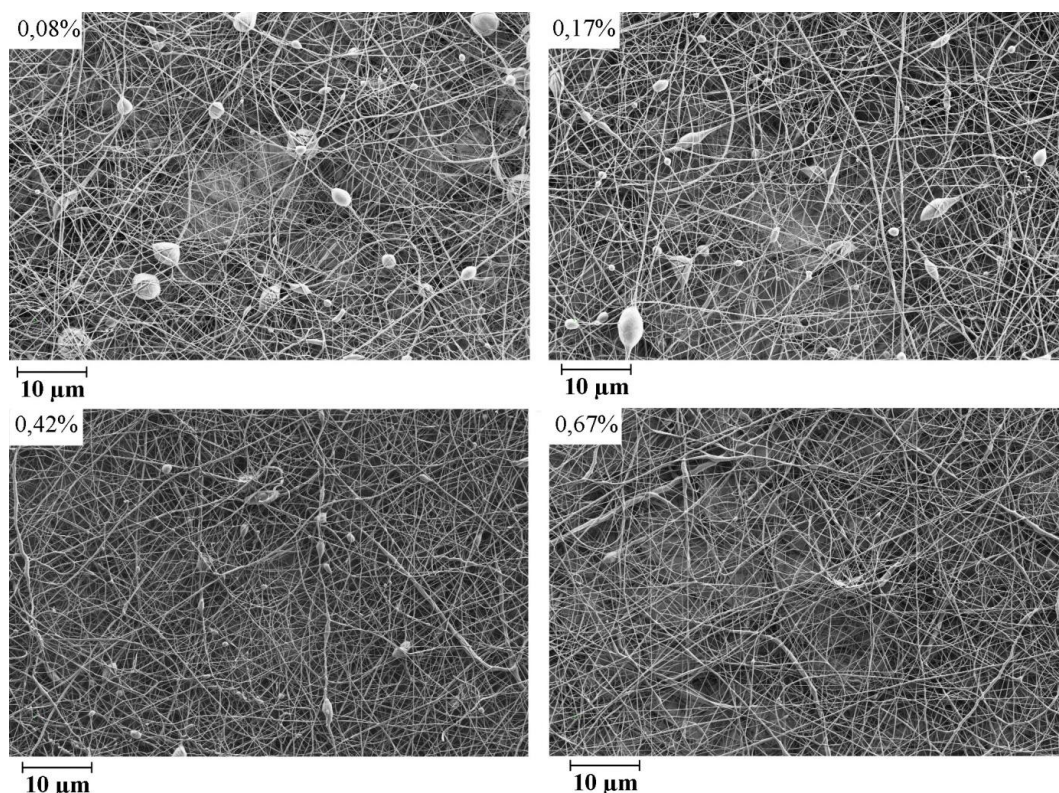
Graf 8: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža NaI izdelanih iz 16 % PCL raztopine v mešanici topil EtOAc aceton (2 : 1).

Nasprotno pa se premeri vozlov z večanjem masnega deleža NaI manjšajo (graf 9) in pri 0,67 % masnem deležu NaI izginejo.



Graf 9: Prevodnost (na grafu predstavljena s kvadrтки) in premer vozlov (na grafu predstavljen s stolpci) v odvisnosti od masnega deleža NaI.

Slika 20 nam prikazuje SEM slike nanovlaken izdelanih iz raztopin z različnimi masnimi deleži NaI.



Slika 20: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z 16 % masnim deležem PCL in različnimi masnimi deleži NaI (označeno na sliki) $U = 25 \text{ kV}$, $Q = 1,41 \text{ mL/h}$.

Na sliki 20 lahko vidimo, da se poleg premera vozlov z večanjem masnega deleža NaI manjša tudi frekvenca njihovega pojavljanja. Zaradi višje prevodnosti raztopin je gostota naboja večja

in zato v curku delujejo večje elektrostatske sile. Večje elektrostatske sile polimerne verige v curku bolj raztezajo in tako se vozli manjšajo. Podobno naj bi se manjšali tudi premeri nanovlaken, vendar se zaradi prejetja dodatne količine polimera iz vozlov to ne zgodi. Obe dejavnosti se uravnotežita in dobimo primerljive vrednosti premera nanovlaken.

S tem poskusom smo dokazali, da za uspešno izdelavo nanovlaken iz organskega topila ni nujno potrebno zelo velika dielektrična konstanta topila. Nekateri avtorji navajajo, da mora biti večja od 19 (36). V našem primeru smo uporabili mešanico topil EtOAc in aceton v volumskem razmerju 2 : 1, ki ima izračunano dielektrično konstanto 11,04, in uspešno izdelali nanovlakna brez vozlov. Z večanjem dielektrične konstante se pri enaki uporabljeni napetosti večja količina shranjene električne energije, kar vodi do večjega naboja v sistemu, ki omogoča večje in dalj časa trajajoče elektrostatske sile v curku. Te sile so odgovorne za raztezanje polimernih verig in končno za tvorbo nanovlaken brez vozlov. V našem primeru elektrostatskih sil nismo povečali z večanjem dielektrične konstante, temveč z višanjem prevodnosti sistema in s tem večanjem gostote naboja v curku. Na tem mestu razložimo, zakaj nismo izdelovali nanovlaknovlaken samo z uporabo EtOAc ampak smo v sistem dodajali še aceton. Razlog je premajhen dvig prevodnosti sistema ob uporabi le EtOAc in NaI, saj ima EtOAc premajhno zmožnost električne polaribilnosti, da bi NaI disociiral na proste ione. Mislimo, da bi uporaba kakšne druge soli (npr. LiCl) zvišala prevodnost sistema in omogočala uporabo samega EtOAc. Ker pa je LiCl toksičen material, tega nismo storili, saj je eden od naših namenov uporabljati čim manj toksične materiale.

4.2.5.4 Vpliv masnega deleža PCL in uporabljene napetosti na morfologijo gladkih nanovlaken

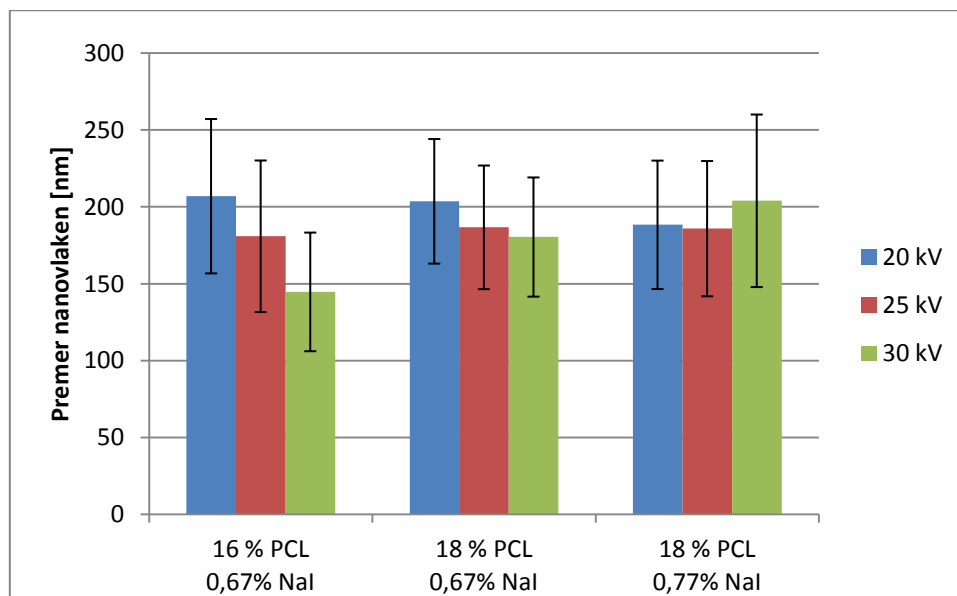
Da bi preverili vpliv masnega deleža PCL in napetosti na morfologijo gladkih nanovlaken smo izdelali set raztopin in jih sukali pri različnih pogojih (preglednica 16).

Preglednica 16: Uporabljeni pogoji in raztopine pri elektrostatskem sukanju.

Masni delež PCL [%]	Masni delež NaI [%]	Masni delež NaI glede na maso PCL [%]	Napetost			Pretok
			20 kV	25 kV	30 kV	
16	0,67	4,3	1,41 ml/h	1,41 ml/h	2,83 mL/h	
18	0,67	3,8	1,41 ml/h	1,41 ml/h	2,83 mL/h	
18	0,77	4,3	1,41 ml/h	1,41 ml/h	2,83 mL/h	
20	0,67	3,4	/	1,41 ml/h	/	
20	0,85	4,3	/	1,41 ml/h	/	

Za preverjanje vpliva napetosti smo pri 16 % in 18 % masnem deležu polimera spreminjali napetost. Ko smo uporabili napetost 30 kV, smo zaradi hitrejšega odstranjevanja raztopine s konice igle morali za doseg stabilnega curka povečati pretok skozi. Za preverjanje vpliva masnega deleža PCL smo pripravili tudi 20 % raztopini in ju sukali pod pogoji, ki smo jih v prejšnjem poskusu uporabili za doseg nanovlaken brez vozlov.

Na grafu 10, ki prikazuje premer vlaken v odvisnosti od uporabljene napetosti pri različnih pretokih opazimo, da ima napetost vpliv le pri 16 % masnem deležu PCL.

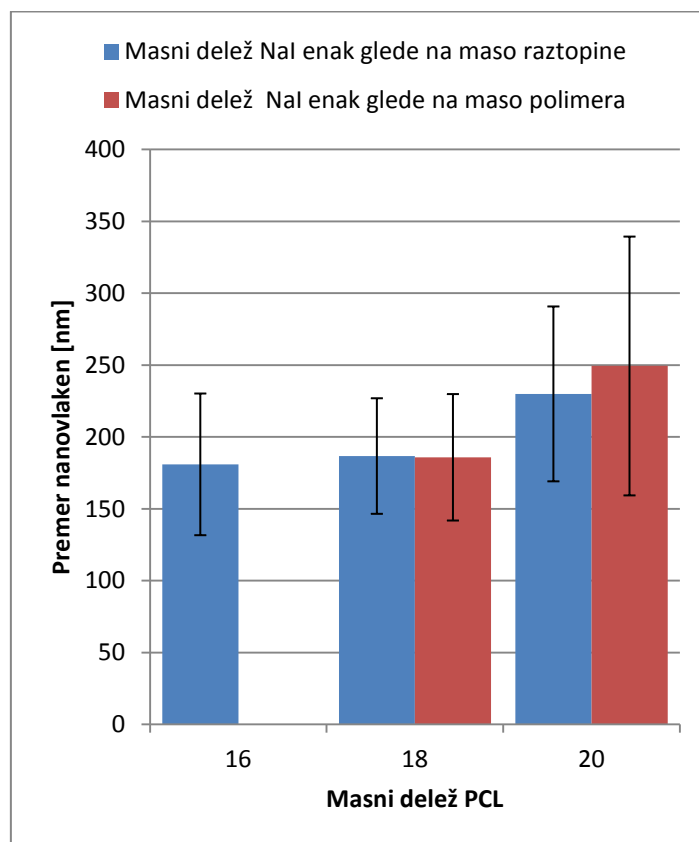


Graf 10: Premer nanovlaken v odvisnosti od uporabljene napetosti.

Z višanjem napetosti se večajo elektrostatske sile, ki raztegujejo polimerne verige, zato se povprečni premer nanovlaken manjša. Pri 18 % masnem deležu PCL se to ne zgodi. Razlog za

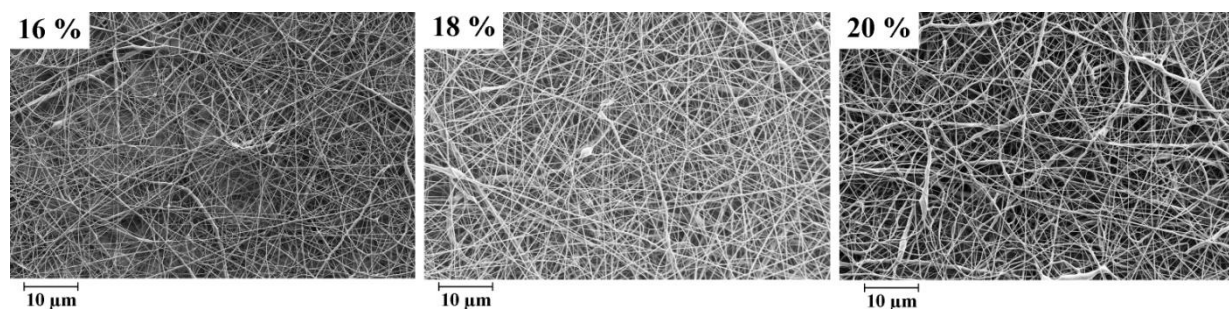
to je najverjetneje znižana prevodnost sistema, tudi ob večji količini NaI. Prevodnost raztopine z masnim deležem 16 % je $141,7 \mu\text{S}/\text{cm}$, medtem ko je prevodnost 18 % raztopin $118,0 \mu\text{S}/\text{cm}$ in $125,2 \mu\text{S}/\text{cm}$. Nižja prevodnost 18 % raztopin pomeni nižjo gibljivost nabojev in s tem nižji učinek elektrostatskih sil. Razlog za neopazen vpliv napetosti pri raztopini z 18 % masnim deležem PCL pa je lahko tudi hitro izhlapevanje topila pri konici igle in strjevanje curka, o čemer smo pisali že pri acetonu. Strjeni del curka lahko delno moti potovanje curka in s tem vpliva na premer nanovlaken. Na ta način si lahko razlagamo tudi standardno deviacijo premera nanovlaken in občasne zadebelitve, ki nastanejo na nanovlaknih. Za preverjanje te domneve bi potrebovali bolj kontrolirane pogoje, ki pa jih naša izvedba naprave za elektrostatsko sukanje ne omogoča.

Iz grafa 11, ki prikazuje premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža PCL lahko razberemo, da dvig masnega deleža polimera iz 16 % na 18 % nima vpliva na premer nanovlaken, ko pa masni delež povečamo na 20 % se povprečni premer nanovlaken rahlo poveča.



Graf 11: Premer nanovlaken v odvisnosti od masnega deleža PCL.

Pričakovali bi, da se premer nanovlaken veča z večanjem masnega deleža polimera v obeh primerih, saj se taka povezava pojavlja v literaturi (1, 7). Razlog za to neskladje bi lahko ponovno iskali v prevodnosti sistema. Ker je raztopina s 16 % masnim deležem polimera bolj prevodna, nanjo delujejo večje elektrostatske sile, te pa so odgovorne tudi za hitrost potovanja curka proti zbiralu. Hitrejše potovanje pomeni, da se več raztopine odstranjuje s konice igle in tako je v curku večja količina polimera, zato je tudi prepletanje med polimernimi verigami večje, s tem pa se veča tudi premer nanovlaken. To je enakovredno z rahlim povečanjem masnega deleža polimera. Na grafu 11 tudi vidimo, da ni bistvene razlike v premeru nanovlaken, če masni delež NaI ohranjamo konstanten glede na maso celotne raztopine ali glede na maso polimera. Z večanjem masnega deleža PCL se nižja prevodnost raztopine, vendar vozli zaradi tega ne nastanejo (slika 21).



Slika 21: SEM slika: Nanovlakna izdelana iz raztopine z različnimi masnimi deleži PCL (označeno na sliki) in 0,67 % masnim deležem NaI; U = 25 kV, Q = 1,41 mL/h.

4.2.5.5 Prevodnost raztopin pripravljenih z mešanico topil EtOAc in aceton v razmerju 2 : 1

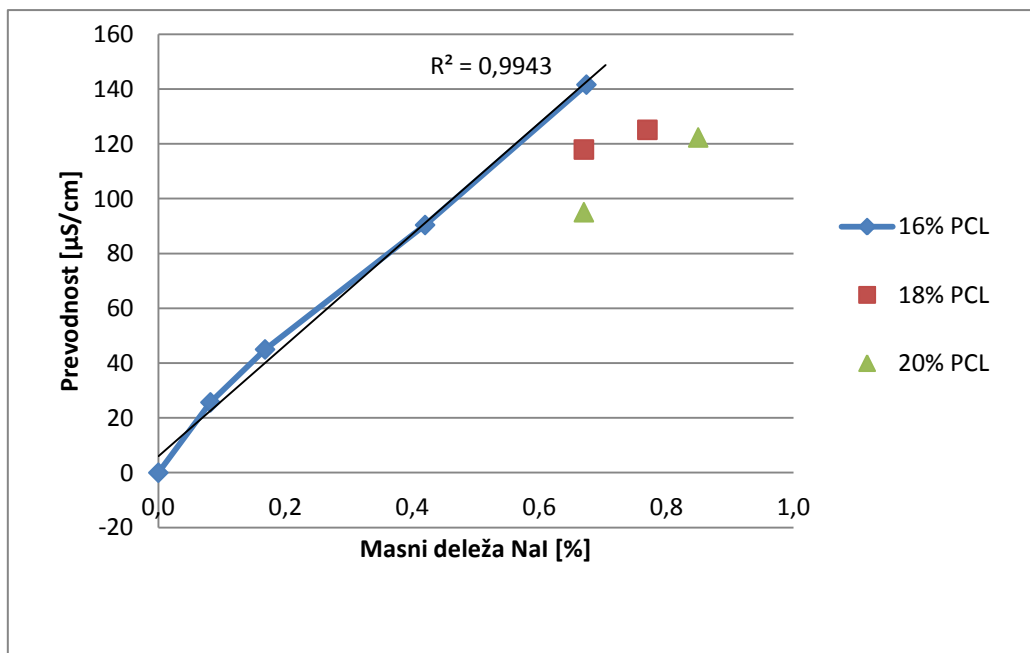
Rezultati so pokazali, da je za odpravo vozlov pri 16 % masnem deležu PCL potrebna prevodnost vsaj 141,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Pri nižjih prevodnostih so vozli ostali. Pri 18 % in 20 % raztopini polimera je pri enakem masnem deležu NaI, bodisi ga ohranimo konstantega glede na maso celotne raztopine, bodisi glede na maso polimera, prevodnost nižja (preglednica 17), kar pa za posledico nima tvorbe vozlov.

Preglednica 17: Prevodnost PCL raztopin uporabljenih pri postopku elektrostatskega sukanja.

Masni delež PCL [%]	Masni delež NaI [%]	Prevodnost [$\mu\text{S}/\text{cm}$]
16	0	$0,023 \pm 0,002$
16	0,08	$25,70 \pm 0,56$
16	0,17	$45,02 \pm 0,03$
16	0,42	$90,42 \pm 0,23$
16	0,67	$141,67 \pm 0,15$
18	0,67	$117,98 \pm 0,79$
18	0,77	$125,17 \pm 1,64$
20	0,67	$95,10 \pm 0,64$
20	0,85	$122,38 \pm 1,10$

Pri večjem masnem deležu polimera prihaja namreč do večjega števila prepletov med verigami polimera, ki omogočajo bolj homogeno razporeditev molekul topila v curku in silam površinske napetosti preprečuje združevanje molekul topila, ter posledičnega nastanka vozlov.

Graf 12 prikazuje prevodnost polimernih raztopin v odvisnosti od masnega deleža NaI.



Graf 12: Prevodnost polimernih raztopin v odvisnosti od masnega deleža NaI.

Iz grafa lahko razberemo, da pri konstantnem masnem deležu polimera (16 %) prevodnost sistema linearno narašča z naraščanjem masnega deleža NaI ($R^2 = 0,994$). Vidimo, da je prevodnost raztopine odvisna ne le od količine NaI, ampak tudi od količine polimera. Pri enakem masnem deležu NaI ima 18 % PCL raztopina za 16 %, 20 % PCL raztopina pa kar za 33 % nižjo prevodnost v primerjavi s prevodnostjo 16 % PCL raztopine. Iz vseh rezultatov meritev prevodnosti vidimo, da je prevodnost pri konstantni temperaturi funkcija masnega deleža NaI, masnega deleža PCL (viskoznosti raztopine) in dielektrične konstante topila. Pokazali smo, da je prevodnost kritičen parameter raztopine, ki določa morfologijo nanovlaken.

4.3 Osnovna analiza izdelanih nanovlaken

Za test smo uporabili nanovlakna izdelana iz 16 % raztopine PCL z 0,67 % masnim deležem NaI v 2 : 1 mešanici EtOAc in acetona. Procesni parametri izdelave so bili: napetost 25 kV, pretok 1,41 mL/h in razdalja do zbirala 15 cm.

4.3.1 Zaostanek topil v procesu elektrostatskega sukanja

Rezultati testa, ki so zbrani v preglednica 18 kažejo, da je v nastalih nanovlaknih 2 % zaostalih hlapnih snovi.

Preglednica 18: Rezultati testa izguba pri sušenju (pri sobnih pogojih, 2 dni).

Masa nanovlaken takoj po izdelavi [mg]	Masa nanovlaken po dveh dneh [mg]	Delež hlapnih snovi
33,2	32,5	2,11 %
31,7	31,1	1,89 %
35,8	35,0	2,23 %
		$\bar{x} = 2,08 \%$ RSD = 8,2 %

Potrebno se je zavedati, da se v procesu elektrostatskega sukanja topilo ne odstrani popolnoma, kar je pomemben podatek za primer uporabe nanovlaken v nadaljnjih poskusih (npr. za uporabo na celicah). Zaostanek topil je za celice namreč lahko toksičen. Pri delu smo uporabili topila, ki imajo minimalno stopnjo tveganja, kljub temu pa menimo, da je potrebno v primeru gojenja celic na izdelanih nanovlaknih, le-ta predhodno sušiti pri znižanem zračnem tlaku in tako odstraniti zaostalo topilo. Ne glede na to smo mnenja, da je uporaba EtOAc in acetona bolj smiselna in z vidika farmacevtske industrije bolj sprejemljiva, kot uporaba drugih, bolj toksičnih organskih topil.

4.3.2 Stabilnost nanovlaken pri fizioloških pogojih

Na sliki 22 lahko vidimo produkt elektrostatskega sukanja, ki smo ga z aluminijaste folije odstranili s preprostim potegom. Ne prihaja do trganja nanovlaken ali do njihovega lepljenja na folijo. Nanovlakna so odporna na raztezanje tako v vzdolžni kot strižni smeri.



Slika 22: Krpica iz polikaprolaktonskih nanovlaken.

Stabilnost nastalih nanovlaken pri fizioloških pogojih je njihova pomembna lastnost. Kot smo omenili v uvodu, se nanovlakna intenzivno proučujejo v tkivnem inženirstvu in kot sestavina oblog za hitrejše celjenje ran. Če so nanovlakna pri fizioloških pogojih nestabilna, jih ne moremo uporabiti, ker prehitro razpadejo in ne dosežejo želenih učinkov. Nanovlakna izdelana iz v vodi topnih polimerov so v vodi nestabilna, saj se zaradi izjemno velike površine zelo hitro hidratirajo in raztopijo, zato je potrebno taka nanovlakna pred nadaljnjim delom stabilizirati.

Pri našem poskusu smo fiziološke pogoje posnemali z uporabo fosfatnega pufru s pH vrednostjo 7,4. Nanovlakna v pufru niso nabrekala in so obdržala svojo obliko vseh pet dni. Ta rezultat je v skladu z literaturo (44). L. Bosworth je z bolj natančnim proučevanjem obnašanja PCL nanovlaken v fosfatnem pufru ugotovila, da le-ta ne zapadejo eroziji in odpletanju polimernih verig, temveč le hidrolizi verig. Hidroliza je pospešena v prisotnosti esteraz, ki katalizirajo reakcijo hidrolize. Ta poteka do 6-hidroksiheksanojske (kaprojske) kisline (44). Hitrost degradacije lahko nadzorujemo z uporabo kopolimerov PCL s PLA ali PGA.

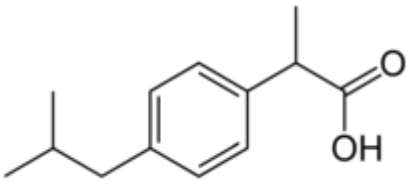
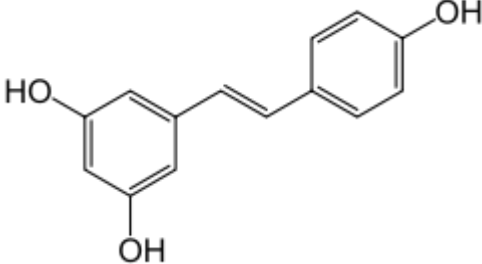
Rezultati našega testa kažejo, da nanovlakna izdelana iz PCL za nadaljnje delo ne potrebujejo stabilizacije, tako se v samem procesu znebimo dodatnega koraka, ki je potreben pri uporabi nanovlaken iz vodotopnega polimera.

4.4 Vgradnja učinkovin v PCL nanovlakna

Vgradnja različnih učinkovin v nanovlakna je lahko zelo koristna. Že v uvodu smo poročali, da so bila uspešno izdelana nanovlakna, ki so vsebovala heparin, ki se je iz njih podaljšano sproščal. V nanovlakna, ki bi jih želeli uporabiti kot oblogo za hitrejše celjenje ran, bi lahko vgradili antibiotik in tako zdravili okužene rane.

V nanovlakna smo poskusili vgraditi dve različni modelni učinkovini: ibuprofen in resveratrol. Njune glavne značilnosti so zbrane v preglednici 19. Obe učinkovini vsebujeta fragmente, ki so značilni za številne zdravilne učinkovine kot so benzenski obroč, fenolna OH skupina in karboksilna skupina ter sta zato dobri modelni učinkovini. Zavestno se nismo odločali za uporabo soli učinkovine (npr. natrijeva sol ibuprofena), saj nismo želeli dodatno posegati v sistem in zviševati njegove prevodnosti.

Preglednica 19: Fizikalne-kemijske lastnosti modelnih učinkovin.

	Ibuprofen	Resveratrol
Strukturna formula		
Mr	206,2	228,2
pKa	4,31 (45)	pKa ₁ = 8,8; pKa ₂ = 9,8; pKa ₃ = 11,4 (46)
Topnost*	V vodi skoraj netopen; lahko topen v acetonu, metanolu, EtOAc in diklorometanu (47,48)	V vodi skoraj netopen; lahko topen v acetonu in topen v etanolu in EtOAc (49)

* topnosti so podane, kot jih podaja Ph. Eur.

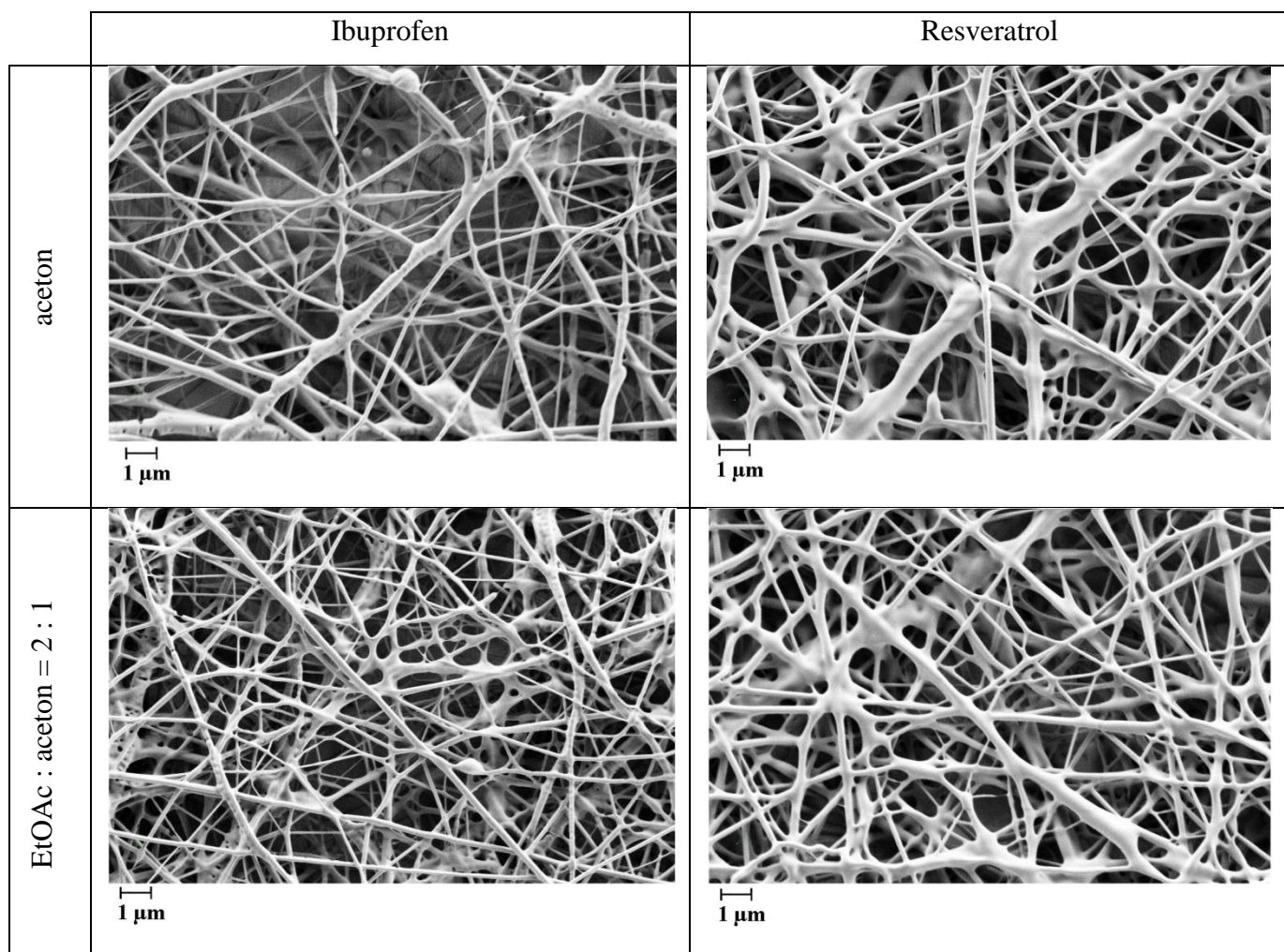
Učinkovini smo poskusili vgraditi v nanovlakna, tako iz acetonske raztopine PCL, kot tudi iz 2 : 1 mešanice EtOAc in acetona (preglednica 20).

Preglednica 20: Parametri raztopine in elektrostatskega sukanja.

Topilo	Aceton	EtOAc : aceton = 2 : 1
Masni delež PCL	18 %	16 %
Mani delež NaI	0,018 %	0,067 %
Mani delež učinkovin	10 % glede na maso polimera	10 % glede na maso polimera

Uporabljen napetost	25 kV	25 kV
Uporabljen pretok	2,82 mL/h	1,41 mL/h
Razdalja do zbirala	15 cm	15 cm

Na SEM slikah nastalih nanovlaken (slika 23) opazimo, da se je morfologija nanovlaken z zdravilno učinkovino spremenila.



Slika 23: SEM slika: Nanovlakna z vgrajenima učinkovinama.

Vlakna imajo na nekaterih mestih zadebelitve in izgledajo, kot da bi izgubljala svojo strukturo. Vzroka za to bi po našem mnenju lahko bila dva. Nastala morfologija je lahko posledica zmanjšane parnega tlaka topila v curku, ki so ga povzročile molekule učinkovine, in je bil tako čas za odparevanje topila prekratek zato nastala nanovlakna še niso bila dovolj posušena. Ob tem velja omeniti, da na zbiralu nismo opazili mokrih lis, temveč je bilo suho. Zato domnevamo, da bi lahko molekule učinkovine »ujele« molekule topila v notranjosti vlaken, te pa bi potem s časom difundirale ven in raztapljale PCL. Lahko pa je vzrok v

količini vgrajenih snovi (učinkovina in NaI), ki v primeru uporabe kombinacije topil znaša kar 14 %, in je ta prevelika, da bi se tvorila »lepa« nanovlakna in zato njihova struktura razpada. Na SEM slikah vidimo tudi, da na površini nanovlaken ni videti kristalčkov učinkovine, zato sklepamo, da se je vsa vgradila v notranjost nanovlaken in ni ostala na površini. To je dobrodošlo, saj se tako izognemo »burst« efektu, ki povzroči zelo hitro začetno sproščanje učinkovine ob stiku s tekočino. Če bi želeli uporabljati nanovlakna z vgrajeno učinkovino, bi zagotovo morali optimirati tako procesne parametre kot tudi parametre raztopine, da bi pridobili nanovlakna z ustrezno morfologijo. Potrebno bi bilo tudi preučiti kinetiko sproščanja učinkovine iz nastalih nanovlaken.

5 ZAKLJUČEK

Uspešno smo izdelali polikaprolaktonska nanovlakna z elektrostatskim sukanjem polimerne raztopine v acetonu in EtOAc. Pokazali smo, da je za izdelavo nanovlaken bolj primerna uporaba polimera z večjo molsko maso.

Pri uporabi PCL in acetona so nastala nanovlakna vozlaste morfologije. Vozli so ostajali tudi ob spreminjanju procesnih parametrov in spreminjanju masnega deleža polimera v raztopini. Z večanjem masnega deleža polimera se je manjšalo število vozlov, večal pa se je premer nanovlaken. Večja uporabljena napetost je rezultirala v zmanjšanem premeru vozlov.

Vozlasto morfologijo smo odpravili z dodatkom NaI v polimerno raztopino, ki ji je dvignil prevodnost. Z večanjem masnega deleža NaI se je premer nanovlaken manjšal, napetost in pretok pa pri dodatku NaI nista imela vpliva na njihovo morfologijo.

S topilom EtOAc nanovlakna niso nastala. Tudi dodatek NaI ni imel velikega vpliva, saj se je prevodnost raztopine zaradi nizke dielektrične konstante EtOAc dvignila zanemarljivo malo. Prav tako za nastanek gladkih nanovlaken ni zadoščal dodatek acetona v volumskem razmerju 3 : 1 v korist acetona, ki je dielektrično konstanto dvignil iz 6,08 na 17,27.

Gladka nanovlakna so nastala pri uporabi kombinacije obeh topil v volumskem razmerju 2 : 1 v korist EtOAc in dodatku NaI.

Pri povečanju masnega deleža polimera iz 16 % na 20 % se je premer nanovlaken povečal. uporabljena napetost pa ni imela konsistentnega vpliva na premer nanovlaken.

Pokazali smo, da prevodnost polimernih raztopin narašča linearno z masnim deležem NaI v sistemu in da je prevodnost pri dani temperaturi funkcija masnega deleža polimera (PCL), masnega deleža soli (NaI) in dielektrične konstante topila.

Ugotovili smo, da je najbolj kritični parameter pri elektrostatskem sukanju raztopin iz organskih topil količina naboja v curku, ki ga kontroliramo z dielektrično konstanto in s prevodnostjo raztopine. Večja kot je dielektrična konstanta, manjša je potrebna prevodnost za nastanek gladkih nanovlaken.

Z osnovnimi analizami izdelanih nanovlaken smo ugotovili, da so polikaprolaktonska nanovlakna stabilna pri fizioloških pogojih ter da takoj po izdelavi vsebujejo še okoli 2 % hlapnih snovi.

V nanovlakna smo vgradili tudi dve modelni učinkovini. Prvi testi kažejo, da je vgradnja možna, saj na površini nanovlaken ni videti kristalov učinkovine. Videti je možno tudi spremenjeno morfologijo nanovlaken, zato bi bilo v prihodnje potrebno optimizirati procesne parametre in parametre raztopine.

Nanovlakna predstavljajo mnogo nadaljnjih možnosti raziskovanja in v prihodnosti morda tudi uporabo v farmacevtskem svetu.

6 LITERATURA

1. N. Bhardwaj, S. C. Kundu. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 325–347
2. X. Zhang, M. R. Reagan, D. L. Kaplan. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 988–1006
3. T. J. Sill, H. A. von Recum. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 1989–2006
4. C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland et al. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 1413–1433
5. R. Jayakumar, M. Prabakaran, S.V. Nair, H. Tamura. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 142–150
6. Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna. A review of polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 2003; 63: 2223–2253
7. S Ramakrishna, K Fujihara, WE Teo, et al: An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific, New Jersey 2005
8. H. Jiang, Y. Hu, Y. Li et al. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release* 2005; 108: 237–243
9. S Thomas. Wound management and dressings. *Pharm Presse* 1990; 1: 37–57
10. N. Barttarai, D. Edmondson, O. Veiseh, F. A. Matsen et al. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005; 26: 6176–6184
11. M.-S. Khil, D.-I. Cha, I.-S. Kim et al. Electrospun Nanofibrous Polyurethane Membrane as Wound Dressing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2003; 67: 675–679
12. J Jia, YY Duan, SH Wang, et al. Preparation and characterization of antibacterial silver-containing nanofibers for wound dressing applications. *Journal of US–China Medical Science* 2007, 4: 52–54.
13. J. S. Choi, K. W. Leongb, H. S. Yoo. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* 2008; 29: 587–596

14. S. Chakraborty, I-C. Liao, A. Adler, et al. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 1043–1054
15. M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher. The return of a forgotten polymer– Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 2010; 35: 1217–1256
16. J. S. Choi, S. J. Lee, G. J. Christ, et al. The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials* 2008; 29: 2899–2906
17. E. Luong-Van, L. Grøndahl, K. N. Chua et al. Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials* 2006; 27: 2042–2050
18. H. Yoshimotoa, Y.M. Shina, H. Teraia, et al. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24: 2077–2082
19. M. Shina, O. Ishiia, T. Sueda et al. Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh. *Biomaterials* 2004; 25: 3717–3723
20. W.-J. Li, R. Tuli, X. Huang, et al. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005; 26: 5158–5166
21. W.-J. Li, R. Tulia, C. Okafor et al. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2005; 26: 599–609
22. S. N. Fischer, J. K. Johnson, C. P. Baran, et al. Organ-derived coatings on electrospun nanofibers as ex vivo microenvironments. *Biomaterials* 2011; 32: 538–546
23. R. Nirmalaa, K. T. Namb, D. K. Parkb, et al. Structural, thermal, mechanical and bioactivity evaluation of silver-loaded bovine bone hydroxyapatite grafted poly(ϵ -caprolactone) nanofibers via electrospinning. *Surface & Coatings Technology* 2010; 205: 174–181
24. A. K. Moghe, R. Hufenus, S.M. Hudson, et al. Effect of the addition of a fugitive salt on electrospinnability of poly(ϵ -caprolactone). *Polymer* 2009; 50: 3311–3318
25. Y. Yokoyama, S. Hattori, C. Yoshikawa et al. Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric. *Materials Letters* 2009; 63: 754–756

26. E. D. Boland, T. A. Telemeco, D. G. Simpson. Utilizing Acid Pretreatment and Electrospinning to Improve Biocompatibility of Poly(Glycolic Acid) for Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2004; 71B: 144–152,
27. G. Larson, R. Spretz, R. Velarde-Ortiz. Use of Coaxial Gas Jackets to Stabilize Taylor Cones of Volatile Solutions and to Induce Particle-to-Fiber Transitions. *Advanced Materials* 2004; 16: 166–169
28. A. Sonseca, L. Peponi, O. Sahuquillo, et al. Electrospinning of biodegradable polylactide/hydroxyapatite nanofibers: Study on the morphology, crystallinity structure and thermal stability. *Polymer Degradation and Stability* 2012; 97: 2052–2059
29. M. Bognitzki, W. Czado, T. Frese, et al. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials* 2001; 13: 70–72
30. E. Kenawy, G. L. Bowlin, K. Mansfield, et al Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release* 2002; 81: 57–64
31. X. Zonga, K. Kima, D. Fang, et al. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* 2002; 43: 4403–4412
32. D. S. Katti, K. W. Robinson, F. K. Ko, et al. Bioresorbable Nanofiber-Based Systems for Wound Healing and Drug Delivery: Optimization of Fabrication Parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2004; 70: 286–96.
33. X. Zonga, S. Rana, D. Fang, et al. Control of structure, morphology and property in electrospun poly(glycolide-co-lactide) non-woven membranes via post-draw treatments. *Polymer* 2003; 44: 4959–4967
34. W. Li, C. T. Laurencin, E. J. Caterson, et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; 60: 613–621
35. O. J. Yoon, C. Y. Jung, I. Y. Sohn, et al. Nanocomposite nanofibers of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) and graphene oxide nanosheets *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 2011; 42: 1978–1984
36. C.J. Luo, E. Stride, M. Edirisinghe. Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions. *Macromolecules* 2012; 45: 4669–4680

37. D. H. Reneker, A. L. Yarin. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* 2008; 49: 2387–2425
38. K.H. Lee, H.Y. Kim, M.S. Khil, et al. Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer* 2003; 44: 1287–1294
39. D. R Lide: CRC Handbook of chemistry and physics 90th Edition. CRC press, 2009–2010
40. Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5), ICH harmonised tripartite guideline, 4. februar 2011
41. H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 1999; 40: 4585–4592
42. P. Wang, A. Anderko. Computation of dielectric constants of solvent mixtures and electrolyte solutions. *Fluid Phase Equilibria* 2001; 186: 103–122
43. T. Uyar, F. Besenbacher. Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer* 2008; 49: 5336–5343
44. L. A. Bosworth, S. Downes. Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds. *Polymer Degradation and Stability* 2010; 95: 2269–2276
45. R. Hamoudová, M. Pospíšilová. Determination of ibuprofen and flurbiprofen in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 41: 1463–1467
46. J.M. López-Nicolás, F. García-Carmona. Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 17: 7600–7605
47. P. Bustamante M.A. Pena, J. Barra. The modified extended Hansen method to determine partial solubility parameters of drugs containing a single hydrogen bonding group and their sodium derivatives: benzoic acid:Na and ibuprofen:Na. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 194: 117–124
48. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 7th ed., Strasbourg: Council of Europe; 2010
49. X. Sun, B. Peng, W. Yan. Measurement and correlation of solubility of trans-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2) The *Journal of Chemical Thermodynamics* 2008; 40: 735–738