

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA POTRČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA POTRČ

**NAČRTOVANJE IN IZDELAVA NANOVLAKEN IZ
POLIKAPROLAKTONA IN ZMESI POLIETILENOKSIDA IN
HITOSANA**

**FORMULATION AND PREPARATION OF NANOFIBERS FROM
POLYCAPROLACTONE AND MIXTURE OF
POLYETHYLENEOXIDE AND CHITOSAN**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

SEM analize je naredila doc. dr. Petra Kocbek na Kemijskem inštitutu, Ljubljana, in TEM analize izr. prof. dr. Mateja Erdani Kreft na Inštitutu za biologijo celice, UL-Medicinska fakulteta, Ljubljana.

Zahvala

Za strokovno usmerjanje, pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek. Iskrena hvala tudi izr. prof. dr. Saši Baumgartner, Janu Pelipenku ter vsem ostalim s Katedre za farmacevtsko tehnologijo za vse napotke, ideje in zamisli.

Posebno zahvalo namenjam moji družini, fantu Dejanu in prijateljem za ljubezen, podporo, spodbudo, pogum in potrpežljivost v času študija ter pri nastajanju magistrske naloge. Hvala za vse prijetne in zabavne trenutke, ki so popestrili študentska leta in jih naredili nepozabna.

Ljubljana, januar 2014

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Petre Kocbek, mag. farm.

Tanja Potrč

Magistrska komisija

Predsednik: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Mentorica: doc. dr. Petra Kocbek, mag. farm.

Član: asist. dr. Simona Mencej Bedrač, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1 ELEKTROSTATSKO SUKANJE	1
1.1.1 Mehanizem elektrostatskega sukanja.....	1
1.1.2 Elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe.....	2
1.1.3 Vpliv različnih spremenljivk na proces elektrostatskega sukanja.....	4
1.1.3.1 Parametri polimerne raztopine	5
1.1.3.2 Procesni parametri	6
1.1.3.3 Parametri okolja	6
1.2 NANOVLAKNA	7
1.2.1 Vrednotenje nanovlaken.....	7
1.2.2 Uporaba nanovlaken	8
1.2.2.1 Dostava zdravil	9
1.2.2.2 Obloge za rane	10
1.3 PROUČEVANI POLIMERI	12
1.3.1 Polikaprolakton.....	12
1.3.2 Hitosan.....	13
1.3.3 Polietilenoksid	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.2 MODELNA BARVILA IN UČINKOVINE, KI SMO JIH POSKUSILI VGRADITI V DVOSLOJNA NANOVLAKNA	17
3.3 NAPRAVE	18
3.4 METODE	19
3.4.1 Priprava raztopin PCL	19
3.4.1.1 Priprava polimernih raztopin PCL za izdelavo dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim barvilom ali učinkovino.....	20

3.4.2	Priprava polimernih raztopin PEO in hitosana	21
3.4.3	Elektrostatsko sukanje	21
3.4.4	Elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe	22
3.4.5	Proučevanje morfoloških lastnosti nanovlaken	22
3.4.6	Priprava medija za vrednotenje sproščanja	23
3.4.7	Vrednotenje sproščanja modelnih barvil in učinkovin iz dvoslojnih nanovlaken	23
3.4.8	Ugotavljanje vsebnosti modelnih barvil in učinkovin v nanovlaknih	24
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1	IZDELAVA ENOSLOJNIH NANOVLAKEN IZ RAZTOPINE PCL.....	25
4.1.1	Masni delež raztopine PCL.....	25
4.1.2	Optimizacija 10 % raztopine PCL	26
4.2	IZDELAVA DVOSLOJNIH NANOVLAKEN IZ RAZTOPINE PCL IN RAZTOPINE ZMESI PEO IN HITOSANA	35
4.2.1	Kombinacija A	35
4.2.2	Kombinacija B.....	35
4.2.3	Kombinacija C	37
4.2.4	Kombinacija D	40
4.2.5	Kombinacija E.....	41
4.2.6	Kombinacija F.....	43
4.2.7	Kombinacija G	44
4.3	VGRAJEVANJE IN SPROŠČANJE MODELNIH SPOJIN V DVOSLOJNA NANOVLAKNA	46
4.3.1	Tartrazin.....	46
4.3.2	Natrijev salicilat	47
4.3.3	Metilvijolično	47
4.3.3.1	Sproščanje barvila metilvijolično iz dvoslojnih nanovlaken.....	48
4.3.4	Pentoksifilin	48
4.3.4.1	Sproščanje pentoksifilina iz dvoslojnih nanovlaken	51
4.3.5	Azur	52
4.3.5.1	Sproščanje barvila azur iz dvoslojnih nanovlaken	54
5.	SKLEP	55
6.	LITERATURA.....	57

POVZETEK

Nanovlakna uvrščamo med najsodobnejše in izredno obetavne nanooblike materiala. Zaradi svojih lastnosti imajo širok spekter uporabe. Zlasti pomembno mesto zasedajo v biomedicini, kjer potekajo številne raziskave na področjih izdelave tkivnih nadomestkov, sodobnih oblog za celjenje ran ter razvoja dostavnih sistemov s takojšnjim ali nadzorovanim sproščanjem zdravilnih učinkovin. Mehanizem delovanja tkivnih nadomestkov in oblog za rane iz nanovlaken temelji na posnemanju fibrilarnih gradnikov zunajceličnega ogrodja, kar vodi v hitrejšo regeneracijo tkiva ali organov, medtem ko lahko pri dostavnih sistemih dosežemo želeni profil sproščanja z vgrajevanjem učinkovin v notranjost ali na površino nanovlaken. Za izdelavo enoslojnih nanovlaken se najpogosteje uporablja metoda elektrostatskega sukanja, za izdelavo dvo ali večslojnih nanovlaken pa modificirana metoda elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe.

Cilj magistrskega dela je bil razvoj procesa elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe, ki bi omogočal kontinuirano nastajanje nanovlaken s polikaprolaktonsko ovojnico ter jedrom iz zmesi polietilenoksida in hitosana z vgrajeno modelno vodotopno spojino.

Najprej smo s postopnim sistematičnim spreminjanjem in preizkušanjem izvedljivosti procesa definirali parametre, ki so omogočali, da smo z elektrostatskim sukanjem raztopine polikaprolaktona izdelali enoslojna nanovlakna. Površina izdelanih nanovlaken je bila hrapava in vdolbinasta, z debelino v območju 360–520 nm. Nato smo začeli z optimizacijo parametrov, ki so omogočali proces elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe. Velik izziv je predstavljala tvorba polikaprolaktonske ovojnice okrog hidrofilnega jedra iz zmesi polietilenoksida in hitosana, saj sta se med procesom na stični površini srečali organska in vodna faza s povsem različnimi fizikalno kemijskimi lastnostmi. Ko smo definirali najugodnejše parametre, ki so omogočili nastanek dvoslojnih nanovlaken, smo vanje vgrajevali modelne vodotopne snovi. Tudi površina dvoslojnih nanovlaken je bila hrapava in vdolbinasta, medtem ko se je njihova debelina večala z večanjem pretoka notranje faze in se je nahajala v območju 230–1260 nm. Na podlagi vrednotenja sproščanja smo posredno dokazali, da smo uspeli izdelati dvoslojna nanovlakna, saj se je vodotopna snov iz vlaken sproščala upočasnjeno.

Dvoslojna nanovlakna s polikaprolaktonsko ovojnico in hidrofilnim jedrom nudijo številne možnosti nadaljnjega razvoja in nadgradnje, predvsem na področju izdelave dostavnih sistemov za peptide in proteine.

ABSTRACT

Nanofibers represent of the newest and extremely promising nanomaterials with wide application area. They have a particularly important role in biomedicine, where numerous studies have been performed in the field of tissue engineering, novel dressings for wound healing and development of immediate and controlled drug release drug delivery systems. Tissue engineering constructs and wound dressings based on nanofibers resemble the fibrillar elements of natural extracellular matrix, which leads to faster tissue or organ regeneration and enables formulation of drug delivery system with desired release profile. The drug can be incorporated in the nanofiber core or attached to their surface. The most common method for nanofiber production is electrospinning, which is slightly modified i.e. coaxial electrospinning for production of core-shell nanofibers. The aim of this master thesis was the development of coaxial electrospinning process which would enable continuous formation of nanofibers with a polycaprolactone shell and a core from polyethylene oxide and chitosan mixture with incorporated model water soluble substance. Firstly, electrospinning parameters were systematically altered to enable production of nanofibers from polycaprolactone solution. The surface of obtained nanofibers was rough and their average diameter was 360–520 nm. Then optimisation of parameters was carried out to enable coaxial electrospinning. A major challenge represented the formation of polycaprolactone shell around the hydrophilic core made of polyethylene oxide and chitosan mixture, since during the electrospinning the two phases with entirely different physical and chemical properties came in a contact on the interface. When parameters, which enabled the formation of core-shell nanofibers, were set, a model water soluble substance was incorporated in nanofibers. The produced core-shell nanofiber had also a rough surface, meanwhile their average diameter was increasing with increase in flow rate of inner phase. It was found in range 230–1260 nm. Based on the release studies it was indirectly confirmed that the core-shell nanofibers were successfully produced, since the release of water soluble substances from nanofibers was sustained.

The core-shell nanofibers with a polycaprolactone shell and a hydrophilic core offer numerous possibilities for a further development and upgrade, especially in the field of drug delivery system for peptides and proteins.

KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS

Polikaprolakton, polietilenoksid, hitosan, dvoslojna nanovlakna, elektrostatsko sukanje/
Polycaprolactone, polyethyleneoxide, chitosan, core-shell nanofibers, electrospinning

SEZNAM OKRAJŠAV

AFM: mikroskop na atomsko silo

PCL: polikaprolakton

PEO: polietilenoksid

SEM: vrstična elektronska mikroskopija

TEM: presečna elektronska mikroskopija

PBS: fosfatni pufer

SD: standardna deviacija

RH: relativna vlažnost

T: temperatura

1. UVOD

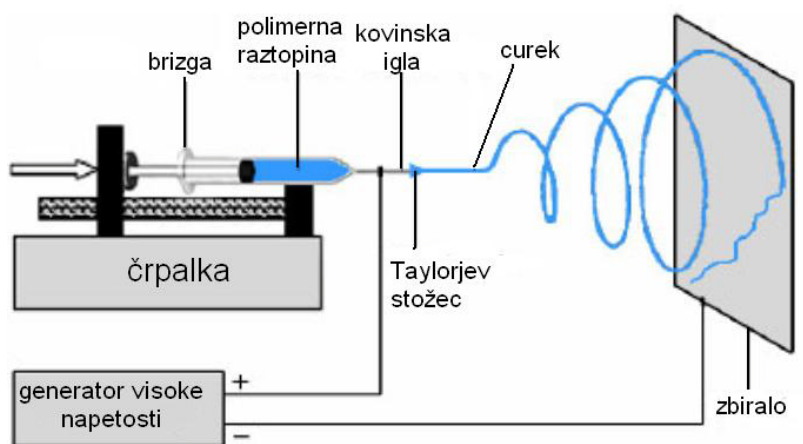
1.1 ELEKTROSTATSKO SUKANJE

Elektrostatsko sukanje je enostavna metoda, ki omogoča kontinuirano pripravo nanovlaken iz raztopin ali talin različnih polimerov. Dobljena vlakna so večinoma premera od nekaj nanometrov do nekaj mikrometrov (1, 2, 3).

Metoda je poznana že od leta 1934, ko je Formahals skupaj s sodelavci patentiral napravo, ki omogoča izdelavo nanovlaken, vendar se je šele v zgodnjih devetdesetih letih zaradi razmaha v razvoju nanotehnologije pojavilo večje zanimanje za samo metodo in s tem se je razmahnila tudi njena uporaba (1, 4, 5).

1.1.1 Mehanizem elektrostatskega sukanja

Za izvajanje elektrostatskega sukanja potrebujemo tri glavne komponente, kar shematsko ponazarja Slika 1: generator kot vir visoke električne napetosti s pozitivno ali negativno polarnostjo, brizgo z nameščeno kovinsko iglo majhnega premera (od 400 μm do več kot 1 mm) za injiciranje polimerne raztopine ter ozemljeno zbiralo, na katerem se zbirajo vlakna (1, 6, 7). Zbiralo običajno predstavlja planarna kovinska plošča; vendar obstajajo tudi številne druge modificirane oblike kot na primer rotirajoče zbiralo, ki omogoča, da se med zbiranjem vlakna uredijo, medtem ko so na planarnem zbiralu zbrana vlakna naključno urejena (4, 6).



Slika 1: Shematski prikaz naprave za elektrostatsko sukanje (8).

Izvajanje procesa elektrostatskega sukanja je enostavno. Želena polimerno raztopino napolnimo v brizgo in jo s pomočjo črpalke, potisnega plina ali gravitacijske sile potiskamo skozi kovinsko iglo majhnega premera, ki je nameščena na koncu brizge. Na iglo priključimo generator visoke napetosti. Po priključitvi vira visoke napetosti uvajamo v raztopino električni naboj, ki se razporedi po površini kapljice, ki pred tem nastane na konici igle. Z višanjem napetosti začnejo v kapljici naraščati odbojne sile med enakimi naboji, obenem pa naraščajo privlačne sile med kapljico in nasprotno nabitim zbiralom. Pri ustrezni električni napetosti pride do njene izenačitve s površinsko napetostjo polimerne raztopine in do preoblikovanja kapljice v Taylorjev stožec, ki se začne v trenutku, ko električna napetost preseže površinsko napetost, raztegovati, kar vodi v nastanek nabitega curka, ki potuje proti zbiralu (4, 6, 9, 10).

Curek je na poti od konice igle do zbirala podvržen številnim nestabilnostim ter dejavnikom, ki vplivajo na uspešnost nastanka nanovlaken. Na proces vplivajo elektrostatske odbojne sile med enako nabitimi molekulami v raztopini, elektrostatske privlačne sile, ki vlečejo curek k zbiralu, viskoelastične sile in sile površinske napetosti, ki preprečujejo raztezanje curka, gravitacijske sile zaradi teže curka ter sile zaradi upora med curkom in okoliškim zrakom. Vsi ti dejavniki vplivajo na izhlapevanje topila, kar omogoča, da nastanejo suha vlakna, in na raztezanje curka, kar vpliva na debelino nastalih vlaken. V kolikor proces ni optimiziran ter odločilni dejavniki, ki vplivajo na izvedljivost elektrostatskega sukanja, niso natančno nadzorovani, ne pride do popolnega raztezanja polimernih verig, kar vodi v nastanek nepravilnosti v morfologiji dobljenega produkta (npr. nastanejo vozli) (1, 4, 6).

1.1.2 Elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe

Elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe je napredna, modificirana oblika elektrostatskega sukanja, ki omogoča izdelavo dvo ali večslojnih vlaken (11, 12, 13). Sun s sodelavci je prvi, ki je v literaturi objavil uporabo te metode (3, 14, 15). Glavne komponente naprave za izdelavo dvoslojnih nanovlaken so enake kot pri enostavnem elektrostatskem sukanju tj. izdelava enoslojnih nanovlaken, edina razlika je v šobi, ki je sestavljena iz dveh koncentričnih kapilar, kot ponazarja Slika 2. Takšna šoba omogoča, da sta jedro in ovoj nanovlaken narejena iz različnih polimerov. Pogosto je notranja faza, iz katere nastane jedro vlaken, vodna raztopina polimera, medtem ko je lahko zunanja faza, iz

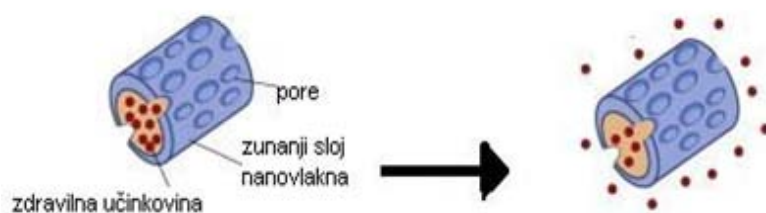
katere nastane ovojnica vlaken, vodna raztopina polimera ali raztopina polimera v organskem topilu. Med polimernima raztopinama, ki tvorita jedro in ovojnico vlakna, med samim procesom elektrostatskega sukanja ne sme priti do mešanja (2, 15, 16).



Slika 2: Prikaz koaksialne šobe, ki smo jo uporabljali za izdelavo dvoslojnih nanovlaken.

(A) Sestavna dela koaksialne šobe z zunanjo in notranjo kapilaro, (B) pogled na sestavljeno šobo s sprednje strani, (C) pogled na sestavljeno šobo z zadnje strani, kjer se vidita odprtini, skozi kateri dovajamo raztopino zunanje in notranje faze.

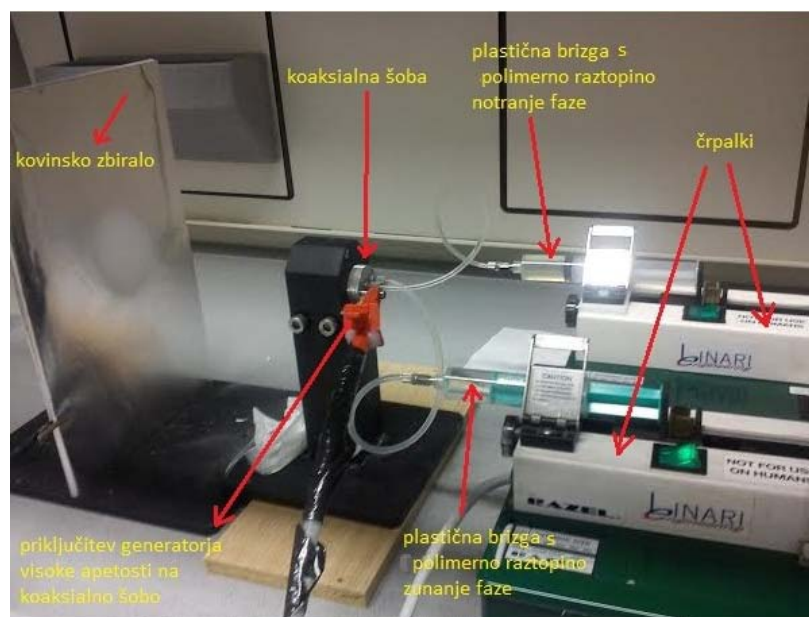
Dvoslojna vlakna, sestavljena iz jedra in ovojnice, kar prikazuje Slika 3, predstavljajo velik potencial na področju razvoja dostavnih sistemov s prirejenim sproščanjem, tkivnega inženirstva in izdelave nanovlaken z modificirano površino. Takšna vlakna omogočajo vgrajevanje težko topnih učinkovin in biomakromolekul (npr. DNA, proteini) v notranji sloj vlaken, kar preprečuje neposredni stik z neugodnimi dejavniki okolja, ki lahko vplivajo na biološko aktivnost zdravilne učinkovine ter povzročijo njeno inaktivacijo (3, 15, 17, 18).



Slika 3: Shematični prikaz zgradbe dvoslojnih nanovlaken in sproščanja vgrajene učinkovine (19).

Ker pri elektrostatskem sukanju dvoslojnih nanovlaken uporabljamo drugačno šobo kot pri izdelavi enoslojnih nanovlaken, potrebujemo dve črpalki, ki omogočata neodvisen in stalen pretok vsake polimerne raztopine posebej. Aparaturo, ki smo jo uporabili za izdelavo dvoplastnih nanovlaken, prikazuje Slika 4. Ko priključimo generator visoke napetosti na

konico šobe, začnemo z vnašanjem naboja v obe polimerni raztopini. Naboj se v glavnem zbira na površini kapljice, torej na površini zunanje raztopine, ki bo tvorila zunanji sloj vlakna. Prav tako kot pri izdelavi enoslojnih nanovlaken, se tudi v tem primeru začne kapljica, nastala na konici šobe, zaradi delovanja elektrostatskih odbojnih sil med enako nabitimi molekulami v raztopini in elektrostatskih privlačnih sil med raztopino in nasprotno nabitim zbiralom, raztezati v Taylorjev stožec. Vse te sile večinoma delujejo na zunanjo polimerno raztopino, kar posledično povzroči, da se začne notranja raztopina zaradi viskoznosti in medfaznega trenja vleči. Z dodatnim višanjem električne napetosti pride do nastanka kontinuiranega koaksialnega curka, ki potuje proti zbiralu (20).



Slika 4: Naprava za elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe.

1.1.3 Vpliv različnih spremenljivk na proces elektrostatskega sukanja

Elektrostatsko sukanje je kompleksen proces, na katerega vplivajo procesni parametri, parametri polimerne raztopine ter parametri okolja (7, 9, 21, 22).

Pri elektrostatskem sukanju z uporabo koaksialne šobe se pojavijo glede na elektrostatsko sukanje enoslojnih nanovlaken še dodatne spremenljivke, ki jih je potrebno optimizirati, če želimo, da proces funkcioniira. Enega pomembnejših dejavnikov nestabilnosti predstavlja stik mejnih površin polimernih raztopin notranje in zunanje faze, ki bosta tvorili jedro in ovojnico vlaken (2, 13).

1.1.3.1 Parametri polimerne raztopine

Lastnosti polimerne raztopine so odvisne od vrste parametrov, ki signifikantno vplivajo na proces elektrostatskega sukanja ter posledično na morfologijo in debelino nastalih nanovlaken (9, 21). Najpomembnejšo vlogo imajo:

- **Molekulska masa polimera** ima odločilen vpliv na reološke in električne lastnosti polimerne raztopine, predvsem na viskoznost in prevodnost. Večinoma uporabljamo polimere z višjo molekulsko maso, medtem ko elektrostatsko sukanje s polimeri z nižjo molekulsko maso pogosteje vodi v nastanek produkta z vozli (9, 21).
- **Koncentracija polimerne raztopine** vpliva na premer nanovlaken. Ugotovili so, da se z višanjem koncentracije večja tudi premer vlaken (9, 21).
- **Viskoznost** je odvisna od molekulske mase polimera in koncentracije polimerne raztopine ter igra pomembno vlogo pri debelini vlaken. Znano je, da nizka viskoznost ne omogoča kontinuiranega nastajanja vlaken, medtem ko je težava pri visoki viskoznosti oteženo prehajanje raztopine iz šobe (9, 21).
- **Površinska napetost** je odvisna od uporabljenega topila. Elektrostatske sile morajo biti za nastanek stabilnega curka večje od sil površinske napetosti. V primeru, da so sile površinske napetosti večje od elektrostatskih sil, pride do razpada curka v kapljice, kar ne omogoča nastanka nanovlaken (9, 21).
- **Prevodnost** je določena z vrsto polimera, uporabljenim topilom in drugimi prisotnimi ionogenimi topljenci. Ugotovili so, da se z višanjem prevodnosti polimerne raztopine zmanjša premer vlaken (9, 21).
- **Topilo** s svojimi lastnostmi prav tako pomembno vpliva na optimalni potek elektrostatskega sukanja. Pomembno je, da je topilo dobro hlapno, tj. da ima ustrezen parni tlak, ter da učinkovito raztaplja polimer. Še posebej pomembno vlogo ima pravilna izbira topila pri elektrostatskem sukanju z uporabo koaksialne šobe, saj pride med procesom na mejni površini do stika topil zunanje in notranje faze. Pri tem je potrebno paziti, da med procesom elektrostatskega sukanja nobeno izmed uporabljenih topil ne obori bodisi polimera, ki bo tvoril jedro, bodisi polimera, ki bo tvoril ovojnico dvoslojnih nanovlaken. Veliko pozornost moramo nameniti medfazni napetosti med raztopinama. To pomeni, da mora biti le-ta primerno nizka, ker je s tem omogočen nastanek stabilnega Taylorjevega stožca in

kasneje curka, vendar ne sme biti prenizka, saj lahko pride na stiku do mešanja obeh polimernih raztopin (9, 20, 21).

1.1.3.2 Procesni parametri

Prav tako kot parametri polimerne raztopine, imajo tudi procesni parametri pomemben vpliv na elektrostatsko sukanje.

- **Električna napetost** je ključni dejavnik, ki omogoča elektrostatsko sukanje, saj inducira naboj v polimerni raztopini, kar skupaj z električnim poljem omogoča začetek procesa elektrostatskega sukanja v trenutku, ko elektrostatske sile presežejo sile površinske napetosti (6, 9, 21).
- **Pretok polimerne raztopine** vpliva na hitrost curka in njegovo debelino ter posledično na debelino, obliko ter poroznost nastalih vlaken. Pretok ne sme biti prevelik, saj je s tem onemogočeno, da bi topilo na poti do zbirala popolnoma izhlapelo; zraven tega pa se poveča tudi število nastalih vozlov (6, 9, 21).
- **Razdalja med iglo in zbiralom** narekuje predvsem vpliv na čas potovanja curka, jakost električnega polja in posledično na debelino nastalih vlaken (6, 9, 21).

1.1.3.3 Parametri okolja

Pri izvajanju elektrostatskega sukanja moramo paziti tudi na dejavnike okolja, saj lahko že najmanjše odstopanje iz okvira optimalnih pogojev povzroči nestabilnost sistema in onemogoči proces. Najpomembnejšo vlogo pri tem igrata relativna vlažnost in temperatura okolja, v katerem poteka elektrostatsko sukanje.

- **Relativna vlažnost** vpliva na hitrost izhlapevanja topila med procesom elektrostatskega sukanja. Le-to je hitrejše, v kolikor je relativna vlažnost nižja. Ustrezna relativna vlažnost okolja vpliva na uspešno izvedbo procesa elektrostatskega sukanja predvsem v primeru, kadar izdelujemo hidrofilna nanovlakna. V primeru visoke relativne vlažnosti vlaga iz atmosfere kondenzira na površini vlaken, kar vpliva na njihovo morfologijo, saj se poveča globina por (9, 21).
- **Temperatura okolja** pomembno vpliva na hitrost izhlapevanja topila. V primeru višje temperature se na eni strani zmanjša viskoznost polimerne raztopine, medtem ko se poveča topnost polimera ter hitrost izhlapevanja topila (9, 21).

1.2 NANOVLAKNA

Nanovlakna so drobna trdna vlakna s premerom od nekaj deset do 1000 nm ter teoretično neomejeno dolžino, z majhno velikostjo por ter z zelo veliko površino na enoto mase. V primerjavi z drugimi oblikami istega materiala je zanje značilna tudi velika prožnost in mehanska trdnost (1, 4, 9, 22, 23). Ravno zaradi specifičnih fizikalnih in kemijskih lastnosti so nanovlakna optimalna za uporabo na različnih področjih; pomembno mesto zasedajo predvsem v biomedicini (1, 23). Izdelana so lahko iz polimerov naravnega ali sinteznega izvora. Za uporabo v biomedicini je zaželeno, da so nanovlakna biokompatibilna in biorazgradljiva (23). Izbira polimera ima pomemben vpliv na lastnosti nanovlaken (4).

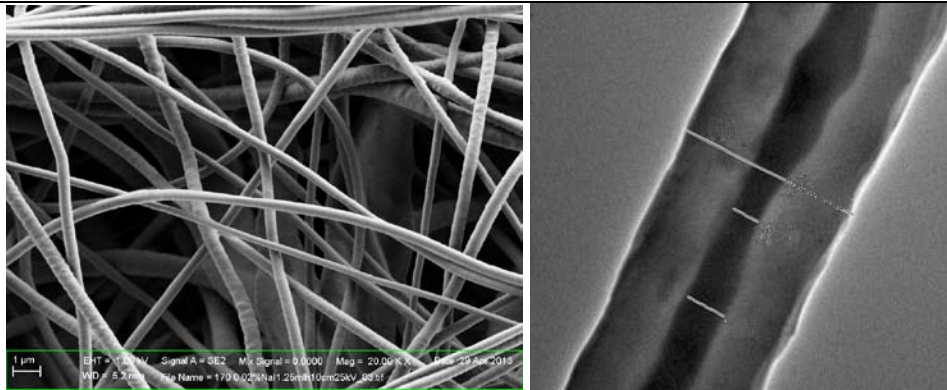
Zraven elektrostatskega sukanja so poznane še druge metode izdelovanja nanovlaken, kot na primer vlečenje (ang. *drawing*), fazna separacija (ang. *phase separation*), samozdruževanje (ang. *self-assembly*), uporaba predložnih membran (ang. *template synthesis*), vendar so večinoma specifične za določen polimer ter ne omogočajo kontinuiranosti procesa (1, 5, 21, 24, 25).

1.2.1 Vrednotenje nanovlaken

Lastnosti nanovlaken lahko vrednotimo na različnih nivojih:

- **morfološke lastnosti nanovlaken**

Z uporabo vrstične elektronske mikroskopije (angl. *Scanning Electron Microscopy, SEM*) (primer SEM slike vzorca je prikazan na Sliki 5, levo), vrstične elektronske mikroskopije s hladnim virom elektronov na poljsko emisijo (angl. *Field Emission Scanning Electron Microscopy, FESEM*), presevne elektronske mikroskopije (angl. *Transmission Electron Microscopy, TEM*) (primer TEM slike je prikazan na Sliki 5, desno) in mikroskopije na atomsko silo (angl. *Atomic Force Microscopy, AFM*) lahko določimo orientiranost, morfologijo ter premer nanovlaken. S pomočjo AFM lahko določimo tudi hrapavost površine nanovlaken. Pomembna lastnost nanovlaken je poroznost; tako samih vlaken (intrafibrilarna poroznost) kot materiala iz nanovlaken (interfibrilarna poroznost). Velikost interfibrilarnih por tj. por med vlakni vpliva na uporabnost nanovlaken, še posebej kadar se uporabljajo za filtracijo, v tkivnem inženirstvu ter za izdelavo zaščitnih oblek (1, 9).



Slika 5: SEM (levo) in TEM slika (desno) (26) nanovlaken.

- **struktura nanovlaken**

Za določanje kemijske in fizikalne strukture nanovlaken ter intermolekularnih interakcij je primerna analiza z infrardečo spektroskopijo s Fourier-evo transformacijo (angl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR*) in z jedrsko magnetno resonanco (angl. *Nuclear Magnetic Resonance, NMR*). Še natančnejša analiza molekularne strukture, ki daje podatke o konfiguraciji makromolekul v nanovlaknih, je mogoča z optično dvojno refrakcijo, s širokokotnim rentgenskim sipanjem (angl. *Wide-angle X-ray diffraction, WAXD*), z ozkokotnim rentgenskim sipanjem (angl. *Small-angle X-ray scattering, SAXS*) in diferenčno dinamično kalorimetrijo (angl. *Differential Scanning Calorimetry, DSC*) (1, 9). Za določanje površinskih kemijskih lastnosti lahko uporabimo meritev stičnega kota ali rentgensko fotoelektronsko spektroskopijo (angl. *X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS*) (1, 9).

- **mehanske lastnosti nanovlaken**

Pri mehanskem vrednotenju nanovlaken proučujemo tako skupek nanovlaken kot posamezno vlakno, za kar lahko uporabimo standardne tehnike natezne trdnosti. Za vrednotenje posameznega vlakna si pomagamo z AFM (1, 9).

1.2.2 Uporaba nanovlaken

Nanovlakna so zaradi svojih lastnosti uporabna na mnogih področjih. Še zlasti pomembno področje, na katerem se predvsem v zadnjih dveh desetletjih izvajajo obsežne raziskave, je biomedicina.

Nanovlakna se najbolj intenzivno preiskuje za uporabo na področjih izdelave:

- **filtr**, ki so namenjeni predvsem čiščenju zraka (9);
- **zaščitnih oblačil**, ki so lahka, prepuščajo zrak in vlago ter zaradi velike specifične površine omogočajo tudi nevtralizacijo škodljivih plinov in zaščito pred biološkim orožjem (9, 21);
- **baterij in kondenzatorjev** (9, 21);
- **kemijskih senzorjev, senzorjev za pline, optičnih senzorjev in biosenzorjev**, saj je uporaba ugodna predvsem zaradi visoke občutljivosti in hitrega odziva (21);
- **afinitetnih membran**, ker omogoča ločevanje tarčnih biomolekul z uporabo ligandov, ki so kemijsko pritrjeni na površino membrane iz nanovlaken (21).

V biomedicini je uporaba nanovlaken najpomembnejša na naslednjih treh področjih izdelave:

- **tkivnih nadomestkov**: Ugotovili so, da je večina človeških organov in tkiv, kot so krvne žile, kosti, živčevje, koža, hierarhično urejena vlaknata struktura. Nanovlakna posnemajo topografijo in strukturne lastnosti gradnikov zunaj celičnega ogrodja ter tako omogočajo učinkovito oporo celicam, kar vodi do izboljšane razraščanja ter regeneracije poškodovanega ali obolelega tkiva (23, 25, 27, 28);
- **dostavnih sistemov**, ki omogočajo prirejeno sproščanje in ciljano dostavo učinkovin (21, 23);
- **oblog za rane**, kjer je mehanizem delovanja podoben kot pri tkivnih nadomestkih. Najpomembnejše je posnemanje topografije in strukturnih lastnosti mreže kolagenskih vlaken, med katerimi so biomolekule, kar vodi v hitrejšo regeneracijo poškodovanega tkiva (23, 30).

Zadnji točki predstavljata osrednje področje našega raziskovanja, zato sta v nadaljevanju podrobneje razloženi.

1.2.2.1 Dostava zdravil

Nanovlakna odlikuje dobra adhezivnost, ki je odraz velike površine in porozne zgradbe. Ob stiku z mukosom pride do trenutne absorpcije vlage v pore vlaken, kar je razlog za intenzivno adhezijo na površino sluznic, zato so v ospredju raziskovanja in uporabe predvsem mukoadhezivni dostavni sistemi ter dostavni sistemi za dermalno uporabo (23).

Iz nanovlaken lahko naredimo dostavni sistem s takojšnjim ali s prirejenim sproščanjem, ki je lahko podaljšano ali pulzirajoče, kar je odvisno od izbire polimera ter načina vgrajevanja učinkovine, vezave na površino ali vključevanja v notranjost nanovlaken. Profil sproščanja lahko še dodatno modificiramo s spreminjanjem premera ali usmerjenosti nanovlaken (21, 23).

Vgrajujemo lahko številne učinkovine, vendar so v ospredju predvsem težko topne učinkovine, ki jim želimo povečati topnost in hitrost raztapljanja, ter biomakromolekule (23). Enotni cilj izdelave dostavnih sistemov je doseči večji terapevtski učinek ter zmanjšati stranske učinke (21).

1.2.2.2 Obloge za rane

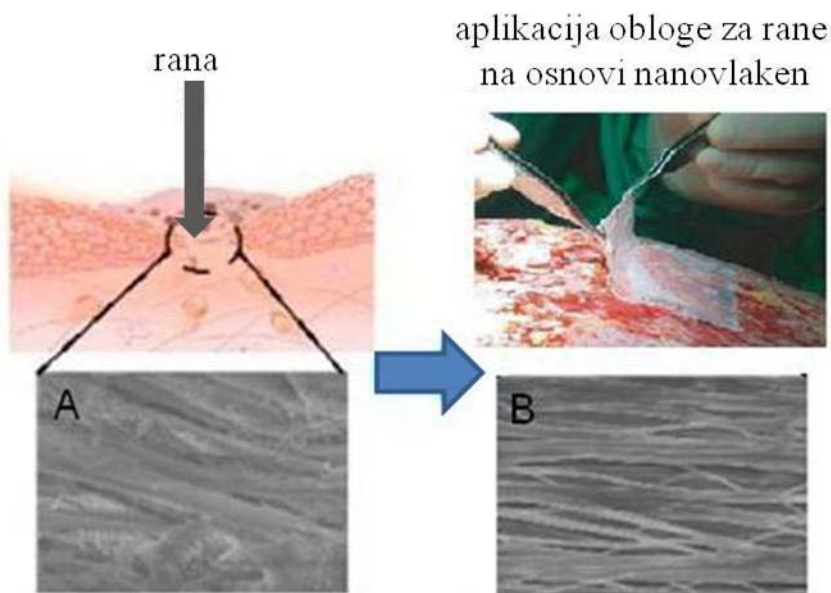
Zdravljenje kroničnih ran je vedno bolj pomembno; tako s terapevtskega kot ekonomskega vidika (29). Rana je po definiciji odprta poškodba kože ali globljega tkiva ali sluznic zaradi fizikalnih, patoloških ali drugih dejavnikov. Poškodba kože pomeni prekinitev njene integritete, kar je lahko vzrok za oslabitev ali izpad njenih funkcij. Tem spremembam nasprotujejo endogeni procesi celjenja rane, saj ima vsaka rana lastno sposobnost za celjenje (30). Celjenje rane lahko razdelimo v tri sklope procesov, ki potekajo različno dolgo, se med seboj prepletajo in jih sprožajo različni dejavniki: faza vnetja, proliferacije (neoangiogeneza, tvorba kolagena s fibroblasti, reepitelizacija) ter zorenja vezivnega tkiva (29, 30). Pri procesu celjenja sodelujejo rastni dejavniki in proteaze, njihovo izražanje in aktivnost pa sta fiziološko natančno nadzorovana (30).

Posebno obravnavo potrebujejo kronične rane. To so vse zdravljene rane, ki se v času osmih tednov ne zacelijo (30). Nastanejo lahko iz akutne rane zaradi nepravilne oskrbe ali infekcije, najpogosteje pa se pojavijo pri ljudeh, pri katerih so prisotni dejavniki, ki zavirajo celjenje, kot so bolezni ožilja, sladkorna bolezen, oslavljen imunski sistem kot posledica načina življenja ali bolezni. Velik problem predstavlja tudi pritisk na površino kože pri ležečih bolnikih, kar pogosto vodi do nastanka preležanin. Pojavijo se lahko kjerkoli na telesu, vendar so največkrat prisotne na spodnjih okončinah (31). V kronični rani so moteni naravni procesi celjenja. Prisotno je neravnovesje med rastnimi dejavniki in proteazami, pri čemer je koncentracija rastnih dejavnikov znižana, proteaz pa zvišana. Najpogosteje se celjenje ustavi v vnetni fazi. V akutni rani so citokini vedno v ravnovesju z njihovimi zaviralci, v kronični rani pa prevlada delovanje vnetnih citokinov, ki jih izločajo makrofagi. S tem se poveča izražanje proteaz tj. encimov, ki hidrolizirajo peptidne vezi, ter

zniža delovanje inhibitorjev in rastnih dejavnikov, ki sodelujejo pri migraciji celic, proliferaciji, sintezi proteinov in tvorbi zunaj celičnega ogrodja. Povišane koncentracije proteaz uničujejo rastne dejavnike in njihove receptorje, zavirajo angiogenezo ter razgrajujejo na novo nastalo granulacijsko tkivo. Stanje še dodatno poslabšajo reaktivne kisikove spojine, kopica nekrotičnega tkiva ter kolonizacija bakterij (30).

Zunajcelično ogrodje je sestavljeno iz mreže kolagenskih vlaken, ki so po debelini nanovelikosti, med katerimi so biomolekule (citokini in rastni dejavniki). Zunajcelično ogrodje ima bistven pomen pri procesu regeneracije. Ker pride ob poškodbah do sprememb zunannceličnega ogrodja in celic, ki se morajo v procesu regeneracije obnoviti, je smiselna uporaba oblog iz nanovlaken, saj s tem posnemamo fibrilarne elemente zunannceličnega ogrodja, omogočimo pravilno nalaganje in orientacijo novonastalih kolagenskih vlaken ter spodbudimo lastno obnovo tkiva (2, 23, 30).

Idealna obloga za rano mora imeti hemostatične lastnosti, preprečiti vdor bakterij, omogočiti drenažo izcedka iz rane, prepuščati pline, imeti dober oprijem na površino rane ter obenem omogočati lahko, nebolečo odstranitev s površine tkiva (9, 32). V proces celjenja in regeneracije lahko aktivno posežemo z učinkovinami, ki jih vgradimo v nanovlakna ali vežemo na njihovo površino (23).



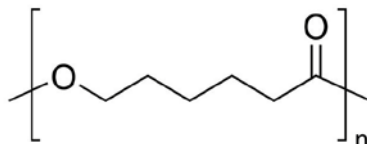
Slika 6: Uporaba obloge za rane na osnovi nanovlaken in vpliv na strukturo kolagenskega matriksa tkiva, kar prikazujeta SEM sliki: (A) zgradba kolagenskega matriksa v rani in (B) zgradba kolagenskega matriksa v zaceljenem tkivu po uporabi obloge za rane na osnovi nanovlaken. (33, 34).

1.3 **PROUČEVANI POLIMERI**

V nadaljevanju bodo predstavljeni le polimeri, ki smo jih uporabili za izdelavo nanovlaken.

1.3.1 Polikaprolakton

Polikaprolakton (Slika 7) je eden prvih polimerov, ki ga je v tridesetih letih prejšnjega stoletja sintetizirala raziskovalna skupina ameriškega kemika Carotherja (35).



Slika 7: *Kemijska formula polikaprolaktona.*

Polikaprolakton je semikristaliničen polimer, ki ima temperaturo steklastega prehoda (T_g) - 60 °C, temperaturo tališča med 59 in 64 °C, odvisno od kristaliničnosti polimera ter povprečno molekulsko maso od 3.000 do 80.000 g/mol. Pri sobni temperaturi je topen v kloroformu, diklorometanu, tetraklorometanu, benzenu, toluenu, cikloheksanonu in 2-nitropropanu, slabše topen je v acetonu, 2-butanonu, etilacetatu, dimetilformamidu in acetonitrilu, medtem ko je netopen v alkoholu, dietiletru in petroletru (35, 36).

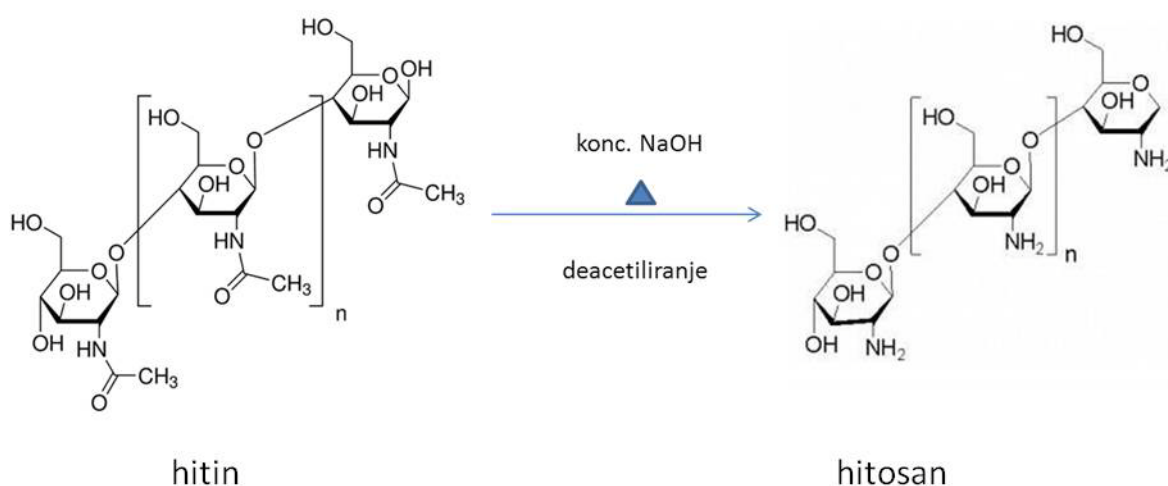
Polikaprolakton se razgrajuje zelo počasi, zato je primeren za uporabo pri izdelavi dostavnih sistemov s podaljšanim sproščanjem (čas sproščanja lahko traja več kot eno leto). Razgradnja polikaprolaktona poteka v dveh stopnjah. Prva daljša faza vključuje hidrolizo esterskih skupin, medtem ko se v drugi, ki nastopi, ko je polimer kristaliničen in ima nižjo molekulsko maso od 3.000 g/mol, fragmenti polikaprolaktona popolnoma razgradijo v fagosomih makrofagov ter celic velikank. Edini presnovek, ki pri tem nastane, je 6-hidroksi kaprojska kislina, ki se kasneje pretvori v acetil koencim A, ta vstopi v Krebsov cikel in se tako izloči iz telesa (35, 36, 37).

Polikaprolakton je zaradi kompatibilnosti z mnogimi zdravilnimi učinkovinami, biokompatibilnosti in počasne razgradnje primeren za izdelavo dostavnih sistemov ter implantatov z nadzorovanim sproščanjem učinkovin in z razgradnjo do dveh let. V zadnjem desetletju sta ciljni področji raziskovanja uporaba polikaprolaktona v tkivnem inženirstvu, saj je polimer netoksičen in biokompatibilen ter izdelava dostavnih sistemov za nadzorovano sproščanje peptidov in proteinov. Največjo težavo in razlog, da je veliko

formulacij še vedno na raziskovalni ravni, predstavlja hidrofobnost samega polimera (35, 36, 37). Polikaprolaktonu lahko s kopolimerizacijo ali z mešanjem z drugimi polimeri spreminjamo mehanske, fizikalne in kemijske lastnosti, lahko pa ga uporabimo kot dodatek za izboljšanje lastnosti drugih polimerov, kar še dodatno poveča možnosti njegove uporabe (35, 36, 38). V biomedicini se uporablja za izdelavo mikrosfer, filmskih oblog, micelov, implantatov, nanodelcev, mikro in nanovlaken, tkivno inženirskih kostnih nadomestkov itd. (5, 28, 35, 36, 37).

1.3.2 Hitosan

Hitosan je polisaharid in je naravni kationski linearni polimer oz. poliamin, sestavljen iz glukozamina in N-acetil glukozamina (39, 40). Pridobivamo ga z delnim deacetiliranjem hitina pri povišani temperaturi in v prisotnosti baze (Slika 8). Glavni vir hitina so celične stene nekaterih gliv ter zunanje ogrodje žuželk in rakov. Na tržišču najdemo več vrst hitosana, ki se med seboj razlikujejo v molekularni masi (20 kDa–375 kDa), stopnji deacetiliranja (40–98 %) ter viskoznosti (39, 41). V glavnem razlikujemo med nizkomolekularnim hitosanom, ki ima molekularno maso med 20 in 190 kDa, ter visokomolekularnim hitosanom z molekularno maso med 190 in 375 kDa (41).



Slika 8: Pridobivanje hitosana iz hitina.

V kislinskih raztopinah se amino skupine hitosana protonirajo in dobijo pozitiven naboj, pri čemer nastane vodotopen kationski polielektrolit (39). Soli hitosana, kot so kloridi, glutamati, acetati, laktati, malati, citrati, piruvati, glikolati in askorbati, so dobro topne v

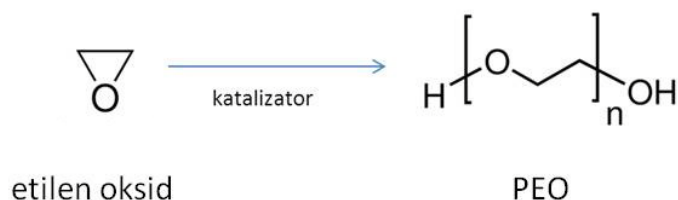
vodi, medtem ko je hitosan slabo topen v vodi, organskih topilih in alkalnem okolju. Na topnost ima velik vpliv stopnja deacetiliranja, saj le-ta določa pomembno fizikalno lastnost hitosana, to je število prostih amino skupin, ki se lahko pri ustreznem pH medija protonirajo (NH_3^+) (39, 40).

Hitosan je kompatibilen s številnimi zdravilnimi učinkovinami in pomožnimi snovmi. Z negativno nabitimi zdravilnimi učinkovinami lahko tvori komplekse, kar spremeni fizikalno-kemijske značilnosti formulacije. Zaradi mukoadhezivnosti je hitosan primeren za izdelavo dostavnih sistemov za ciljno dostavo zdravilnih učinkovin in nadzorovano sproščanje, saj omogoča, zaradi bioadhezivnih lastnosti, dober stik s površino, od koder poteka absorpcija. S tem se podaljša čas zadrževanja na mestu absorpcije in posledično poveča koncentracija učinkovine na mestu delovanja. Če je pH sluznice nižji od 6, se amino skupine hitosana protonirajo. Med njimi in negativno nabitimi skupinami sialične kisline glikoproteinov in proteoglikanov, ki tvorijo sluz na površini sluznic, nastanejo močne elektrostatske interakcije (39).

Hitosan odlikujejo številne lastnosti: je biokompatibilen, biorazgradljiv, netoksičen, neimunogen, pospešuje celjenje ran, preprečuje brazgotinjenje ter ima protimikrobno delovanje (11, 38, 40). Slednje je verjetno posledica elektrostatskih interakcij med kationskimi skupinami hitosana in negativno nabitimi skupinami gradnikov bakterijske stene, kar spremeni prepustnost bakterijske stene, povzroči poškodbe bakterijske membrane in osmotsko neravnovesje celice, kar vodi v lizo celice in celično smrt (32, 39). Zaradi opisanih lastnosti je hitosan primeren za uporabo v medicini. Iz hitosana so izdelali že npr. gele, membrane, mikrodolge, nanodelce, pene, v ospredju raziskovanja pa je tudi izdelava nanovlaken ter njihova uporaba na področju tkivnega inženirstva, izdelave implantatov, dostavnih sistemov za vnos učinkovin in oblog za rane (32, 42). Za izdelavo nanovlaken iz hitosana se zaradi enostavnosti in vsestranskosti metode najpogosteje uporablja elektrostatsko sukanje. Ugotovili so, da iz raztopine hitosana v šibko kislem mediju zaradi previsoke viskoznosti in polielektrolitske narave polimera ni mogoče pripraviti nanovlaken, zato je nujen dodatek drugega polimera (11, 24). Pogosto se uporablja kombinacija hitosana in PEO v masnem razmerju 2:1 ali 1:1. Masno razmerje polimerov pomembno vpliva na morfologijo izdelanih vlaken (11, 24, 42).

1.3.3 Polietilenoksid

PEO je neionski linearni sintetični homopolimer etilen oksida, ki nastane s kisló ali bazično katalizirano reakcijo med epoksidnim obročem in vodo, kar prikazuje Slika 9 (43, 44).



Slika 9: *Sinteza polietilenoksida.*

V literaturi se za PEO pojavljata še dve poimenovanji, to sta polietilenglikol (PEG) in poli(oksietilen) (POE). Vsa tri imena, glede na kemizem snovi, so sinonimi, vendar je uveljavljeno, da se PEG uporablja za oligomerne enote in polimere PEO z molekulsko maso do 100.000 g/mol, polimeri z višjo molekulsko maso so ponavadi poimenovani kot PEO, medtem ko se POE uporablja redkeje (45). Dolžina verige in posledično molekulska masa bistveno vpliva na lastnosti polimera. Polimeri z molekulsko maso nižjo od 1.000 g/mol so viskozne, brezbarvne tekočine, medtem ko so polimeri z višjo molekulsko maso trdni, voskaste konsistence. Temperatura tališča je sorazmerna z molekulsko maso, a ni višja od 67 °C (43, 44).

PEO je dobro topen v vodi in mnogih organskih topilih, kot so diklorometan, etanol, toluen, aceton in kloroform (44). Je nizko toksičen in biokompatibilen. V kolikor ima molekulsko maso nižjo od 1.000 g/mol, se iz telesa izloči večina v nespremenjeni obliki, zato je pomemben za uporabo v prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji. Na področju farmacije se uporablja pri izdelavi in oblaganju tablet, za izdelavo dostavnih sistemov z nadzorovanim sproščanjem, pomemben je tudi na področju razvoja mukoadhezivnih in transdermalnih dostavnih sistemov (43, 44).

2. NAMEN DELA

Nanotehnologija je v zadnjem desetletju dosegla revolucionaren razvoj. Med najsodobnejše in izredno obetavne nanooblike uvrščamo tudi nanovlakna, ki so zaradi svojih lastnosti uporabna na različnih področjih; med drugim tudi pri izdelavi sodobnih oblog za celjenje ran ter razvoju dostavnih sistemov za vnos zdravilnih učinkovin.

Namen magistrske naloge bo raziskati možnosti izdelave dvoslojnih nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe, saj bi tako dosegli podaljšan čas sproščanja zdravilnih učinkovin iz tovrstnih nanodostavnih sistemov.

Prvi cilj magistrske naloge bo poiskati in proučiti formulacijske in procesne parametre, ki bodo omogočili kontinuirano izdelavo enoslojnih nanovlaken iz PCL. Znano je, da v kolikor hočemo izdelati dvoslojna nanovlakna, mora biti zunanja faza, ki jo v našem primeru predstavlja polimerna raztopina PCL, sposobna sama tvoriti nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja, medtem ko pri notranji fazi tega pogoja ni. Zunanja faza namreč deluje kot vodilo, saj med procesom obda notranjo fazo. Preizkusili bomo izvedljivost procesa elektrostatskega sukanja z raztopinami z različno koncentracijo polimera, dodatkom soli, uporabljenimi topili ter s spreminjanjem procesnih parametrov, ki vključujejo razdaljo med iglo in zbiralom, električno napetost in pretok.

Naslednji cilj bo preučiti vpliv različnih formulacijskih in procesnih parametrov na izvedljivost izdelave dvoslojnih nanovlaken ter tako doseči ponovljivost procesa. Izhajali bomo iz parametrov, za katere bomo ugotovili, da omogočajo kontinuirano izdelavo enoslojnih PCL nanovlaken. Dvoslojna nanovlakna bomo poskusili izdelati iz PCL ter zmesi PEO in hitosana. Velik izziv bo predstavljala tvorba nevodotopne polikaprolaktonske ovojnice okrog hidrofilnega jedra iz zmesi PEO in hitosana, saj se bosta med izdelavo na stičnih površinah srečali organska in vodna faza, ki imata povsem različne fizikalno kemijske lastnosti.

V zadnjem delu bomo poskušali v jedro dvoslojnih nanovlaken vgraditi modelno vodotopno snov (zdravilno učinkovino ali barvilo) in ovrednotiti njen profil sproščanja iz nanovlaken. Na podlagi profila sproščanja bomo skušali posredno ugotoviti, ali nam je uspelo izdelati dvoslojna nanovlakna in s tem doseči upočasnjeno sproščanje vgrajene modelne vodotopne snovi.

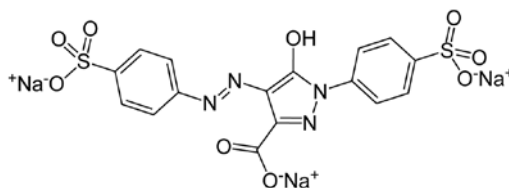
3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

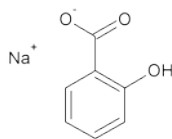
- aceton (CH_3COCH_3) (> 99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), (> 99,0 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- Epon , Serva, Heidelberg, Nemčija
- hitosan z nizko molekulsko maso, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), (99,5-100,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid (KCl) (> 99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- kloroform, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina (HCl) (37 %), Panreac Quimica S.A.U., Španija
- natrijev hidroksid (NaOH) M_r 40 g/mol, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev jodid (NaI) (99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- natrijev klorid (NaCl) (> 99,5 %), Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
- očetna kislina (CH_3COOH), koncentrirana, Merck KGaA, Nemčija
- polietilenoksid (PEO) M_r 900.000 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- polikaprolakton (PCL) M_r 70.000-90.000 g/mol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- prečiščena voda, pripravljena na UL-Fakulteti za farmacijo

3.2 MODELNA BARVILA IN UČINKOVINE, KI SMO JIH POSKUSILI VGRADITI V DVOSLOJNA NANOVLAKNA

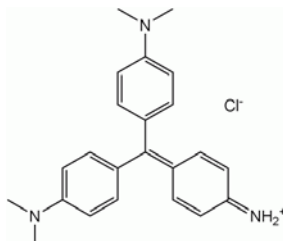
- Tartrazin (> 85 %), sintetično azo-barvilo, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija:



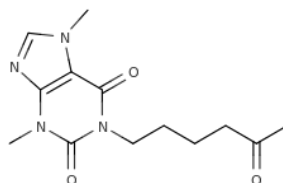
-
- natrijev salicilat (> 99,5 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija:



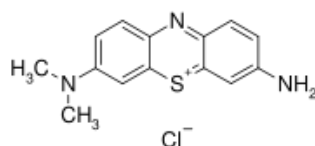
- metilvijolično, barvilo, E. Merck KG, Darmstadt, Nemčija:



- pentoksifilin, Krka, d. d., Novo mesto, Slovenija:



- Azur A, barvilo, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija:



3.3 *NAPRAVE*

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Schwerzenbach, Švica
- digitalna tehtnica, Sartorius CP3202S, Göttingen, Nemčija
- magnetno mešalo:
 - IKA WERKE, Nemčija
 - Tehnica, Rotamix 560 MMH, Slovenija

-
- aparatura za elektronsko sukanje:
 - generator visoke napetosti, model HVG-P50-R-EU, Linari Engineering s.r.l., Italija
 - črpalki, model R-99E, Razel Scientific, ZDA
 - kovinska igla, notranji premer 0,8 mm, Linari Engineering s.r.l., Italija
 - koaksilna šoba, izdelano po naročilu, Slovenija
 - plastična brizga, 20 ml, B.Braun, ZDA
 - zbiralo, aluminijasta folija nameščena na nosilec kot planarno zbiralo
 - invertni svetlobni mikroskop, model CKX41, Olympus, Japonska
 - vrstični elektronski mikroskop, Supra35 VP, Carl Zeiss, Oberkochen, Nemčija
 - pH meter, Metter Toledo, Seven Compact, Švica
 - UV/Vis spektrofotometer, Hewlett Packard 8453, Agilent Technologies, Nemčija
 - presevni elektronski mikroskop, Philips CM 100

3.4 METODE

3.4.1 Priprava raztopin PCL

Za pripravo polimernih raztopin PCL smo najprej natehtali ustrezno količino NaI, ga kvantitativno prenesli v erlenmajerico z obrusom, kamor smo dodali ustrezno organsko topilo (zmes kloroforma in acetona v masnem razmerju 50:50 ali 75:25), nato smo med mešanjem na magnetnem mešalu počasi dodajali ustrezno količino polimera, da se le-ta ni prijel na dno čaše. Tako pripravljeno zmes smo pokrili s pokrovčkom in zatesnili s parafilmom ter pustili mešati na magnetnem mešalu 3–4 h, da se je polimer popolnoma raztopil in je nastala homogena raztopina. Za pripravo enoslojnih nanovlaken smo pripravili raztopine PCL s sestavami, ki so prikazane v Preglednici I, in za pripravo dvoslojnih nanovlaken raztopine s sestavami, ki so prikazane v Preglednici II.

Preglednica I: Sestava raztopin PCL za izdelavo enoslojnih nanovlaken.

Sestava	Masni delež PCL (%)	Topilo (% , m/m)		Masni delež NaI (%)
		Kloroform	Aceton	
i.	16	50	50	0,032
ii.	16	50	50	0,048
iii.	13	50	50	0,028
iv.	13	50	50	0,039
v.	10	50	50	0,010
vi.	10	50	50	0,020
vii.	10	50	50	0,030
viii.	10	50	50	0,040
ix.	10	75	25	0,010
x.	10	75	25	0,020
xi.	10	75	25	0,030
xii.	10	75	25	0,040

Preglednica II: Sestava raztopin PCL za izdelavo dvoslojnih nanovlaken.

Kombinacija	Masni delež PCL (%)	Topilo (% , m/m)		Masni delež NaI (%)
		Kloroform	Aceton	
A.	10	50	50	0,030
B.	10	75	25	0,030
C.	8	75	25	0,030
D.	8	75	25	0,015
E.	8	100	0	0,030
F.	7	75	25	0,015
G.	6	75	25	0,010

3.4.1.1 Priprava polimernih raztopin PCL za izdelavo dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim barvilom ali učinkovino

Pri izdelavi dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim barvilom ali učinkovino smo preverjali možnost izvedbe procesa elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe z raztopinami, kjer je zunanjo fazo predstavljala raztopina PCL v zmesi kloroforma in acetona v masnem razmerju 75:25. Sestave proučevanih raztopin so prikazane v Preglednici III.

Preglednica III: Sestava raztopin PCL za izdelavo dvoslojnih nanovlaken z vgrajeno učinkovino ali barvilom

Sestava	Masni delež PCL (%)	Masni delež NaI (%)
i.	8	0,030
ii.	7	0,015
iii.	6	0,010

3.4.2 Priprava polimernih raztopin PEO in hitosana

Najprej smo iz koncentrirane očetne kisline pripravili 3 % (m/m) raztopino, ki smo jo uporabljali kot topilo pri pripravi raztopine PEO in hitosana.

Nato smo ločeno pripravili raztopini obeh polimerov. Za pripravo 3 % (m/m) raztopine PEO smo natehtali ustrezno količino PEO ter ga kvantitativno prenesli k ustreznemu volumnu 3 % (m/m) raztopine očetne kisline, ki se je mešala na magnetnem mešalu. Prav tako smo natehtali ustrezno količino hitosana, ki je ustrezala za pripravo 2 % (m/m) raztopine, in ga dodali k ustreznemu volumnu 3 % (m/m) raztopine očetne kisline, ki se je mešala na magnetnem mešalu. Obe erlenmajerici z obrusom smo zaprli in zatesnili s parafilomom ter pustili mešati na magnetnem mešalu 4–5 h, da smo dobili bistro raztopino brez sledu neraztopljenega polimera.

Na koncu smo naredili še zmes obeh raztopin z masnim razmerjem obeh polimerov 1:1 ter jo pustili mešati na magnetnem mešalu 30 min, da sta se polimera homogeno pomešala.

3.4.3 Elektrostatsko sukanje

Enoslojna nanovlakna smo izdelovali z metodo elektrostatskega sukanja tako, da smo najprej na 20 ml plastično brizgo namestili kovinsko iglo z notranjim premerom 0,8 mm. Brizgo smo napolnili s 5–10 ml polimerne raztopine, pri čemer smo pazili, da se v raztopino niso ujeli zračni mehurčki. Nato smo iz brizge iztisnili v konici ujet zrak in jo namestili na črpalko, ki je zagotavljala konstanten pretok, ter nastavili želen pretok. V našem primeru smo preverjali možnost izvedbe procesa pri preizkušanih pretokih 0,5 ml/h, 1 ml/h, 1,25 ml/h, 2 ml/h ter 2,75 ml/h. Na kovinski nosilec smo pritrdili aluminijasto folijo, kar je predstavljalo zbiralo. Na aluminijasto folijo smo s pomočjo obojestranskega prevodnega lepilnega traku namestili še krovna stekelca, da se je na njih nabral produkt elektrostatskega sukanja, ki smo ga kasneje pregledali s pomočjo invertne svetlobne mikroskopije. Zbiralo smo postavili na izbrano razdaljo od kovinske igle. V našem primeru sta bili testirani razdalji 10 cm in 15 cm. Aluminijasto folijo smo ozemljili, na kovinsko iglo pa s pomočjo sponke pripeli kabel, povezan z generatorjem električne napetosti v območju do 60 kV, ter ga vključili. V okviru naših testiranj smo preizkušali možnosti izvedbe procesa elektrostatskega sukanja pri uporabi električne napetosti 10 kV, 15 kV, 20 kV in 25 kV. Ker smo uporabljali organska topila, smo zaradi varnosti vse poskuse izvajali v digestoriju. Ves čas smo tudi spremljali temperaturo okolja, kjer smo izvajali proces

elektrostatskega sukanja, in njeno relativno vlažnost ter ju v okviru zmožnosti uravnavali (RH: 25–40 %, T: 23–30 °C). Pomembno vlogo ima predvsem temperatura, saj signifikantno vpliva na hlapnost izhlapevanja organskih topil ter posledično na ponovljivost procesa.

3.4.4 Elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe

Elektrostatsko sukanje z uporabo koaksialne šobe smo uporabili za izdelavo dvoslojnih nanovlaken. Pri tem smo najprej napolnili eno 20 ml plastično brizgo z raztopino PCL, drugo 20 ml plastično brizgo pa z raztopino zmesi PEO in hitosana. Ponovno smo pazili, da se v raztopino niso ujeli zračni mehurčki, iztisnili smo zrak, ki se je ujel v konici igle. Brizgi smo namestili na črpalki, na kateri smo nastavili želeni pretok za vsako raztopino posebej. Preverjali smo možnosti izvedbe različnih kombinacij uporabljenih pretokov notranje faze 0,14 ml/h, 0,21 ml/h, 0,27 ml/h, 0,33 ml/h, 0,42 ml/h, 0,54 ml/h in 0,64 ml/h ter uporabljenih pretokov zunanje faze 1,25 ml/h, 1,625 ml/h ter 2 ml/h. Na konice brizg smo namestili plastični cevki. Cevko, ki je vodila od brizge z raztopino PCL, smo povezali s kanalom za zunanjo fazo, cevko, ki je vodila od raztopine zmesi PEO in hitosana, pa s kanalom za notranjo fazo na koaksilni šobi. Tako kot pri izdelavi enoslojnih vlaken smo kot zbiralo uporabili aluminijasto folijo, nameščeno na kovinski nosilec. Zbiralo smo ozemljili ter ga postavili na razdaljo 10 ali 15 cm od konice koaksialne šobe. Nanjo smo nato s sponko pripeli kabel, povezan z izvorom visoke električne napetosti. Poskuse smo zaradi uporabe organskih topil izvajali v digestoriju. Ponovno smo nadzorovali in v okviru možnosti uravnavali temperaturo okolja (T: 23–30 °C), kjer smo izvajali proces elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe in njeno relativno vlažnost (RH: 25–40 %).

3.4.5 Proučevanje morfoloških lastnosti nanovlaken

Vzorci za SEM analizo smo pripravili tako, da smo iz aluminijaste folije z nanovlakni izrezali vzorce velikosti približno 5x5 mm in jih z obojestranskim prevodnim lepilnim trakom prilepili na nosilce za SEM. Slike vzorcev smo posneli pri pospeševalni napetosti 1 kV in z uporabo sekundarnega detektorja. Posnete slike smo kasneje analizirali s pomočjo računalniškega programa ImageJ 1.44p. Naključno smo izbrali 30–40 nanovlaken ter na podlagi teh določili njihov povprečni premer.

Za analizo s TEM smo uporabili krovna stekelca, ki smo jih pred pričetkom elektrostatskega sukanja s pomočjo obojestranskega prevodnega lepilnega traku namestili na aluminijasto folijo, ter počakali, da so se na njih zbrala nanovlakna. Tako pripravljene vzorce smo previdno odstranili s krovnih stekelc ter jih položili v Epon. Ko je potekla polimerizacija Epona, smo vzorec narezali na ultra tanke rezine ter ga analizirali s TEM.

3.4.6 Priprava medija za vrednotenje sproščanja

Za vrednotenje sproščanja smo uporabili fosfatni pufer (PBS) s pH 7,4. V želji, da bi se čim bolj približali fiziološkim pogojem, smo izbrali fosfatni pufer, saj je eden glavnih pufrov v našem organizmu ter igra pomembno vlogo pri uravnavanju pH v celicah.

Za pripravo 1 l PBS smo v bučko natehtali 0,2 g KCl, 8,0 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄ in 0,24 g KH₂PO₄ ter soli raztopili v prečiščeni vodi. S pomočjo 0,1 M raztopine HCl ali NaOH smo pH pufru uravnali na 7,4 ter nato dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

3.4.7 Vrednotenje sproščanja modelnih barvil in učinkovin iz dvoslojnih nanovlaken

Naš cilj je bil izdelava dvoslojnih nanovlaken z v jedro vgrajenim barvilom ali učinkovino, katere sproščanje bi bilo upočasnjeno. Vzorce smo pripravili tako, da smo v čaše z ravnim dnom položili aluminijasto folijo z nanovlakni, pri čemer je bila stran z nanovlakni obrnjena navzgor. Nato smo na nanovlakna previdno nalili 12 ml PBS in jih pustili stati pri sobni temperaturi. Po 1 ml vzorca smo odvzeli po 20, 28, 48, 72, 144, 216, 312, 360 in 528 h tako, da smo pred vsakim odvzemom celoten vzorec rahlo premešali, da se je sproščena spojina enakomerno porazdelila po celotnem volumnu medija. Za analizo sproščanja smo uporabili UV/VIS spektrofotometrično metodo. Metoda temelji na merjenju absorpcije svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Pred merjenjem vzorcev smo za vsako vgrajeno barvilo ali učinkovino posneli absorpcijski spekter ter določili, pri kateri valovni dolžini ima spojina absorpcijski maksimum. Pri valovni dolžini maksimuma absorpcije smo nato izmerili absorbance vzorcev. Kot ozadje pri spektrofotometričnih meritvah smo uporabili PBS. Absorbance vzorca v vsaki časovni točki smo določili pri valovni dolžini 274 nm (pentoksifilin) ali 633 nm (azur). Profil sproščanja smo prikazali relativno glede na količino učinkovine, ki se je sprostil v zadnji proučevani časovni točki tj. 528 h.

3.4.8 Ugotavljanje vsebnosti modelnih barvil in učinkovin v nanovlaknih

Enako velik vzorec aluminijaste folije z nanovlakni, kot smo ga uporabili za analizo sproščanja, smo uporabili za ugotavljanje vsebnosti modelnih barvil in učinkovin v nanovlaknih. Vzorec smo položili v čašo z ravnim dnom in nanj nalili 6 ml kloroforma ter počakali, da so se nanovlakna raztopila. Odvzeli smo 1 ml vzorca ter ga pomešali z 1 ml vode in dobro pretresli, da je nastala bela emulzija. Nato smo počakali, da sta se vodna in organska faza popolnoma ločili, in za spektrofotometrično analizo odvzeli 1 ml zgornje, tj. vodne faze. Izmerili smo absorbanco vzorca in sicer v primeru določanja pentoksifilina pri valovni dolžini 274 nm ter v primeru določanju azura pri valovni dolžini 633 nm.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZDELAVA ENOSLOJNIH NANOVLAKEN IZ RAZTOPINE PCL

Naše raziskovalno delo smo začeli z iskanjem ustreznih parametrov raztopine PCL, kar pomeni, da smo eksperimentalno določali optimalno koncentracijo ter s tem povezano viskoznost raztopine, ustrezno količino dodanega NaI, ki je zagotovil optimalno prevodnost, in izbrali primerno topilo oziroma zmes topil. Nato smo optimizirali še procesne parametre, ki vključujejo oddaljenost igle od zbirala, električno napetost in pretok črpalke. Ustreznost izbranih parametrov smo eksperimentalno preverjali in se poskušali s sistematičnimi postopnimi spremembami čim bolj približati takim vrednostim, ki bi zagotovile kontinuirano nastajanje nanovlaken s procesom elektrostatskega sukanja.

Pri prvi seriji poskusov smo kot topilo uporabili zmes kloroforma in acetona. Zaradi kancerogenosti in uspavalnega učinka kloroforma smo želeli njegov delež karseda zmanjšati, zato smo kot izhodno razmerje topil uporabili razmerje 50:50 (m/m).

4.1.1 Masni delež raztopine PCL

Na podlagi navedb literature je za izdelavo enoslojnih nanovlaken iz PCL potrebna raztopina z masnim deležem polimera od 8 do 18 % (10, 38). Naša izhodna raztopina je bila 16 % raztopina PCL z 0,032 % dodatkom NaI. Izvedli smo dve seriji poskusov elektrostatskega sukanja, ki sta se med seboj razlikovali v pretoku polimerne raztopine tj. 0,5 ml/h in 1 ml/h. Razdalja med iglo in zbiralom je bila 15 cm in električna napetost 10 kV, 15 kV, 20 kV ali 25 kV. Ugotovili smo, da zaradi previsoke viskoznosti polimerne raztopine v nobenem primeru ne pride do tvorbe curka, saj se je igla zamašila še preden je uspel curek nastati.

Tudi povečanje masnega deleža NaI z 0,032 % na 0,048 % ni omogočilo elektrostatskega sukanja 16 % raztopine PCL pri enakih eksperimentalnih pogojih kot so opisani zgoraj.

Nato smo preverjali izvedljivost elektrostatskega sukanja raztopine PCL z nižjim, tj. 13 % masnim deležem PCL in z 0,028 % in 0,039 % NaI. Preizkušene vrednosti pretoka in razdalje smo ohranili enake kot v prejšnjih eksperimentih, tj. 0,5 ml/h in 1 ml/h ter razdalja 15 cm. Ugotovili smo, da pri nobeni izmed uporabljenih kombinacij ne pride do nastanka Taylorjevega stožca, v kolikor smo priključili električno napetost 10 kV ali 15 kV, medtem

ko smo pri električni napetosti 20 kV in 25 kV opazili curek, ki pa je bil stabilen le nekaj sekund, saj se je nato igla zamašila zaradi prehitrega sušenja raztopine na konici igle. Z raztopino s 13 % masnim deležem PCL smo dosegli majhen korak naprej k izvedljivosti procesa elektrostatskega sukanja, vendar je bil curek prekratek čas stabilen, da bi omogočal izdelavo in zbiranje nanovlaken na zbiralu.

V naslednjem koraku smo masni delež PCL še dodatno znižali, tj. na 10 %, ter pripravili raztopino z 0,010 % NaI. Preizkušali smo potek pri pretoku 0,5 ml/h in razdalji 15 cm od zbirala ter postopno večali priključeno električno napetost. Opazili smo, da je curek stabilnejši dlje časa kot v primeru 13 % raztopine in da se na kovinskem zbiralu pojavi lisa. Kljub temu smo med procesom opazili, da občasno zbiralo dosežejo posamezne kapljice raztopine in da se v nadaljevanju kapljice sušijo že na konici igle. Ker se je 10 % raztopina PCL izkazala kot zelo obetavna, smo se odločili, da bo to naša osnovna polimerna raztopina, ki jo bomo optimirali tako, da bomo spreminjali količino dodanega NaI, in da bomo preizkusili izvedljivost procesa pri razdaljah 10 in 15 cm med iglo in zbiralom, različnih pretokih raztopine ter postopno naraščajoči električni napetosti (10 kV, 15 kV, 20 kV in 25 kV).

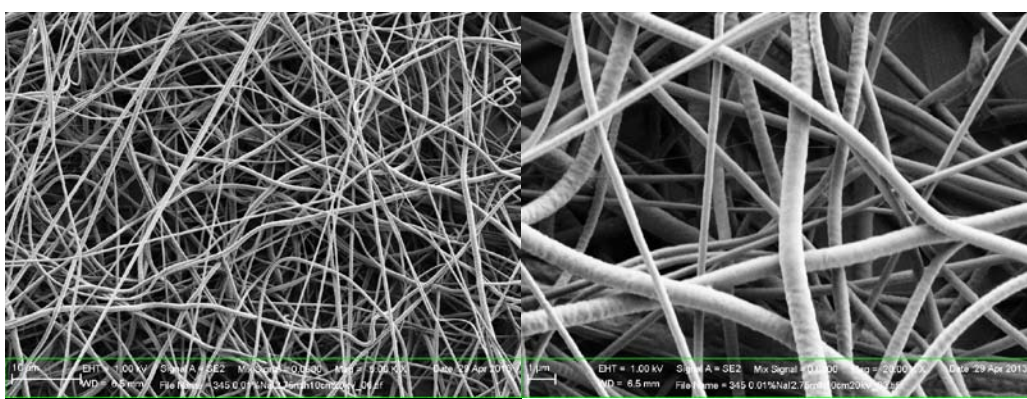
4.1.2 Optimizacija 10 % raztopine PCL

Po pripravi 10 % raztopine PCL v zmesi kloroforma in acetona v masnem razmerju 50:50 in z 0,010 %, 0,020 %, 0,030 % in 0,040 % NaI smo skrbno opazovali postopne spremembe posameznih parametrov na izvedljivost procesa elektrostatskega sukanja. Z vsako izmed pripravljenih raztopin smo naredili sklop poskusov, pri čemer smo spremljali potek pri 10 cm in 15 cm razdalji med iglo in zbiralom pri pretokih 0,5 ml/h, 1 ml/h, 1,25 ml/h, 2 ml/h in 2,75 ml/h ter postopno naraščajoči električni napetosti (10 kV, 15 kV, 20 kV in 25 kV). Skupno smo izvedli 160 poskusov pri različnih pogojih. Na podlagi rezultatov pregleda vseh izdelanih vzorcev pod svetlobnim mikroskopom smo izbrali tistih 5 vzorcev, kjer smo opazili največ vlaken in čim manj vozlastih struktur (Preglednica IV). Natančno vizualizacijo izbranih vzorcev je omogočila SEM analiza (Slike 12–16).

Preglednica IV: Parametri izbranih 10 % raztopin PCL v zmesi kloroforma in acetona (50/50, m/m) in procesni parametri elektrostatskega sukanja.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok črpalke (ml/h)	Električna napetost (kV)
V1	0,010	10	2,75	20
V2	0,030	10	1	20
V3	0,030	15	2	20
V4	0,030	15	2,75	20
V5	0,040	15	2	20

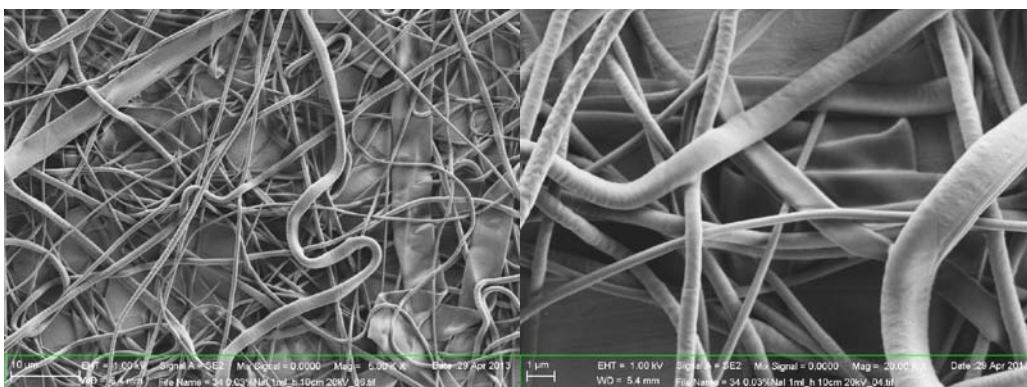
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V1:**



Slika 10: SEM slike nanovlaken V1 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Rezultat elektrostatskega sukanja vzorca V1 so vlakna z rahlo nagubano površino brez vidnih vozlastih struktur (Slika 10). Njihov povprečni premer znaša (379 ± 165) nm. Debelina vlaken je precej neenakomerna, kar potrjuje standardna deviacija meritev povprečne velikosti.

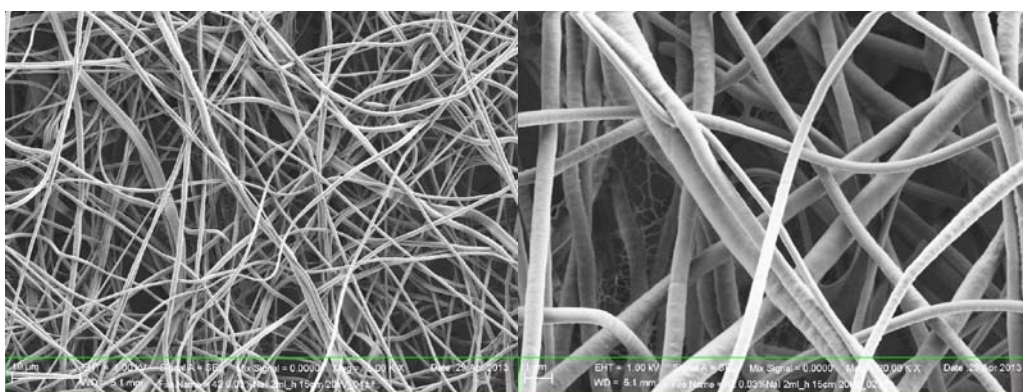
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V2:**



Slika 11: SEM slike nanovlaken V2 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Na SEM posnetkih vzorca V2 lahko poleg gladkih in nagubanih vlaken vidimo tudi sploščene strukture nepravilnih oblik (Slika 11). Morebitna razloga sta lahko kratka razdalja med iglo in zbiralom ter relativno nizek pretok črpalke, ki smo ju uporabili med elektrostatskim sukanjem. Kombinacija teh dveh dejavnikov je lahko onemogočila nastanek stabilnega curka ter popolno iztegnitev polimernih verig, kar je vodilo v nastanek sploščenih struktur. Povprečni premer nastalih nanovlaken znaša (514 ± 236) nm.

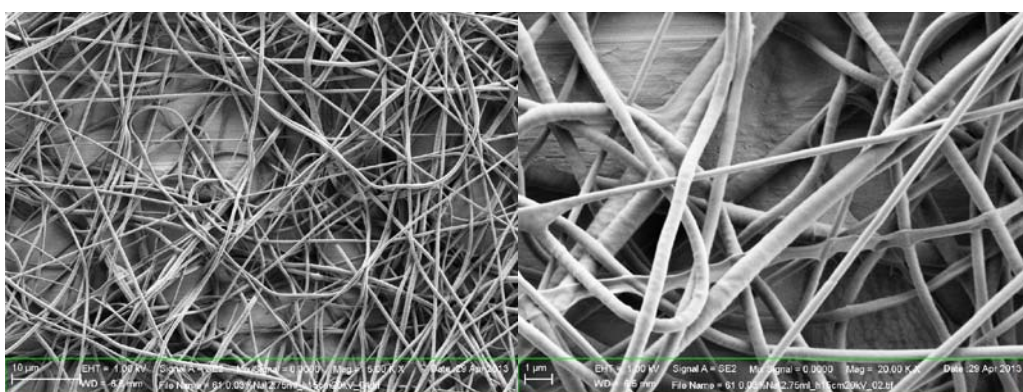
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V3**



Slika 12: SEM sliki nanovlaken V3 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

SEM sliki vzorca V3 kažeta vlakna brez prisotnih vozlov (Slika 12). Povprečni premer vlaken znaša (472 ± 119) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V4**

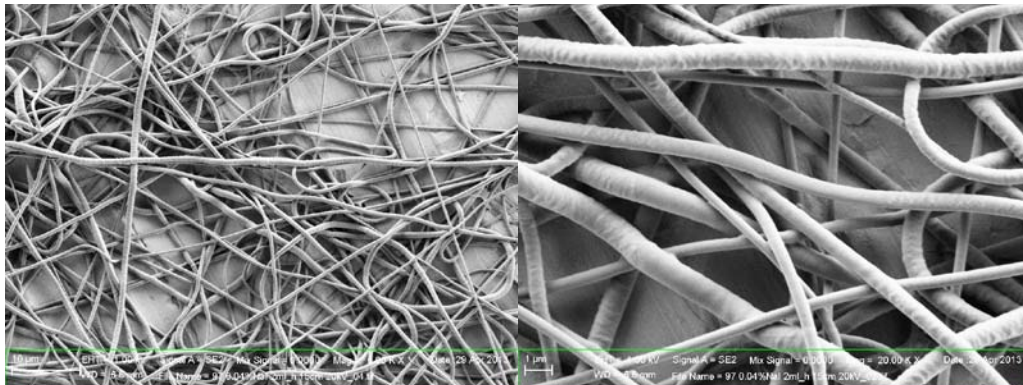


Slika 13: SEM sliki nanovlaken V4 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Podobno kot v primeru vzorca V2 lahko tudi v tem primeru (V4) opazimo, da so poleg vlaken prisotne tudi nepravilne sploščene strukture (Slika 13). Vzrok večjega števila

morfoloških nepravilnosti lahko predstavlja previsok pretok v kombinaciji z relativno visoko električno napetostjo. Povprečni premer nastalih vlaken znaša (403 ± 68) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V5**



Slika 14: SEM slike nanovlaken V5 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Rezultat elektrostatskega sukanja V5 so vlakna s hrapavo površino. Med njimi lahko opazimo tudi nekaj nepopolno iztegnjenih struktur (Slika 14). Povprečni premer izbranih nanovlaken znaša (467 ± 187) nm.

Iz rezultatov elektrostatskega sukanja vzorcev V1–V5 lahko sklepamo na zelo pomembno korelacijo med izbranim pretokom in razdaljo med iglo ter zbiralom. V primeru previsokega pretoka in kratke razdalje do zbirala je prihajalo do nabiranja kapljic na zbiralu ter mašenja igle, v primeru prenizkega pretoka pa se niso vzpostavili ustrezni pogoji za nastanek Taylorjevega stožca.

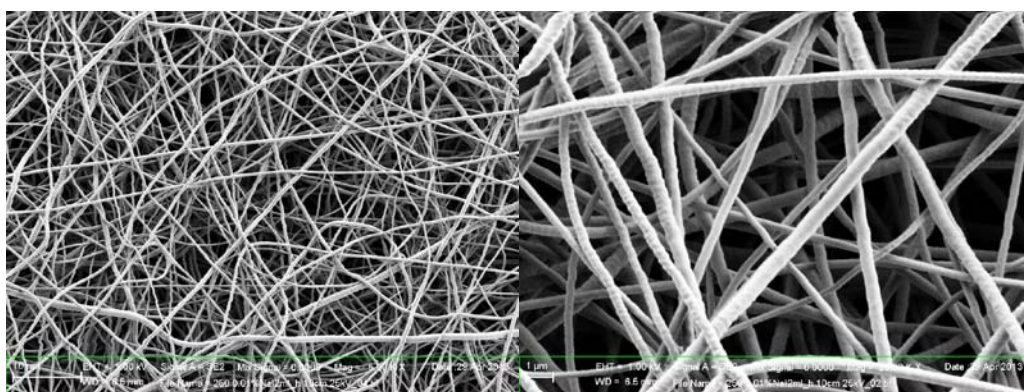
Pri procesu elektrostatskega sukanja vseh petih raztopin je prišlo v manj kot 5 min do zamašitve igle, saj se je raztopina zaradi velike hlapnosti topila na konici igle posušila. Da smo lahko zbrali zadostno količino vzorca produkta elektrostatskega sukanja, smo morali proces pogosto prekiniti, saj je bilo iglo potrebno očistiti in odmašiti. Ker smo ugotovili, da je prevelika hlapnost uporabljene zmesi topil kritični parameter, ki je onemogočal kontinuiranost procesa elektrostatskega sukanja, smo se odločili, da zmanjšamo delež acetona v zmesi topil. Tako smo v nadaljevanju uporabili kloroform in aceton v masnem razmerju 75:25. Ponovno smo preizkusili proces elektrostatskega sukanja z uporabljenimi 10 % raztopinami PCL, z 0,010 %, 0,020 %, 0,030 % in 0,040 % NaI, razdaljo 10 in 15 cm med iglo in zbiralom, pretokih 0,5 ml/h, 1 ml/h, 1,25 ml/h, 2 ml/h in 2,75 ml/h ter naraščajočo

električno napetost (10 kV, 15 kV, 20 kV in 25 kV). Odločitev o spremembi topila se je izkazala za pravilno. Kljub temu, da se je raztopina še vedno relativno hitro sušila in je posledično prihajalo do zamašitve igle, je bilo v najboljših primerih potrebno iglo očistiti šele po več kot 10 min elektrostatskega sukanja. Na podlagi izvedbe nadaljnjih 160 poskusov in analize dobljenih produktov s pomočjo svetlobne mikroskopije smo spet izbrali najperspektivnejše vzorce za SEM analizo (Preglednica V).

Preglednica V: Parametri izbranih 10 % raztopin PCL v zmesi kloroforma in acetona (75/25, m/m) in procesni parametri elektrostatskega sukanja.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok črpalke (ml/h)	Električna napetost (kV)
V6	0,010	10	2	25
V7	0,020	15	1,25	20
V8	0,020	10	1,25	25
V9	0,030	10	1,25	15
V10	0,030	10	2	20
V11	0,030	10	2,75	20
V12	0,040	10	1	25
V13	0,040	10	2	20

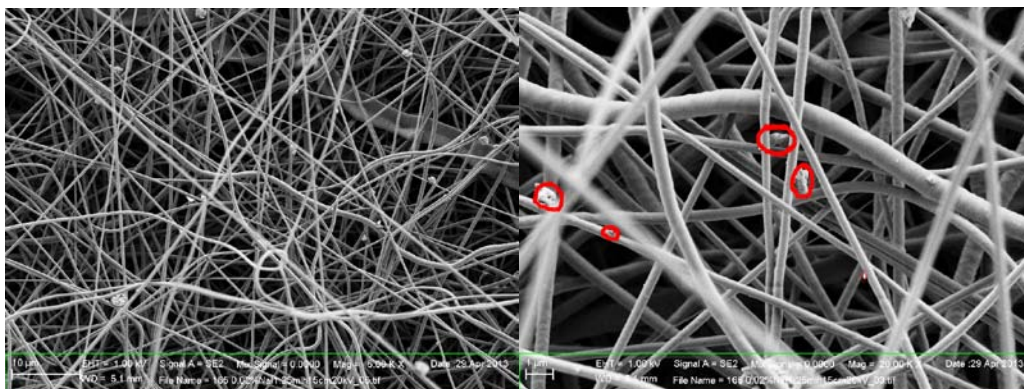
- Elektrostatsko sukanje vzorca V6**



Slika 15: SEM sliki nanovlaken V6 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Rezultat elektrostatskega sukanja V6 so vlakna s hrapavo oz. rahlo nagubano površino, a brez prisotnih vozlastih struktur (Slika 15). Povprečni premer izdelanih nanovlaken znaša (398 ± 95) nm.

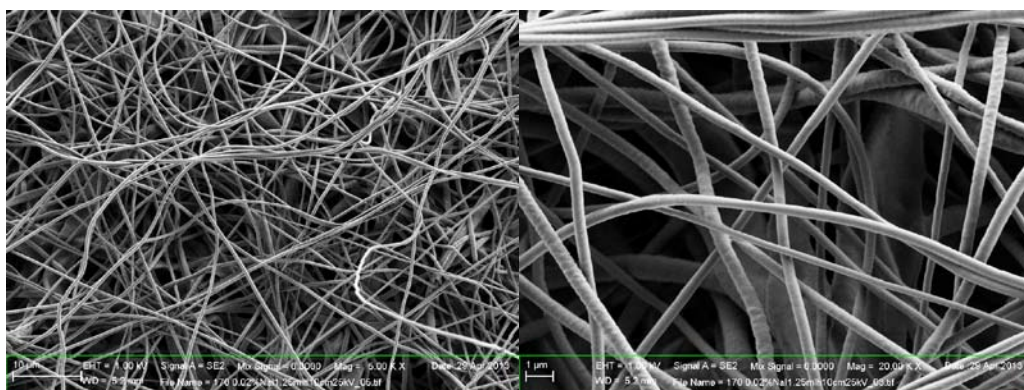
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V7**



Slika 16: SEM slike nanovlaken V7 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Nanovlakna V7 so rahlo nagubana, na površini so opazne tudi manjše strukture, označene z rdečo na SEM sliki, ki bi lahko bile posledica nepopolno raztopljenega NaI (Slika 16, desno). Povprečni premer nanovlaken znaša (371 ± 122) nm.

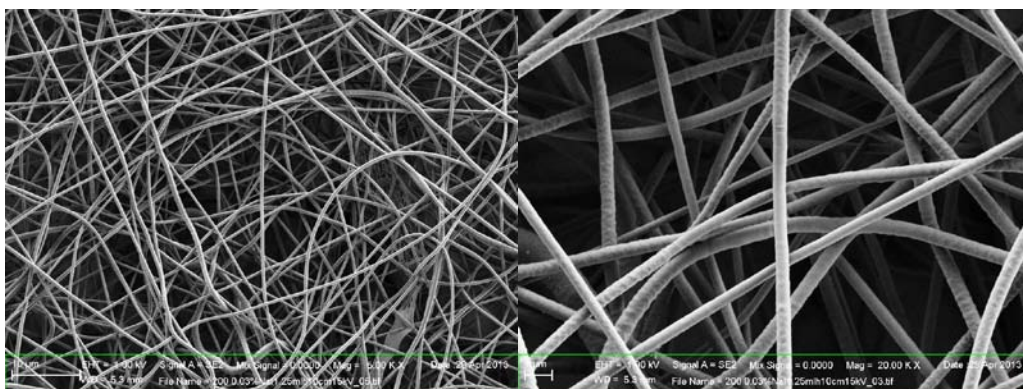
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V8**



Slika 17: SEM slike nanovlaken V8 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Tudi rezultat elektrostatskega sukanja V8 so hrapava in relativno enakomerna vlakna (Slika 17). Njihov povprečni premer znaša (383 ± 76) nm.

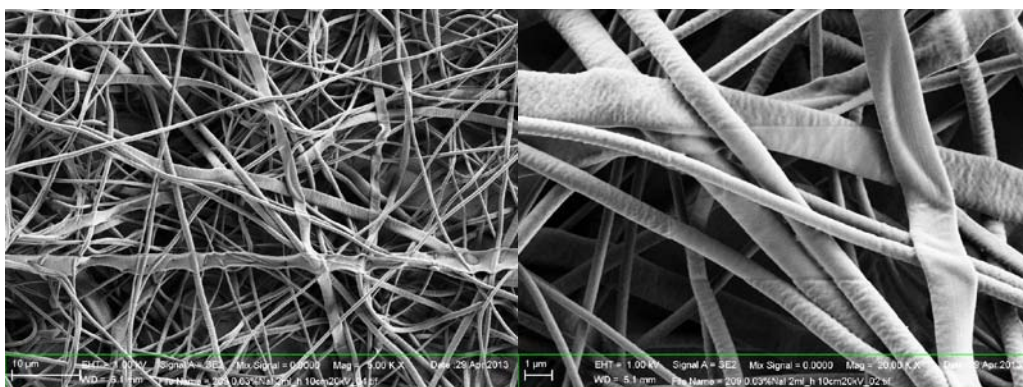
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V9**



Slika 18: SEM sliki nanovlaken V9 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Rezultat elektrostatskega sukanja V9 so vlakna s hrapavo površino in enakomerno debelino, brez prisotnosti vozlastih struktur (Slika 18). Povprečni premer znaša (472 ± 83) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V10**

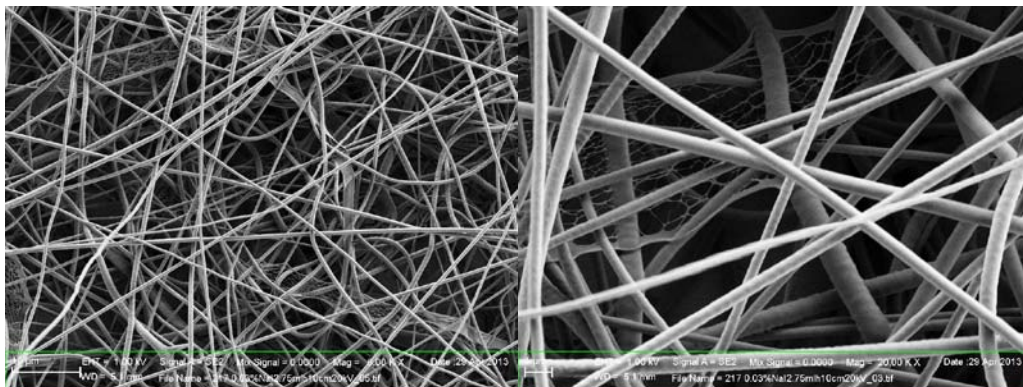


Slika 19: SEM sliki nanovlaken V10 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

SEM sliki vzorca V10 kažeta prisotnost kombinacije relativno neenakomernih vlaken ter sploščenih struktur (Slika 19). Tako vlakna kot sploščene strukture nimajo gladke površine. Glede na to, da so rezultat elektrostatskega sukanja V11 tudi vlakna brez prisotnih morfoloških nepravilnosti, razloga za sploščene strukture V10 ne moremo pripisati prevelikemu pretoku ali električni napetosti. V trenutku, ko se je začela raztopina na igli sušiti, so se zaradi oviranega prehoda tvorili številni nekontrolirani sekundarni curki, ki običajno povečajo možnost nepravilnosti v morfologiji produkta in povzročijo tvorbo vozlastih struktur. Zelo verjeten vzrok nepravilnih struktur, ki jih vidimo na SEM

slikah, je izbira neprimernega dela vzorca za SEM analizo, ki je vsebovala tudi produkt sekundarnih curkov. Povprečni premer vlaken znaša (493 ± 140) nm.

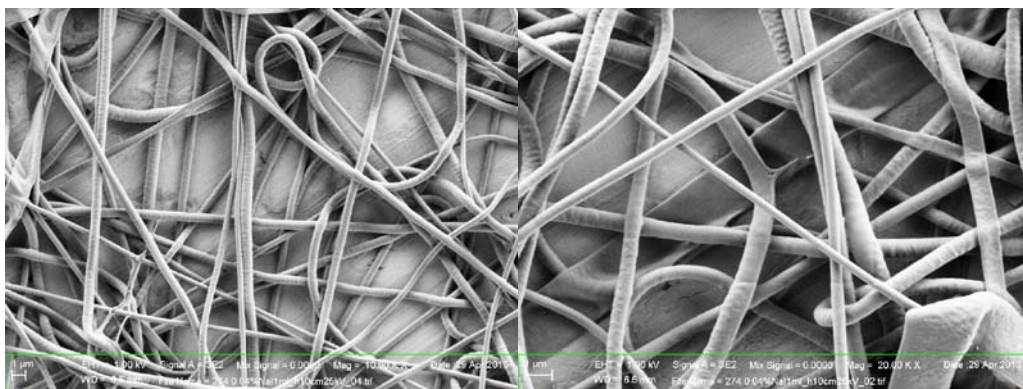
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V11**



Slika 20: SEM slike nanovlaken V11 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Nanovlakna V11 nimajo gladke površine, vendar so po debelini razmeroma enakomerna (Slika 20). Njihov povprečni premer je (441 ± 80) nm.

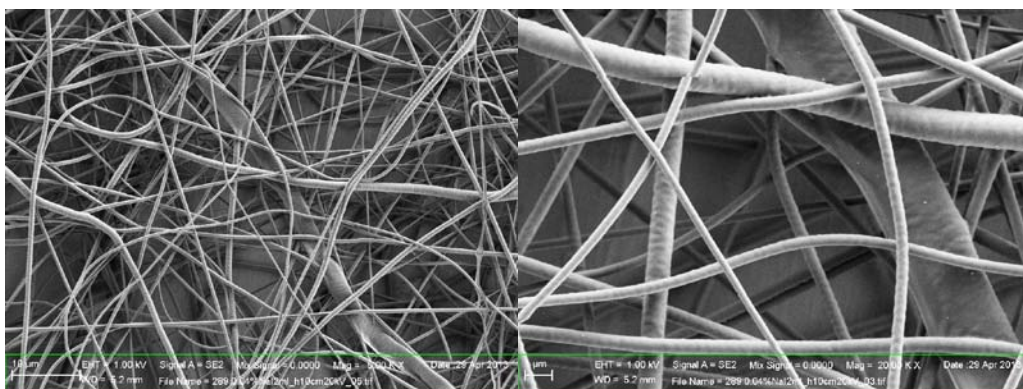
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V12**



Slika 21: SEM slike nanovlaken V12 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Pri elektrostatskem sukanju V12 so nastala vlakna, vendar so jasno vidne tudi številne zadebelitve ter sploščene strukture (Slika 21), kar ponazarja, da so bili procesni parametri ter lastnosti raztopine izbrani v neustrezni kombinaciji. Povprečni premer nastalih nanovlaken znaša (519 ± 124) nm.

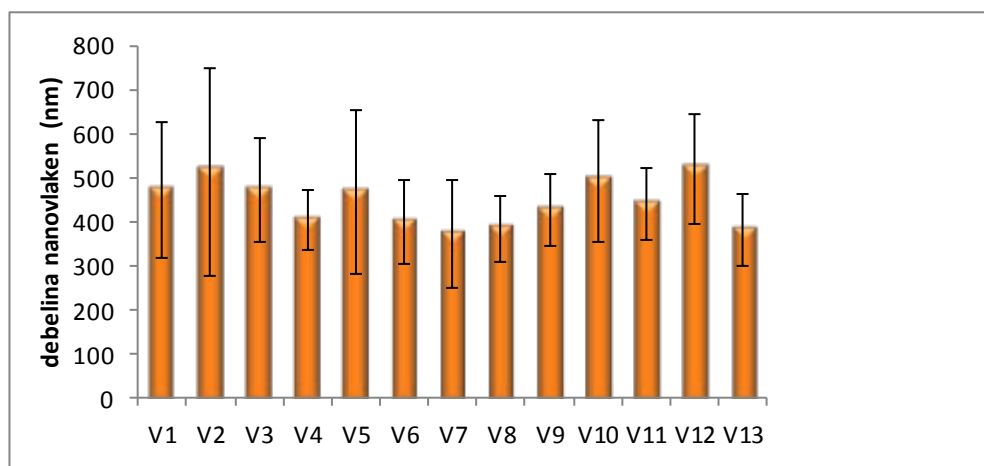
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V13**



Slika 22: SEM slike nanovlaken V13 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Nanovlakna V13 so hrapava in po debelini precej neenakomerna, kar kažeta SEM sliki (Slika 22). Povprečni premer znaša (380 ± 82) nm.

Nanovlakna iz druge serije, pri kateri smo kot topilo uporabili zmes kloroforma in acetona v masnem razmerju 75:25, so bila bistveno bolj enakomerna kot tista, ki smo jih izdelali v prvi seriji. Njihov povprečni premer je bil nekoliko manjši, z izjemo V10 in V12, kjer so nastale sploščene in številne zadebeljene strukture. Povprečni premeri nanovlaken obeh serij so se nahajali znotraj območja 360–520 nm (Slika 23).



Slika 23: Debelina enoslojnih nanovlaken, ki smo jih izdelali iz 10 % raztopine PCL v zmesi kloroforma in acetona (masno razmerje kloroform: aceton 50:50 (V1–V5) in 75:25 (V6–V13)).

4.2 IZDELAVA DVOSLOJNIH NANOVLAKEN IZ RAZTOPINE PCL IN RAZTOPINE ZMESI PEO IN HITOSANA

Z izdelavo enoslojnih nanovlaken iz raztopine PCL smo dokazali, da je PCL primeren polimer za izdelavo nanovlaken s procesom elektrostatskega sukanja. Optimirane parametre za izdelavo enoslojnih nanovlaken, ki so omogočili uspešno izvedbo procesa, smo uporabili kot izhodišče izdelave dvoslojnih nanovlaken s procesom elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe. Za zunanji sloj nanovlaken smo uporabili raztopino PCL, medtem ko smo za notranji sloj uporabili raztopino zmesi PEO in hitosana v 3 % ocetni kislini, za katero so predhodne raziskave potrdile, da je sposobna tvoriti enoslojna nanovlakna z elektrostatskim sukanjem (46).

V nadaljevanju smo proučevali 7 različnih kombinacij raztopine PCL in raztopine zmesi PEO in hitosana. Sestave raztopine notranjega sloja (raztopina zmesi PEO in hitosan) nismo spreminjali, medtem ko smo spreminjali koncentracijo raztopine PCL, količino dodanega NaI in topilo raztopine zunanjega sloja. Prav tako smo sistematično spreminjali procesne parametre (pretok zunanje in notranje faze, oddaljenost med iglo in zbiralom in električno napetost).

V nadaljevanju sledi pregled bistvenih rezultatov poskusov, ki smo jih izvedli v okviru posamezne kombinacije.

4.2.1 Kombinacija A

V nobenem izmed 45 poskusov različnih kombinacij parametrov nam ni uspelo izdelati nanovlaken. V vseh poskusih je prihajalo do zastajanja in sušenja raztopine na konici igle, kar je onemogočilo nastanek Taylorjevega stožca in stabilnega curka. Prav tako kot pri izdelavi enoslojnih nanovlaken se je tudi pri izdelavi dvoslojnih nanovlaken zmes kloroforma in acetona v masnem razmerju 50:50 izkazala kot neustrezno topilo, saj se je zaradi prehitrega izhlapevanja topila raztopina sušila že na konici igle.

4.2.2 Kombinacija B

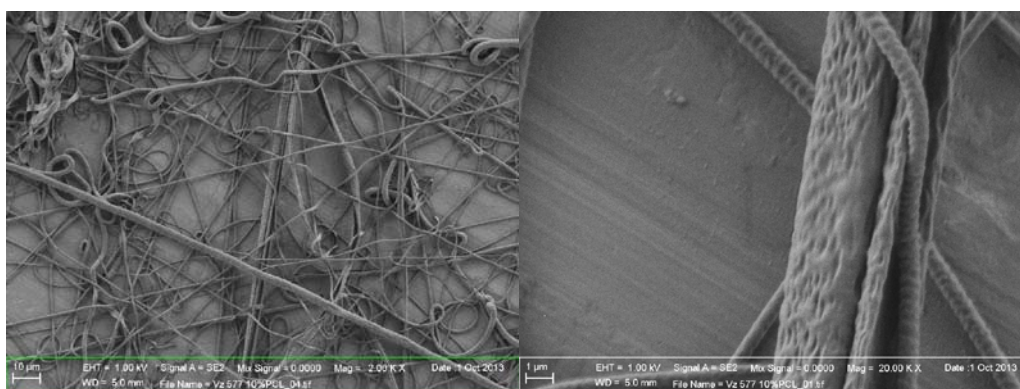
Tudi v tem primeru smo izvedli 45 poskusov različnih kombinacij uporabljenih parametrov. V nobenem izmed 15 poskusov, ko smo uporabili električno napetost 15 kV, ni nastal Taylorjeve stožec, temveč je prihajalo, tako kot pri eksperimentih v okviru

kombinacije A, do zastajanja in sušenja raztopine na konici igli. V ostalih poskusih je prišlo do nastanka curka, vendar je bil le-ta v najboljših primerih obstojen do 10 s. Nato se je igla zamašila, saj se je kapljica polimerne raztopine posušila na konici igle, zato smo morali proces večkrat prekiniti in odmašiti iglo, da smo lahko izdelali zadostno količino vzorca. Glede na izvedljivost procesa, pri katerem je igral pomembno vlogo čas obstojnosti curka v kombinaciji z morfologijo produkta elektrostatskega sukanja, ki smo jo v grobem ovrednotili z uporabo invertnega svetlobnega mikroskopa, smo izbrali V14 (Preglednica VI) kot najperspektivnejši vzorec za nadaljnjo SEM analizo.

Preglednica VI: Parametri izbrane raztopine kombinacije B.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V14	0,030	15	1,625	0,27	20

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V14**



Slika 24: SEM slike nanovlaknen V14 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

SEM slika V14 kaže, da je rezultat elektrostatskega sukanja zelo heterogena morfologija produkta (Slika 24). Vidimo lahko iztegnjena nanovlakna in nepopolno iztegnjena, zadebeljena in sploščena strukture. Nastala vlakna so različnih debelin in imajo izrazito neravno površino z vidnimi vdolbinami. Povprečni premer nanovlaknen znaša (1260 ± 530) nm.

Menjava razmerja kloroforma in acetona je sicer vodila v izboljšanje procesa, vendar je rezultat analize vzorcev s SEM pokazal, da glede na prevladujoče število nepravilnih struktur v morfologiji produkta izbrani parametri niso bili ustrezni za izvajanje

elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe. Predvidevali smo, da je razlog zastajanja raztopine previsoka viskoznost, kar smo v nadaljevanju upoštevali in zmanjšali njeno koncentracijo.

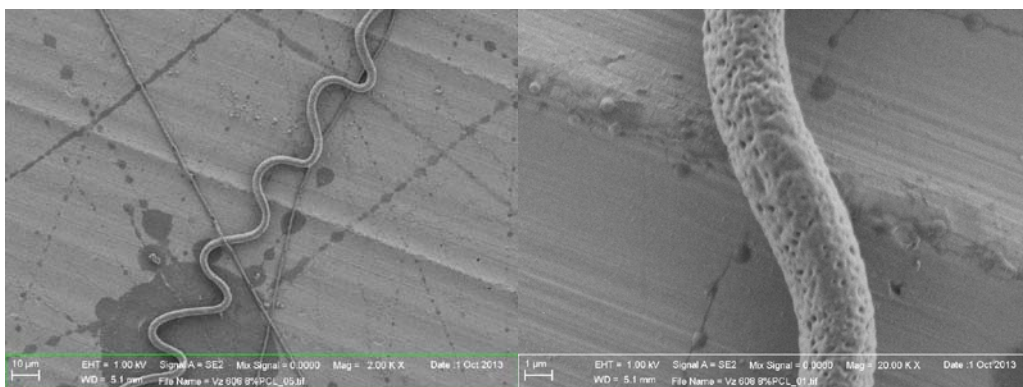
4.2.3 Kombinacija C

Na podlagi dosedanjih eksperimentalnih rezultatov glede možnosti izvedbe elektrostatskega sukanja z uporabo dvokanalne šobe smo ugotovili, da je 15 kV prenizka napetost, da bi proces uspešno izvedli, zato smo v nadaljevanju proučili proces le pri uporabi višje električne napetosti tj. 20 kV in 25 kV. Nadalje smo iskanje ugodnih parametrov še dodatno optimizirali z upoštevanjem podatka iz literature, ki pravi, da morata biti za uspešen nastanek dvoslojnih nanovlaken, pretoka zunanje in notranje faze v razmerju med 1:3 in 1:6 (12). Preverili smo, če slednje drži tudi v našem primeru, ter ugotovili, da pride do nastanka curka tudi pri drugačnem razmerju pretokov (npr. 1:9). V vseh primerih je bil nastali curek najdlje obstojen in kontinuiran pri razmerjih pretokov 1:6 in 1:9. Znižanje koncentracije polimera zunanje faze je podaljšalo čas trajanja stabilnega curka, vendar le-ta še vedno ni trajal več kot 20 s. Analiza dobljenih produktov pod invertnim s svetlobnim mikroskopom je pokazala, da je morfologija produkta zelo heterogena in da so v večini vzorcev prisotne morfološke nepravilnosti. Tako smo za SEM analizo izbrali le 4 najboljše vzorce (Preglednica VII).

Preglednica VII: *Parametri izbranih raztopin kombinacije C.*

Oznaka raztopine	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V15	0,030	15	1,25	0,42	20
V16	0,030	15	1,25	0,42	25
V17	0,030	15	1,625	0,42	20
V18	0,030	15	1,625	0,42	25

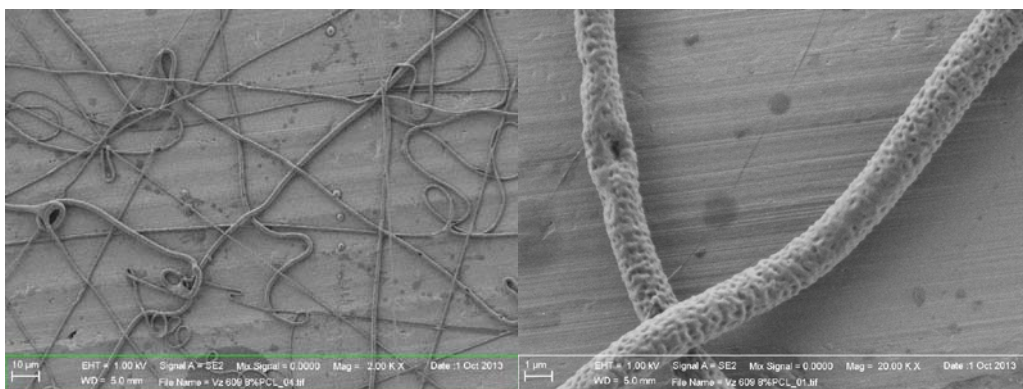
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V15**



Slika 25: SEM slike nanovlaken V15 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Na SEM slikah vzorca V15 vidimo zelo malo vlaken (Slika 25). Prevladujejo predvsem nepravilne vozlaste strukture. Temnejši madeži, ki so vidni v ozadju, so najverjetneje posledica posušenih kapljic polimernih raztopin, ki so dosegle zbiralo. Izmerili smo samo premer enega vlakna (Slika 25, desno), ki znaša 2456 nm, saj je bilo število vlaken v vzorcu premajhno, da bi lahko podali povprečno vrednost debeline. Površina vlakna je hrapava ter s številnimi vidnimi vdolbinami.

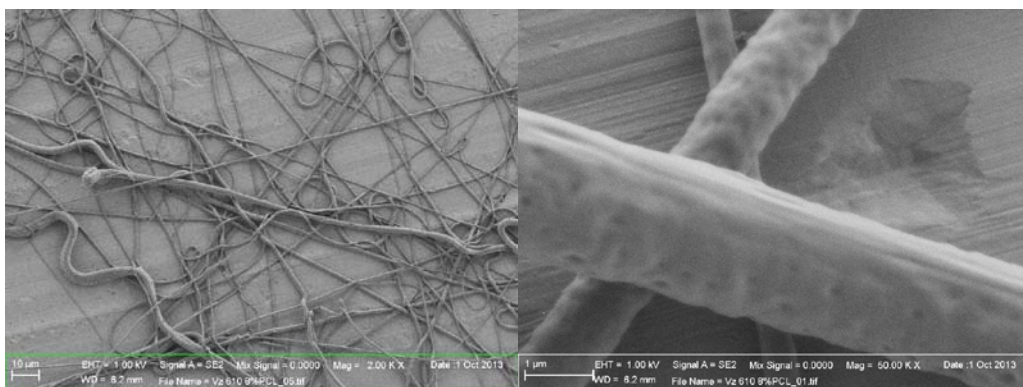
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V16**



Slika 26: SEM slike nanovlaken V16 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Število nastalih vlaken v primeru V16 (Slika 26, levo) je nekoliko večje kot v primeru V15 (Slika 25, levo); vendar pa še vedno prevladujejo zadebeljene, nepopolno iztegnjene in vozlaste strukture. Izmerili smo povprečni premer nastalih vlaken, ki znaša (1155 ± 160) nm.

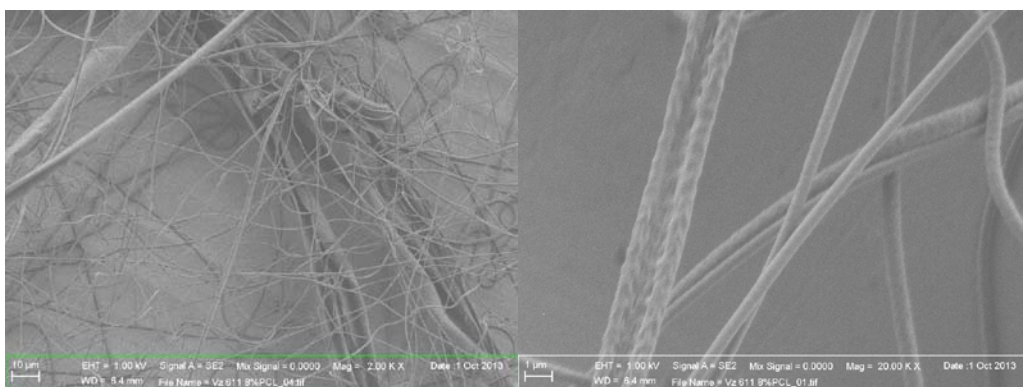
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V17**



Slika 27: SEM sliki nanovlaken V17 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

SEM slika vzorca V17 kaže prisotnost zelo heterogene morfologije produkta, ki se kaže kot zadebeljene, vozlaste in nepopolno iztegnjene strukture (Slika 27, levo). Število nastalih vlaken je bistveno večje v primerjavi z do sedaj opisanimi vzorci kombinacije C. Vlakna nimajo gladke površine, njihov povprečni premer znaša (1023 ± 210) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V18**



Slika 28: SEM sliki nanovlaken V18 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Znotraj serije poskusov v okviru kombinacije C je največje število nanovlaken nastalo v primeru vzorca V18. Morfologija elektrostatsko sukanega produkta je še vedno precej heterogena (Slika 28), kar dokazuje, da kombinacija izbranih parametrov raztopine in procesa še ni bila optimalna, vendar pa je opazno vidno izboljšanje v primerjavi z vzorcem V15. Povprečni premer nastalih vlaken znaša (514 ± 145) nm in je signifikantno manjši kot v prejšnjih vzorcih (V15–V17).

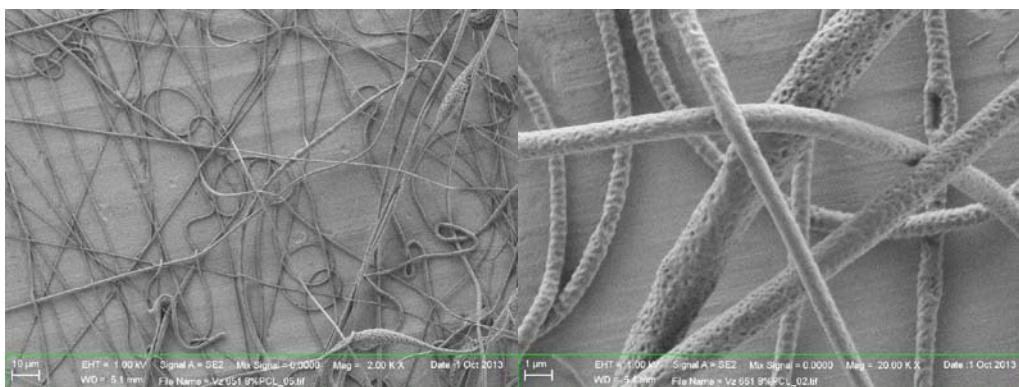
4.2.4 Kombinacija D

Potek poskusov v okviru kombinacije D je bil podoben tistim v okviru kombinacije C. Ponovno je prihajalo do hitrega sušenja raztopine na konici igle in posledično do kratkotrajne obstojnosti curka, ki je bil velikokrat neenakomeren ali pa so se pojavili sekundarni curki. Po pregledu morfologije 18 produktov elektrostatskega sukanja pod invertnim svetlobnim mikroskopom smo izbrali le dva, pri katerih je bil nastanek vlaken najočitnejši (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Parametri izbranih raztopin kombinacije D.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V19	0,015	15	1,625	0,27	25
V20	0,015	15	1,625	0,54	20

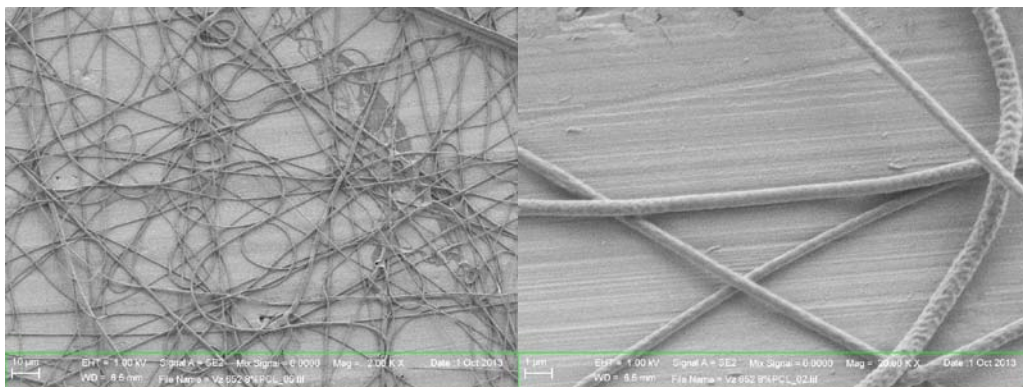
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V19**



Slika 29: SEM sliki nanovlaken V19 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Vlakna vzorca V19 so zelo različnih debelin s številnimi zadebelitvami, vozlastimi in nepopolno iztegnjenimi strukturami (Slika 29, levo). Površina vlaken ni gladka, saj so pri večji povečavi jasno vidne številne vdolbine, ki lahko predstavljajo nastale pore (Slika 29, desno). Povprečni premer vlaken vzorca V19 znaša (699 ± 323) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V20**



Slika 30: SEM sliki nanovlaken V20 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

SEM slika produkta, nastalega z elektrostatskim sukanjem z uporabo koaksialne šobe vzorca V20 (Slika 30), je podobna morfologiji vzorca V19 (Slika 29). Zraven nastalih vlaken, ki nimajo gladke površine, so prisotne tudi redke zadebelitve. Povprečni premer nastalih vlaken je manjši kot v primeru V19 ter znaša (458 ± 193) nm. Nastala nanovlakna so tudi bolj enakomerne debeline.

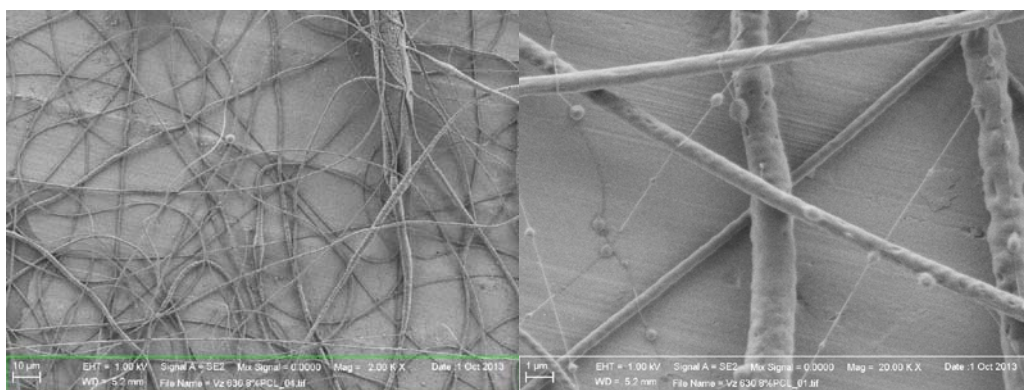
4.2.5 Kombinacija E

Z doslej opisanimi poskusi smo navkljub še vedno prisotnim nepravilnostim v morfologiji produkta elektrostatskega sukanja dokazali izvedljivost nastanka nanovlaken. Še vedno pa smo se soočali s težavami zaradi zastajanja in sušenja raztopine na konici igle in posledično s kratkotrajnim, nekontinuiranim curkom polimerne raztopine. Tako je sledilo proučevanje izvedljivosti procesa z uporabo 8 % raztopine PCL v 100 % kloroformu z dodatkom 0,03 % NaI. Izvedba procesa ni potekala po pričakovanjih, saj kljub temu, da do sušenja raztopine na konici igle ni prišlo ali je prišlo bistveno kasneje, so se v vseh 18 izvedenih poskusih pojavili sekundarni, nenadzorovani curki in številne nitkaste povezave med iglo in zbiralom. Po pregledu produktov elektrostatskega sukanja pod invertnim svetlobnim mikroskopom smo izbrali dva, ki smo ju nato natančneje proučili s pomočjo SEM (Preglednica IX).

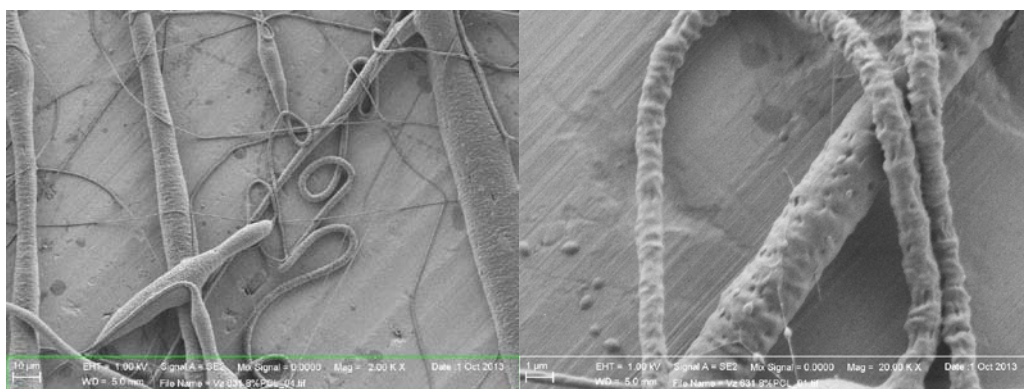
Preglednica IX: Parametri izbranih raztopin kombinacije E.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V21	0,03	15	2	0,33	20
V22	0,03	15	2	0,33	25

• **Elektrostatsko sukanje vzorca V21 in V22**



Slika 31: SEM slike nanovlaken V21 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.



Slika 32: SEM slike nanovlaken V22 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

SEM slike vzorcev V21 (Slika 31) in V22 (Slika 32) so zelo podobne. Pri obeh lahko ločimo dve vrsti vlaken, ki se bistveno razlikujeta glede na premer in po izgledu površine (debelejša z nagubano, luknjasto površino in tanjša z nanizanimi vozli). Predvidevamo, da je slednje posledica nastanka ločenih curkov notranje in zunanje faze ter s tem ločenega nastanka dveh vrst vlaken. Sklepamo, da je do ločitve curkov prišlo zaradi velikih odbojnih sil na stični površini notranje faze, kjer smo kot topilo uporabili vodno raztopino očetne kisline, in zunanje faze, kjer smo kot topilo uporabili čisti kloroform.

Z uporabo 100 % kloroforma kot topila za raztapljanje PCL smo dosegli manjše zastajanje in sušenje raztopine na konici igle, vendar je podrobnejša analiza pokazala, da je uporabljen sistem manj ugoden za nastanek vlaken.

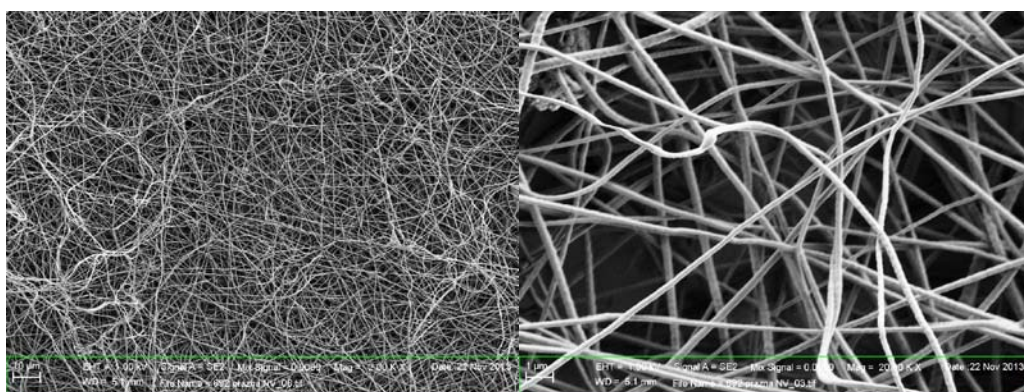
4.2.6 Kombinacija F

Ker se uporaba 100 % kloroforma kot topila zunanje faze ni izkazala kot optimalna, smo v nadaljevanju ponovno uporabili zmes topil kloroforma in acetona v masnem razmerju 75:25 in znižali masni delež PCL v raztopini na 7 %. Preizkusili smo elektrostatsko sukanje 18 različnih kombinacij procesnih parametrov. V teh poskusih nismo opazili pojava sekundarnih curkov takoj ob začetku procesa elektrostatskega sukanja kot pri kombinaciji E. Do nastanka le-teh pa je prišlo v trenutku, ko je začela zastajajoča kapljica raztopine na konici igle motiti curek ter je s tem prekinila njegovo kontinuiteto. Kot najboljša sta se v tem sklopu poskusov izkazala vzorca V23 in V24 (Preglednica X).

Preglednica X: Parametri izbranih raztopin kombinacije F.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V23	0,015	15	2	0,21	20
V24	0,015	15	2	0,33	20

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V23**

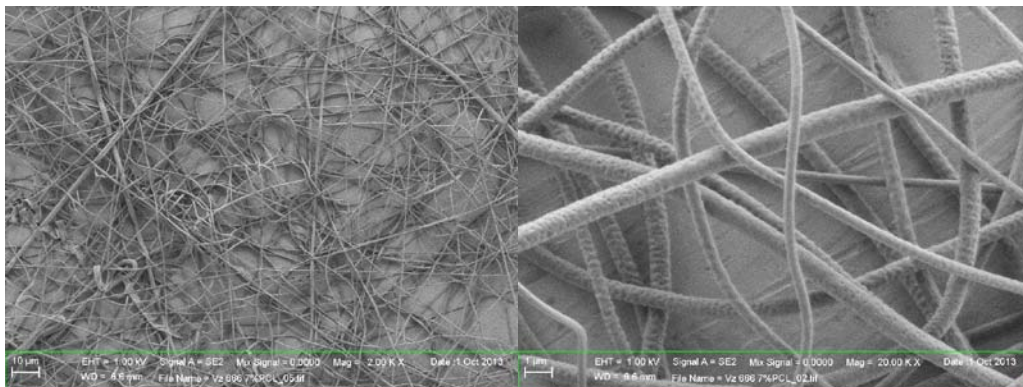


Slika 33: SEM sliki nanovlaken V23 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Rezultat elektrostatskega sukanja vzorca V23 so razmeroma gladka in enakomerna vlakna, kar prikazujeta SEM sliki (Slika 33). V primerjavi z drugimi vzorci je prisotno zelo malo nepravilnosti v morfologiji produkta, kar dokazuje, da smo izbrali ugodno kombinacijo

parametrov, ki je omogočila nastanek vlaken. Povprečni premer nastalih nanovlaken znaša (240 ± 66) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V24**



Slika 34: SEM slike nanovlaken V24 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Produkt elektrostatskega sukanja vzorca V24 so večinoma vlakna, kar prikazujeta SEM sliki (Slika 34). Prisotnih je tudi nekaj nepravilnih, zadebeljenih struktur. Vlakna so dokaj enakomerna, z negladko površino in s povprečnim premerom (529 ± 159) nm.

V procesu elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe vzorcev v okviru kombinacije F so večinoma nastala vlakna, vendar same izvedbe procesa nismo uspeli popolnoma optimizirati, saj je po določenem času še vedno prihajalo do pojava zastajajoče kapljice raztopine na konici igle, ki je onemogočila nastanek Taylorjevega stožca in prekinila curek.

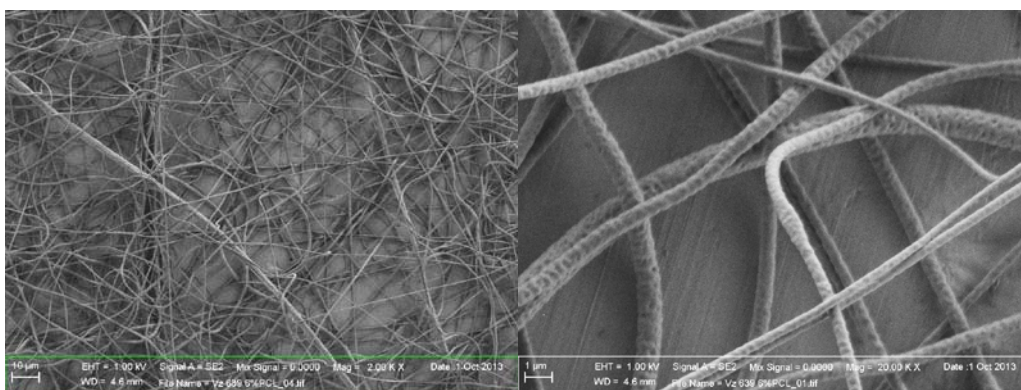
4.2.7 Kombinacija G

V tem sklopu poskusov smo poskusili izdelavo nanovlaken iz 6 % raztopine PCL v zmesi kloroforma in acetona v masnem razmerju 75:25 z dodatkom 0,01 % NaI. Izvedba vseh 18 poskusov z uporabo različnih kombinacij procesnih parametrov je potekala podobno kot v sklopu poskusov pri kombinaciji F. Razlika pa je bila v tem, da je bil curek v tem primeru bolj neenakomeren in ga je bilo težje nadzorovati. Ponovno smo zbrane vzorce najprej analizirali s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa ter nato izbrali dva, ki sta se izkazala v tej kombinaciji za najoptimalnejša (Preglednica XI).

Preglednica XI: Parametri izbranih raztopin kombinacije G.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V25	0,03	15	1,625	0,27	25
V26	0,03	15	1,625	0,54	20

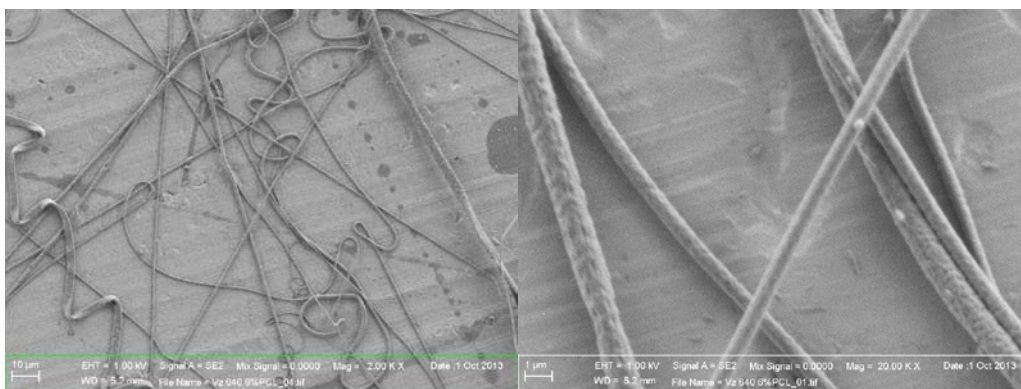
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V25**



Slika 35: SEM sliki nanovlaken V25 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Vlakna, ki smo jih izdelali iz vzorca V25 (Slika 35), so strukturno in po debelini podobna tistim, ki smo jih izdelali iz V24 (Slika 34). Povprečni premer izdelanih nanovlaken znaša (476 ± 152) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V26**



Slika 36: SEM sliki nanovlaken V26 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Iz SEM slike vidimo, da v vzorcu V26 prevladujejo sploščene, nepopolnoma iztegnjene strukture (Slika 36), medtem ko imajo sicer redka vlakna, ki so nastala, podobno

morfologijo, kot smo jo opazili v prejšnjih primerih. Na površini vlaken so jasno vidne vdolbine, medtem ko je povprečni premer izdelanih vlaken veliko večji kot v primeru vzorca V25 in znaša (730 ± 124) nm.

Po analizi vzorcev V14–V26 smo ugotovili, da sta bila izvedba elektrostatskega razprševanja z uporabo koaksialne šobe ter dobljeni produkt najoptimalnejša v primeru V18, V23, V24 in V25.

4.3 VGRAJEVANJE IN SPROŠČANJE MODELNIH SPOJIN V DVOSLOJNA NANOVLAKNA

Pri izbiri parametrov raztopine in procesnih parametrov za izdelavo dvoslojnih nanovlaken z vgrajeno modelno spojino smo izhajali iz ugotovitev do katerih nas je pripeljala izdelava praznih dvoslojnih nanovlaken. Kot izhodiščne smo uporabili raztopine in parametre vzorcev V18, V23, V24 in V25. Poglavitni zahtevi pri izbiri ustreznih modelnih spojin sta bili vodotopnost in možnost detekcije z UV/VIS spektrofotometrom v nizkem koncentracijskem območju. Vodotopnost je bil kriterij, ker je bil naš cilj vgrajevanje modelnih spojin v hidrofilni notranji sloj nanovlaken, medtem ko je bila detekcija pri nizkih koncentracija potrebna, ker so bili vzorci, ki smo jih imeli na voljo za spremljanje sproščanja, majhni, tj. majhna masa nanovlaken. Naš cilj je bil s spremljanjem sproščanja modelnih spojin iz nanovlaken posredno potrditi dvoslojnost nanovlaken, saj smo pričakovali, da zunanji sloj iz PCL upočasni hitrost sproščanja vgrajenih spojin. Iz predhodnih raziskav je znano, da se vgrajene snovi iz enoslojnih nanovlaken iz PEO in hitosana zelo hitro sprostijo (46).

4.3.1 Tartrazin

Tartrazin je azo barvilo in se nahaja v obliki natrijeve soli. S tem, ko smo natehali 2 % barvila glede na maso suhih polimerov notranje faze in barvilo počasi dodajali v raztopino zmesi hitosana in PEO v 3 % očetni kislini, smo opazili nastajanje oborine. Po preučitvi kemijske strukture vseh prisotnih spojin, smo ugotovili, da pride do elektrostatskih interakcij med protoniranimi amino skupinami (NH_3^+) hitosana ter negativno nabitimi

skupinami tartrazina. S tem smo dokazali, da tartrazin zaradi svoje anionske narave ni ustrezna modelna spojina.

4.3.2 Natrijev salicilat

Natrijev salicilat se je v našem primeru podobno kot tartrazin izkazal kot neprimerna spojina za vgrajevanje v notranji sloj naših dvoslojnih nanovlaken. Za razliko od tartrazina pri natrijevem salicilatu ni prišlo do težav zaradi obarjanja, saj ima molekula natrijevega salicilata samo eno negativno nabito skupino, ki ne omogoča premreženja s hitosanom, je pa reakcija povzročila čebulno obarvanje raztopine, kar bi lahko vplivalo na kasnejše rezultate merjenja sproščene učinkovine iz dvoslojnih nanovlaken z UV/VIS spektrofotometrično metodo.

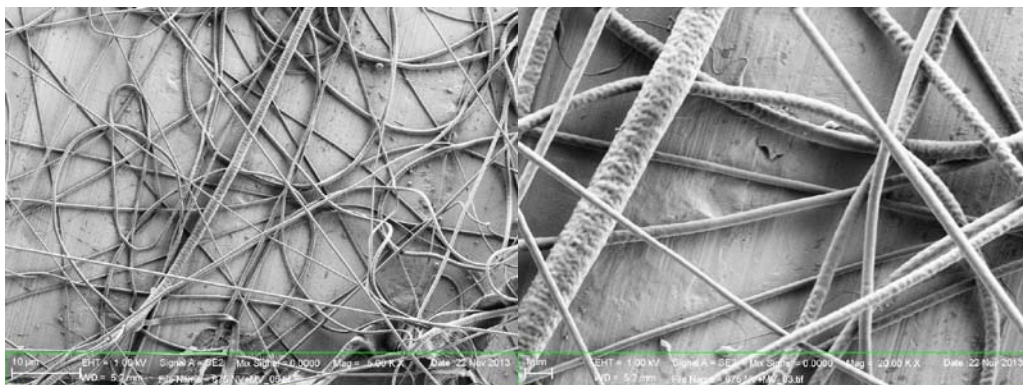
4.3.3 Metilvijolično

V dvoslojna nanovlakna smo poskusili vgraditi 0,5 % in 10 % barvila metilvijolično glede na maso suhih polimerov notranje faze z uporabo parametrov in raztopin vzorcev V18, V23, V24 in V25. Izvedbe elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe ni bilo mogoča izvesti v primeru, ko smo kot notranjo fazo uporabili zmes PEO in hitosana z 10 % vsebnostjo barvila. V primeru 0,5 % vsebnosti barvila je bila izvedba najoptimalnejša v primeru uporabe 7 % raztopine PCL, pripravljene v zmesi kloroforma in acetona v masnem razmerju 75:25 (vzorec V27, Preglednica XII).

Preglednica XII: Parametri izbrane raztopine PCL za izdelave dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim metilvijoličnim.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Masni delež barvila (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V27	0,015	0,5	15	2	0,33	20

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V27**



Slika 37: SEM sliki nanovlaken V27 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Na SEM sliki vzorca V27 so zraven nepopolno iztegnjenih in sploščenih struktur jasno vidna tudi vlakna, ki pa so precej neenakomerna (Slika 37). Vlakna z večjim premerom imajo površino s številnimi vdolbinami, medtem ko so tista z manjšim premerom gladka. Slednje najverjetneje dokazuje, da so tekom procesa nastali individualni curki notranje in zunanje faze ter posledično dva tipa vlaken, tj. vlakna iz PCL in vlakna iz zmesi PEO in hitosana. Povprečni premer vlaken znaša (456 ± 266) nm.

4.3.3.1 Sproščanje barvila metilvijolično iz dvoslojnih nanovlaken

Pri nanovlaknih z vgrajenim barvilom metilenvijolično se je UV/VIS spektrofotometrija izkazala kot neprimerna metoda za analizo sproščanja, saj tvori metilenvijolično z ioni joda, ki se nahajajo v zunanjem sloju nanovlaken, kompleks, ki ima drugačen absorpcijski maksimum kot samo barvilo. V nadaljevanju smo se iz tega razloga odločili za vgrajevanje modelne snovi, ki ne vstopa v interakcije z drugimi sestavinami nanovlaken ter tako omogoča točno in nemoteno spektrofotometrično vrednotenje sproščene spojine iz nanovlaken

4.3.4 Pentoksifilin

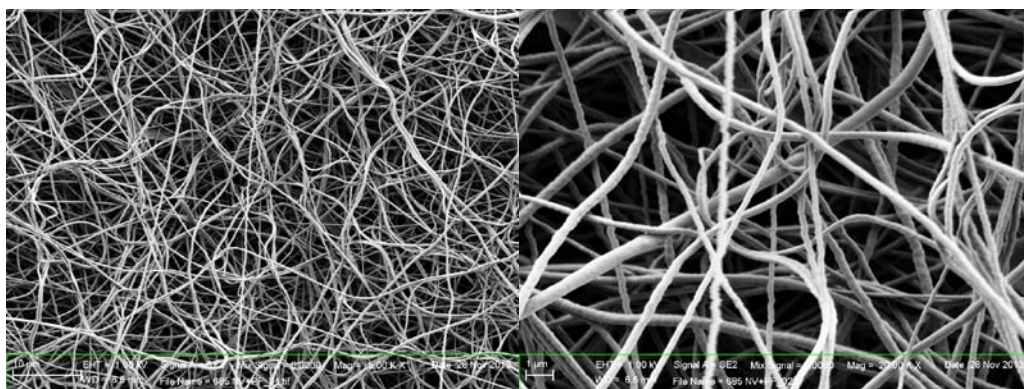
Po pripravi zmesi PEO in hitosana v 3 % očetni kislini z 2 % in 10 % vsebnostjo pentoksifilina glede na maso suhih polimerov notranje faze v kombinaciji s parametri raztopin vzorcev V18, V23, V24 in V25 smo preverili možnost izvedbe procesa izdelave dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim pentoksifilinom. Tako kot v primeru vgrajevanja barvila metilvijolično smo tudi pri pentoksifilinu ugotovili, da pri raztopinah, ki vsebujejo v zmesi PEO in hitosana 10 % pentoksifilina glede na maso suhih polimerov notranje faze,

bodisi ne pride do nastanka Taylorjevega stožca, bodisi je nastali curek nekontroliran ter obstojen le nekaj sekund. Pri raztopinah z 2 % vsebnostjo pentoksifilina glede na maso suhih polimerov notranje faze je nastal Taylorjev stožec v primerih, ko smo za zunanjo fazo uporabili 7 % raztopino PCL. Procesna nismo uspeli izvesti v primeru 8 % in 6 % raztopine PCL kot zunanje faze. Vzorce, pri katerih je bila izvedba najuspešnejša ter kjer so bila s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa vidna nastala vlakna (Preglednica XIII), smo podrobneje preučili s pomočjo elektronske mikroskopije (SEM in TEM).

Preglednica XIII: Parametri izbranih raztopin in procesnih parametrov za izdelavo dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim pentoksifilinom.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Masni delež učinkovine (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V28	0,015	2	15	2	0,21	20
V29	0,015	2	15	2	0,33	20

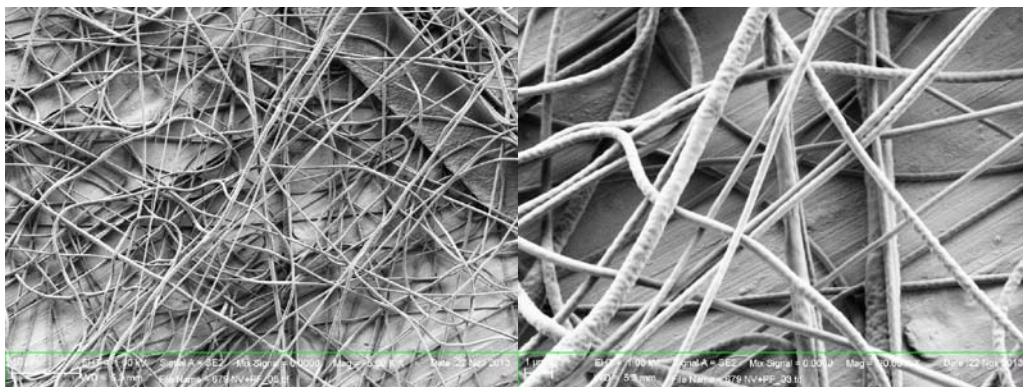
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V28**



Slika 38: SEM slike nanovlaken V28 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

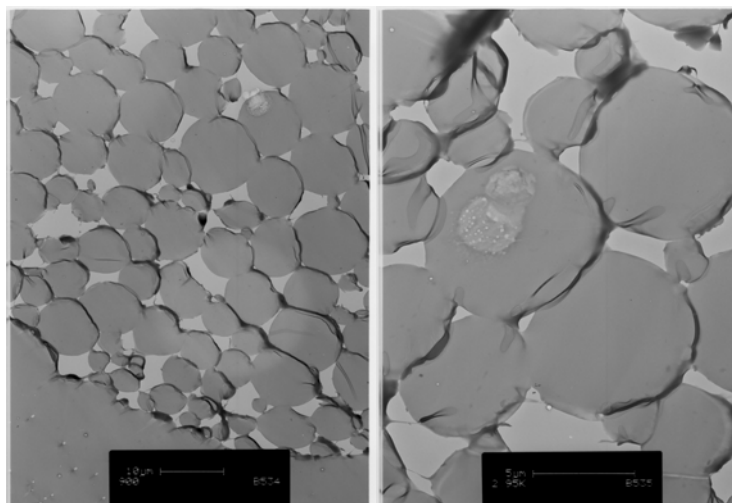
Na SEM sliki vzorca V28, so vidna številna enakomerna, a dokaj tanka vlakna z ne povsem gladko površino (Slika 38). Njihov povprečni premer znaša (236 ± 72) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V29**



Slika 39: SEM slike nanovlaken V29 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Za razliko od vzorca V28 (Slika 38) lahko v primeru vzorca V29 opazimo manj homogeno morfologijo vzorca (Slika 39). Vlakena so nekoliko debelejša in po debelini manj homogena. Njihova površina kaže številne opazne vdolbine, tj. neravno površino. Povprečni premer vlaken je po pričakovanjih večji kot v prejšnjem primeru, saj smo uporabili višji pretok notranje faze, in znaša (343 ± 108) nm.



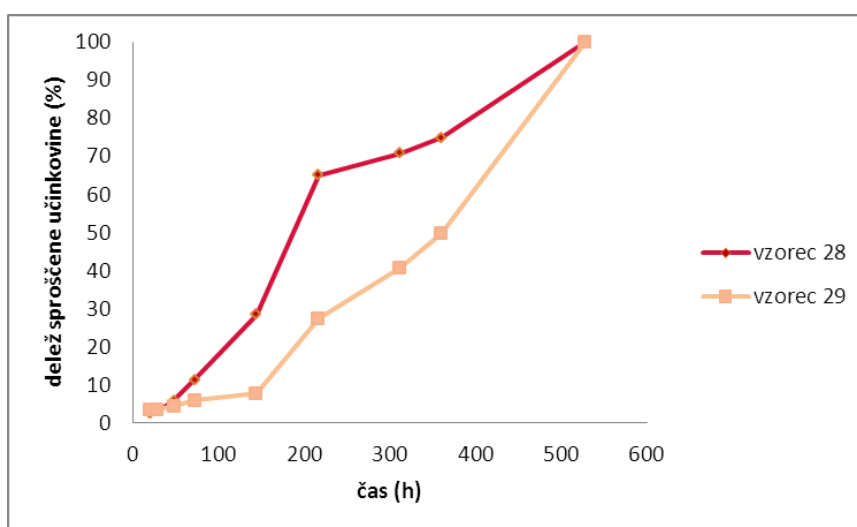
Slika 40: TEM slike prečnega prereza nanovlaken vzorca V29 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Na TEM sliki vzorca vidimo prečni presek vlaken pravilne okrogle oblike (Slika 40). Sliki pa ne kažeta prisotnosti dveh različnih slojev, kar bi dokazovalo, da so izdelana nanovlakna res dvoslojna. Najverjetnejši razlog temu je neprimernost uporabljene metode, saj je bilo potrebno tekom postopka priprave vzorca za TEM analizo le-tega segreti na 90 °C. S tem smo presegli temperaturo tališča PCL in PEO, kar je povzročilo spremembe

zgradbe nanovlaken. Na neustreznost metode lahko sklepamo tudi na podlagi signifikantno večjega premera vlaken istega vzorca pri TEM in SEM analizi.

4.3.4.1 Sproščanje pentoksifilina iz dvoslojnih nanovlaken

Rezultati sproščanja pentoksifilina iz nanovlaken V28 in V29 so prikazani na Sliki 41. Pri izračunu deleža sproščene učinkovine smo kot maksimalno količino sproščene učinkovine upoštevali vrednost, ki smo jo izmerili v zadnji proučevani časovni točki, tj. po 528 h oz. 22 dneh. Zavedamo se, da se v tem času verjetno še ni sprostila vsa učinkovina, saj je koncentracija še naraščala, a za prikaz profila sproščanja, je takšen prikaz sprejemljiv. V ločenem poskusu smo skušali določiti vsebnost pentoksifilina v nanovlaknih. Ugotovili smo, da uporabljena emulzijska metoda ni ustrezna, saj zaradi porazdelitve pentoksifilina med obe fazi, znaten del učinkovine ostane v organski fazi, zato naredimo veliko napako, če učinkovino določamo v vodni fazi. Tekom raziskovalnega dela nam torej ni uspelo postaviti metode določanja vsebnosti učinkovine v dvoslojnih nanovlaknih.



Slika 41: Delež sproščene učinkovine v odvisnosti od časa.

Profila sproščanja obeh proučevanih vzorcev kažeta, da je delež sproščene učinkovine v prvih 48 h zelo majhen (Slika 43). Primerjava rezultatov v naslednjih časovnih točkah kaže nepričakovana opažanja. Pri vzorcu V28 se je bistveno hitreje sprostil večji delež pentoksifilina kot v primeru vzorca V29, čeprav smo za izdelavo slednjega uporabili višji pretok notranje faze, kar bi posledično naj vodilo v večji delež vgrajene učinkovine, medtem ko smo za zunanjo fazo v obeh primerih uporabili enak pretok. Na podlagi

kasnejših ugotovitev neustreznosti analizne metode v primeru določanja pentoksifilina sklepamo, da je takšen rezultat posledica napake pri meritvah.

Zaradi neustrezne metode priprave vzorcev za TEM analizo na dobljenih posnetkih sicer nismo mogli potrditi nastanka dvoslojnih nanovlaken, vendar smo lahko na uspešnost izdelave sklepali na podlagi profila sproščanja modelne učinkovine. Sproščanje je podaljšano, kar kaže, da učinkovina ni na površini nanovlaken, ampak je uspešno vključena v polimerni matriks, kar velja za oba vzorca.

Pripravili smo si tudi vzorce sproščanja iz nanovlaken brez vgrajene modelne učinkovine (negativna kontrola). Spektrofotometrična meritev absorbance vzorca pri valovni dolžini 274 nm, ki ustreza absorpcijskemu maksimumu pentoksifilina, je pokazala, da kljub temu, da vzorec ni vseboval učinkovine, le-ta absorbira svetlobo pri isti valovni dolžini kot učinkovina. Torej se je spektrofotometrična analiza tudi v tem primeru izkazala kot neprimerna. Po natančnejši analizi uporabljenih spojin za izdelavo notranjega in zunanega sloja nanovlaken ter meritvah absorbance raztopin teh spojin pri valovni dolžini 274 nm smo ugotovili, da pri merjeni valovni dolžini absorbirajo tudi uporabljeni polimeri in prisotne nečistote. Čeprav se je izmerjena absorbanca v odvisnosti od časa tako v primeru vzorca V28 kot tudi v primeru vzorca V29 večala, nismo mogli ugotoviti, ali je porast absorbance posledica sproščenega pentoksifilina ali drugih sestavin vzorca ali kombinacija obojega. Ponovno smo začeli z iskanjem nove spojine, ki bi jo lahko vgradili v nanovlakna. Izbrali smo barvilo azur, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 633 nm, kar pomeni, da tudi morebitna prisotnost nečistot v nanovlaknih ne moti meritev.

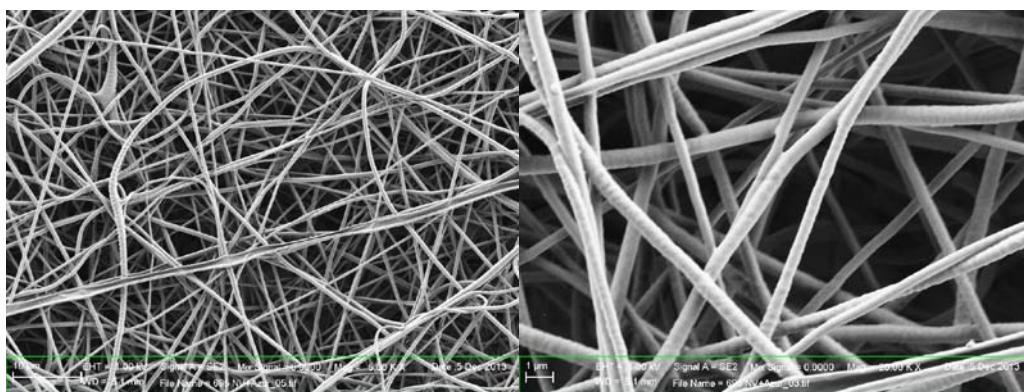
4.3.5 Azur

Glede na uspešne predhodne poskuse izvedbe procesa elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe in z vgrajevanjem učinkovin in barvil smo kot notranjo fazo uporabili zmes PEO in hitosana z 2 % vsebnostjo barvila. Proces elektrostatskega sukanja je bil izvedljiv, ko smo kot zunanjo fazo uporabili 7 % raztopino PCL v kombinaciji z različnimi procesnimi parametri. Po pregledu produktov elektrostatskega sukanja pod invertnim svetlobnim mikroskopom smo izbrali dva, ki smo ju nato natančneje analizirali s SEM analizo (Preglednica XIV).

Preglednica XIV: Parametri izbranih raztopin in procesnih parametrov za izdelavo dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim azurom.

Oznaka vzorca	Masni delež NaI (%)	Koncentracija barvila oz. učinkovine (%)	Razdalja med iglo in zbiralom (cm)	Pretok zunanje faze (ml/h)	Pretok notranje faze (ml/h)	Električna napetost (kV)
V30	0,015	2	15	2	0,21	20
V31	0,015	2	15	2	0,33	20

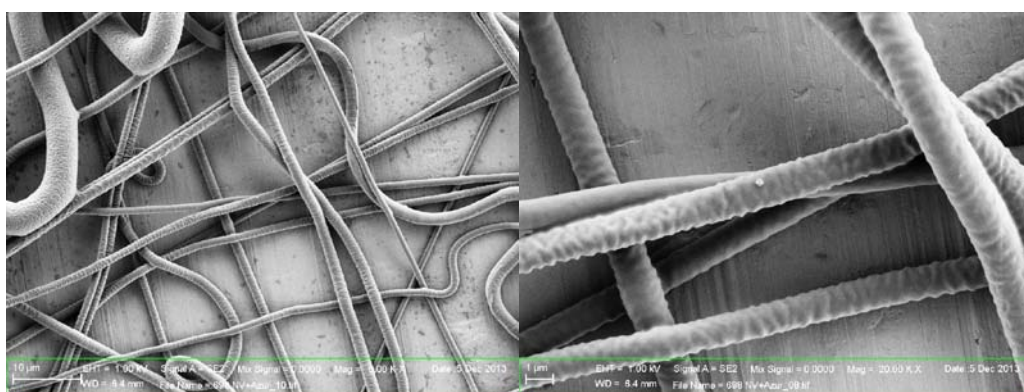
- **Elektrostatsko sukanje vzorca V30**



Slika 42: SEM slike nanovlaken V30 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Na SEM slikah vzorca V30 lahko opazimo, da so s procesom elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe nastala negladka vlakna (Slika 42). Na površini vlaken so vidni drobni delci. Vlakna so enakomerna z majhnim deležem nepravilnosti v morfologiji, kar nakazuje na ustrezno kombinacijo izbranih parametrov. Povprečni premer vlaken znaša (398 ± 87) nm.

- **Elektrostatsko sukanje vzorca V31**

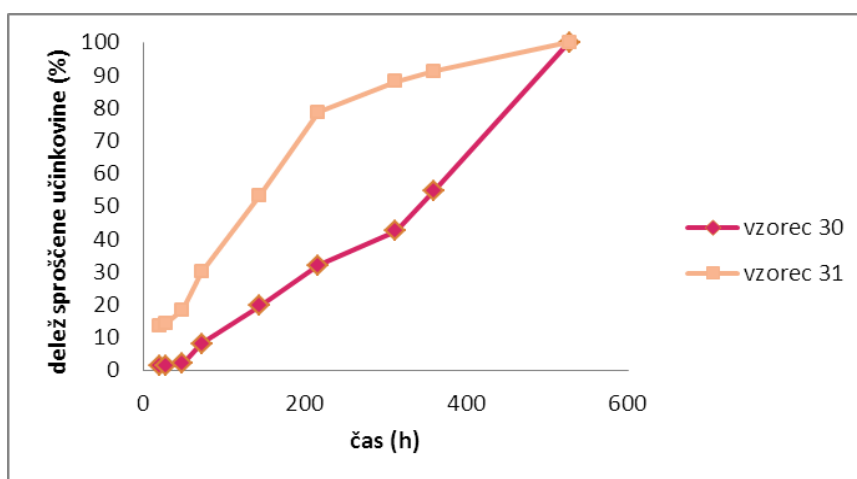


Slika 43: SEM slike nanovlaken V31 pri manjši (levo) in večji (desno) povečavi.

Za razliko od prejšnjega vzorca v primeru vzorca V 31 vidimo veliko več nepravilnosti v morfologiji nastalega produkta (slika 43); poleg tega je površina produkta še manj gladka in na vlaknih so vidni majhni delci, podobno kot pri vzorcu V30. Vlakna niso homogena; so bistveno bolj neenakomerna ter imajo večji povprečni premer, ki znaša (1108 ± 274) nm.

4.3.5.1 Sproščanje barvila azur iz dvoslojnih nanovlaken

Rezultati sproščanja azura iz nanovlaken V30 in V31 so prikazani na Sliki 44. Pri izračunu deleža sproščene učinkovine smo tudi v tem primeru, tako kot pri pentoksifilinu, izmerjeno vrednost po 528 h opredelili kot maksimalno količino sproščene spojine, tj. 100 %.



Slika 44: Delež sproščene barvila v odvisnosti od časa.

Profil sproščanja barvila iz nanovlaken V30 in V31 kaže, da je delež sproščene barvila pri vzorcu V31 ves čas bistveno večji kot v primeru vzorca V30, pri katerem delež sproščene barvila vse do 144 h ne preseže 10 %. Razmeroma velik začetni delež sproščene barvila pri vzorcu V31 lahko pripišemo neuspešnemu vgrajevanju barvila v notranji sloj nanovlaken. Barvilo je očitno ostalo na površini in se je ob stiku z medijem takoj sprostil. Povsem po pričakovanjih je tudi počasnejše sproščanje barvila iz vzorca V30, saj smo pri izdelavi slednjih nanovlaken uporabili manjši pretok notranje faze kot v primeru vzorca V31, kar pomeni, da je delež vgrajenega barvila manjši. Ne glede na razlike v hitrosti in deležu sproščene učinkovine smo v obeh primerih dosegli podaljšano sproščanje, na podlagi česar lahko posredno potrdimo, da so bila izdelana nanovlakna zares dvoslojna.

5. SKLEP

V magistrski nalogi smo najprej proučevali in iskali ustrezne parametre raztopine PCL ter procesne parametre, ki so omogočili izdelavo enoslojnih nanovlaken s procesom elektrostatskega sukanja. Eksperimentalno smo dokazali, da je za izdelavo enoslojnih nanovlaken najprimernejša raztopina z 10 % masnim deležem PCL v zmesi kloroforma in acetona v masnem razmerju 75:25, z 0,030 % NaI in procesnimi parametri: 10 cm razdaljo med iglo in zbiralom, električno napetostjo znotraj intervala 15 kV do 25 kV ter pretokom polimerne raztopine 1,25 ml/h in 2,75 ml/h. Izdelana enoslojna nanovlakna so imela hrapavo in vdolbinasto površino, povprečni premer pa se je nahajal znotraj območja 360–520 nm.

S tem, ko smo uspešno izdelali enoslojna PCL nanovlakna, smo dosegli prvi zastavljen cilj in smo se lotili naslednjega, tj. izdelave dvoslojnih nanovlaken s procesom elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe. Procesne parametre in parametre polimerne raztopine PCL, ki so se pri izdelavi enoslojnih nanovlaken izkazali kot najugodnejši, smo uporabili za izhodišče izdelave ovojnice dvoslojnih nanovlaken. Za jedrni sloj smo uporabili zmes PEO in hitosana, za katero je bilo že v predhodnih raziskavah na Fakulteti za farmacijo ugotovljeno, kakšni morajo biti izbrani parametri, da omogočajo nastanek vlaken. S postopnim spreminjanjem parametrov ter preučevanjem možnosti uspešne izvedbe procesa elektrostatskega sukanja smo prišli do ugotovitev, da je nastanek vlaken uspešen, v kolikor smo za pripravo raztopin z 8 % PCL in 0,03 % NaI, 7 % PCL in 0,015 % NaI, 6 % PCL ter 0,01 % NaI kot topilo uporabili zmes kloroforma in acetona v masnem razmerju 75:25, pri 15 cm razdalji med iglo in zbiralom ter uporabi pretokov zunanje in notranje faze v razmerju 1:6 oz. 1:9. Tudi dvoslojna nanovlakna so imela hrapavo površino, medtem ko se je njihov povprečni premer večal z uporabo višjega pretoka notranje faze in se je nahajal znotraj območja 230–1260 nm.

Z uporabo parametrov, ki so omogočili izdelavo praznih dvoslojnih nanovlaken, smo poskusili še izvedbo procesa elektrostatskega sukanja z uporabo koaksialne šobe za izdelavo dvoslojnih nanovlaken z vgrajenim tartrazinom, natrijevim salicilatom, metilvijoličnim, pentoksifilinom ter azurom. Izdelava nanovlaken je bila uspešna v primeru vgradnje 0,5 % metilvijoličnega, 2 % pentoksifilina ter 2 % azura glede na maso suhih polimerov notranje faze, pri čemer smo kot topilo za pripravo raztopine zunanje faze s 7 % PCL in 0,015 % NaI ponovno uporabili zmes kloroforma in acetona v masnem razmerju

75:25. Najugodnejša je bila 15 cm razdalja med iglo in zbiralom, električna napetost 20 kV, pretok notranje faze 0,21 ml/h ter zunanje faze 2 ml/h, kar ustreza razmerju 1:9.

Tako pri izdelavi enoslojnih nanovlaken kot pri izdelavi dvoslojnih nanovlaken z ali brez učinkovine je prihajalo do hitrega izhlapevanja topila in posledično do sušenja raztopine na konici igle. Zaradi tega je bilo potrebno proces večkrat prekiniti ter odmašiti iglo, da smo lahko zbrali zadostno količino vzorca. Z možnostjo natančnega nadzora nad temperaturo okolja, ki ima zelo velik vpliv na hlapnost organskih topil, bi lahko dosegli izboljšanje izvedbe procesa.

Na uspešno izdelavo dvoslojnih nanovlaken lahko sklepamo na podlagi rezultatov vrednotenja sproščene azura s pomočjo UV/VIS spektrofotometrije. Prišli smo do ugotovitve, da je sproščanje vgrajenih hidrofilnih snovi iz izdelanih nanovlaken podaljšano, kar je značilnost vgrajevanja snovi v jedro dvoslojnih vlaken.

Analizna metoda sproščanja učinkovine ali barvila iz dvoslojnih nanovlaken, kot smo jo uporabili v našem primeru, še ni razvita. Čeprav smo s pomočjo UV/VIS spektrofotometrije dobili okvirne vrednosti sproščene snovi, je potrebno v prihodnje za analizo uporabiti in optimizirati eno izmed metod, ki omogočajo večjo natančnost v zelo nizkem koncentracijskem območju, kot je npr. HPLC.

6. LITERATURA

- 1) Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 2003; 63: 2223–2253.
- 2) Ji W, Yang F, van den Beucken J, Bian Z, Fan M, Chen Z, Jansen JA: Fibrous scaffolds loaded with protein prepared by blend or coaxial electrospinning. *Acta Biomaterialia* 2010; 6: 4199–4207.
- 3) Yan S, Xiaoqiang L, Lianjiang T, Chen H, Xiumei M; Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers for encapsulating and sustained releasing proteins. *Polymer* 2009; 50: 4212–4219.
- 4) Frenot A, Chronakis IS: Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2003; 8: 64–75.
- 5) Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL: Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 1413–1433.
- 6) Sill TJ, von Recum HA: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 1989–2006.
- 7) Luo CJ, Nangrejo M, Edirisinghe M: A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning. *Polymer* 2010; 51: 1654–1662.
- 8) Ziabar M, Mottaghitalab V, Haghi AK: Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2009; 36: 53–62.
- 9) Bhrdwaj N, Kundu SC: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 325–347.
- 10) Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL: Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 1413–1433.
- 11) Nguyen TTT, Chung OH, Park JS: Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 2011; 86: 1799–1806.

-
- 12) Szentivanyi A, Chakradeo T, Zernetsch H, Glasmacher B: Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63: 209–220.
 - 13) Yu DG, Williams GR, Gao LD, Bligh SWA, Yang JH, Wang X: Coaxial electrospinning with sodium dodecylbenzene sulfonate solution for high quality polyacrylonitrile nanofibers. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 2012; 396: 161–168.
 - 14) Sun ZC., Zussman E., Yarin AL, Wendorff JH, Greiner A: Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Materials* 2003; 15: 1929–1932.
 - 15) Liang D, Hsiao BS, Chu B: Functional electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 1392–1412.
 - 16) Liao IC, Chen S, Liu JB, Leong KW: Sustained viral gene delivery through core-shell fibers. *Journal of Controlled Release* 2009; 139: 48–55.
 - 17) Kim TG, Lee DS, Park TG: Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene oxide). *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 338: 276–283.
 - 18) Jiang H, Hu Y, Li Y, Zhao P, Zhu K, Chen W: A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release* 2005; 108: 237–243.
 - 19) Nguyen TTT, Ghoshi C, Hwang SG, Chanunpanich N, Park JS: Porous core/sheath composite nanofibers fabricated by coaxial electrospinning as a potential mat for drug release system. *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 439: 296–306.
 - 20) Moghe A, Gupta B: Co-axial electrospinning for Nanofiber Structures: Preparation and Applications. *Polymer reviews* 2008; 2:353–377.
 - 21) Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Lim TC, Ma Z: *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishing Co., Pte.Ltd, Singapore, 2005.
 - 22) Rošic R., Pelipenko J, Kristl J, Kocbek P, Bešter-Rogač M, Baumgartner S: Physical characteristics of poly (vinyl alcohol) solutions in relation to electrospun nanofiber formation. *European Polymer Journal* 2013, 49: 290–298.

-
- 23) Kocbek P: Novelties in the field of pharmaceutical nanotechnology. *Farmaceutski vestnik* 2012; 63: 75–81.
- 24) Rošic R: Design, formulation and evaluation of biocompatible nanofibers by electrospinning. *Doktorska disertacija*, Ljubljana, 2013.
- 25) Beachley V, Wen X: Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science* 2010; 35: 868–892.
- 26) <http://www.rsc.org/ej/JM/2007/b618508h/b618508h-f3.gif>
(Dostopano: 31. 12. 2013).
- 27) Pelipenko J, Kocbek P, Govedarica B, Rošic R, Baumgartner S, Kristl J: The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013; 84: 401–411.
- 28) Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A: Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 2008; 49: 5603–5621.
- 29) Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P: Wound healing in the 21st century. *American Academy of Dermatology* 2010; 63: 866–881.
- 30) Rošic R, Kristl J, Baumgartner S: Protein loaded hydrogels as dressing for moist wound healing. *Farmaceutski vestnik* 2010; 61: 187–193.
- 31) MacLellan DG: Chronic wound management. *Australian Prescriber* 2000; 23:6–9, <http://www.australianprescriber.com/magazine/23/1/6/9> (Dostopano: 31. 12. 2013).
- 32) Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H: Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances* 2011; 29: 322–337.
- 33) Xi Y, Dong H, Sun K, Liu H, Liu R, Qin Y, Hu Z, Zhao Y, Nie F, Wang S: Scab-Inspired Cytophilic Membrane of Anisotropic Nanofibers for Rapid Wound Healing, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013; 5: 4821–4826.
- 34) Mahfuzur Rahman Chowdhury M: Electrospinning process, nanofiber and their application, <http://www.cottonbangladesh.com/January2009/ElectroSpinning.htm>
(Dostopano: 31. 12. 2013).
- 35) Woodruff MA, Hutmacher DW: The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. *Polymer Science* 2010; 35: 1217–1256.

-
- 36) Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A: Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 278: 1–23.
- 37) Dash TK, Konkimalla VB: Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* 2012; 158: 15–33.
- 38) Van der Schueren L, Steyaert I, De Schoenmaker B, De Clerck K: Polycaprolactone/chitosan blend nanofibers electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydrate Polymers* 2012; 88: 1221–1226.
- 39) Erman A: Chitosan and its possible use in medicine. *Zdrav. Vestn.* 2011; 80: 489–498.
- 40) Pillai CKS, Paul W, Sharma PC: Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 2009; 34: 641–678.
- 41) Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E: Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2011; 36: 981–1014.
- 42) Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H: Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 142–150.
- 43) Shah AP, Bhandary SR: POLYOX (Polyethylene Oxide)- Applications in Pharma Industry. <http://www.pharmainfo.net/reviews/polyox-polyethylene-oxide-applications-pharma-industry> (Dostopano: 31. 12. 2013).
- 44) <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html> (Dostopano: 31. 12. 2013).
- 45) <http://www.scientificpolymer.com/utills/search.asp> (Dostopano: 31. 12. 2013).
- 46) Bertonecelj V, Kocbek P: Razvoj nanovlaken z rastnimi dejavniki in njihov vpliv na celični odziv in vitro. Magistrska naloga, Ljubljana, 2013.