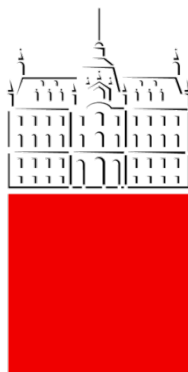


UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



URŠA NAGODE

POVEČEVANJE TOPNOSTI IN HITROSTI RAZTAPLJANJA KARVEDILOLA Z  
ELEKTROSTATSKIM SUKANJEM

SOLUBILITY AND DISSOLUTION RATE IMPROVEMENT OF CARVEDILOL BY  
ELECTROSPINNING

Ljubljana, 2015

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, mag. farm., na Kemijskem inštitutu, Ljubljana.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Petri Kocbek, mag. farm., za vse razprave, strokovne nasvete in znanja, ki mi jih je predala med pripravo magistrske naloge. Zahvaljujem se asist. dr. Zoranu Lavriču za pomoč pri izvedbi DSC in TGA analiz. Prav tako bi se zahvalila vsem ostalim s Katedre za farmacevtsko tehnologijo za pomoč in nasvete, ki so mi jih nudili.

Zahvaljujem se farmacevtskemu podjetju Krka d.d., ki mi je s podelitvijo štipendije omogočilo kvaliteten študij ter kvalitetno pisanje magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi očetu Romanu in materi Silvi, bratu Maticu, fantu Klemenu ter preostalim družinskim članom in prijateljem, ki so mi nudili podporo v času celotnega študija in mi tako pomagali na poti do zelenega cilja.

### **Izjava**

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

Urša Nagode

# KAZALO VSEBIN

POVZETEK .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS.....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV .....	IX
1 UVOD .....	1
1.1 TOPNOST IN HITROST RAZTAPLJANJA.....	1
1.2 ELEKTROSTATSKO SUKANJE .....	3
1.2.1 Izvedba elektrostatskega sukanja.....	4
1.2.2 Vpliv parametrov na proces elektrostatskega sukanja.....	7
1.3 NANOVLAKNA .....	10
1.3.1 Povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja z vgrajevanjem učinkovin v polimerna nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja .....	11
1.4 SESTAVINE NANOVLAKEN V NAŠI RAZISKAVI.....	12
1.4.1 Polietilenoksid (PEO).....	12
1.4.2 Poloksameri .....	13
1.4.3 Karvedilol .....	14
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE .....	17
3.1 MATERIALI .....	17
3.2 NAPRAVE.....	17
3.3 METODE.....	18
3.3.1 Določanje topnosti karvedilola v prečiščeni vodi.....	18
3.3.2 Določanje topnosti karvedilola v raztopinah polimerov.....	18
3.3.3 Priprava suspenzij in nanosuspenzije karvedilola v raztopinah polimerov za izdelavo nanovlaken .....	21

3.3.4	Izdelava nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja .....	22
3.3.5	Izdelava filmov iz suspenzij in nanosuspenzij .....	23
3.3.6	Proučevanje morfoloških lastnosti vzorcev .....	23
3.3.7	Vrednotenje sproščanja učinkovine.....	24
3.3.8	Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	25
3.3.9	Termogravimetrična analiza (TGA) .....	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	27
4.1	TOPNOST KARVEDILOLA V PREČIŠČENI VODI .....	27
4.2	TOPNOST KARVEDILOLA V RAZTOPINAH POLIMEROV .....	27
4.2.1	Vpliv polimerov na rezultate določanja topnosti karvedilola v raztopinah polimerov .....	29
4.3	PRIPRAVA SUSPENZIJ IN NANOSUSPENZIJE KARVEDILOLA V RAZTOPINAH POLIMEROV IN IZDELAVA NANOVLAKEN Z METODO ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA.....	32
4.4	IZDELAVA FILMOV IZ SUSPENZIJ IN NANOSUSPENZIJE KARVEDILOLA .....	40
4.5	VREDNOTENJE SPROŠČANJA UČINKOVINE.....	41
4.5.1	Homogenost pripravljene fizikalne zmesi karvedilola s polimeri .....	44
4.5.2	Nosilec za filme in nanovlakna pri preskusu raztapljanja karvedilola .....	44
4.5.3	Način odvzema vzorcev pri preskusu sproščanja .....	45
4.5.4	Vpliv polimerov na rezultate spektrofotometričnega določanja karvedilola .....	46
4.6	UČINKOVITOST VGRAJEVANJA KARVEDILOLA V NANOVLAKNA IN FILME .....	46
4.7	KRISTALINIČNOSTI KARVEDILOLA .....	49
4.8	ANALIZA VSEBNOSTI VLAGE V VZORCIH .....	52
5	SKLEP.....	54
6	LITERATURA.....	56

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> <i>Naprava za elektrostatsko sukanje (a) in shematski prikaz izdelave nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja (19) (b).</i> .....	6
<b>Slika 2:</b> <i>Nanovlakna s sferičnimi (a) in vretenastimi vozli (b) ter enakomerna nanovlakna brez vozlastih struktur (c).</i> .....	8
<b>Slika 3:</b> <i>Strukturna formula PEO: n-število enot etilenoksida.</i> .....	12
<b>Slika 4:</b> <i>Strukturna formula poloksamerov: a-število enot etilenoksida, b-število enot propilenoksida (36).</i> .....	13
<b>Slika 5:</b> <i>Strukturna formula karvedilola z označenim kiralnim centrom (33).</i> .....	14
<b>Slika 6:</b> <i>Steklena palčka, kot nosilec za filme in nanovlakna (a), in steklena palčka v posodi Apparatus 2 naprave med preskusom sproščanja (b).</i> .....	25
<b>Slika 7:</b> <i>SEM sliki nanovlaken, izdelanih iz suspenzije <math>S_{6a}</math> (a) in polimerne raztopine <math>PR_{6a}</math> (b).</i> .....	34
<b>Slika 8:</b> <i>Izolirana komora za izvedbo elektrostatskega sukanja (s sušilnim sredstvom) (a) in SEM slika nanovlaken, izdelanih iz suspenzije <math>S_{6a}</math> pri RV 30 % (izdelana v izolirani komori) (b).</i> .....	34
<b>Slika 9:</b> <i>Nanovlakna, izdelana iz suspenzije <math>S_{6b}</math> pri večji ((a) in (b)) ter manjši (c) povečavi. Prašek karvedilola pri manjši (d) in večji (e) povečavi. Z rdečo so označeni večji kristali karvedilola, ki se vgradijo med nanovlakna. Z rumeno so označeni kristali karvedilola, ki so dovolj majhni, da se lahko vgradijo v notranjost nanovlaken. Z zeleno so označene zadebelitve nanovlaken, kjer so glede na obliko in velikost lahko vključeni manjši kristali karvedilola, označeni na sliki (e) z rumeno barvo.</i> .....	36
<b>Slika 10:</b> <i>SEM slika nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije karvedilola v raztopini polimerov (<math>NS_{6b}</math>). Z zeleno so označene zadebelitve nanovlaken, ki verjetno predstavljajo manjše kristale karvedilola, ki so se vgradili v notranjost nanovlaken.</i> .....	37
<b>Slika 11:</b> <i>Kristali karvedilola v nanovlaknih, izdelanih iz <math>NS_{6b}</math> pri manjši (a) in večji (b) povečavi.</i> .....	38
<b>Slika 12:</b> <i>Vzorec nanovlaken, izdelanih z elektrostatskim sukanjem suspenzije <math>S_{6b}</math> (a) in nanosuspenzije <math>NS_{6b}</math> (b) karvedilola na aluminijasti foliji.</i> .....	39
<b>Slika 13:</b> <i>SEM slika filma, izdelanega iz suspenzije karvedilola <math>S_{6b}</math> (površina filma (a), rob oz. prerez filma (b)), in SEM slika filma, izdelanega iz nanosuspenzije <math>NS_{6b}</math> (c).</i> .....	40

<b>Slika 14:</b> Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken, filmov in fizikalne zmesi v časovnem intervalu 0–540 min (a) ter časovnem intervalu 0–120 min (b). Graf na sliki 14 (b) je izsek grafa na sliki 14 (a).	41
<b>Slika 15:</b> Profil sproščanja karvedilola iz nanovlaken, ki smo jih izdelali iz suspenzije $S_{6b}$ . Pri preskusu sproščanja smo kombinirali avtomatsko in ročno odvzemanje vzorcev.	46
<b>Slika 16:</b> Elektrostatsko sukanje in možni mehanizmi za nepopolno vgrajevanje karvedilola v nanovlakna.	48
<b>Slika 17:</b> DSC krivulje poloksamera 407, PEO, karvedilola in fizikalne zmesi karvedilola in polimerov v masnem razmerju 1:2:2 (karvedilol:poloksamer 407:PEO).	49
<b>Slika 18:</b> DSC krivulje karvedilola, poloksamera 407 in PEO ter filma in nanovlaken, izdelanih iz suspenzije $S_{6b}$ .	50
<b>Slika 19:</b> DSC krivulje karvedilola, poloksamera 407 in PEO ter filma in nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije $NS_{6b}$ .	50
<b>Slika 20:</b> TGA termogram fizikalne zmesi, filma, izdelanega iz nanosuspenzije $NS_{6b}$ , filma, izdelanega iz suspenzije $S_{6b}$ , nanovlaken, izdelanih iz suspenzije $S_{6b}$ , in nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije $NS_{6b}$ .	53

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Podajanje stopnje topnosti (pri temperaturi 15–25 °C) (6).	2
<b>Preglednica II:</b> Sestava polimernih raztopin.	19
<b>Preglednica III:</b> Sestava suspenzij karvedilola v raztopinah polimerov.	20
<b>Preglednica IV:</b> Parametri elektrostatskega sukanja za izdelavo nanovlaken s karvedilolom.	23
<b>Preglednica V:</b> Topnost karvedilola v vodnih raztopinah polimerov.	28
<b>Preglednica VI:</b> Vpliv polimerov na spektrofotometrično določanje karvedilola. Kot slepi vzorec smo pri analizi uporabili prečiščeno vodo.	30
<b>Preglednica VII:</b> Vpliv polimerov na spektrofotometrično določanje karvedilola. Kot slepi vzorec smo pri analizi uporabili raztopino polimerov.	31
<b>Preglednica VIII:</b> Učinkovitost vgrajevanja karvedilola v nanovlakna in filme.	46

## POVZETEK

Majhna topnost in nizka hitrost raztapljanja zdravilnih učinkovin sta danes veliki težavi, s katerima se srečuje farmacevtska industrija, zato veliko časa nameni razvoju in optimizaciji metod, ki bi izboljšale topnost in hitrost raztapljanja takšnih učinkovin. Eno takšnih metod predstavlja tudi vgrajevanje težko topnih učinkovin v nanovlakna.

Namen magistrskega dela je bil povečati topnost in hitrost raztapljanja karvedilola, ki je v vodi skoraj netopna lipofilna zdravilna učinkovina, z njegovo vgradnjo v polimerna nanovlakna iz polietilenoksida in poloksamera 407. Nanovlakna smo izdelali z metodo elektrostatskega sukanja iz suspenzije in nanosuspenzije karvedilola v vodni raztopini polimerov. Preden smo se lotili izdelave nanovlaken, smo preverili vpliv uporabljenih polimerov na topnost karvedilola. Ugotovili smo, da poloksamer 407 poveča topnost karvedilola v vodi, najverjetneje z mehanizmom solubilizacije, medtem ko polietilenoksid nima bistvenega vpliva na topnost učinkovine. Topnost karvedilola je bila v raztopini s 3 % (m/m) poloksamera 407 kar ~10-krat večja od topnosti učinkovine v prečiščeni vodi. Z vrstično elektronsko mikroskopijo smo potrdili, da smo nanovlakna uspešno izdelali; njihova morfologija pa je bila odvisna predvsem od koncentracije polimerov v raztopini. Večja koncentracija polimerov je omogočila izdelavo nanovlaken brez vozlastih struktur. Hitrost sproščanja karvedilola iz nanovlaken je bila višja kot hitrost sproščanja karvedilola iz filmov z enako sestavo in iz fizikalne zmesi polimerov in karvedilola. Višja hitrost sproščanja učinkovine iz nanovlaken je bila verjetno posledica neposrednega stika učinkovine s polimeroma, velike površine in poroznosti nanovlaken ter pretvorbe dela karvedilola iz kristalne v amorfno obliko. Na krivulji diferenčne dinamične kalorimetrije nanovlaken nismo opazili vrha pri temperaturi tališča kristalne oblike karvedilola, kar je verjetno posledica raztapljanja kristalov karvedilola v talini polimerov med segrevanjem vzorcev pri analizi. Določen delež karvedilola je med elektrostatskim sukanjem lahko prešel iz kristalne v amorfno obliko, a tega zaradi raztapljanja karvedilola v talini polimerov nismo uspeli zagotovo potrditi. Termogravimetrična analiza je pokazala zanemarljivo vsebnost vlage v izdelanih vzorcih, kar dokazuje, da vlaga ni imela pomembnega vpliva na rezultate izvedenih testov. Z raziskovalnim delom smo pokazali, da nanovlakna iz polietilenoksida in poloksamera 407 predstavljajo sodoben in obetaven način povečevanja topnosti in hitrosti raztapljanja težko topnih učinkovin.

## **ABSTRACT**

Low solubility and low dissolution rate of drugs represent nowadays great challenges for pharmaceutical industry; therefore, a lot of time is devoted to the development and optimization of methods, which would improve the solubility and dissolution rate of poorly soluble drugs. One of such methods is their incorporation into nanofibres.

The aim of the master thesis was to increase the solubility and dissolution rate of carvedilol, which is practically insoluble, lipophilic drug, via its incorporation into polymer nanofibres of polyethylene oxide and poloxamer 407. Nanofibres were produced from carvedilol suspension and nanosuspension in aqueous polymer solution by electrospinning. Before the nanofibres have been produced, the influence of the polymers used on solubility of carvedilol was examined. Poloxamer 407 increased the solubility of carvedilol in water, most likely due to the solubilization, while the polyethylene oxide did not exert any significant impact on the solubility of the drug. The solubility of carvedilol in 3% (m/m) poloxamer 407 solution was ~10-times higher than the solubility of the drug in purified water. Morphology of nanofibers was mainly dependent on the polymer concentration in solution. Higher concentrations of polymers enabled the production of beadless nanofibres. The rate of carvedilol release from the nanofibres was higher compared to its release from the films, with identical composition, and from the physical mixture of polymers and carvedilol. Faster drug release rate from the nanofibers was most likely due to the direct contact of the drug with polymers, the large surface area and porosity of the nanofibres and the partial conversion of carvedilol from crystalline to amorphous form. On the differential scanning calorimetry curve of nanofibres no peak was observed at the melting point of the crystalline form of carvedilol, which was most likely due to the dissolution of carvedilol crystals in the polymer melt, since the sample was heated during the analysis. A certain proportion of carvedilol could have changed from crystalline to amorphous form during the electrospinning, however, due to the carvedilol dissolution in the polymer melt the latter could not be confirmed with sufficient certainty. Thermogravimetric analysis showed negligible content of the moisture in the produced samples; therefore, the moisture had no significant impact on the results of the performed tests. With our research we have shown that nanofibres from polyethylene oxide and poloxamer 407 represent a modern and promising approach to increase the solubility and dissolution rate of poorly soluble drugs.



## **KLJUČNE BESEDE/KEYWORDS**

Karvedilol, nanovlakna, polietilenoksid, poloksamer, topnost.

Carvedilol, nanofibers, polyethyleneoxide, poloxamer, solubility

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

CMC: kritična micelska koncentracija

DSC: diferenčna dinamična kalorimetrija

NS: nanosuspenzija

PAS: površinsko aktivna snov

PCL: polikaprolakton

PEG: polietilenglikol

PEO: polietilenoksid

PGA: poliglikolna kislina

PLA: polimlečna kislina

PR: polimerna raztopina

RV: relativna vlažnost

PVA: polivinilakohol

S: suspenzija

SD: standardna deviacija

SEM: vrstična elektronska mikroskopija

T<sub>g</sub>: temperatura steklastega prehoda

TGA: termogravimetrična analiza

T<sub>max</sub>: temperatura taljenja

T<sub>onset</sub>: začetna temperatura taljenja

w: masni delež

# 1 UVOD

## 1.1 *TOPNOST IN HITROST RAZTAPLJANJA*

Pred dobrimi stotimi leti so fizikalni kemiki pričeli proučevati proces raztapljanja snovi. Prve raziskave na področju raztapljanja snovi sta leta 1897 izvedla Noyes in Whitney in s tem postavila temelj za vse nadaljnje raziskave na tem področju. Okoli leta 1950 so raziskovalci prišli do spoznanja, da proces raztapljanja snovi pomembno vpliva na biološko uporabnost snovi, kar je na področju farmacije močno povečalo zanimanje za proučevanje raztapljanja zdravilnih učinkovin (1).

Slaba topnost in hitrost raztapljanja zdravilnih učinkovin v vodi je danes ena pglavitnih težav v farmacevtskem razvoju in farmacevtski industriji. V zadnjih nekaj desetletjih je prišlo do hitrega razvoja kombinatorne kemije in metod rešetanja visoke zmogljivosti, s katerimi odkrivamo vedno več potencialnih zdravilnih učinkovin s slabo vodotopnostjo in nizko hitrostjo raztapljanja (2, 3). Približno 70 % na novo odkritih potencialnih zdravilnih učinkovin izkazuje slabo topnost v vodi, kar 40 % vseh peroralnih farmacevtskih oblik (FO) s takojšnjim sproščanjem, trenutno prisotnih na tržišču, pa vsebuje učinkovino, ki je skoraj netopna (4). Med učinkovine s slabo topnostjo spadajo med drugimi tudi fenitoin, sulfatazol, kloramfenikol, karvedilol in še številne druge. Danes je tako eden glavnih izzivov farmacevtske industrije razvoj učinkovitih metod za povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja slabo topnih učinkovin. Posledica večje topnosti in hitrosti raztapljanja sta boljša biološka uporabnost zdravilnih učinkovin ter manj stranskih učinkov, saj za doseganje enakega terapevtskega učinka potrebujemo manjši odmerek učinkovine, kar vodi v boljše klinične izide zdravljenja (2, 3, 5).

Topnost (intrinzična) je lastnost snovi in predstavlja maksimalno koncentracijo te snovi, ki z danim volumnom topila daje nasičeno homogeno molekularno disperzijo. Topnost snovi je torej enaka koncentraciji nasičene raztopine te snovi v danem topilu. Topnost lahko podamo kot absolutno topnost (točna koncentracija topljenca v topilu pri znanih pogojih) ali pa jo podamo kot stopnjo topnosti (topnost podamo znotraj določenih meja), kakor jo podaja tudi Evropska farmakopeja in kot je predstavljeno v preglednici I (6, 7).

**Preglednica I: Podajanje stopnje topnosti (pri temperaturi 15–25 °C) (6).**

Opis	Približen volumen topila v mililitrih na gram topljenca
Zelo lahko topen	manj kot 1
Lahko topen	od 1 do 10
Topen	od 10 do 30
Zmerno topen	od 30 do 100
Težko topen	od 100 do 1000
Zelo težko topen	od 1000 do 10000
Skoraj netopen	več kot 10000
<p><b>Opis "delno topen" opisuje zmes, v kateri se topijo le nekatere sestavine.</b></p> <p><b>Opis "meša se" označuje tekočino, ki se meša v vseh razmerjih z navedenim topilom.</b></p>	

Hitrost raztapljanja se nanaša na hitrost prehoda snovi iz trdnega agregatnega stanja v raztopino tj. v obliko, ki je na voljo za absorpcijo (7). Hitrost raztapljanja učinkovin podajamo z modificirano Noyes-Whitneyevo enačbo (enačba 1):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD(C_s - C)}{h} \quad \text{Enačba 1}$$

V enačbi 1 je  $dc/dt$  hitrost raztapljanja učinkovine,  $A$  površina učinkovine, na voljo za raztapljanje,  $D$  difuzijski koeficient učinkovine,  $h$  debelina difuzijske plasti,  $c_s$  topnost učinkovine v mediju za raztapljanje in  $c$  koncentracija učinkovine ob času  $t$  (3, 7).

Iz Noyes-Whitneyeve enačbe lahko razberemo nekaj najpomembnejših pristopov za povečevanje hitrosti raztapljanja učinkovine. Prvi pristop za povečanje hitrosti raztapljanja je povečanje površine, ki je na voljo za raztapljanje, kar lahko dosežemo z zmanjšanjem velikosti delcev učinkovine (izdelava nanosuspenzij, mletje delcev učinkovine z uporabo različnih mlinov) ali z izboljšanjem močenja površine snovi, ki se raztaplja (dodatek močljivcev, npr. poloksamera 407). Hitrost raztapljanja lahko povečamo tudi tako, da stanjšamo debelino difuzijske plasti, tako da zagotovimo "sink" pogoje (pogoji, pri katerih že raztopljen snov ne vpliva na topnost preostale neraztopljene snovi; navadno jih dosežemo, ko je volumen medija, v katerem poteka raztapljanje, vsaj 3–10-krat večji od

volumna medija nasičene raztopine (8)) in tako, da povečamo topnost učinkovine (3, 9). Topnost učinkovine lahko povečamo s številnimi kemijskimi in fizikalnimi metodami. Najpogosteje uporabljeni kemijski metodi sta tvorba soli in izdelava topnih predzdravil. Med fizikalne metode pa uvršamo solubilizacijo učinkovine (uporaba ustreznih površinsko aktivnih snovi (PAS)), tvorbo kompleksov učinkovine s ciklodekstrini, izdelavo kokristalov, uporabo sotopil, pretvorbo učinkovine v amorfno obliko (amorfna oblika ima v večini primerov boljšo topnost kot kristalna oblika), izdelavo trdnih disperzij, uravnavanjem pH formulacije, uporabo polimorfov/psevdopolimorfov (2, 3, 4, 10).

## 1.2 **ELEKTROSTATSKO SUKANJE**

Elektrostatsko sukanje je ena izmed metod za izdelavo nanovlaken običajno iz polimernih raztopin, lahko pa tudi iz talin polimerov. Metodo je kot prvi patentiral Formhals leta 1934. Čeprav je metoda relativno stara, zanimanje za njeno uporabo iz leta v leto narašča. V zadnjem desetletju je elektrostatsko sukanje podvrženo hitremu razvoju in je deležno velike pozornosti raziskovalcev na številnih področjih (npr. biomedicina, elektronika, tekstilna industrija, farmacija), predvsem zaradi številnih prednosti, ki jih ima pred ostalimi metodami izdelave nanovlaken (11, 12).

Poleg elektrostatskega sukanja lahko za izdelavo nanovlaken uporabimo metode, kot so vlečenje (*ang. drawing*), uporaba predložnih membran (*ang. template synthesis*), fazna separacija (*ang. phase separation*) in samozdruževanje (*ang. self-assembly*), vendar so te metode zamudne, zahtevne za izvedbo, ne omogočajo kontinuirane izdelave nanovlaken ter so omejene na majhno število polimerov, iz katerih lahko izdelamo nanovlakna (11, 12, 13).

- ***Prednosti elektrostatskega sukanja***

Elektrostatsko sukanje, katerega osnovni princip je opisan v poglavju 1.2.1, je enostaven enostopenjski postopek, ki omogoča izdelavo nanovlaken iz najrazličnejših naravnih in sinteznih polimerov (11, 12, 13, 14, 15). Je edina metoda, ki omogoča kontinuirano izdelavo nanovlaken (11). Izdelava nanovlaken s to metodo je relativno poceni in omogoča izdelavo nanovlaken z manjšim premerom in posledično večjo površino kot ostale metode izdelave nanovlaken (11, 15). Omogoča izdelavo nanovlaken iz polimernih raztopin in talin ter vgrajevanje mikro/nano delcev v izdelana nanovlakna. V polimerni raztopini/talini lahko dispergiramo mikro/nanometriške delce snovi (npr. zdravilne učinkovine), ki se med elektrostatskim sukanjem vgradijo v polimerno ogrodje nastalih nanovlaken (10, 12, 15). V

izdelana nanovlakna lahko s postopkom elektrostatskega sukanja vgradimo različne pomožne snovi, kot so ciklodekstrini, površinsko aktivne snovi in sladila (13, 16). Celoten postopek elektrostatskega sukanja praviloma poteka pri sobni temperaturi in atmosferskih pogojih, kar omogoča izdelavo nanovlaken tudi s termolabilnimi sestavinami (10, 11). Elektrostatsko sukanje je zaradi svojih številnih prednosti danes edina metoda izdelave nanovlaken, ki je potencialno primerna za masovno kontinuirano izdelavo nanovlaken in tako prehod iz laboratorijskega na industrijski nivo (*ang. scale up*) (12, 13). Elektrostatsko sukanje je tudi zelo prilagodljiva metoda, saj lahko s prilagajanjem procesnih parametrov, parametrov polimerne raztopine, z izbiro ustreznih polimerov in izvedb zbirala vplivamo na lastnosti izdelanih nanovlaken in jih tako prilagodimo namenu njihove uporabe (npr. površinske lastnosti, poroznost, masa, trdnost nanovlaken) (11, 12).

- ***Slabosti elektrostatskega sukanja***

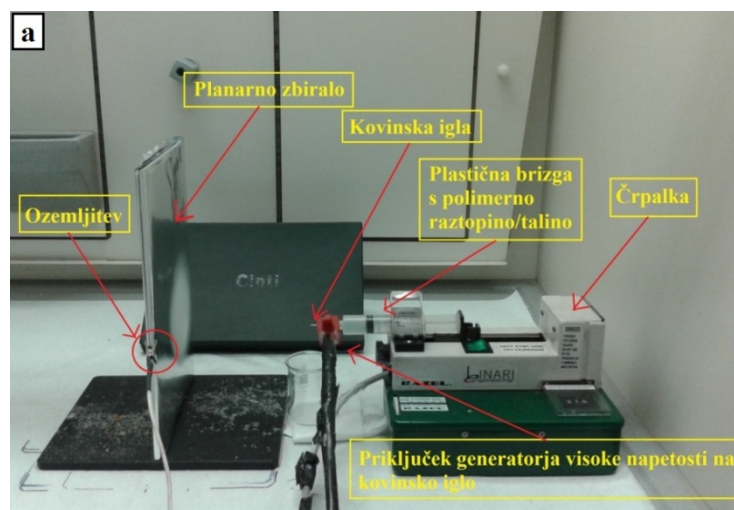
Kljub številnim prednostim, ki jih nudi elektrostatsko sukanje, je nizka produktivnost (tj. količina nanovlaken, ki jih izdelamo na enoto časa) te metode njena največja slabost, ki omejuje njeno uporabo v industrijskem merilu (10). Da bi se izognili tej omejitvi, številni raziskovalci skušajo optimizirati postopek elektrostatskega sukanja tako, da bi omogočal večjo proizvodnjo nanovlaken. V ta namen so razvili različne modificirane osnovne metode elektrostatskega sukanja, kot so metoda multiplih šob (*ang. multiple nozzles system*), elektrostatsko sukanje s prosto površino (*ang. free surface electrospinning*), dvoslojno elektrostatsko sukanje (*ang. two-layer electrospinning system*) in elektrostatsko sukanje z mehurčki (*ang. bubble electrospinning* ali *gas-jet electrospinning*) (10, 11, 12). Namen vseh naštetih metod je povečati število curkov, ki se tvorijo med elektrostatskim sukanjem, in s tem hitrost izdelave nanovlaken v primerjavi s klasičnim elektrostatskim sukanjem, ki temelji na enem samem curku (*ang. singl-jet electrospinning*).

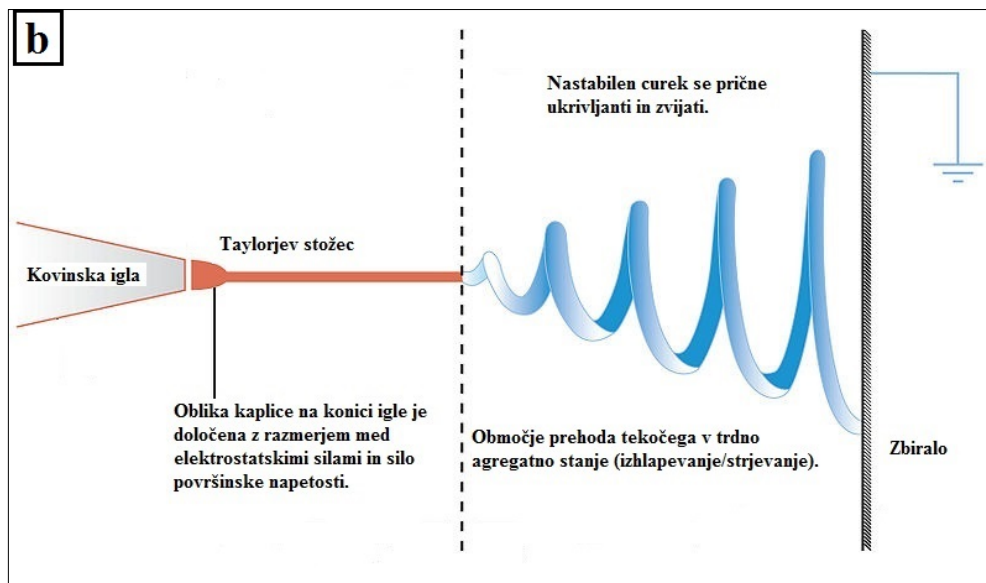
### **1.2.1 Izvedba elektrostatskega sukanja**

Naprava za elektrostatsko sukanje je sestavljena iz treh osnovnih komponent: brizge s kovinsko iglo majhnega premera, vira visoke napetosti z negativno ali pozitivno polarnostjo in kovinskega ozemljenega zbirala (12, 15). Primer opisane naprave je predstavljen na sliki 1(a).

Izdelavo nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja pričnemo s pripravo polimerne raztope ali taline z ustreznimi lastnostmi, ki omogočajo izvedbo elektrostatskega sukanja (ustrezna površinska napetost, prevodnost, viskoznost, koncentracija polimera v raztopini).

Pripravljeno polimerno raztopino/talino napolnimo v brizgo in jo s pomočjo črpalke, potisnega plina ali sile gravitacije potiskamo skozi kovinsko iglo majhnega premera, pri čemer na konici kovinske igle nastane viseča kapljica polimerne raztopine/taline. Kovinsko iglo povežemo z virom visoke napetosti ter tako omogočimo nastanek električnega polja med konico igle in zbiralom ter v polimerno raztopino/talino uvedemo električni naboj, ki se razporedi po površini kapljice. S povečevanjem napetosti pričnejo v kapljici naraščati odbojne sile med enakimi naboji in hkrati naraščati privlačne sile med nabito kapljico in ozemljenim zbiralom. Omenjeni sili težita k raztezanju kapljice in k tvorbi curka, čemur pa nasprotuje sila površinske napetosti tekočine. Ko je napetost dovolj visoka, se elektrostatične sile izenačijo s silo površinske napetosti in v stanju ravnotežja sil se hemisferična oblika kapljice preoblikuje v Taylorjev stožec (slika 1(b)). Z nadaljnjim povečevanjem napetosti električne sile presežejo silo površinske napetosti, kar vodi v raztezanje Taylorjevega stožca in nastanek nabitega curka, ki potuje proti ozemljenemu zbiralu. Curek polimerne raztopine/taline je na poti od konice igle do zbirala podvržen številnim nestabilnostim. Nestabilnosti povzročijo, da pot curka do zbirala ni ravna, ampak se curek prične ukrivljati in zvijati, kar podaljša pot in čas potovanja curka do zbirala (slika 1(b)). Med potovanjem se curek razteza in tanjša, kar vodi v povečevanje njegove površine. Zaradi velike površine curka pride do zelo hitrega izhlapevanja topila polimerne raztopine oz. strjevanja polimerne taline že pri sobni temperaturi, kar vodi v nastanek trdnih nanovlaknen, ki se zberejo na ozemljenem zbiralu. Najpogosteje uporabljeno zbiralo je planarno zbiralo, na katerem se zberejo neurejena oz. naključno urejena nanovlakna. Namesto planarnega lahko uporabimo tudi rotirajoče cilindrično zbiralo, zbiralo v obliki okvirja ali zbiralo v obliki bobna, ki omogočajo, da se vlakna med zbiranjem uredijo (10, 11, 12, 15, 17, 18, 19).





**Slika 1:** Naprava za elektrostatsko sukanje (a) in shematski prikaz izdelave nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja (b) (20).

- **Polimeri, ki omogočajo izdelavo nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja**

Z izbiro polimera pomembno vplivamo na številne lastnosti izdelanih nanovlaken (npr. poroznost, mehansko trdnost, površinske lastnosti, hitrost razgradnje, termično stabilnost) (17). Številni polimeri, tako naravnega, kot sinteznega izvora, omogočajo izdelavo nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja (11). Le-ti lahko imajo tako hidrofilne, hidrofobne, kot amfifilne lastnosti (12). Naravni polimeri v primerjavi s sintezniimi večinoma izkazujejo boljšo biokompatibilnost in nižjo imunogenost, ki sta želeni lastnosti predvsem pri nanovlaknih, ki jih uporabljamo v biomedicinske namene (11, 14). Do danes je raziskovalcem uspelo s postopkom elektrostatskega sukanja izdelati nanovlakna že iz številnih naravnih polimerov, kot so želatina, hitosan, hialuronska kislina in kolagen (11, 14). Glavno omejitev pri izdelavi nanovlaken iz naravnih polimerov pa predstavlja delna denaturacija polimerov, do katere pride med procesom elektrostatskega sukanja (11). Prednost sinteznih polimerov pred naravnimi je, da jih lahko obdelamo oz. preoblikujemo in tako prilagodimo njihove lastnosti, kot so mehanske lastnosti (npr. viskoelastičnost, trdnost) in hitrost razgradnje, različnim potrebam oz. področjem uporabe (11). Za izdelavo nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja uporabljamo sintezne polimere, kot so biorazgradljivi poliestri (polikaprolakton (PCL), polimlečna kislina (PLA), poliglikolna kislina (PGA)) (11), polietilenoksid (PEO) (21), polivinilalkohol (PVA) (22) in številne druge.

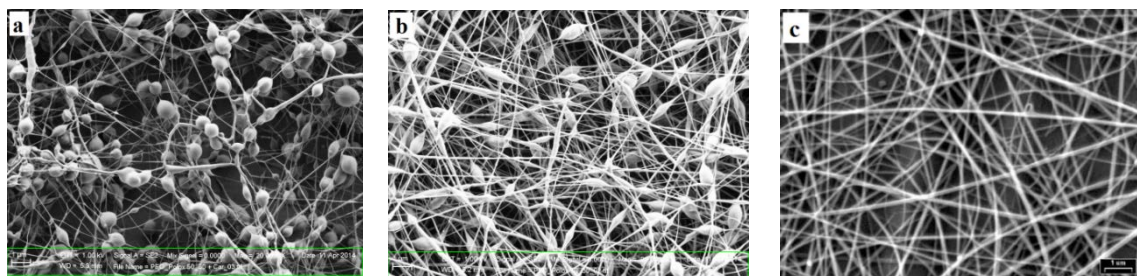
## 1.2.2 Vpliv parametrov na proces elektrostatskega sukanja

Na proces elektrostatskega sukanja in lastnosti izdelanih nanovlaken (predvsem morfološke lastnosti) vplivajo številni parametri, ki jih lahko razdelimo v tri osnovne skupine: procesni parametri, parametri polimerne raztopine oz. polimerne taline in parametri okolja. Z ustrezno prilagoditvijo vseh parametrov lahko izdelamo nanovlakna z želenim premerom in želenimi morfološkimi lastnostmi (11, 14).

### 1.2.2.1 Parametri polimerne raztopine

- **Koncentracija polimera**

Koncentracija polimera v polimerni raztopini določa, ali bo med elektrostatskim sukanjem prišlo do nastanka nanovlaken, in pomembno vpliva na morfologijo ter premer izdelanih nanovlaken. Koncentracija polimera je tesno povezana s površinsko napetostjo in viskoznostjo, ki sta prav tako pomembna parametra polimerne raztopine. Za raztopino vsakega polimera obstaja koncentracijski interval, znotraj katerega lahko s postopkom elektrostatskega sukanja izdelamo nanovlakna. Deitzel s sodelavci je uspel izdelati nanovlakna iz vodne raztopine PEO znotraj koncentracijskega območja 4–10 % (m/m) (21). Če je koncentracija polimera nižja od minimalne koncentracije koncentracijskega intervala, se curek na poti do zbirala, zaradi nizke viskoznosti in visoke površinske napetosti, lomi in namesto nanovlaken pride do nastanka kapljic polimerne raztopine. Če koncentracija polimera preseže maksimalno koncentracijo koncentracijskega intervala, je zaradi visoke viskoznosti onemogočen konstanten pretok polimerne raztopine skozi kovinsko iglo in tvorba nanovlaken ni mogoča. Kadar je koncentracija polimera nizka, a znotraj koncentracijskega intervala, ki omogoča tvorbo nanovlaken, pogosto pride do tvorbe nanovlaken s prisotnimi vozlastimi strukturami. Z naraščanjem koncentracije polimera se sferična oblika vozlov spremeni v vretenasto obliko. Z nadaljnjim naraščanjem koncentracije vozli izginejo in tvorijo se enakomerna nanovlakna brez vozlastih struktur (slika 2).





**Slika 2:** Nanovlakna s sferičnimi (**a**) in vretenastimi vozli (**b**) ter enakomerna nanovlakna brez vozlastih struktur (**c**).

Koncentracija polimera ima poleg vpliva na morfologijo nanovlaken pomemben vpliv tudi na njihov premer. Praviloma z naraščanjem koncentracije polimera v raztopini narašča tudi premer izdelanih nanovlaken (11, 15, 21, 23, 24).

- ***Molekulska masa polimera***

Molekulska masa polimerov ima pomemben vpliv na viskoznost, površinsko napetost, prevodnost in dielektrično konstanto polimerne raztopine. Je parameter, ki vpliva na morfološke lastnosti izdelanih nanovlaken. V večini primerov za izdelavo nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja uporabljamo polimere z visoko molekulsko maso, saj le-ta zagotavlja ustrezno viskoznost, ki omogoči nastajanje nanovlaken. Raziskovalci so opazili, da pri uporabi polimerov z nizko molekulsko maso pogosto pride do tvorbe kapljic in vozlov, katerih število se zmanjšuje z naraščanjem molekulske mase uporabljenega polimera (11, 24).

- ***Viskoznost***

Viskoznost polimerne raztopine močno vpliva na premer in morfologijo izdelanih nanovlaken in je tesno povezana z molekulsko maso uporabljenega polimera in koncentracijo polimerne raztopine. Raziskave kažejo, da za vsak polimer obstaja tako imenovana optimalna viskoznost polimerne raztopine, ki omogoča kontinuirano izdelavo nanovlaken brez prisotnih vozlastih struktur. Pri nižjih viskoznostih pogosto pride do tvorbe vozlov, z naraščanjem viskoznosti pa vozli izginejo. Z naraščanjem viskoznosti praviloma narašča tudi premer izdelanih nanovlaken (11, 14, 24).

- ***Površinska napetost***

Površinska napetost polimerne raztopine je odvisna predvsem od vrste in sestave topila. Praviloma visoka površinska napetost onemogoča elektrostatsko sukanje, saj povzroči nestabilnost curka in njegovo razpršitev v kapljice. Nanovlakna, izdelana iz raztopin z višjo površinsko napetostjo, imajo pogosto v strukturi prisotne vozle. Polimerne raztopine z nizko površinsko napetostjo pa večinoma omogočajo izdelavo nanovlaken brez vozlov. Nižja površinska napetost pomeni tudi nižjo električno napetost, ki jo potrebujemo za tvorbo nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja (11, 24).

- ***Prevodnost***

Prevodnost polimerne raztopine je eden glavnih parametrov elektrostatskega sukanja, saj se kapljica polimerne raztopine prične raztezati v curek zaradi odboja med enakimi naboji na površini kapljice. Da se ta naboj v kapljici lahko pojavi, mora biti polimerna raztopina prevodna; bolj, kot je prevodna, več naboja lahko vnesemo v raztopino. Za pripravo polimernih raztopin zato navadno uporabljamo topila, ki so dobro prevodna; prevodnost pa povečujemo tudi z dodatkom anorganskih soli. Večja, kot je prevodnost polimerne raztopine, manjši bo premer izdelanih nanovlaken in manj bo prisotnih vozlastih struktur (11, 24, 25).

### **1.2.2.2 Procesni parametri**

- ***Električna napetost***

Električna napetost vpliva na premer in morfologijo izdelanih nanovlaken. Veliko raziskav je pokazalo, da s povečevanjem električne napetosti premer polimernih vlaken pada, medtem ko verjetnost za nastajanje vozlov v izdelanih nanovlaknih z naraščanjem napetosti narašča. Nekateri raziskovalci pa so opazili, da je vpliv napetosti na premer nanovlaken zanemarljiv. Kako velik oz. pomemben je vpliv električne napetosti na premer nanovlaken, je tako odvisno od koncentracije polimera ter razdalje med konico igle in zbiralom. Yoördem O. S. in sodelavci so ugotovili, da je vpliv električne napetosti na premer nanovlaken velik pri nižjih koncentracijah polimera, z naraščanjem koncentracije pa vpliv na premer pada. Prav tako so ugotovili, da vpliv električne napetosti na premer nanovlaken pada z naraščanjem razdalje med konico igle in zbiralom (11, 23, 26).

- ***Pretok polimerne raztopine***

Pretok polimerne raztopine je pomemben parameter elektrostatskega sukanja, saj vpliva na debelino in hitrost curka in s tem na premer in morfologijo nastalih nanovlaken. Pri elektrostatskem sukanju je zaželeno, da nastavimo najnižji pretok polimerne raztopine, ki še omogoča kontinuirano tvorbo curka. S tem zagotovimo topilu dovolj časa za izhlapevanje in s tem preprečimo tvorbo vozlastih struktur. Nekatere raziskave so pokazale, da večji pretok polimerne raztopine vodi v tvorbo debelejših nanovlaken (11, 24).

- ***Razdalja med konico igle in zbiralom***

Razdalja med iglo in zbiralom je parameter, ki prav tako vpliva na morfologijo in premer nanovlaken, a je njegov vpliv, glede na vpliv ostalih parametrov, manjši. Pomembno je, da ugotovimo in nastavimo optimalno razdaljo, ki omogoči popolno izhlapevanje topila in izdelavo suhih nanovlaken brez prisotnih vozlov. Razdalja med konico in zbiralom je tesno

povezana z aplicirano električno napetostjo; večja, kot je razdalja, večjo napetost moramo uporabiti (11, 23, 24).

### 1.2.2.3 Parametri okolja

- *Relativna vlažnost*

Relativna vlažnost (RV) vpliva na hitrost izhlapevanja topila in s tem na debelino ter morfologijo izdelanih nanovlaken. Raziskave so pokazale, da pri nižji RV pride do hitrejšega izhlapevanja topila in tvorbe debelejših nanovlaken, medtem ko je izhlapevanje topila pri višji RV počasnejše in tvorijo se nanovlakna z manjšim premerom. Pri višji RV pogosto pride tudi do tvorbe nanovlaken s prisotnimi vozlastimi strukturami ali pa izdelava nanovlaken zaradi previsoke RV ni več mogoča (na zbiralu se tvori polimerni film). Vpliv RV na izdelavo nanovlaken je odvisen od uporabljenega polimera; različni polimeri so namreč različno občutljivi na RV v okolju, kjer poteka elektrostatsko sukanje (11, 27).

- *Temperatura*

Raziskave poročajo o vplivu temperature na debelino izdelanih nanovlaken. Z naraščanjem temperature pride do znižanja viskoznosti polimerne raztopine, kar povzroči zmanjšanje premera izdelanih nanovlaken (11). Vpliv na izdelavo nanovlaken ima tudi temperatura okolice, ki vpliva na hitrost izhlapevanja topila oz. strjevanje curka polimerne raztopine/taline.

## 1.3 NANOVLAJNA

Nanovlakna so trdna vlakna s premerom od nekaj nm do 1000 nm in teoretično neomejeno dolžino. Za nanovlakna je značilna zelo velika površina na enoto mase (npr. nanovlakna s premerom ~100 nm imajo specifično površino ~1000 m<sup>2</sup>/g), velika poroznost, dobre mehanske lastnosti (mehanska trdnost), velika prožnost, ekonomičnost izdelave (predvsem pri uporabi metode elektrostatskega sukanja) ter sposobnost tvorbe tridimenzionalne kontinuirane mreže oz. tridimenzionalnega spleta nanovlaken (5, 12, 13, 28).

Zaradi svojih lastnosti ter relativno enostavne in poceni izdelave so nanovlakna zanimiva za uporabo na številnih področjih, kot so izdelava zaščitnih oblačil (npr. v vojaške namene), izdelava kozmetičnih izdelkov (npr. izdelki za čiščenje kože), izdelava filtrov (predvsem filtrov za čiščenje zraka), izdelava senzorjev/biosenzorjev za uporabo v zdravstvene in okoljevarstvene namene ter kontrolo kakovosti hrane, imobilizacija encimov, izdelava afinitetnih membran (za čiščenje velikih biomolekul, kot so proteini in

DNA, za odstranjevanje zaostankov organskega topila), uporaba na področju elektronike in proizvodnje energije (npr. izdelava baterij in kondenzatorjev) ter uporaba na področju biomedicine. Raziskave uporabe nanovlaken na področju biomedicine lahko razdelimo v tri osnovne skupine: izdelava sodobnih oblog za rane, tkivni inženiring (priprava tkivnih nadomestkov za regeneracijo tkiv) in izdelava dostavnih sistemov za zdravilne učinkovine (5, 11, 12, 18, 28).

Nanovlakna predstavljajo sodoben način dostave zdravilnih učinkovin, in sicer nam omogočajo izdelavo dostavnih sistemov s takojšnjim, zadržanim, pulzirajočim ali podaljšanim sproščanjem. Profil sproščanja je odvisen od polimera, ki ga uporabimo za izdelavo nanovlaken, ter od morfologije in strukture izdelanih nanovlaken (npr. enoslojna, večslojna nanovlakna (*ang. core-shell nanofibers*)) (11, 12, 19). Nanovlakna predstavljajo tudi možnost za povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja slabo topnih zdravilnih učinkovin (5), kar je natančneje opisano v poglavju 1.3.1.

Nanovlakna imajo eno dimenzijo v nanometrskem (premer), drugo dimenzijo pa v makro (dolžina) območju. Zaradi te edinstvene lastnosti imajo dostavni sistemi, izdelani iz nanovlaken, prednosti, ki izvirajo iz njihove nanometrskosti, kot so spremenjene biofarmacevtske in farmakokinetične lastnosti (npr. topnost, hitrost raztapljanja, biološka uporabnost), ki omogočajo boljši klinični izid zdravljenja kot zdravljenje s konvencionalnimi trdnimi farmacevtskimi oblikami, ki jih odlikujejo prednosti, kot so enostavna izdelava, dobra stabilnost vgrajenih zdravilnih učinkovin, enostavno pakiranje in transport (12).

### **1.3.1 Povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja z vgrajevanjem učinkovin v polimerna nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja**

Eden od pristopov za povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja je vgrajevanje učinkovine v polimerna nanovlakna z metodo elektrostatskega sukanja. Izdelana nanovlakna imajo veliko površino in veliko poroznost, kar vodi v hitrejše raztapljanje in sproščanje vgrajene učinkovine. Poleg tega lahko z metodo elektrostatskega sukanja učinkovino vgradimo v nanovlakna v amorfni obliki ali v obliki nanokristalov, s čimer povečamo topnost in hitrost raztapljanja vgrajene učinkovine (22). Zaradi velike površine curka, ki se tvori pri elektrostatskem sukanju, je izhlapevanje topila zelo hitro, kar omogoči nenadno "strditev" polimerov in zmanjšanje mobilnosti raztopljenih molekul učinkovine.

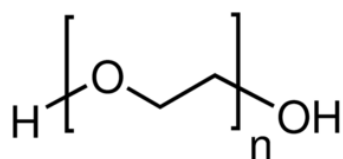
Učinkovina zaradi zmanjšane mobilnosti in omejenega časa, ki je na voljo za kristalizacijo, ne bo kristalizirala, temveč se bo v nanovlakna vgradila v amorfni obliki. Učinkovina je tako dispergirana v polimernem ogrodju nanovlaken, kjer polimeri z učinkovino tvorijo molekularne interakcije, kot je vodikova vez, s čimer stabilizirajo amorfno obliko učinkovine in preprečijo njeno takojšno pretvorbo v kristalno obliko (22, 29, 30). Da lahko pri elektrostatskem sukanju pride do pretvorbe učinkovine v amorfno obliko, mora biti učinkovina v raztopini polimerov raztopljen. Kadar učinkovina v topilu polimerne raztopine ni topna, bo med procesom elektrostatskega sukanja ohranila svojo kristalno obliko in bo v obliki kristalov dispergirana znotraj polimernega ogrodja nanovlaken ali prisotna na površini nanovlaken. Ko se bodo vlakna med raztapljanjem razgradila, se bo učinkovina sprostila v medij v obliki posameznih kristalov in nastala bo suspenzija. Površina učinkovine bo tako večja, saj ne bo prisotnih agregatov učinkovine, kar bo vodilo v večjo hitrost raztapljanja učinkovine (10).

Na topnost in hitrost raztapljanja učinkovine, vgrajene v nanovlakna, lahko še dodatno vplivamo z izbiro ustreznih pomožnih snovi, ki jih vključimo v nanovlakna. Izboljšanje raztapljanja učinkovine lahko dosežemo tako, da v vlakna dodamo ciklodekstrine, ki kompleksirajo učinkovino in povečajo njeno topnost (16), ali z uporabo polimerov, ki imajo površinsko aktivne lastnosti in omogočijo solubilizacijo vgrajene učinkovine (npr. poloksamer 188, poloksamer 407) (9).

## 1.4 *SESTAVINE NANOVLAKEN V NAŠI RAZISKAVI*

### 1.4.1 Polietilenoksid (PEO)

PEO je sintezni neionski homopolimer etilenoksida s strukturno formulo, prikazano na sliki 3. Število monomerov je med 2.000 in 200.000, zato danes poznamo številne različne vrste PEO, ki se razlikujejo v molekulski masi. PEO poznamo tudi pod imenom polietilenglikol (PEG). Kot PEG navadno označujemo polimere, čigar molekulska masa je <100.000 g/mol, kot PEO pa polimere z višjo molekulsko maso (31, 32).



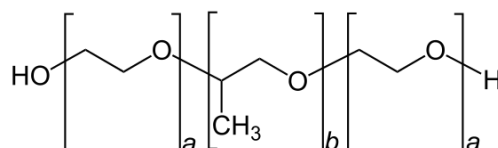
**Slika 3:** Strukturna formula PEO: *n*-število enot etilenoksida.

PEO je dobro topen v vodi in številnih organskih topilih, kot so etanol, aceton, kloroform, toluen in metilen klorid. V vodi tvori viskozne raztopine, katerih viskoznost je odvisna od molekulske mase in koncentracije uporabljenega PEO (32, 33).

Zaradi njegove netoksičnosti in biokompatibilnosti je uporaba PEO danes močno razširjena na področju prehranske in kozmetične industrije ter biomedicine. Uporablja se za izdelavo materialov v tkivnem inženirstvu, za izdelavo dostavnih sistemov za dobro in slabo vodotopne učinkovine, npr. kot polimer, ki tvori ogrodje tablet, kot polimer za oblaganje tablet, kot vezivo in zgoščevalo (32, 33). Je polimer, ki s svojimi lastnostmi omogoča izdelavo nanovlaken, zato smo ga v naši raziskavi uporabili kot osnovni gradnik nanovlaken, izdelanih s postopkom elektrostatskega sukanja (21).

#### 1.4.2 Poloksameri

Poloksameri so sintezni blok kopolimeri etilenoksida in propilenoksida s splošno strukturno formulo, predstavljeno na sliki 4. Glede na razmerje med monomeroma in število posameznih monomerih enot v polimeru poznamo različne poloksamere: poloksamer 124, poloksamer 188, poloksamer 237, poloksamer 338 in poloksamer 407 (34, 35, 36). Poloksamere poznamo tudi pod različnimi tržnimi imeni, kot sta Lutrol<sup>®</sup> in Pluronic<sup>®</sup> (35, 36).



**Slika 4:** Strukturna formula poloksamerov: *a*-število enot etilenoksida, *b*-število enot propilenoksida (37).

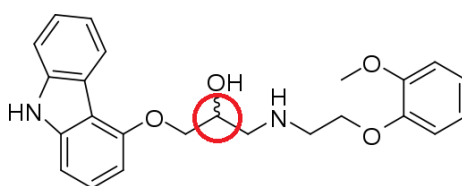
Poloksameri so dobro topni v vodi ter v polarnih in nepolarnih organskih topilih (34, 35). Zaradi svoje strukture so poloksameri amfifilne molekule, ki v vodi tvorijo micelle, če je presežena kritična micelska koncentracija (CMC) polimera v raztopini. Pri koncentracijah, nižjih od CMC, so v raztopini prisotne posamezne molekule poloksamera, pri koncentracijah nad CMC pa se polimerne molekule pričnejo med seboj združevati v skupke – micelle. Različne vrste poloksamerov imajo različne vrednosti CMC. V notranjosti micelov se ustvari hidrofobno okolje, ki ga tvorijo predvsem enote propilenoksida s svojimi metilnimi skupinami, medtem ko je površina micelov hidrofilna (kisiki etilenoksidnih enot tvorijo vodikove vezi z vodo). Vgrajevanje slabo topnih

učinkovin v micela predstavlja enega od načinov povečevanja topnosti učinkovin, ki ga imenujemo solubilizacija. V hidrofobni notranjosti micelov poloksamera metilne skupine propilenoksida tvorijo van der Waalsove vezi z vgrajeno učinkovino in tako omogočajo njeno solubilizacijo. Poloksamere tako pogosto uporabljamo kot solubilizatorje, pa tudi kot močljivce, emulgatorje, koemulgatorje in tvorilce gelov. Sposobnost geliranja poloksamerov je odvisna od njihove molekulske mase. Poloksameri z višjo molekulsko maso lahko tvorijo gele pri nižjih koncentracijah, zato sta poloksamera 338 in 407 najpogosteje uporabljena poloksamera za pripravo gelov. Pri nižjih koncentracijah, kjer se struktura gelov še ne vzpostavi, se poloksameri lahko uporabljajo tudi kot snovi za uravnavanje tj. povečevanje viskoznosti (zgoščevala) (9, 35, 36).

Poloksamera 338 in 407 sta polimera, ki omogočata tvorbo termoreverzibilnih gelov. Vodne raztopine teh poloksamerov so tekoče pri temperaturi 4–5 °C in pri temperaturi nad 70 °C, maksimalno viskoznost pa imajo v temperaturnem območju 30–60 °C, kjer pride do tvorbe gelov. Struktura gelov se tako s spreminjanjem temperature poruši in ponovno vzpostavi (geli so reverzibilni). Da pride do nastanka gelov, mora biti koncentracija poloksamerov v vodi zadosti visoka (16–30 % (m/m)). Pri nižjih koncentracijah poloksameri ne tvorijo gelov, vplivajo pa na viskoznost vodne raztopine (35).

### 1.4.3 Karvedilol

Karvedilol je bel kristaliničen prašek z molekulsko maso 406,5 g/mol, molekulsko formulo  $C_{24}H_{26}N_2O_4$  in strukturno formulo, ki je prikazana na sliki 5 (38).



**Slika 5:** Strukturna formula karvedilola z označenim kiralnim centrom (39).

Karvedilol je skoraj netopen v vodi (38). Po biofarmaceutski klasifikaciji učinkovin (BCS klasifikaciji) karvedilol uvrščano v razred II, saj je slabo topna in dobro permeabilna učinkovina (40).

Karvedilol je šibka baza (njegova pKa vrednost znaša 8,77), saj ima v strukturi prisotno sekundarno amino skupino, zato je slabše topen v nevtralnem in bazičnem mediju; s padanjem pH vrednosti medija pa njegova topnost narašča in doseže plato blizu pH

vrednosti 5. Topnost v vodi pri sobni temperaturi in pH 7 znaša 23 µg/mL, pri pH 5 znaša 100 µg/mL, pri pH vrednostih nad 9 pa znaša manj kot 1 µg/mL. Pri vrednostih pH, nižjih od vrednosti 5, je topnost karvedilola omejena s topnostjo nastale protonirane oblike karvedilola, ki je pri nižjih pH vrednostih medija slabše topna (41, 42).

Je neselektivni zaviralec adrenergičnih receptorjev  $\beta$  z zavirajočim delovanjem tudi na adrenergične receptorje  $\alpha_1$ . Ima vazodilatacijski, antioksidativni in antiproliferativni učinek. Z zaviranjem adrenergičnih receptorjev  $\beta$  v srcu, znižuje arterijski krvni tlak ter zmanjšuje srčno frekvenco in minutni volumen srca; z zaviranjem adrenergičnih receptorjev  $\alpha_1$  pa povzroča periferno vazodilatacijo in zmanjša sistemski žilni upor. Uporablja se za zdravljenje esencialne hipertenzije, kronične stabilne angine pectoris, kroničnega srčnega popuščanja in za zdravljenje po miokarden infarktu z dokazano disfunkcijo levega prekata (41, 43).

Po peroralni aplikaciji se karvedilol hitro in skoraj v celoti absorbira (43). Absorbcija karvedilola je največja v jejunumu, nato pa se zmanjšuje v sledečem vrstnem redu: jejunum > ileum > debelo črevo (44). Njegova biološka uporabnost je nizka in znaša 25 %, kar je posledica obsežnega metabolizma pri prvem prehodu skozi jetra (predvsem z jetrnih encimov CYP2D6 in CYP2C9). V plazmi se skoraj v celoti veže na beljakovine ( $\geq 95$  %). Ker je lipofilna ( $\log P = 4,19$ ) učinkovina, se v veliki meri porazdeljuje v ekstravaskularna tkiva in doseže volumen porazdelitve 1,5 do 2 L/kg. Karvedilol se metabolizira hitro in v velikem obsegu, pri čemer nastanejo tudi trije aktivni metaboliti, ki zavirajo adrenergične receptorje beta. Karvedilol se v glavnem izloča v obliki metabolitov v feces, le 2% pa se ga izloči z urinom v nespremenjeni obliki (42, 43, 45, 46).

Karvedilol ima kiralni center (slika 5) in zato obstaja v obliki dveh enantiomerov. Enantiomer S (-) zavira adrenergične receptorje  $\alpha_1$  in  $\beta$ , enantiomer R (+) pa zavira le receptorje  $\alpha_1$ . Obstaja lahko tako v obliki posameznega enantiomera, kot v obliki racemata, kar zavisi od metode izdelave (41, 43).

Karvedilol je prisoten v številnih polimorfnih modifikacijah. Za polimorfne modifikacije je značilno, da imajo enako kemijsko strukturo, razlikujejo pa se v kristalni strukturi, kar povzroči tudi razlike v njihovih fizikalnih lastnostih, med drugim tudi v topnosti in temperaturi tališča. Pri našem raziskovalnem delu smo uporabili obliko II karvedilola, katere začetna temperatura taljenja (*ang. melting onset temperature*) ( $T_{\text{onset}}$ ) je 113–115 °C (47). Karvedilol je lahko prisoten tudi v obliki amorfa s temperaturo steklastega prehoda med 34 °C in 39 °C (48, 49).



## 2 NAMEN DELA

Veliko zdravil, ki so danes prisotna na trgu, vsebuje učinkovino, ki je slabo topna v vodi in ima nizko hitrost raztapljanja. Prav tako danes odkrivajo vedno več novih potencialnih zdravilnih učinkovin, katerih nadaljnji razvoj in uporaba sta omejeni z njihovo slabo vodotopnostjo in nizko hitrostjo raztapljanja.. Topnost in hitrost raztapljanja takšnih učinkovin skušamo zato izboljšati na različne načine. Enega izmed novejših pristopov predstavlja uporaba nanotehnologije, kamor uvrščamo tudi izdelavo nanovlaken, v katera vgradimo težko topno učinkovino.

Ker je karvedilol učinkovina z dobro permeabilnostjo in slabo topnostjo (razred II biofarmacevtske klasifikacije učinkovin), je proces raztapljanja tisti omejujoči faktor, ki določa hitrost in obseg absorpcije učinkovine. S povečanjem topnosti in hitrosti raztapljanja, bi tako lahko povečali hitrost in obseg absorpcije, kar bi vodilo v doseganje višjih plazemskih koncentracij učinkovine ter v boljšo biološko uporabnost. Za doseganje enakega učinka, bi potrebovali manjši odmerek karvedilola in tako bi povečali učinkovitost zdravila, izboljšali pa bi tudi njegovo varnost (manj stranskih učinkov). V okviru magistrske naloge bomo zato raziskali, ali lahko z vgrajevanjem karvedilola, ki je v vodi skoraj netopen, v polimerna nanovlakna povečamo njegovo topnost in hitrost raztapljanja.

Najprej bomo določili topnost karvedilola v prečiščeni vodi in vodnih raztopinah izbranih polimerov (PEO, poloksamer 407), da bi ugotovili, ali polimeri vplivajo na njegovo topnost. Koncentracijo karvedilola v vzorcih bomo določali spektrofotometrično pri valovni dolžini 241 nm, zato bomo preverili tudi vpliv polimerov, tj. PEO in poloksamera 407, na rezultate merjenja absorbance pri izbrani valovni dolžini.

Nato bomo z metodo elektrostatskega sukanja izdelali nanovlakna iz PEO in poloksamera 407, v katera bomo poskušali vgraditi karvedilol v obliki suspenzije in nanosuspenzije. Uspešnost izdelave nanovlaken ter njihovo morfologijo bomo vrednotili s SEM analizo. Profil sproščanja karvedilola iz nanovlaken bomo ugotavljali s preskusom sproščanja. Hitrost sproščanja učinkovine iz nanovlaken bomo primerjali s hitrostjo sproščanja učinkovine iz fizikalne zmesi ter polimernih filmov, katerih kvali in kvantitativna sestava bo enaka sestavi nanovlaken. Proučili bomo tudi učinkovitost vgrajevanja karvedilola v nanovlakna in polimerne filme. Z DSC analizo bomo proučili kristaliničnost karvedilola in s TGA vsebnost vlage v izdelanih nanovlaknih, filmih in fizikalni zmesi učinkovine s polimeri.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

- karvedilol, Krka d.d., Novo mesto, Slovenija
- polietilenoksid (PEO), Mr 400.000 g/mol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- Lutrol® F127 (poloksamer 407), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- metanol (CH<sub>3</sub>OH), (≥ 99,8 %), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- aceton (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>), (≥ 99,5 %), Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija
- prečiščena voda, pripravljena na UL – Fakulteti za farmacijo
- sušilno sredstvo (Silica gel Rubin), Sigma-Aldrich chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- injekcijske brizge (5 mL, 10 mL in 20 mL), BD Discordit™ II, Becton Dickinson S.A., Španija
- injekcijske igle:
  - G22 0,7 x 50, TIK d.o.o., Kobarid, Slovenija
  - G18 1,2 x 50, TIK d.o.o., Kobarid, Slovenija
- filtri:
  - Minisart® RC25 0,45 µm, Sartorius, Nemčija

Full flow filters, 10 µm, Agilent Technologies, ZDA

### 3.2 NAPRAVE

- analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Scherzenbach, Švica
- analitska tehtnica, Mettler Toledo XS205, Scherzenbach, Švica
- mehanska pipeta mLINE 100–1000 µL, BIOHIT, Finska
- magnetno mešalo, IKA® RCT basic, Nemčija
- magnetno mešalo RO15 power, IKA® – WERKE, Nemčija
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra pio d.o.o., Kranj, Slovenija
- naprava za elektrostatsko sukanje:
  - generator visoke napetosti, model HVG-P50-R-EU, Linari Engineering s.r.l., Italija

- črpalka, model R-99, Razel Scientific, ZDA
  - planarno zbiralo (nosilec obdan z aluminijasto folijo (Labor))
  - plastična brizga, 20 mL, B. Braun, ZDA
  - kovinska igla z notranjim premerom 0,8 mm, Linari Engineering s.r.l., Italija
- ročni termo-higrometer TFH 620, Ebro, Ingolstadt, Nemčija
  - eksikator, Brand, Nemčija
  - naprava z vesli (naprava II) VanKel VK 7000, ZDA; naprava z vesli (naprava II) ERWEKA DT 6, Nemčija
  - UV-VIS spektrofotometer, Hewlett Packard 8453, Agilent Technologies, Nemčija
  - stiskalnica za zapiranje DSC lončkov
  - DSC1 (diferenčni dinamični kalorimeter) STARe SYSTEM (programska oprema STARe Software v9.30), Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
  - TGA (termogravimetrični analizator), STARe SYSTEM (programska oprema STARe Software v9.30), Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica
  - vrstični elektronski mikroskop, Supra 35 VP, Carl Zeiss, Švica

### 3.3 **METODE**

#### 3.3.1 **Določanje topnosti karvedilola v prečiščeni vodi**

V 50 mL bučko s prečiščeno vodo smo dali presežno količino zdravilne učinkovine, karvedilola, in pustili mešati na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi 24 h. Nasičeno raztopino smo nato filtrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter. Prvih nekaj mL filtrata smo zavrgli, preostanek filtrata pa ustrezno redčili in mu spektrofotometrično izmerili absorbanco pri valovni dolžini 241 nm (valovna dolžina absorpcijskega maksimuma karvedilola). Na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili v koncentracijskem območju 0,352–7,06  $\mu\text{g/mL}$  karvedilola, smo določili koncentracijo učinkovine v ustrezno zredčenem filtratu in topnost karvedilola v prečiščeni vodi. Kot slepi vzorec (*ang. blank*) smo uporabili prečiščeno vodo. Za meritev smo uporabili kiveto iz kvarčnega stekla z optično potjo 1 cm. Test smo izvedli v treh paralelah.

#### 3.3.2 **Določanje topnosti karvedilola v raztopinah polimerov**

##### 3.3.2.1 **Priprava raztopin polimerov**

Pripravili smo raztopine zmesi PEO in poloksamera 407 v prečiščeni vodi pri sobni temperaturi. Natehtali smo ustrezni količini obeh polimerov, ju kvantitativno prenesli v erlenmajerico z obrušom in dotehtali vodo do skupne mase 20 g. Pripravljeno zmes smo za 10 min postavili v zamrzovalnik ter jo nato prenesli na magnetno mešalo in pustili mešati preko noči, da sta se polimera popolnoma raztopila. Sestava polimernih raztopin je podana v preglednici II. Pripravili smo 7 raztopin z različno sestavo. Masa posamezne raztopine, ki smo jo pripravili, je bila 20 g.

**Preglednica II:** *Sestava polimernih raztopin.*

Polimerna raztopina	Masno razmerje PEO : poloksamer 407	Masa PEO [g]	Masa poloksamera 407 [g]	Masa prečiščene vode [g]	Masni delež polimerov v raztopini [%]
PR <sub>1</sub>	100 : 0	0,8	/	19,2	4,0
PR <sub>2</sub>	90 : 10	0,71	0,08	19,2	4,0
PR <sub>3</sub>	80 : 20	0,64	0,16	19,2	4,0
PR <sub>4</sub>	70 : 30	0,56	0,24	19,2	4,0
PR <sub>5</sub>	60 : 40	0,48	0,32	19,2	4,0
PR <sub>6a</sub>	50 : 50	0,40	0,40	19,2	4,0
PR <sub>6b</sub>	50 : 50	0,60	0,60	18,8	6,0

### 3.3.2.2 Priprava suspenzij karvedilola v raztopinah polimerov

V pripravljene polimerne raztopine, katerih sestava je navedena v preglednici II, smo dodali prebito količino karvedilola ter vzorce pustili mešati na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi 24 h. Sestava suspenzij je podana v preglednici III. Vse pripravljene suspenzije karvedilola v raztopini polimerov so vsebovale 20 % (m/m) učinkovine in 80 % (m/m) polimerov glede na maso suhe snovi v vzorcu.

**Preglednica III:** Sestava suspenzij karvedilola v raztopinah polimerov.

Suspenzija	Masno razmerje PEO : poloksamer 407	Masa PEO [g]	Masa poloksamera [g]	Masa prečiščene vode [g]	Masni delež polimerov v raztopini [%]	Masa karvedilola [g]
S <sub>1</sub>	100 : 0	0,8	/	19,2	4,0	0,2
S <sub>2</sub>	90 : 10	0,71	0,08	19,2	4,0	0,2
S <sub>3</sub>	80 : 20	0,64	0,16	19,2	4,0	0,2
S <sub>4</sub>	70 : 30	0,56	0,24	19,2	4,0	0,2
S <sub>5</sub>	60 : 40	0,48	0,32	19,2	4,0	0,2
S <sub>6a</sub>	50 : 50	0,40	0,40	19,2	4,0	0,2
S <sub>6b</sub>	50 : 50	0,60	0,60	18,8	6,0	0,3

### 3.3.2.3 Določanje topnosti karvedilola v raztopinah polimerov

Topnost karvedilola v polimernih raztopinah smo določili z UV-VIS spektrofotometrijo. Pripravljene suspenzije smo po 24 h filtrirali skozi 0,45 µm filtre tako, da smo prvih 10 kapljic filtrata zavrgli, preostanek pa filtrirali v 1 mL mikrocentrifugirke. Prvih 0,5 mL filtrata smo uporabili za spiranje mikrocentrifugirke, naslednjih 0,5 mL filtrata pa je predstavljalo vzorec, katerega 200 µL smo s pomočjo pipete prenesli iz mikrocentrifugirke v 10 mL merilno bučko, dodali 2 mL metanola (kar znaša 20 % (v/v) končnega vzorca) in s prečiščeno vodo vzorec dopolnili do oznake volumna. Pred pipetiranjem vzorca smo tudi nastavke za pipeto sprali z 200 µL filtrata. Po 20 min mešanja na magnetnem mešalu, pri sobni temperaturi, smo vzorcem pomerili absorbanco pri valovni dolžini 241 nm. Na podlagi predhodno določene umeritvene krivulje (poglavje 3.3.1) smo določili koncentracijo karvedilola. Absorbance smo posneli glede na slepe vzorce, ki so jih predstavljale raztopine samih polimerov (preglednica II), ki smo jih pripravili po enakem postopku, kot je opisan zgoraj za suspenzije. Test smo izvedli v treh paralelah za vsako sestavo polimerne raztopine.

#### **3.3.2.4 Vpliv polimerov na rezultate spektrofotometričnega določanja karvedilola**

Vpliv polimerov na izmerjeno absorbanco vzorca oz. določeno topnost karvedilola smo ugotavljali pri suspenzijah  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_{6a}$  in  $S_{6b}$  (preglednica III).

Pripravili smo osnovno raztopino karvedilola v vodi tako, da smo natančno natehtali 7,06 mg učinkovine, jo kvantitativno prenesli v 1000 mL merilno bučko ter s prečiščeno vodo vzorec dopolnili do oznake volumna. Pripravljen vzorec smo pustili 24 h mešati na magnetnem mešalu in tako zagotovili, da se je karvedilol popolnoma raztopil. Koncentracija pripravljene raztopine je bila tako znana in je znašala 7,06  $\mu\text{g/mL}$ .

Vzorci za določanje vpliva polimerov smo pripravili tako, da smo v 100 mL merilne bučke natančno natehtali 2 g polimernih raztopin ( $PR_1$ ,  $PR_2$ ,  $PR_{6a}$  in  $PR_{6b}$ ), dodali 20 mL osnovne raztopine karvedilola s koncentracijo 7,06 mg/mL, 20 mL metanola ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake volumna. Absorbanco tako pripravljenih vzorcev smo pomerili glede na slepe vzorce, ki smo jih pripravili tako, da smo v 100 mL merilne bučke natehtali 2 g polimernih raztopin, dodali 20 mL prečiščene vode, 20 mL metanola ter z vodo dopolnili do oznake volumna.

Proučili smo tudi, ali polimeri, ki se sprostijo v preskusu sproščanja (poglavje 3.3.7), vplivajo na celokupno absorbanco vzorca pri valovni dolžini, kjer smo določali karvedilol. Pripravili smo vzorec, v katerem je bila koncentracija polimerov takšna, kot je bila teoretično pri preskusu sproščanja. V 500 mL merilno bučko smo natehtali 250 mg vzorca  $PR_{6b}$ , katerega sestava in priprava je navedena v preglednici II, in ga s prečiščeno vodo dopolnili do oznake volumna. Na magnetnem mešalu smo ga pri sobni temperaturi mešali 9 h in nato spektrofotometrično izmerili absorbanco vzorca pri valovni dolžini 241 nm. Pri spektrofotometričnem določanju smo kot slepi vzorec uporabili prečiščeno vodo. Test smo izvedli v treh paralelah.

### **3.3.3 Priprava suspenzij in nanosuspenzije karvedilola v raztopinah polimerov za izdelavo nanovlaken**

#### **3.3.3.1 Priprava suspenzij za izdelavo nanovlaken**

Za izdelavo nanovlaken smo pripravili suspenziji  $S_{6a}$  in  $S_{6b}$ , katerih sestava je navedena v preglednici III. Natehtali smo ustrezno količino polimerov, jih kvantitativno prenesli v erlenmajerico z obrusom in dotehtali vodo do skupne mase 20 g. Zmes smo postavili v zamrzovalnik za 10 min, nato pa jo postavili na magnetno mešalo in pustili mešati pri sobni temperaturi preko noči, da sta se polimera popolnoma raztopila. V raztopino smo

nato dodali ustrezno maso karvedilola in suspenzijo pustili mešati na magnetnem mešalu 24 h pri sobni temperaturi.

### **3.3.3.2 Priprava nanosuspenzije za izdelavo nanovlaken**

Nanosuspenzijo karvedilola v raztopini polimerov smo pripravili z metodo nanoprecipitacije. Za izdelavo nanosuspenzije NS<sub>6b</sub> smo najprej pripravili raztopino polimerov PR<sub>6b</sub>, katere sestava je navedena v preglednici II. Natehtali smo ustrežni količini polimerov, ju prenesli v erlenmajerico z obrusom, dotehtali prečiščeno vodo, 10 min ohlajali v zamrzovalniku in nato pustili vzorec 24 h mešati pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu.

300 mg karvedilola smo natehtali v stekleno vialo in s pipeto dodali 6 mL acetona ter dobro premešali. Raztopino karvedilola v acetonu smo nato napolnili v 5 oz. 10 mL brizgo in jo skozi iglo injicirali v predhodno pripravljeno raztopino polimerov. Disperzijo smo nato pustili mešati na magnetnem mešalu nadaljnjih 5 min.

### **3.3.4 Izdelava nanovlaken z metodo elektrostatskega sukanja**

Iz suspenzij in nanosuspenzije karvedilola, katerih priprava in sestava je navedena v poglavjih 3.3.3 in 3.3.2, smo s postopkom elektrostatskega sukanja izdelali nanovlakna. Suspenzije smo pred elektrostatskim sukanjem za 10 min postavili v ultrazvočno kadičko, s čimer smo razbili morebitne agregate učinkovine in zagotovili večjo homogenost suspenzije (10). Nanosuspenzijo smo pripravili tik pred izdelavo nanovlaken. Elektrostatsko sukanje je potekalo pri sobni temperaturi (22–26 °C) in relativni vlažnosti 30–46 %. Da smo zagotovili ustrezno vlažnost, smo elektrostatsko sukanje izvedli v izolirani komori ob prisotnosti sušilnega sredstva, ki je nase vezalo vlago in tako zagotavljalo ustrezne pogoje okolja med elektrostatskim sukanjem. Parametri elektrostatskega sukanja, ki smo jih uporabili, so navedeni v preglednici IV.

Elektrostatsko sukanje smo izvedli tako, da smo 5–10 mL suspenzije/nanosuspenzije karvedilola napolnili v plastično brizgo ter nanjo namestili kovinsko iglo in pri tem pazili, da smo iz igle iztisnili vse zračne mehurčke. Brizgo smo namestili na črpalko, ki je zagotavljala konstanten pretok vzorca. Na ustrezno razdaljo od konice igle smo postavili kovinsko zbiralo, ga ovili z aluminijasto folijo in ga ozemljili. Kovinsko iglo smo povezali z virom visoke napetosti ter tako omogočili nastanek električnega polja med konico igle in zbiralom.

**Preglednica IV:** *Parametri elektrostatskega sukanja za izdelavo nanovlaken s karvedilolom.*

<b>Prametri</b>	<b>Izdelava nanovlaken iz suspenzije</b>	<b>Izdelava nanovlaken iz nanosuspenzije</b>		
<b>Notranji premer kovinske igle [mm]</b>	0,8	0,8		
<b>Razdalja med zbiralom in konico igle [cm]</b>	15	15		
<b>Napetost [V]</b>	15.000	15.000		
<b>Pretok [mL/h]</b>	1,414	1,414		
<b>Trajanje elektrostatskega sukanja [min]</b>	Za SEM analizo	Za test sproščanja, DSC in TGA analizo	Za SEM analizo	Za test sproščanja, DSC in TGA analizo
	10	105	10	165

### 3.3.5 Izdelava filmov iz suspenzij in nanosuspenzij

Iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola, katerih sestava in priprava je navedena v poglavjih 3.3.3 in 3.3.2, smo izdelali tudi filme, ki so služili kot primerjava izdelanim nanovlaknom pri določanju njihovih lastnosti (DSC, TGA analizi in preskusu sproščanja). Filme smo pripravili tako, da smo 10 g sveže pripravljene nanosuspenzije oz. 10 g suspenzije takoj po 10 min soniciranju zlili na aluminijasto folijo, ki smo jo postavili na ravno dno petrijevke in pustili pri sobni temperaturi 48 h, da so se filmi posušili. Za zagotavljanje primerljive vsebnosti vlage v nanovlaknih in filmih, smo pred vsako analizo nanovlakna in filme za 12 h postavili v eksikator.

### 3.3.6 Proučevanje morfoloških lastnosti vzorcev

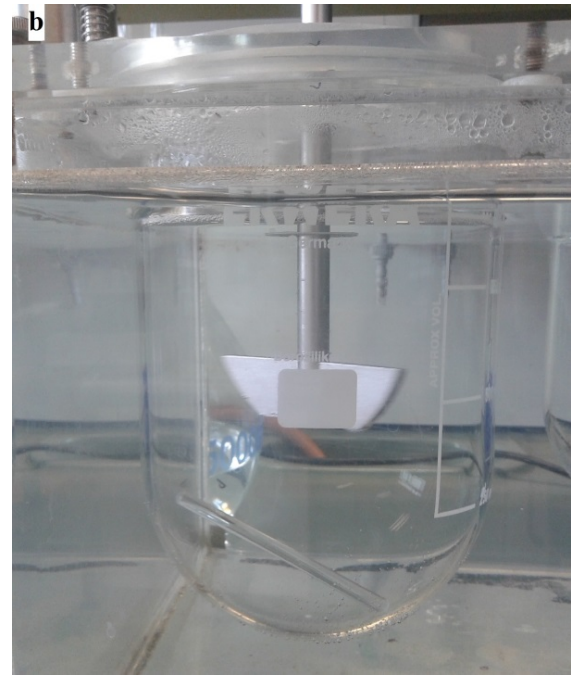
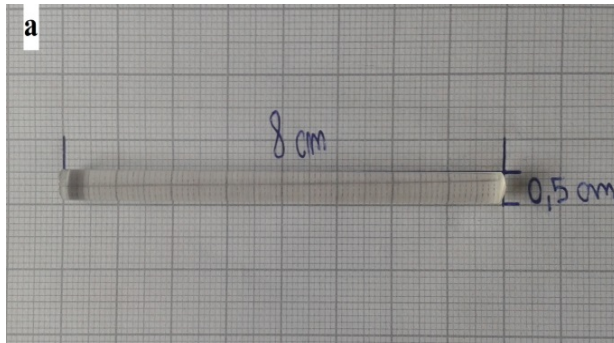
Z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) smo proučili morfološke lastnosti izhodnih vzorcev (praškov) karvedilola, PEO in poloksamera 407 ter polimernih nanovlaken in filmov, ki smo jih izdelali iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola. Vzorce smo z obojestranskim prevodnim ogljikovim lepilnim trakom pritrdili na kovinske nosilce za SEM analizo. Slike smo posneli pri pospeševalni napetosti 1 kV z uporabo detektorja za sekundarne elektrone.



### 3.3.7 Vrednotenje sproščanja učinkovine

Sproščanje karvedilola iz polimernih nanovlaken in filmov ter fizikalne zmesi učinkovine in polimerov smo vrednotili s preskusom sproščanja z uporabo naprave z vesli (naprava II (50)). Kot medij za sproščanje smo uporabili prečiščeno vodo. Volumen medija je bil 900 mL, temperatura  $37,0 \pm 0,5$  °C in hitrost vesel 50 obratov na minuto. Položaj vesel smo prilagodili našemu vzorcu. Spodnji rob vesla je bil oddaljen 6,5 cm od dna posode (farmakopeja predpisuje 2,5 cm (50)). Časi vzorčenja so bili: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 165, 210, 270, 330, 390, 480, 540 min. Odvzem vzorcev je potekal ročno. Volumen odvzema je znašal 10 mL. Odvzetega volumna vzorcev nismo nadomeščali, temveč smo ga upoštevali pri izračunu celokupne količine raztopljene učinkovine v posamezni časovni točki. Vzorce smo odvzeli s plastično brizgo, na katero smo predhodno namestili filter z velikostjo por 10 µm. Odvzete vzorce smo nato takoj še dodatno filtrirali skozi 0,45 µm filtre. Absorbanco ustrezno filtriranih vzorcev smo določili z UV-VIS spektrofotometrijo pri valovni dolžini 241 nm. Na podlagi umeritvene premice (poglavje 3.3.1) smo določili koncentracijo karvedilola v vzorcih. Kot slepi vzorec smo pri spektrofotometričnem določanju karvedilola uporabili prečiščeno vodo.

Nanovlakna in filme smo po sušenju na sobni temperaturi in v eksikatorju pripravili za preskus sproščanja. Odstranili smo jih z aluminijaste folije tako, da smo jih navili na steklene palčke s premerom 0,5 cm in dolžino 8 cm, ki so služile kot nosilci vzorcev med preskusom sproščanja (slika 6(a)). Palčke z vlakni/s filmi smo potopili na dno posode naprave z vesli in izvedli preskus sproščanja (slika 6(b)). Preskus smo za vsak vzorec izvedli v treh paralelah. Fizikalno zmes učinkovine in polimerov smo pripravili tako, da je bila njena kvantitativna sestava enaka sestavi filmov in nanovlaken. V pateno smo natehtali 2 g PEO, 2 g poloksamera 407 in 1 g karvedilola ter zmes s pestilom homogeno premešali. Nato smo natehtali ustrezno maso homogene zmesi in jo s pomočjo steklenega čolnička kvantitativno prenesli v posodo z medijem naprave z vesli in izvedli preskus sproščanja. Preskus smo izvedli v petih paralelah. Masa vzorcev nanovlaken, filmov in fizikalnih zmesi za preskus sproščanja je znašala 30–35 mg.



**Slika 6:** *Steklena palčka, kot nosilec za filme in nanovlakna (a), in steklena palčka v posodi naprave z vesli med preskusom sproščanja (b).*

### 3.3.7.1 Določanje končne točke raztapljanja

Končno točko raztapljanja fizikalne zmesi smo določili tako, da smo v 1000 mL merilno bučko natančno natehtali 14 mg PEO, 14 mg poloksamera in 7 mg karvedilola ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake volumna (koncentracija polimerov in učinkovine ter razmerje med njimi je bilo takšno kot pri preskusu sproščanja). Vzorce smo pustili mešati na magnetnem mešalu, jih po 165 min, 540 min in 24 h filtrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filtre in jim spektrofotometrično izmerili absorbanco pri valovni dolžini 241 nm. V vsaki časovni točki smo test izvedli v treh paralelah.

### 3.3.8 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Z DSC analizo smo proučevali kristaliničnost vzorcev karvedilola, poloksamera 407, PEO, fizikalne zmesi učinkovine in polimerov s sestavo, ki je opisana v poglavju 3.3.7, ter polimernih filmov in nanovlaken s karvedilolom. Natančno smo v 40  $\mu\text{L}$  aluminijaste lončke natehtali 3–5 mg vzorcev in jih zaprli s pomočjo stiskalnice za zapiranje DSC lončkov. Vzorce smo segrevali s hitrostjo 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  v temperaturnem območju od 0  $^{\circ}\text{C}$  do 130  $^{\circ}\text{C}$ . Meritve smo izvedli v dušikovi atmosferi s pretokom dušika 50 mL/min. Aparatura je bila kalibrirana z indijem.

### 3.3.9 Termogravimetrična analiza (TGA)

Vsebnost vlage v praškastih vzorcih karvedilola in polimerov, fizikalni zmesi učinkovine in polimerov, katere sestava in priprava je opisana v poglavju 3.3.7, polimernih filmih in nanovlaknih s karvedilolom smo preverili s TGA. Vzorce (30–50 mg) smo natančno natehtali v 150  $\mu$ L lončke iz aluminijevega oksida in jih segrevali v temperaturnem območju od 25 °C do 200 °C s hitrostjo 10 °C/min. Meritve smo izvedli v atmosferi dušika, katerega pretok je znašal 50 mL/min. Aparatura je bila kalibrirana z indijem.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Karvedilol je učinkovina z nizko vodotopnostjo, zato je bil namen magistrske naloge povečati njegovo topnost in hitrost raztapljanja z nanotehnološkim pristopom, tj. z vgrajevanjem karvedilola v nanovlakna iz PEO in poloksamera 407.

### 4.1 *TOPNOST KARVEDILOLA V PREČIŠČENI VODI*

Naše raziskovalno delo smo začeli z ugotavljanjem topnosti karvedilola v prečiščeni vodi. Pri filtriranju vzorcev smo prvih nekaj mL filtrata zavrgli in tako preprečili, da bi adsorpcija učinkovine na filter povzročila lažno nižje rezultate topnosti karvedilola. Določili smo, da topnost karvedilola v prečiščeni vodi pri sobni temperaturi znaša  $27,2 \pm 0,2$   $\mu\text{g/mL}$ . Po 48 h smo vzorcem ponovno pomerili absorbanco in ugotovili, da so koncentracije karvedilola primerljive s koncentracijami, izmerjenimi po 24 h. S tem smo potrdili, da se je v vzorcih že v 24 h vzpostavilo termodinamsko ravnotežje in da smo določili ravnotežno topnost karvedilola v vodi. Dobljeno vrednost smo primerjali s podatki iz literature, ki navaja, da je topnost karvedilola pri sobni temperaturi v mediju s pH 7  $23 \mu\text{g/mL}$ , topnost karvedilola pri sobni temperaturi v mediju s pH 5 pa  $100 \mu\text{g/mL}$  (41). Topnost karvedilola, ki smo jo določili v laboratoriju, je bila tako primerljiva s podatkom iz literature.

### 4.2 *TOPNOST KARVEDILOLA V RAZTOPINAH POLIMEROV*

Topnost in hitrost raztapljanja karvedilola smo skušali povečati z vgraditvijo karvedilola v nanovlakna iz PEO in poloksamera 407. Pred izdelavo nanovlaken smo preverili, kakšen je vpliv polimerov, ki smo ju uporabili kot gradnika nanovlaken, na topnost učinkovine. Koncentracijo raztopljenega karvedilola v polimernih raztopinah smo določali spektrofotometrično. Pred merjenjem absorbance smo suspenzije karvedilola v polimernih raztopinah filtrirali skozi  $0,45 \mu\text{m}$  filtre, da smo odstranili delce neraztopljene učinkovine in tako pripravili raztopine karvedilola v raztopinah polimerov. Filtrate smo nato 50-krat redčili s prečiščeno vodo in tako dosegli koncentracijo karvedilola znotraj območja umeritvene krivulje. Koncentracije poloksamera 407 v vzorcih po redčenju filtratov so znašale  $0,08\text{--}0,60 \text{ mg/mL}$ , kar pomeni, da so presegale njegovo CMC vrednost, ki znaša  $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ , tj.  $3,5 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$  (36). Poloksamer tako lahko v filtratih tvori micеле in povzroči solubilizacijo karvedilola. Da bi preprečili morebiten vpliv micelov na

izmerjeno absorbanco in s tem na določitev topnosti karvedilola, smo vzorcem dodali 20 % (v/v) metanola. Ugotovili smo, da metanol ne vpliva na rezultate meritev in da je koncentracija karvedilola, ki jo spektrofotometrično določimo v raztopini poloksamera 407 s koncentracijo nad CMC, primerljiva s teoretično, tj. koncentracijo, ki smo jo izračunali iz natehtanega karvedilola (poglavje 3.3.2.4). Rezultat dokazuje, da lahko po tej metodi pravilno določimo koncentracijo karvedilola v vodnih raztopinah polimerov PR<sub>1</sub>–PR<sub>6b</sub>. Pri pripravi vzorcev smo opazili, da ima karvedilol veliko afiniteto do adsorpcije na površine vsebnikov in pribora, ki smo ga uporabljali, tj. karvedilol se je adsorbiral na filtre, mikrocentrifugirke in konice pipet, kar je vodilo do lažno nižjih koncentracij vzorcev. Da smo se vplivu adsorpcije učinkovine izognili, smo vsebnike in pribor pred uporabo sprali s filtratom. Med pripravo polimernih raztopin in suspenzij smo vzorce pred mešanjem na magnetnem mešalu za 10 min postavili v zamrzovalnik, da so se ohladili. Tako smo pospešili hitrost raztapljanja poloksamera 407 v vodi. Poloksamer 407 tvori v vodi termoreverzibilne hidrogelne, kar pomeni, da je viskoznost raztopin polimera pri nižni temperaturi manjša in posledično hitrost raztapljanja večja (35).

Rezultati določanja topnosti karvedilola v raztopinah polimerov v prečiščeni vodi so podani v preglednici V.

**Preglednica V:** Topnost karvedilola v vodnih raztopinah polimerov.

Polimerna raztopina	Topnost* [ $\mu\text{g/mL}$ ]
PR <sub>1</sub>	28,2 ± 4,3
PR <sub>2</sub>	45,5 ± 3,3
PR <sub>3</sub>	84,8 ± 5,6
PR <sub>4</sub>	91,0 ± 4,3
PR <sub>5</sub>	111,0 ± 3,7
PR <sub>6a</sub>	129,7 ± 2,6
PR <sub>6b</sub>	272,2 ± 1,2

\* Topnost je podana kot povprečje treh meritev.

Topnost karvedilola, ki smo jo določili v vodni raztopini PEO (PR<sub>1</sub>), je bila primerljiva s topnostjo karvedilola v prečiščeni vodi (27,2 µg/mL), kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji. PEO je namreč hidrofilni polimer, ki nima lastnosti površinsko aktivnih snovi, s katerimi bi vplival na topnost učinkovine. Za pripravo polimernih raztopin smo PEO uporabili, ker je v nadaljevanju raziskovalnega dela omogočil izdelavo nanovlaken. Topnost karvedilola v polimernih raztopinah, ki so poleg PEO vsebovale tudi poloksamer 407 (PR<sub>2</sub>–PR<sub>6b</sub>), je bila višja v primerjavi s topnostjo karvedilola v prečiščeni vodi in je naraščala sorazmerno s koncentracijo poloksamera 407 v polimerni raztopini. V PR<sub>6b</sub> se je topnost karvedilola v primerjavi z vodo najbolj povečala, in sicer za faktor ~10. Povečanje topnosti je posledica solubilizacije karvedilola z molekulami poloksamera 407, ki imajo amfifilno kemijsko strukturo (36). Ker je karvedilol učinkovina z lipofilnimi lastnostmi, se lahko vključi v hidrofobno notranjost micelov, ki jih molekule poloksamera 407 tvorijo v vodi (36, 45, 46). Da bi poloksamer 407 v vodni raztopini tvoril micela, mora njegova koncentracija doseči kritično micelsko koncentracijo (CMC), ki znaša  $2,8 \times 10^{-6}$  mol/L, tj.  $3,5 \times 10^{-2}$  mg/mL (36). V polimernih raztopinah PR<sub>1</sub>–PR<sub>6b</sub> je koncentracija poloksamera 407 znašala 4,0–30,0 mg/mL (ob predpostavki, da je volumen PR in S z maso 20,0 g znašal 20,0 mL), kar je močno presegalo CMC vrednost in povzročilo tvorbo micelov, v katere se je lahko vgradil karvedilol, ki smo ga dodali v pripravljene polimerne raztopine pri izdelavi suspenzij S<sub>1</sub>–S<sub>6b</sub>. Tako smo potrdili našo domnevo o povečanju topnosti karvedilola z mehanizmom solubilizacije. Odstopanja posameznih meritev določanja topnosti karvedilola v raztopinah polimerov, ki jih kažejo standardne deviacije (SD) (preglednica V), so zlasti pri nizkih koncentracijah poloksamera 407 dokaj velike, kar je posledica nizke topnosti karvedilola, zato se že najmanjše napake (nepopolno spiranje uporabljenega pribora (filtrov, mikrocentrifugirk, konic pipet) z vzorcem, nenatančno redčenje vzorca, nepopolen prenos vzorca iz mikrocentrifugirke v bučko...) in odstopanja pri določanju topnosti zelo poznajo na izmerjeni vrednosti.

#### **4.2.1 Vpliv polimerov na rezultate določanja topnosti karvedilola v raztopinah polimerov**

Osnovno analitsko metodo za spektrofotometrično določanje karvedilola smo razvili za raztopine karvedilola v prečiščeni vodi. Ker so naši vzorci vsebovali poleg karvedilola tudi polimere (PEO in poloksamer 407), smo preverili, ali polimeri motijo oz. vplivajo na določanje karvedilola. Vpliv polimerov smo ugotavljali pri takšnih sestavah vzorcev, kot

smo jih imeli pri določanju topnosti karvedilola v raztopinah polimerov. Ugotavljali smo vpliv polimerov v  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_{6a}$  in  $S_{6b}$ . Vpliv polimerov smo ugotavljali tako, da smo teoretično koncentracijo ( $c_t$ ) karvedilola v vzorcu primerjali s spektrofotometrično določeno koncentracijo karvedilola ( $c_i$ ) v istem vzorcu. Odstopanje izmerjene koncentracije od teoretične smo določili računsko z enačbo 2.

$$\text{odstopanje [\%]} = ((c_i - c_t) / c_t) * 100 \quad \text{Enačba 2}$$

Najprej smo vzorcem, ki smo jim dodali  $PR_1$  in  $PR_{6a}$ , pomerili absorbanco glede na slepi vzorec, ki ga je predstavljala prečiščena voda. Rezultati so podani v preglednici VI. Ugotovili smo, da polimeri pri dani koncentraciji in valovni dolžini 241 nm absorbirajo svetlobo in vplivajo na rezultate določanja karvedilola (rezultati meritev kažejo lažno višjo koncentracijo karvedilola). Ker je odstopanje pri vzorcih z dodanim  $PR_1$  veliko večje kot pri vzorcih z dodanim  $PR_{6a}$ , lahko sklepamo, da ima prisotnost PEO v vzorcu večji vpliv kot prisotnost poloksamera 407, saj je bila koncentracija PEO v  $PR_1$  večja kot v  $PR_{6a}$ . Na podlagi teh ugotovitev smo se odločili, da bomo absorbanco vzorcem izmerili še glede na slepi vzorec, ki ga je predstavljala raztopina z enako koncentracijo polimerov kot proučevan vzorec (sestava te je podana v poglavju 3.3.2.4). Rezultati meritev glede na tako pripravljen slepi vzorec so podani v preglednici VII. Izmerjene koncentracije so bile pri teh meritvah primerljive s teoretično koncentracijo karvedilola v vzorcih. Na podlagi dobljenih rezultatov smo zaključili, da polimeri pri takšni izvedbi metode ne vplivajo na določanje koncentracije karvedilola v vzorcu, saj so bile razlike med teoretično in izmerjeno koncentracijo karvedilola majhne, zato je metoda primerna za analizo vzorcev karvedilola s prisotnimi polimeri. Tako lahko povzamemo, da smo z merjenjem absorbance vzorca glede na slepo raztopino s polimeri kvantificirali le karvedilol in da dobljeni rezultati odražajo dejansko topnost karvedilola v polimernih raztopinah.

**Preglednica VI:** *Vpliv polimerov na spektrofotometrično določanje karvedilola. Kot slepi vzorec smo pri analizi uporabili prečiščeno vodo.*

Polimerna raztopina	$c_i$ [mg/mL]	Odstopanje $c_i$ od $c_t$ [%]
---------------------	---------------	-------------------------------

<b>PR<sub>1</sub></b>	Posamezne meritve	Povprečna vrednost	Odstopanje posamezne meritve	Povprečje odstopanj posameznih meritev
	0,0016270	0,001828	15,23	29,43
	0,0019768		40,00	
	0,0018787		33,05	
<b>PR<sub>6a</sub></b>	Posamezne meritve	Povprečna vrednost	Odstopanje posameznih meritev	Povprečje odstopanj posameznih meritev
	0,001550	0,001530	9,77	8,38
	0,001479		4,71	
	0,001562		10,62	

**Preglednica VII:** *Vpliv polimerov na spektrofotometrično določanje karvedilola. Kot slepi vzorec smo pri analizi uporabili raztopino polimerov.*

<b>Polimerna raztopina</b>	<b>ci [mg/mL]</b>		<b>Odstopanje ci od ct [%]</b>	
	Posamezne meritve	Povprečna vrednost	Odstopanje posameznih meritev	Povprečje odstopanj posameznih meritev*
<b>PR<sub>1</sub></b>	0,001500	0,001460	6,18	3,47
	0,001410		- 0,18	
	0,001470		4,04	
	<b>PR<sub>2</sub></b>	Posamezne meritve	Povprečna vrednost	Odstopanje posameznih meritev
	0,001507		6,75	



	0,001428	0,001448	1,15	2,73
	0,001428		- 0,27	
<b>PR<sub>6a</sub></b>	Posamezne meritve	Povprečna vrednost	Odstopanje posameznih meritev	Povprečje odstopanj posameznih meritev*
	0,001462		3,583	
	0,001489	0,001457	5,44	3,20
	0,001420		0,57	
<b>PR<sub>6b</sub></b>	Posamezne meritve	Povprečna vrednost	Odstopanje posameznih meritev	Povprečje odstopanj posameznih meritev*
	0,001426		0,98	
	0,001422	0,001431	0,72	1,40
	0,001445		2,31	

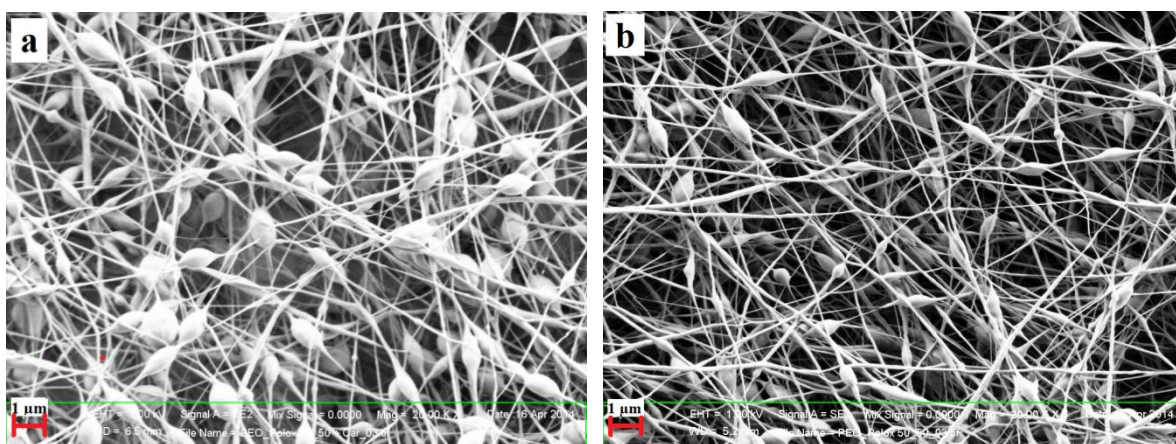
\* Pri izračunu povprečja odstopanj smo upoštevali absolutne vrednosti odstopanj posameznih meritev.

#### **4.3 PRIPRAVA SUSPENZIJ IN NANOSUSPENZIJE KARVEDILOLA V RAZTOPINAH POLIMEROV IN IZDELAVA NANOVLAKEN Z METODO ELEKTROSTATSKEGA SUKANJA**

Raziskovalno delo smo nadaljevali z izdelavo nanovlaken. Glavni namen priprave nanovlaken je bil povečati hitrost raztapljanja karvedilola.

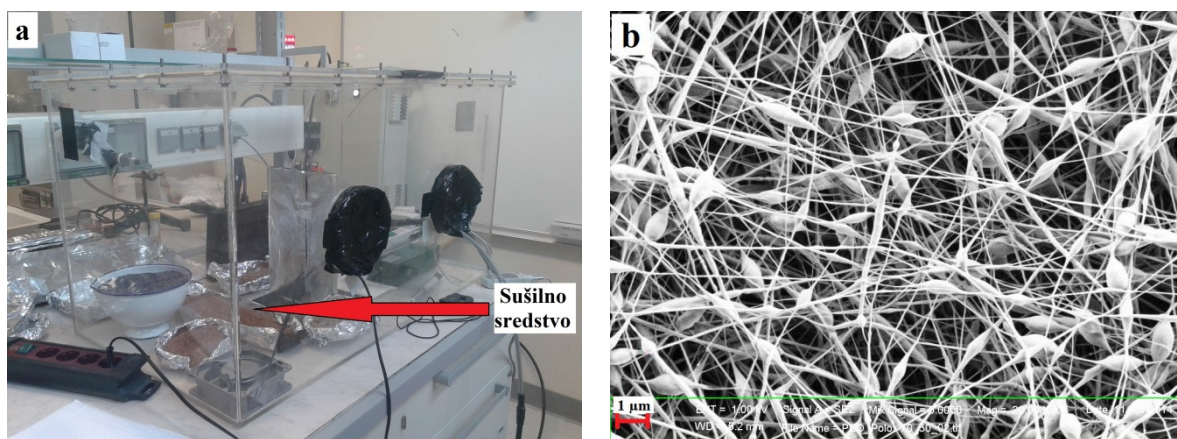
Glavna komponenta polimernih raztopin in suspenzij z vidika izdelave nanovlaken je bil PEO. PEO je polimer, ki omogoča tvorbo nanovlaken in se zato pogosto uporablja za njihovo izdelavo. Da lahko z elektrostatskim sukanjem iz raztopin PEO pripravimo nanovlakna, morajo imeti raztopine ustrezno viskoznost, ki jo dosežemo z ustrezno koncentracijo polimera v raztopini. V literaturi smo zasledili, da mora biti masni delež

PEO v vodni raztopini 4–10 %, da lahko iz raztopine PEO izdelamo nanovlakna. Pri vrednostih, nižjih od 4 %, zaradi nizke viskoznosti pride do pretrganja curka in tvorbe kapljic (interakcije med molekulami polimera niso zadosti močne, da bi omogočile tvorbo nanovlaken). Pri vrednostih nad 10 % pa je viskoznost previsoka in onemogoča konstanten, nadzorovan pretok polimerne raztopine skozi kovinsko iglo (21). Na osnovi izsledkov iz literature smo najprej pripravili 4 % (m/m) vodno raztopino PEO (PR<sub>1</sub>). Nato smo delež PEO v raztopinah zniževali in sorazmerno zviševali delež poloksamera 407 ter tako pripravili polimerne raztopine PR<sub>2</sub>–PR<sub>6a</sub>. Poloksamer 407 je polimer z visoko molekulsko maso, zato se viskoznost vode, v kateri raztopimo poloksamer 407, poveča. Tako smo pripravili PR<sub>1</sub>–PR<sub>6a</sub>, ki so vsebovale celokupno 4 % (m/m) polimerov (vsota PEO in poloksamera). Iz polimernih raztopin PR<sub>1</sub>–PR<sub>6a</sub> in suspenzij S<sub>1</sub>–S<sub>6a</sub> smo s postopkom elektrostatskega sukanja poskušali izdelati nanovlakna pri sobni temperaturi, relativni vlažnosti (RV) prostora, ki je znašala 42–46 %, in parametrih, navedenih v preglednici IV. Suspenzijo smo pred izdelavo nanovlaken postavili v UZ kadičko za 10 min, s čimer smo razbili morebitne agregate učinkovine in zagotovili večjo homogenost suspenzije. Izbrani pogoji izdelave in parametri polimerne raztopine so omogočili tvorbo Taylorjevega stožca in nastanek nanovlaken iz vseh pripravljenih polimernih raztopin in suspenzij. Morfološke lastnosti izdelanih nanovlaken smo proučili s SEM analizo. Ker je bil cilj raziskovalnega dela karseda povečati topnost in hitrost raztapljanja karvedilola, so nas najbolj zanimala nanovlakna, izdelana iz polimerne raztopine PR<sub>6a</sub> in suspenzije S<sub>6a</sub>, ker je bila topnost karvedilola že v sami izhodni raztopini med vsemi polimernimi raztopinami s 4 % masnim deležem polimerov najvišja (preglednica V). Na sliki 7 je prikazan produkt elektrostatskega sukanja polimerne raztopine PR<sub>6a</sub> in suspenzije S<sub>6a</sub>.



**Slika 7:** SEM sliki nanovlaken, izdelanih iz suspenzije  $S_{6a}$  (a) in polimerne raztopine  $PR_{6a}$  (b).

SEM sliki potrjujeta, da smo pri danih pogoji in parametrih elektrostatskega sukanja uspeli izdelati nanovlakna, vendar so le-ta imela prisotne številne vozlaste strukture. Vozli nanovlaken, izdelanih iz suspenzije karvedilola v raztopini polimerov, so bili večji in bolj okrogle oblike kot vozli nanovlaken, izdelanih iz polimerne raztopine. Dodatek učinkovine je torej nekoliko spremenil lastnosti sistema, zato so se nanovlakna, izdelana iz suspenzije, morfološko nekoliko razlikovala od nanovlaken, narejenih iz same polimerne raztopine z enako sestavo. Ker so se vozli pojavili v obeh primerih, smo sklepali, da se razlog njihove prisotnosti skriva v neustrezno izbranih pogojih elektrostatskega sukanja. V literaturi smo zasledili, da ima na morfologijo nanovlaken, izdelanih iz PEO, velik vpliv RV, pri kateri izvajamo elektrostatsko sukanje. Pri elektrostatskem sukanju raztopine PEO pri RV nad 50 % začnejo nastajati v strukturi produkta poleg nanovlaken tudi vozlaste strukture, pri RV nad 70 % pa nanovlakna več ne nastajajo, ampak se tvori polimerni film (27). Ali je bila previsoka RV (42–46 %) razlog za pojav vozlastih struktur v izdelanih nanovlaknih, smo preverili tako, da smo iz suspenzije  $S_{6a}$  izdelali nanovlakna pri nižji RV. Izolirana komora, ki smo jo uporabili, in produkt elektrostatskega sukanja pri nižjani RV (30 %) sta prikazana na sliki 8.

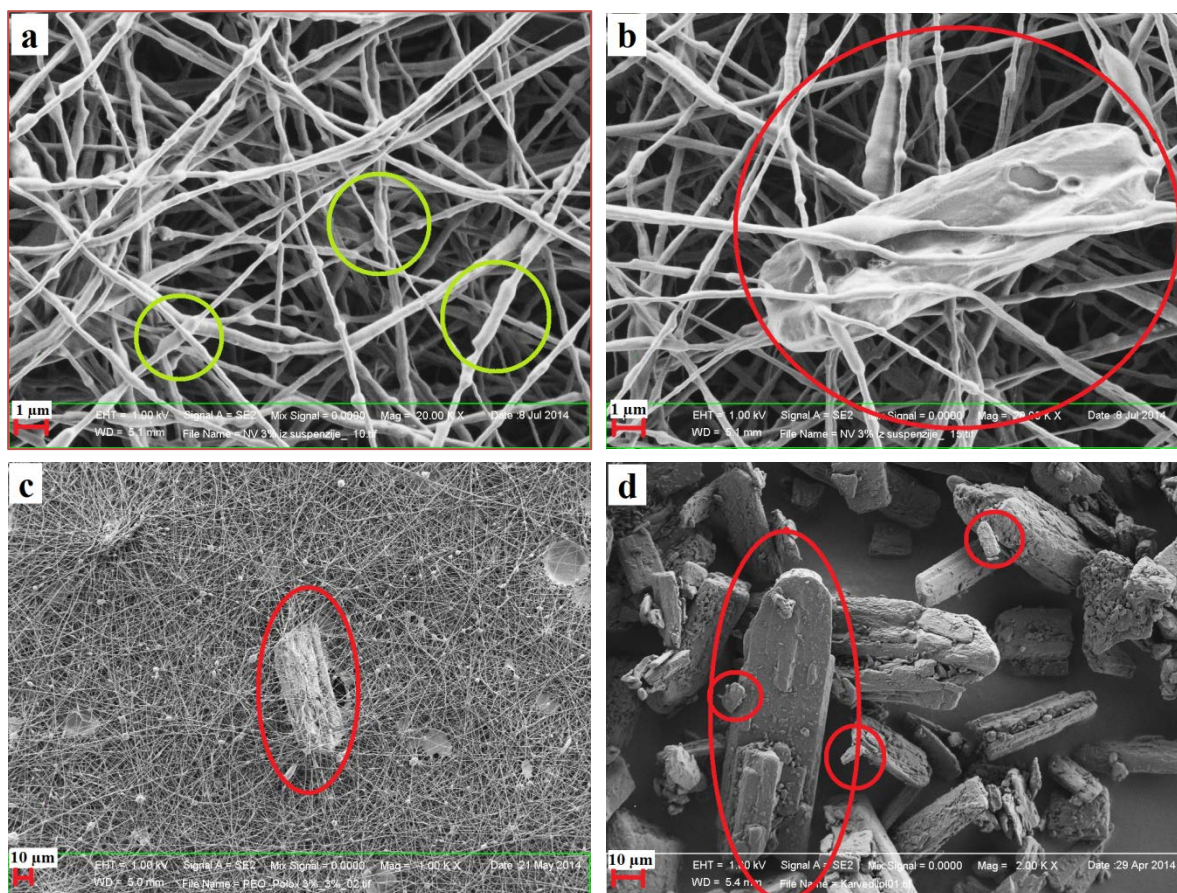


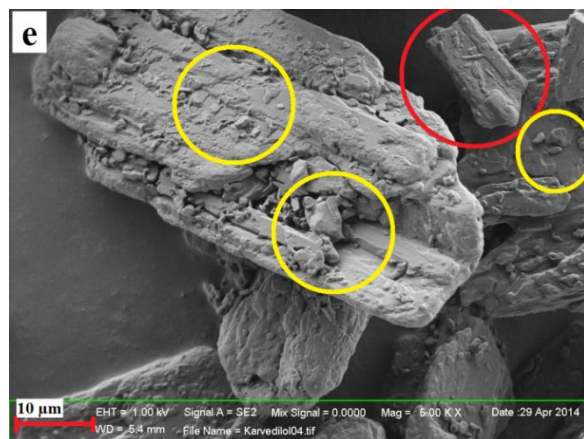
**Slika 8:** Izolirana komora za izvedbo elektrostatskega sukanja (s sušilnim sredstvom) (a) in SEM slika nanovlaken, izdelanih iz suspenzije  $S_{6a}$  pri RV 30 % (izdelana v izolirani komori) (b).

Kljub za ~15 % nižji RV se oblika in gostota vozlastih struktur nista bistveno spremenili. Čeprav z nižanjem RV nismo preprečili nastanka vozlov, smo se odločili, da bomo v

nadaljevanju raziskovalnega dela elektrostatsko sukanje izvajali v izolirani komori pri RV 30–36 %. Tako smo se odločili zato, ker je RV v laboratoriju, v katerem smo izvajali elektrostatsko sukanje, nihala iz dneva v dan med vrednostima 45 % in 65 %. Z delom v komori smo tako zagotovili bolj ponovljive eksperimentalne pogoje (RV 30–36 %) med elektrostatskim sukanjem in se izognili vplivu RV na morfologijo izdelanih nanovlaken.

Ker znižanje RV ni imelo bistvenega vpliva na morfologijo izdelanih nanovlaken, smo na morfologijo skušali vplivati s spremembo sestave polimerne raztopine in suspenzije, iz katerih smo izdelali nanovlakna. Ker je PEO tvorilec nanovlaken, smo njegov delež v polimerni raztopini povečali z 2 % na 3 % (m/m) in tako pripravili polimerno raztopino PR<sub>6b</sub>, katere sestava je prikazana v preglednici II. Poleg povečanja deleža PEO smo povečali tudi delež poloksamera 407 in karvedilola v vzorcu ter tako ohranili enaka masna razmerja med sestavinami v polimernih raztopinah PR<sub>6a</sub> in PR<sub>6b</sub> ter suspenzijah S<sub>6a</sub> in S<sub>6b</sub>. Pri RV 30–36 %, sobni temperaturi in parametrih, navedenih v preglednici IV, smo izdelali nanovlakna in jih analizirali s SEM. Produkt elektrostatskega sukanja je prikazan na sliki 9 (a–c).



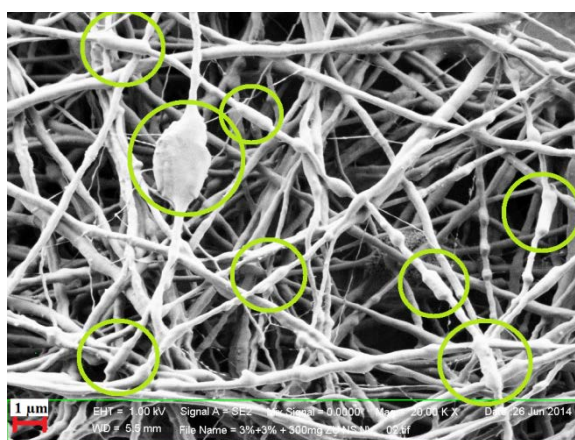


**Slika 9:** Nanovlakna, izdelana iz suspenzije  $S_{6b}$ , pri večji (a, b) ter manjši (c) povečavi. Prašek karvedilola pri manjši (d) in večji (e) povečavi. Z rdečo so označeni večji kristali karvedilola, ki se vgradijo med nanovlakna. Z rumeno so označeni kristali karvedilola, ki so dovolj majhni, da se lahko vgradijo v notranjost nanovlaken. Z zeleno so označene zadebelitve nanovlaken, kjer so glede na obliko in velikost lahko vključeni manjši kristali karvedilola, označeni na sliki (e) z rumeno barvo.

Nanovlakna, izdelana iz suspenzije  $S_{6b}$  (slike 9 (a–c)), so imela boljše morfološke lastnosti, saj je bilo prisotnih veliko manj vozlastih struktur kot v nanovlaknih, izdelanih iz suspenzije  $S_{6a}$  (slika 8 (b)). Na slikah 9 (b) in 9 (c) lahko opazimo velika kristala karvedilola, ki sta se med elektrostatskim sukanjem ujela med nanovlakna. Ker sta strukturi na slikah 9 (b) in 9 (c) podobne oblike kot kristali karvedilola (sliki 9 (d), (e)), smo sklepali, da sta to neraztopljena kristala učinkovine. Da sta strukturi na slikah 9 (b) in 9 (c) kristala karvedilola, potrjuje tudi dejstvo, da takšnih struktur v vlaknih, izdelanih iz polimernih raztopin  $PR_1$ – $PR_{6b}$ , nismo opazili. Kristali so se med nanovlakna ujeli tudi pri elektrostatskem sukanju preostalih suspenzij ( $S_1$ – $S_{6a}$ ). Na sliki 9 (a) lahko vidimo zadebelitve v strukturi nanovlaken (označeno z zeleno). Ker so delci učinkovine paličaste oblike (sliki 9 (d), (e)) in ker so tudi zadebelitve nanovlaken takšne, sklepamo, da vključujejo kristale karvedilola (primeri manjših kristalov karvedilola, ki bi se lahko vgradili v nanovlakna so z rumeno označeni na sliki 9 (e)). Praškasta učinkovina, ki smo jo vgrajevali v nanovlakna, je imela zelo široko porazdelitev velikosti delcev (sliki 9 (d), (e)); to pomeni, da so bili prisotni delci velikosti od več sto mikrometrov do več sto nanometrov. Manjši kristali so se lahko vgradili v notranjost vlaken, medtem ko so se

posamezni večji kristali, med postopkom elektostatskega sukanja, ujeli med vlakna. Največjih kristalov v strukturi produkta elektostatskega sukanja nismo opazili, saj so lahko zaradi velikosti padli iz curka ali se odluščili iz nanovlaken že med potovanjem curka do zbirala.

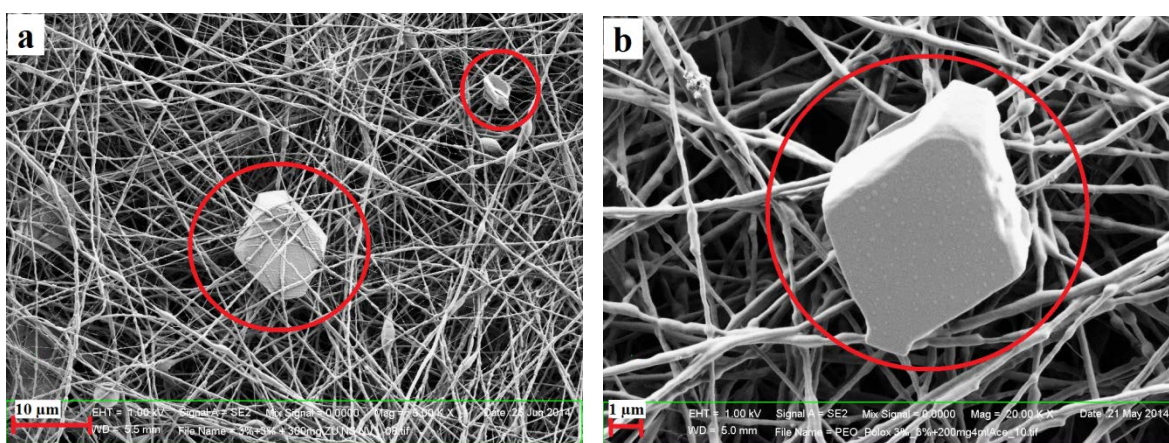
Da bi zmanjšali in poenotili velikost kristalov karvedilola ter tako zmanjšali delež velikih kristalov, ki se vgradijo med vlakna, in povečali delež majhnih kristalov, ki se vgradijo v notranjost vlaken, smo v postopek izdelave nanovlaken vključili izdelavo nanosuspenzije učinkovine v raztopini polimerov (NS<sub>6b</sub>). Vodno fazo za izdelavo nanosuspenzije NS<sub>6b</sub> je tako predstavljala raztopina polimerov PR<sub>6b</sub>, organsko fazo pa raztopina učinkovine v organskem topilu, ki se popolnoma meša z vodo. Kot organska topila smo preizkusili aceton, etanol in etilacetat. Kot najprimernejše topilo se je izkazal aceton, saj je bila topnost karvedilola v acetonu največja, kar je omogočilo, da smo v raztopino polimerov uvedli čim manj organskega topila. Organsko fazo smo počasi injicirali v vodno fazo in po 5 min mešanja pripravljene disperzije na magnetnem mešalu izvedli elektrostatsko sukanje (pri sobni temperaturi, RV 30–36 % in parametrih, navedenih v preglednici IV). Izdelana nanovlakna so prikazana na sliki 10.



**Slika 10:** SEM slika nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije karvedilola v raztopini polimerov (NS<sub>6b</sub>). Z zeleno so označene zadebelitve nanovlaken, ki verjetno predstavljajo manjše kristale karvedilola, ki so se vgradili v notranjost nanovlaken.

Morfologija nanovlaken, ki smo jih izdelali iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, je bila primerljiva z morfologijo nanovlaken, ki smo jih izdelali iz suspenzije S<sub>6b</sub> (odsotnost vozlastih struktur, debelina nanovlaken). V njihovi strukturi so bile prisotne številne zadebelitve, ki glede na obliko verjetno predstavljajo manjše kristale karvedilola, vgrajene v nanovlakna (slika 10,

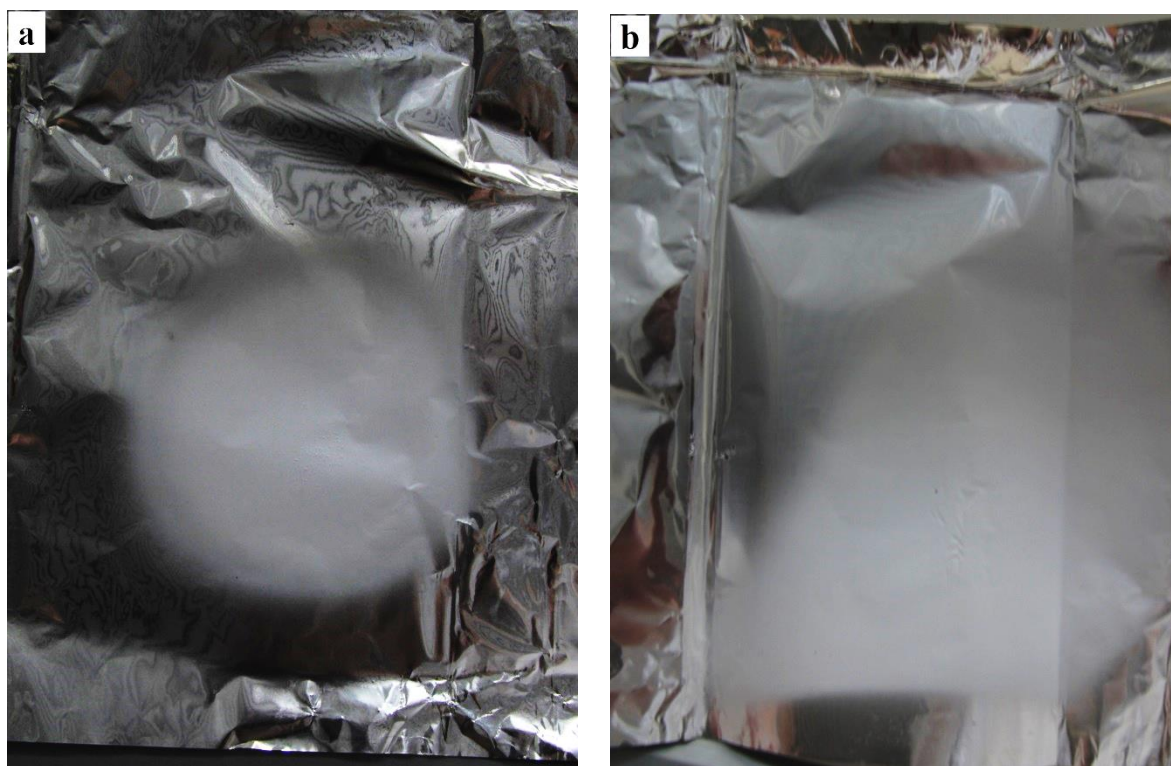
z zeleno označene strukture). Večjih kristalov paličaste oblike, ki bi se vgradili med nanovlakna, pri SEM analizi nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije, nismo zasledili. Pri nanovlaknih, izdelanih iz nanosuspenzije, pa smo zasledili prisotnost nenavadnih struktur, ki so prikazane na sliki 11. Te strukture verjetno predstavljajo kristale karvedilola, ki so nastali med izdelavo nanosuspenzije. Med injiciranjem raztopine karvedilola v acetonu v vodno raztopino polimerov je najverjetneje prišlo do kristalizacije karvedilola zaradi lokalnega prenasičenja. Nastali kristali so se pri elektrostatskem sukanju ujeli med nastajajoča nanovlakna. Kristali, ki so nastali s kristalizacijo med postopkom izdelave NS<sub>6b</sub> in so se ujeli med nanovlakna (slika 11), so bili večinoma manjši v primerjavi s kristali, ki so se vgradili med nanovlakna, izdelana iz suspenzije S<sub>6b</sub> (slika 9).



**Slika 11:** Kristali karvedilola v nanovlaknih, izdelanih iz NS<sub>6b</sub> pri manjši (a) in večji (b) povečavi.

Dodatek acetona v polimerno raztopino pri izdelavi nanosuspenzije je nekoliko spremenil lastnosti vzorca, kar se je odrazilo tudi v velikosti površine, na kateri so se na zbiralu odlagala nanovlakna (slika 12). V primeru elektrostatskega sukanja suspenzije so se nanovlakna zbrala v obliki krožne lise na sredini zbirala (slika 12 (a)), medtem ko so se nanovlakna, izdelana iz nanosuspenzije, odložila na večji površini nepravilne oblike (slika 12 (b)), čeprav smo uporabili enake parametre elektrostatskega sukanja pri obeh vzorcih. Ker so se nanovlakna, izdelana iz nanosuspenzije, razporedila po večji površini zbirala kot nanovlakna, izdelana iz suspenzije, smo v istem času elektrostatskega sukanja iz nanosuspenzije pripravili tanjšo plast nanovlaken. Nanovlakna, narejena iz nanosuspenzije, smo tako za namen izvedbe preskusa sproščanja namesto 105 min elektrostatsko sukali 165 min. S podaljšanjem elektrostatskega sukanja smo na zbiralu zbrali dovolj debelo plast

nanovlaken, da smo jo lahko z aluminijske folije prenesli na stekleno palčko in izvedli preskus sproščanja (poglavje 3.3.7).



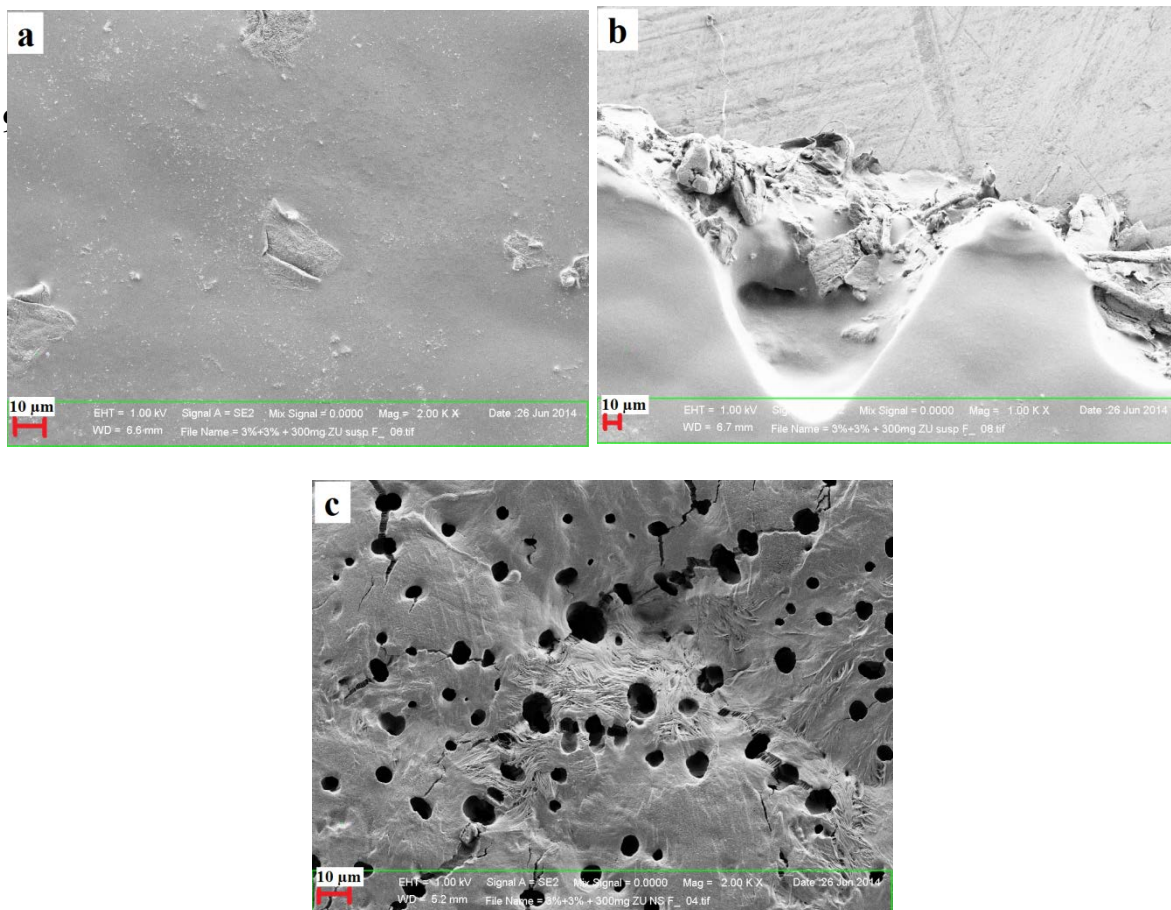
**Slika 12:** Vzorec nanovlaken, izdelanih z elektrostatskim sukanjem suspenzije  $S_{6b}$  (a) in nanosuspenzije  $NS_{6b}$  (b) karvedilola na aluminijski foliji.

Morfološke lastnosti nanovlaken, izdelanih iz suspenzij in nanosuspenzij karvedilola v raztopinah polimerov, bi lahko še izboljšali. Poizkusili bi lahko z optimizacijo parametrov elektrostatskega sukanja, kot je električna napetost, pretok polimerne raztopine in razdalja med konico igle in zbiralom ter s povečevanjem deleža polimerov v raztopini. A osnovni namen našega dela ni bil izdelati nanovlaken brez vozlastih struktur, ampak ugotoviti, ali lahko z izdelavo nanovlaken vplivamo na hitrost raztapljanja karvedilola. Z morfologijo izdelanih nanovlaken iz suspenzije  $S_{6b}$  in nanosuspenzije  $NS_{6b}$  smo bili zadovoljni in smo jih uporabili za vrednotenje sproščanja učinkovine.



#### 4.4 IZDELAVA FILMOV IZ SUSPENZIJ IN NANOSUSPENZIJE KARVEDILOLA

Iz suspenzije  $S_{6b}$  in nanosuspenzije  $NS_{6b}$  smo izdelali polimerne filme s karvedilolom, ki smo jih uporabili kot primerjavo nanovlaknom pri preskusu sproščanja, DSC in TGA analizi. Morfologijo pripravljenih polimernih filmov smo pogledali tudi z vrstičnim elektronskim mikroskopom (slika 13).

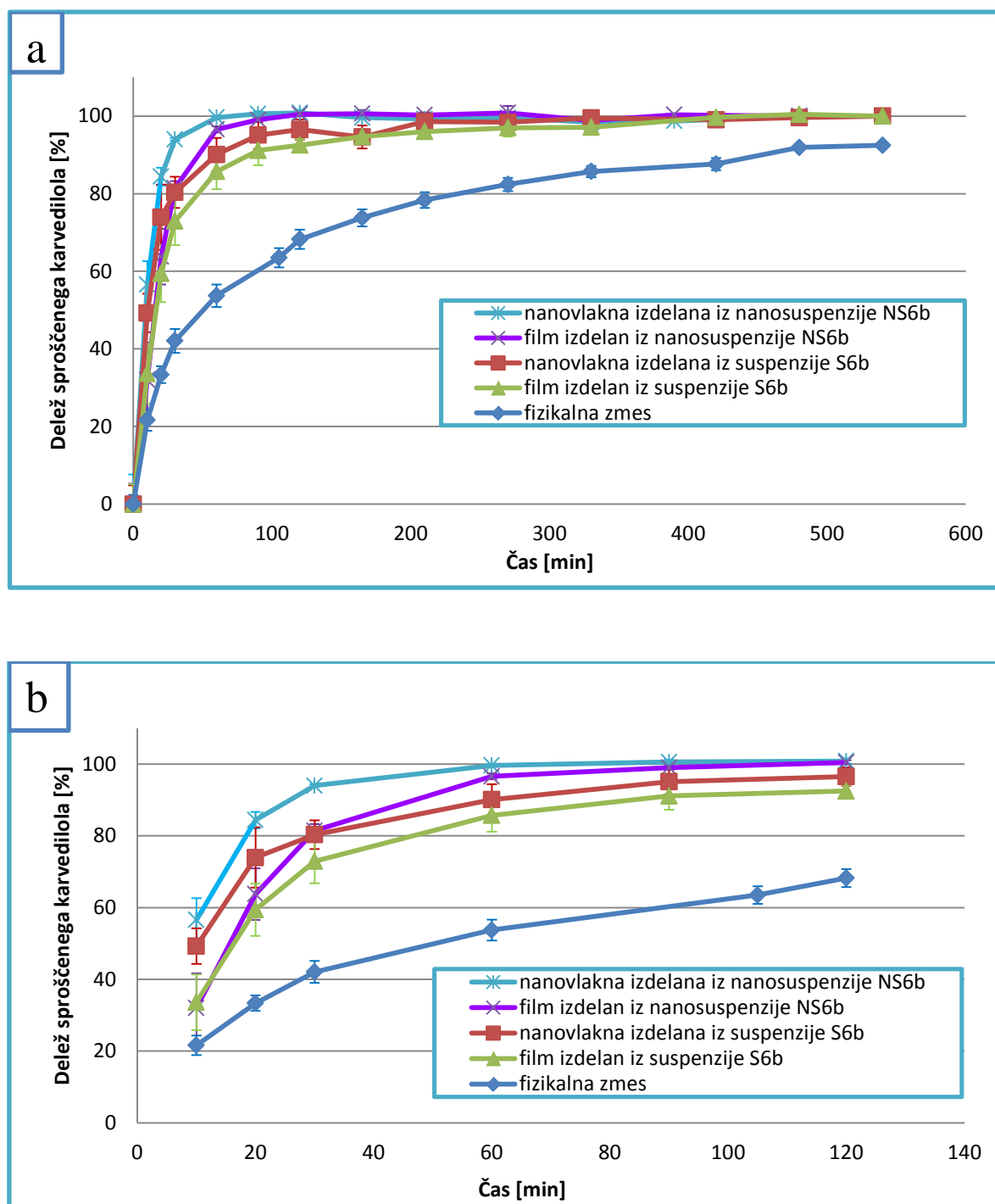


**Slika 13:** SEM slika filma, izdelanega iz suspenzije karvedilola  $S_{6b}$  (površina filma (a), rob oz. prerez filma (b)), in SEM slika filma, izdelanega iz nanosuspenzije  $NS_{6b}$  (c).

V filmu, izdelanem iz suspenzije  $S_{6b}$ , so bili prisotni kristali karvedilola različnih velikosti, kar se dobro vidi na SEM sliki roba filma (sliki 13 (b)). Na SEM sliki površine filma, izdelanega iz nanosuspenzije  $NS_{6b}$ , ni vidnih kristalov karvedilola (slika 13 (c)). Film je močno naluknjan, kar je najverjetneje posledica hitrega izhlapevanja acetona v primerjavi z izhlapevanjem vode.

#### 4.5 VREDNOTENJE SPROŠČANJA UČINKOVINE

Profili sproščanja karvedilola iz polimernih nanovlaken in filmov ter fizikalne zmesi učinkovine in polimerov so podani na sliki 14.



Slika 14: Profili sproščanja karvedilola iz nanovlaken, filmov in fizikalne zmesi v časovnem intervalu 0–540 min (a) ter izsek profilov sproščanja v časovnem intervalu

0–120 min **(b)** Intervali napak na grafu podajajo standardno deviacijo (SD) oz. odstopanje posameznih vrednosti od povprečne vrednosti ( $n$  filmi, nanovlakna = 3,  $n$  fizikalna zmes = 5).

Hitrost sproščanja karvedilola iz fizikalne zmesi je bila nizka. V času testa (9 h) se iz fizikalne zmesi še ni sprostila vsa učinkovina, zato smo izvedli dodatni eksperiment, s katerim smo določili končno točko sproščanja učinkovine iz fizikalne zmesi (poglavje 3.3.7.1). S tem testom smo ugotovili, da je delež sproščene učinkovine po 165 min  $72,8 \pm 1,9$  %, po 9 h  $92,5 \pm 1,8$  % in po 24 h  $100,8 \pm 1,3$  %. Pri preskusu sproščanja karvedilola iz fizikalne zmesi smo ugotovili, da se je v medij po 165 min sprostilo  $12,0 \pm 2,1$  mg karvedilola in po 9 h  $15,0 \pm 2,3$  mg karvedilola. Če bi kot končno točko sproščanja upoštevali časovno točko 9 h, bi bil delež sproščene učinkovine po 165 min  $80,0$  %. Ob upoštevanju rezultatov testa 3.3.7.1 pa  $15,0 \pm 2,3$  mg karvedilola predstavlja le  $92,5 \pm 1,8$  % celotne mase karvedilola v vzorcu, ki znaša  $16,2$  mg. Če pri izračunu deleža sproščene učinkovine upoštevamo ta podatek, se po 165 min sprosti  $74$  % celotne mase karvedilola. Ta vrednost se ujema z vrednostjo, ki smo jo določili v testu 3.3.7.1 ( $72,8 \pm 1,9$  %). Tako smo potrdili, da v 9 h proces sproščanja karvedilola iz fizikalne zmesi ni končan in ugotovili delež karvedilola, ki se v 9 h sprosti iz fizikalne zmesi. Za izračun deležev sproščene učinkovine v posameznih časovnih točkah (slika 14) smo tako upoštevali podatek o teoretični količini karvedilola v fizikalni zmesi, ki smo jo uporabili v preskusu sproščanja.

Pri vrednotenju sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov končnih točk raztapljanja ni bilo potrebno določati z dodatnim testom (opisanim v poglavju 3.3.7.1), saj smo pri preskusu sproščanja določili zanesljive končne točke. V treh ali več zaporednih končnih časovnih točkah smo izmerili enako koncentracijo karvedilola v mediju, kar pomeni, da se je vsa učinkovina sprostila (slika 14).

Profili sproščanja karvedilola, prikazani na sliki 14, kažejo, da smo z vgrajevanjem karvedilola v filme in nanovlakna uspeli povečati njegovo hitrost raztapljanja v prečiščeni vodi. Največjo hitrost raztapljanja karvedilola smo dosegli pri nanovlaknih, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, kjer se je v 10 min raztopilo kar  $56,6$  % karvedilola, znotraj 60 min pa se je raztopil ves karvedilol. Pri raztapljanju filma, izdelanega iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, se je v 10 min raztopilo  $32,0$  %, v 60 min pa  $96,5$  % karvedilola. Ves karvedilol se je iz filmov, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, sprostil v 90 min. Karvedilol v filmu, izdelanem iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, je torej potreboval dalj časa, da se je popolnoma raztopil v

prečiščeni vodi v primerjavi s karvedilolom v nanovlaknih, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>. Iz nanovlaken, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub>, se je v 10 min sprostil 49,2 % karvedilola, po 60 min 90,1 %, ves karvedilol pa se je sprostil po 330 min. Po 10 min se je torej iz nanovlaken iz suspenzije S<sub>6b</sub> sprostil manjši delež karvedilola kot iz nanovlaken iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, a večji delež kot iz filmov, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>. Sproščanje celotne količine karvedilola iz nanovlaken, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub>, je trajalo dlje časa kot sproščanje enake količine učinkovine iz filma in nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>. Pri sproščanju karvedilola iz filma, izdelanega iz suspenzije S<sub>6b</sub>, se je po 10 min sprostil 33,6 % in po 60 min 85,7 % karvedilola. Ves karvedilol pa se je iz filma sprostil po 420 min. Profil sproščanja karvedilola iz filma, ki smo ga izdelali iz suspenzije S<sub>6b</sub>, je bil počasnejši kot profil sproščanja učinkovine iz nanovlaken, ki smo jih izdelali iz suspenzije S<sub>6b</sub>, in kot profil sproščanja iz filma in nanovlaken iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>. Delež sproščenega karvedilola pri fizikalni zmesi je znašal po 10 min 23,4 % in po 60 min 58 %. Po 9 h se je sprostil le 92,5 % karvedilola.

Že z izdelavo filmov smo bistveno povečali hitrost raztapljanja karvedilola v primerjavi z raztapljanjem učinkovine v fizikalni zmesi s polimeri. V filmih so bili kristali karvedilola razporejeni med molekulami PEO in poloksamera. Površina filmov in nanovlaken se je ob stiku z vodo zaradi prístnosti hidrofilnega (PEO) in amfifilnega polimera (poloksamer 407), ki je deloval kot močljivec, hitro omočila, zato so filmi in nanovlakna hitro razpadli. Posamezni kristali karvedilola in/ali amorfni karvedilol so se sprostili v medij, zato je bila velika površina karvedilola na voljo za raztapljanje, zato se je le-ta hitreje raztopil (9). Neposredni stik učinkovine s polimeri (predvsem poloksamerom 407) je pospešil hitrost raztapljanja učinkovine v primerjavi z njeno hitrostjo raztapljanja v fizikalni zmesi. Z izdelavo nanovlaken smo hitrost raztapljanja še povečali. Razlog povečanja hitrosti raztapljanja je bila verjetno veliko večja površina nanovlaken v primerjavi s filmi. Ker so bili delci karvedilola v nanovlaknih in filmih, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, manjši kot delci karvedilola v nanovlaknih in filmih, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub>, sta bili hitrosti raztapljanja karvedilola iz nanovlaken in filmov, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, hitrejši.

Prav tako bi na hitrost raztapljanja lahko vpliva pretvorba kristalne oblike karvedilola v amorfno pri izdelavi nanovlaken, kar smo preverili z DSC analizo (poglavje 4.7).

#### **4.5.1 Homogenost pripravljene fizikalne zmesi karvedilola s polimeri**

Fizikalna zmes učinkovine s polimeri je predstavljala primerjalni vzorec pri vrednotenju sproščanja učinkovine iz nanovlaken. Za naš eksperiment je bila pomembna natančnost odmerjanja karvedilola v fizikalni zmesi; za kar je bilo bistveno zagotavljanje homogenosti fizikalne zmesi. Na podlagi rezultatov preskusa sproščanja in končnih točk sproščanja karvedilola iz fizikalne zmesi, ki smo jih določili s testom, opisanim v poglavju 3.3.7.1, smo ovrednotili homogenost pripravljene fizikalne zmesi. Povprečna vsebnost karvedilola v petih vzorcih, odvzetih iz pripravljene fizikalne zmesi, je znašala  $81,1 \pm 12,6$  % pričakovane vsebnosti karvedilola, kar kaže, da pripravljena fizikalna zmes ni bila homogena. Masno razmerje med poloksamerom, PEO in karvedilolom v pripravljeni zmesi je bilo 2:2:1, a ker je bil prašek karvedilola zelo adheziven, se je najverjetneje v določenem deležu adsorbiral na stene patene in se ni enakomerno porazdelil po pripravljeni zmesi. Težave pri pripravi homogene zmesi smo imeli tudi zato, ker so bile velikosti praškastih delcev PEO, poloksamera in karvedilola med seboj zelo različne. Masni delež karvedilola v vzorcih, ki smo jih odvzeli iz fizikalne zmesi, je bil tako manjši kot pričakovanih 20 %. To smo potrdili tudi z DSC analizo, kjer razmerje površin vrhov PEO:poloksamer:karvedilol ni znašalo 2:2:1. Zaradi nižje dejanske vsebnosti karvedilola v odvzetih vzorcih fizikalne zmesi, pri izračunu deležev sproščene učinkovine iz fizikalne zmesi v posameznih časovnih točkah, kot končno točko nismo upoštevali 20 % mase natehtanega vzorca, ampak smo za izračun končne točke upoštevali rezultate testa, opisanega v poglavju 3.3.7.1.

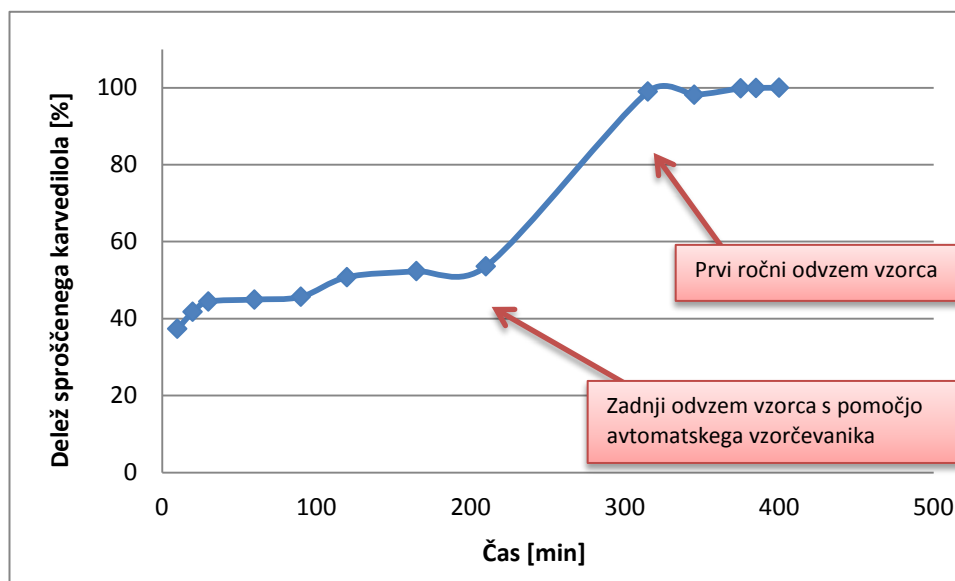
#### **4.5.2 Nosilec za filme in nanovlakna pri preskusu raztapljanja karvedilola**

Pri vrednotenju sproščanja karvedilola iz filmov in nanovlaken smo kot nosilec za nanovlakna in filme uporabili stekleno palčko. Za takšen nosilec smo se odločili zato, da so bili vsi pripravljene vzorci med seboj čim bolj primerljivi, tj. čim bolj primerljiva velikost površine, ki je bila v stiku z medijem. Ali je steklena palčka ustrezen nosilec, ki ne odpušča snovi, ki bi vplivale na izmerjeno absorbanco pri valovni dolžini 241 nm, smo preverili tako, da smo palčko potopili v posodo naprave z vesli in v določenih časovnih točkah izmerili absorbanco medija. V vseh časovnih točkah (navedenih v poglavju 3.3.7)

so bile izmerjene absorbance zanemarljive. Tako smo dokazali, da je steklena palčka ustrezen nosilec za vrednotenje sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov.

#### 4.5.3 Način odvzema vzorcev pri preskusu sproščanja

Vzorčenje smo pri preskusu sproščanja karvedilola iz nanovlaken, izdelanih iz suspenzije  $S_{6b}$ , najprej izvedli z uporabo avtomatskega vzorčevalnika. Na profilu sproščanja karvedilola vidimo, da le-ta doseže plato po 120 min sproščanja (slika 15). Glede na koncentracijo učinkovine v mediju smo izračunali, da se je iz nanovlaken po 120 min sprostil le ~37 % teoretične količine karvedilola. Ker smo v predhodnih poskusih ugotovili, da ima karvedilol veliko afiniteto do adsorpcije na filtre, mikrocentrifugirke in konice pipet, smo posumili, da je tudi pri avtomatskem vzorčenju prišlo do adsorpcije karvedilola na stene cevk znotraj sistema, kar je vodilo v določitev lažnih nižjih koncentracij karvedilola v vzorcih. Domnevo smo preverili tako, da smo vzorce ob času 315 min, 345 min, 375 min, 385 min in 400 min odvzeli ročno. Izmerjene absorbance in koncentracije vzorcev so bile po ročnem odvzemu neprimerno višje. Po 315 min se je na profilu sproščanja pojavil nov plato. Delež sproščene učinkovine v tej časovni točki pa je znašal 71 % teoretične vsebnosti karvedilola v nanovlaknih (slika 15). Tako smo potrdili domnevo, da je pri avtomatskem vzorčenju prišlo do izgub karvedilola, tj. adsorpcije karvedilola znotraj sistema, zato smo vse nadaljnje preskuse sproščanja izvedli z ročnim odvzemom vzorcev.



**Slika 15:** *Profil sproščanja karvedilola iz nanovlaken, ki smo jih izdelali iz suspenzije S<sub>6b</sub>. Pri preskusu sproščanja smo kombinirali avtomatsko in ročno odvzemanje vzorcev.*

#### 4.5.4 Vpliv polimerov na rezultate spektrofotometričnega določanja karvedilola

Med sproščanjem učinkovine iz nanovlaken in filmov sta se v medij sproščala tudi polimera, iz katerih so bila nanovlakna in filmi izdelani. Sproščeni polimeri bi lahko vplivali na določanje učinkovine in vodili do napačnih rezultatov analize. Ker profila sproščanja polimerov nismo poznali, da bi lahko pri spektrofotometričnem določanju uporabili slepi vzorec z enako koncentracijo polimerov, kot je bila prisotna v vzorcih, smo želeli preveriti, ali lahko spektrofotometrično analizo izvedemo z uporabo prečiščene vode kot slepi vzorec. Ugotovili smo, da je vpliv polimerov pri najvišji koncentraciji (tj. koncentracija, ko se celoten vzorec nanovlaken/filma raztopi) na absorbanco vzorca pri valovni dolžini 241 nm zanemarljiv. Pri vrednotenju sproščanja smo tako karvedilol lahko uspešno kvantificirali spektrofotometrično z merjenjem absorbance vzorca glede na prečiščeno vodo.

#### 4.6 ***UČINKOVITOST VGRAJEVANJA KARVEDILOLA V NANOVLAKNA IN FILME***

Na podlagi rezultatov preskusa raztapljanja smo ugotavljali tudi, kakšna je učinkovitost vgrajevanja karvedilola v filme in nanovlakna. Teoretično (izračunano na podlagi natehtanih sestavin pri pripravi vzorcev) je bil delež učinkovine v suhih filmih in nanovlaknih 20 % (m/m). Koliko karvedilola smo uspeli vgraditi v nanovlakna in filme, prikazuje preglednica VIII.

**Preglednica VIII:** *Učinkovitost vgrajevanja karvedilola v nanovlakna in filme.*

Vzorec	Učinkovitost vgrajevanja karvedilola (%)
nanovlakna iz nanosuspenzije NS <sub>6b</sub>	86,7 ± 1,8
film iz nanosuspenzije NS <sub>6b</sub>	86,5 ± 6,0
nanovlakna iz suspenzije S <sub>6b</sub>	75,3 ± 3,4
film iz suspenzije S <sub>6b</sub>	87,3 ± 6,1

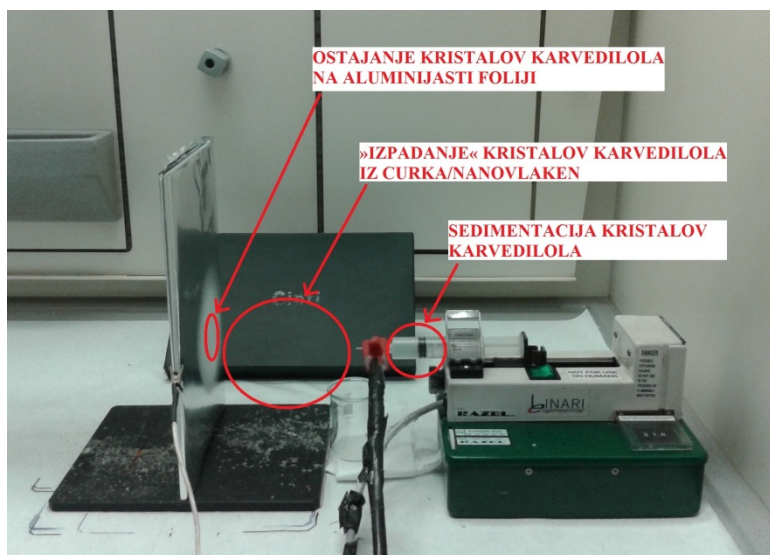
Rezultati kažejo, da v nanovlakna in filme nismo uspeli vgraditi celotne količine karvedilola. Učinkovitost vgrajevanja karvedilola v film, izdelan iz suspenzije  $S_{6b}$  in nanosuspenzije  $NS_{6b}$ , je bila primerljiva. Filme smo izdelali tako, da smo suspenzije in nanosuspenzije karvedilola zlili na aluminijasto folijo in počakali, da so se vzorci posušili. Med sušenjem vzorcev je prišlo do sedimentacije kristalov karvedilola. Neraztopljeni kristali so se tako v posušenem filmu nahajali na spodnji strani filma, tik ob aluminijasti foliji. Ko smo vzorce prenesli s folije na steklene palčke, ki smo jih uporabili kot nosilce za vzorce med preskusom sproščanja (tj. vzorec smo navili na palčko), je verjetno določen delež kristalov ostal na foliji, zato smo pri preskusu raztapljanja v filmih določili zaradi izgub manjšo vsebnost in posledično manjšo učinkovitost vgrajevanja. To domnevo potrjuje tudi SEM slika, kjer vidimo na površini filma, izdelanega iz suspenzije, le nekaj kristalov karvedilola (najverjetneje so to večji kristali, ki segajo skozi celotno debelino filma), na sliki roba oz. prereza filma pa je jasno vidno, da se kristali nahajajo predvsem na spodnji strani filma, zgoraj pa jih prekriva homogena plast, ki je nastala iz raztopine karvedilola in polimerov (slika 13 (b)). Na površini filma, izdelanega iz nanosuspenzije  $NS_{6b}$ , kristalov nismo opazili. Razlog je lahko, da v nanosuspenziji ni bilo prisotnih delcev karvedilola, ki bi segali skozi celotno debelino filma (slika 13 (c)), tako kot so segali kristali karvedilola skozi celotno debelino filma, narejenega iz suspenzije  $S_{6b}$  (slika 13 (a)).

Učinkovitost vgrajevanja karvedilola v nanovlakna, izdelana iz suspenzije in nanosuspenzije, se je razlikovala. Pri izdelavi nanovlaken iz suspenzije  $S_{6b}$  smo v vlakna uspeli vgraditi le 75,3 % karvedilola. Možnih razlogov za izgubo 27,7 % karvedilola med izdelavo nanovlaken s postopkom elektrostatskega sukanja je več (slika 16). Prvi razlog je lahko sedimentacija suspendiranih kristalov karvedilola v brizgi med elektrostatskim sukanjem, ki smo ga izvajali sorazmerno dolgo (105 min). Ker so bili v suspenziji prisotni delci karvedilola različnih velikosti, so se delci večjih velikosti pri izdelavi nanovlaken posedli na dno brizge in se tako niso vgradili v izdelana nanovlakna, ampak so ostali v brizgi. Enako so nepopolno vgrajevanje učinkovine v nanovlakna razložili tudi Brettmann in sodelavci (10). Da je do sedimentacije prišlo, smo opazili tudi sami, saj smo po končanem elektrostatskem sukanju na dnu brizge opazili bel sediment. Drug razlog je lahko izpadanje večjih delcev karvedilola iz curka ali vlaken med procesom elektrostatskega sukanja, tj. med potovanjem curka od konice igle do zbirala. Iz nanovlaken so izpadli, še preden so le-ti dosegli zbiralo. Tretji razlog pa so lahko izgube,



do katerih je prišlo pri prenosu nanovlaken z aluminijaste folije na palčko. Posamezni delci karvedilola so lahko ostali pritrjeni na foliji (tako kot pri prenosu filmov). Izgubo karvedilola pri vgrajevanju v nanovlakna smo opazili tudi pri nanovlaknih, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, a je bila le-ta v primerjavi z izgubo pri izdelavi nanovlaken iz suspenzije S<sub>6b</sub> manjša. Tak rezultat je posledica prisotnosti manjših delcev karvedilola v nanosuspenziji v primerjavi s suspenzijo, zato jih je manj izpadlo med potovanjem curka/nanovlaken v električnem polju in manj jih je sedimentiralo v brizgi pri elektrostatskem sukanju, saj smo po končanem elektrostatskem sukanju na dnu brizge opazili veliko manj belega sedimenta, kot smo ga opazili pri izdelavi nanovlaken iz suspenzije S<sub>6b</sub>.

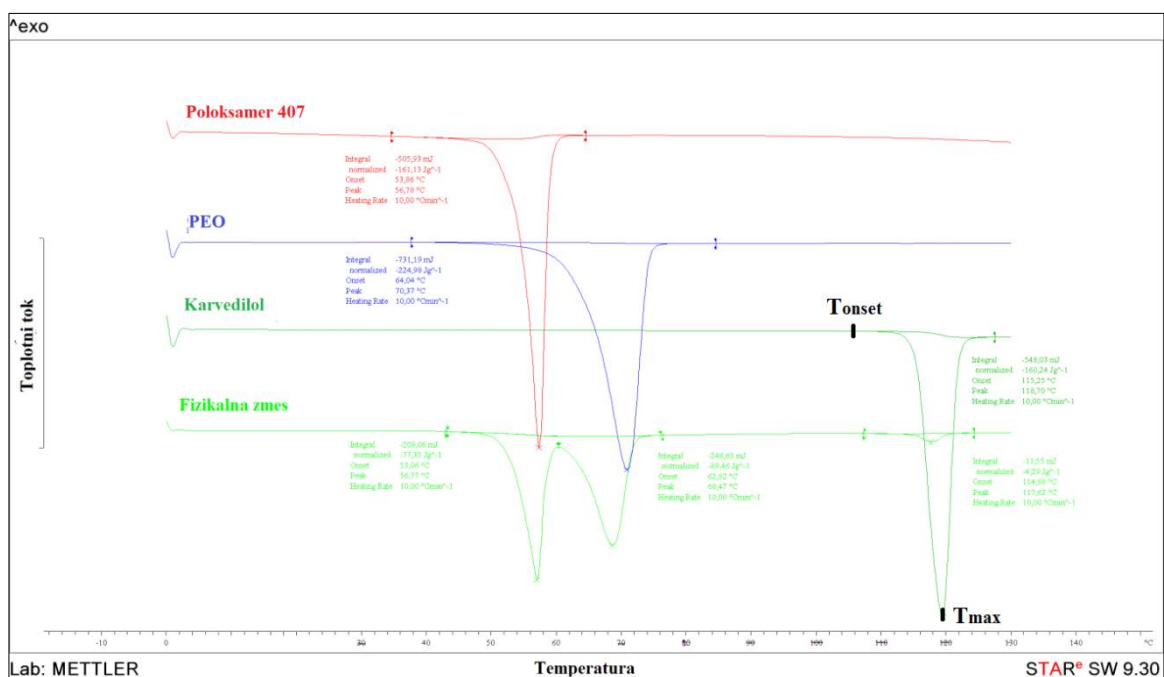
Učinkovitost vgrajevanja karvedilola v nanovlakna bi verjetno lahko izboljšali tako, da bi brizgo med elektrostatskim sukanjem večkrat zavrteli ali vsebino v brizgi premešali, saj bi tako zmanjšali obseg sedimentacije. Še bolje bi bilo, če bi se brizga na črpalki pri izvedbi elektrostatskega sukanja konstantno počasi vrtela, saj bi tako lažje vzdrževali homogenost vzorca med elektrostatskim sukanjem. Učinkovitost vgrajevanja bi lahko izboljšali tudi tako, da bi še bolj zmanjšali in poenotili velikost delcev karvedilola v nanosuspenziji (npr. uporaba drugih metod izdelave nanosuspenzije), lahko pa bi tudi povečali stabilnost nanosuspenzije (npr. dodatek stabilizatorjev, povečevanje viskoznosti disperznega medija).



**Slika 16:** *Elektrostatsko sukanje in možni mehanizmi za nepopolno vgrajevanje karvedilola v nanovlakna.*

## 4.7 KRISTALINIČNOSTI KARVEDILOLA

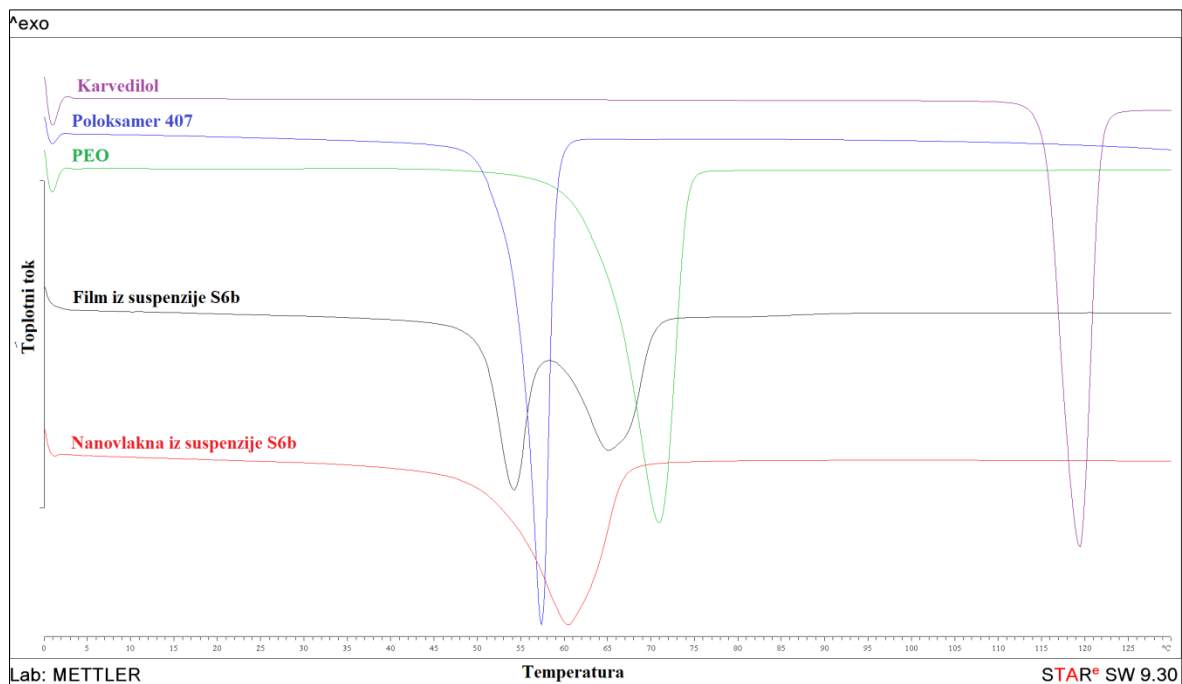
Kristaliničnost karvedilola v izdelanih nanovlaknih in filmih smo preverili z DSC analizo. DSC krivulje karvedilola, poloksamera 407, PEO, fizikalne zmesi karvedilola s polimeri, filmov in nanovlaken so prikazane na slikah 17–19.



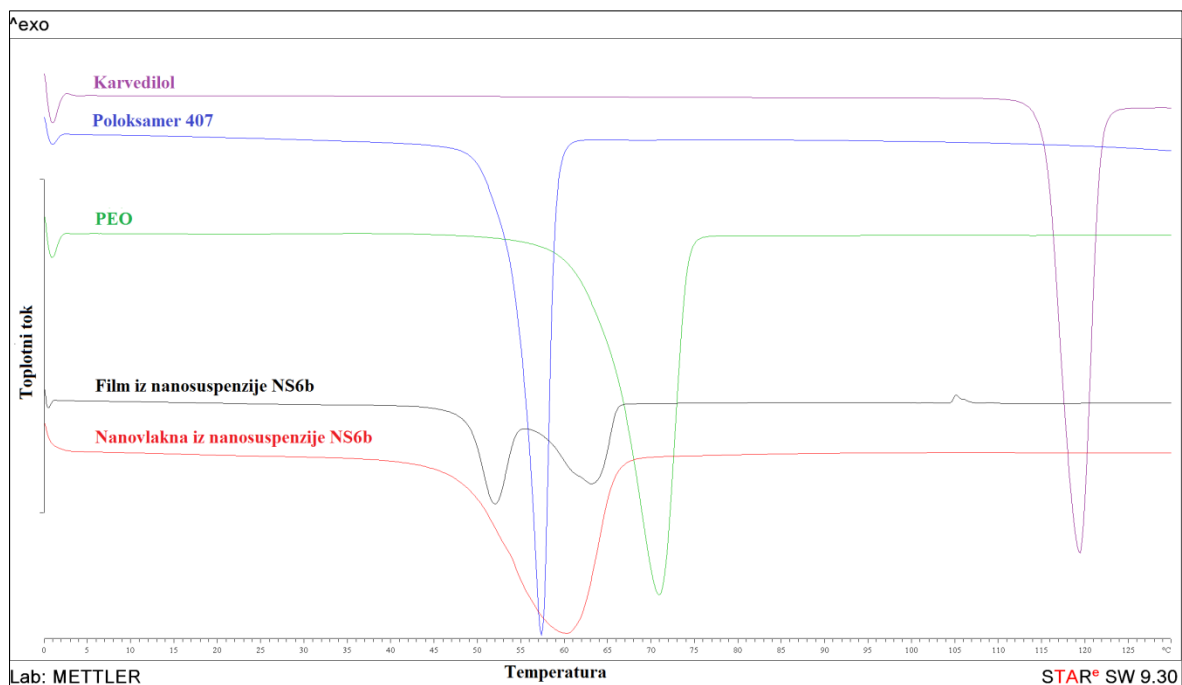
**Slika 17:** DSC krivulje poloksamera 407, PEO, karvedilola in fizikalne zmesi karvedilola in polimerov v masnem razmerju 1:2:2 (karvedilol:poloksamer 407:PEO).

Na DSC krivulji čistega karvedilola vidimo oster endotermni vrh ( $T_{\max}$ ) pri 118,70 °C (slika 17), ki predstavlja temperaturo tališča kristalne oblike karvedilola in se ujema s podatki iz literature (48). Začetna temperatura taljenja ( $T_{\text{onset}}$ ) karvedilola je bila 115,25 °C (*ang. melting onset temperature*), kar se prav tako ujema z literaturo in kaže, da smo uporabili polimorfno obliko II karvedilola (slika 17), katere  $T_{\text{onset}}$  je 113–115 °C (47). DSC krivulji poloksamera 407 in PEO prav tako kažeta prisotnost endotermnih vrhov pri temperaturah 56,78 °C in 70,37 °C, ki predstavljata njuni tališči. Na termogramu fizikalne zmesi so vidni vrhovi pri temperaturah taljenja vseh treh komponent v zmesi. Površina vrha karvedilola je bila majhna v primerjavi s površino vrhov PEO in poloksamera 407, kar nakazuje, da pripravljena fizikalna zmes ni bila homogena. Če bi bila fizikalna zmes homogena, bi bilo razmerje površin vrhov PEO, poloksamera 407 in karvedilola na DSC krivulji vzorca fizikalne zmesi, ki smo ga analizirali, enako njihovemu masnemu razmerju

v fizikalni zmesi, tj. 2:2:1. Da pripravljena fizikalna zmes ni bila homogena, smo ugotovili že v poglavju 4.5.1.



**Slika 18:** DSC krivulje karvedilola, poloksamera 407 in PEO ter filma in nanovlaken, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub>.



**Slika 19:** DSC krivulje karvedilola, poloksamera 407 in PEO ter filma in nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>.

Na DSC krivuljah filmov in nanovlaken, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub> in nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, nismo zaznali vrha pri temperaturi tališča kristalne oblike karvedilola. Razlog odsotnosti tališča kristalne oblike karvedilola pri izdelanih nanovlaknih je lahko pretvorba karvedilola iz kristalne v amorfno obliko. Elektrostatsko sukanje je metoda, ki lahko povzroči pretvorbo kristalne oblike učinkovine v amorfno obliko. Zaradi hitrega izhlapevanja topila iz polimerne raztopine med izdelavo nanovlaken je lahko prišlo do hitre "strditve" PEO in poloksamera 407, kar je povzročilo zmanjšano mobilnost molekul raztopljenega karvedilola. Karvedilol tako ni mogel kristalizirati in se je v nastala nanovlakna vgradil v amorfni obliki (22). A ker je pretvorba iz kristalne oblike v amorfno pri elektrostatskem sukanju možna le, če je karvedilol raztopljen, in ker smo s SEM analizo potrdili, da je določen delež karvedilola prisoten tudi v obliki neraztopljenih kristalov, sklepamo, da je najverjetneje prišlo do raztapljanja kristalov karvedilola v talini polimerov pri segrevanju vzorcev med DSC analizo, saj je tališče polimerov nižje od tališča učinkovine. To je povzročilo, da je vrh pri temperaturi tališča karvedilola izginil. Domnevo potrjuje tudi ugotovitev, da vrha tališča karvedilola nismo zaznali na DSC krivuljah polimernih filmov s karvedilolom, za katere smo vedeli, da vsebujejo karvedilol v kristalni obliki. Torej je rezultat pri nanovlaknih (odsotnost tališča karvedilola) najverjetneje posledica kombinacije obeh zgoraj opisanih mehanizmov: raztopljeni karvedilol se je med elektrostatskim sukanjem v nanovlakna vgradil v amorfni obliki, kristali neraztopljenega karvedilola (ujeti v nanovlakna in med nanovlakna) pa so se med DSC analizo raztopili v talini polimerov. V nanovlaknih, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, smo opazili kristale karvedilola specifične oblike (slika 11), a njihovega tališča na DSC krivulji nismo opazili, kar dodatno potrjuje domnevo, da so se kristali karvedilola pri DSC analizi raztopili v talini polimerov.

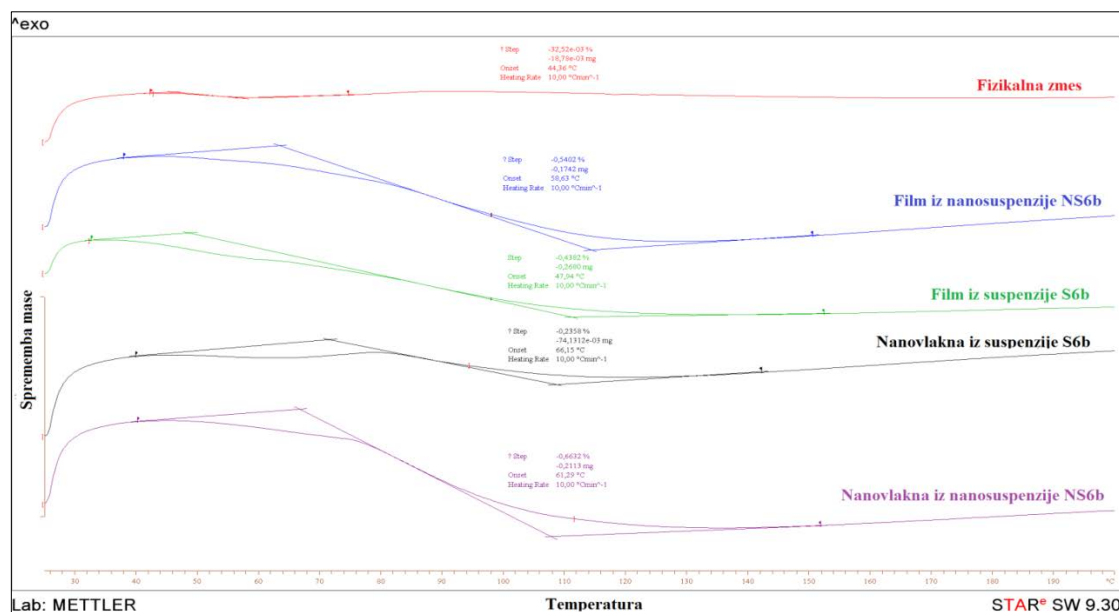
Na DSC krivuljah filmov, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub> in nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, sta prisotna endotermna vrhova, ki predstavljata taljenje PEO in poloksamera 407 (slika 18). Tališči sta rahlo pomaknjeni k nižjima vrednostnima in znašata 53,95 °C za poloksamer 407 in 64,98 °C za PEO v filmu, izdelanem iz suspenzije, ter 53,19 °C za poloksamer 407 in 64,54 °C za PEO v filmu, izdelanem iz nanosuspenzije. Razlog znižanja tališča so verjetno interakcije, ki so se vzpostavili med PEO, poloksamerom 407 in karvedilolom. Zaradi interakcij so se lastnosti polimerov nekoliko spremenile, zato sta se polimera talila pri nižji temperaturi.

DSC krivulji nanovlaken, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub> in nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, kažeta le en endotermni vrh pri temperaturi 60,26 °C in 60,10 °C. Pri elektrostatskem sukanju (najverjetneje med podaljševanjem curka suspenzije oz. nanosuspenzije) je lahko prišlo do interakcij med PEO, poloksamerom 407 in karvedilolom, kar je vodilo do sprememb v strukturi in ureditvi molekul PEO in poloksamera, ki sta najverjetneje tvorila novo kristalno rešetko s temperaturo tališča 60,26 °C oz. 60,10 °C. Da bi potrdili oz. ugotovili vzrok pojava enega samega endotermnega vrha na DSC krivulji nanovlaken, bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

Na DSC krivulji filma, izdelanega iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, smo pri 105 °C zaznali majhen eksotermni signal. Signal predstavlja vodo, ki se je pri sušenju ujela v notranjost izdelanega filma. Pri segrevanju filma med DSC analizo je prišlo do "eksplozije" ujete vode, pri čemer se je sprostil nekaj toplote, ki smo jo zaznali kot eksotermni vrh na DSC krivulji. Zhao in sodelavci so pri proučevanju karvedilola, vgrajenega v nanovlakna iz hidroksiapatita, na DSC krivulji prav tako opazili majhen eksotermni signal pri 103 °C, ki so si ga razlagali kot rekristalizacijo amorfnega karvedilola (49). Ker v našem primeru ni prišlo do pretvorbe kristalne oblike karvedilola v amorfno oz. je bil delež nastale amorfne oblike tako nizek, da pri DSC analizi nismo zaznali njenega steklastega prehoda, ki se zgodi pri temperaturi 34–39 °C (48, 49), tudi morebitne rekristalizacije učinkovine pri 105 °C nismo mogli zaznati .

#### **4.8 ANALIZA VSEBNOSTI VLAGE V VZORCIH**

Vsebnost vlage v filmih, nanovlaknih in fizikalni zmesi učinkovine s polimeri smo določili s TGA analizo. Rezultati so prikazani na sliki 20.



**Slika 20:** TGA termogram fizikalne zmesi, filma, izdelanega iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>, filma, izdelanega iz suspenzije S<sub>6b</sub>, nanovlaken, izdelanih iz suspenzije S<sub>6b</sub>, in nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije NS<sub>6b</sub>.

Zaostanek vlage v izdelanih filmih in nanovlaknih vpliva na skupno maso vzorcev in vpliva na rezultate vseh analiz, kjer ta gravimetrični podatek potrebujemo (sproščanje karvedilola, učinkovitost vgrajevanja karvedilola). Ker smo želeli vpliv zaostalega topila, tj. vode, ki je predstavljala topilo v izdelanih polimernih raztopinah in disperzni medij v suspenzijah ter nanosuspenzijah, karseda zmanjšati, smo izdelana nanovlakna in filme 48 h po izdelavi sušili pri sobnih pogojih. Pred vrednotenjem sproščanja karvedilola smo vzorce še dodatnih 12 h sušili v eksikatorju. Ali smo vlago iz nanovlaken in filmov uspeli popolnoma odstraniti, smo preverili s TGA analizo. S TGA termograma je razvidno, da je bila vlaga v vzorcih prisotna, a v zanemarljivo majhnih količinah. Največ vlage je bilo prisotne v nanovlaknih, izdelanih iz nanosuspencuzije NS<sub>6b</sub>, kjer je izguba mase pri segrevanju nanovlaken na intervalu 25–200 °C znašala 0,6632 % (m/m). Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da zaostanek vlage torej ni imel znatnega vpliva na rezultate vrednotenja sproščanja karvedilola iz nanovlaken in filmov. Vsebnost vlage je bila v skladu s pričakovanji najnižja pri fizikalni zmesi učinkovine s polimeri, kjer je izguba mase vzorca med segrevanjem znašala le 0,03252 % (m/m). Vsebnost vlage v filmih in nanovlaknih, izdelanih tako iz suspenzije S<sub>6b</sub>, kot nanosuspencuzije NS<sub>6b</sub>, je primerljiva. Primerljivo vsebnost vlage v vzorcih smo najverjetneje dosegli s sušenjem vzorcev v eksikatorju, kjer so bili zagotovljeni enaki pogoji sušenja za vse vzorce.

## 5 SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo potrdili, da je karvedilol učinkovina, ki je skoraj netopna v prečiščeni vodi ( $27,2 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ), in dokazali, da z vgradnjo karvedilola v polimerna nanovlakna iz PEO in poloksamera 407, s postopkom elektrostatskega sukanja, lahko izboljšamo tako topnost, kot hitrost raztapljanja karvedilola.

Na topnost in hitrost raztapljanja karvedilola smo vplivali že s samo sestavo nanovlaken. Ugotovili smo, da PEO nima bistvenega vpliva na topnost karvedilola, medtem ko poloksamer 407 poveča topnost učinkovine. Največjo topnost karvedilola v vodni raztopini PEO in poloksamera 407 smo dosegli v vzorcu z najvišjo koncentracijo poloksamera 407, kjer je bila topnost karvedilola v primerjavi s prečiščeno vodo višja za faktor  $\sim 10$ . Poloksamer 407 je amfifilna molekula, zato je topnost učinkovine najverjetneje povečal z mehanizmom solubilizacije. Z vključitvijo poloksamera 407 v nanovlakna smo tako povečali topnost in posledično tudi hitrost raztapljanja učinkovine.

Na hitrost raztapljanja karvedilola iz nanovlaken so poleg sestave nanovlaken vplivale tudi lastnosti nanovlaken ter sam postopek elektrostatskega sukanja. Ugotovili smo, da je bila hitrost sproščanja karvedilola najnižja pri sproščanju karvedilola iz fizikalne zmesi, medtem ko smo z izdelavo polimernih filmov in nanovlaken uspeli hitrost raztapljanja karvedilola povečati. Hitrejše sproščanje karvedilola iz filmov je bilo najverjetneje posledica neposrednega stika karvedilola s polimeroma (predvsem s poloksamerom 407). Z izdelavo nanovlaken s karvedilolom se je hitrost sproščanja še povečala, kar je bilo najverjetneje posledica večje površine nanovlaken v primerjavi s filmi ter pretvorbe določenega deleža karvedilola iz kristalne v amorfno obliko med postopkom elektrostatskega sukanja. Filmi in nanovlakna, izdelana iz nanosuspenzije, so omogočili hitrejše sproščanje karvedilola v primerjavi s filmi in nanovlakni, izdelanimi iz suspenzije, kar je najverjetneje posledica manjše velikosti neraztopljenih delcev karvedilola in posledično večje površine učinkovine, ki je bila na voljo za raztapljanje.

V izdelane filme in nanovlakna nam ni uspelo vgraditi celotne oz. teoretične količine karvedilola. Nižjo vsebnost karvedilola v filmih smo določili zaradi adsorpcije neraztopljenih delcev karvedilola na aluminijasto folijo, pri nanovlaknih pa je poleg adsorpcije delcev karvedilola na aluminijasto folijo prišlo tudi do sedimentacije delcev karvedilola v brizgi med izvedbo elektrostatskega sukanja ter do izpadanja večjih delcev

karvedilola iz curka ali vlaken med procesom elektrostatskega sukanja, tj. med potovanjem curka od konice igle do zbirala.

Na DSC krivuljah filmov in nanovlaken, izdelanih iz nanosuspenzije in suspenzije, nismo opazili vrha pri temperaturi tališča kristalne oblike karvedilola, ker je pri segrevanju vzorcev med DSC analizo najverjetneje prišlo do raztapljanja kristalov karvedilola v talini polimerov. Pri nanovlaknih je lahko prišlo tudi do pretvorbe določenega deleža karvedilola iz kristalne v amorfno obliko, kar je prispevalo k večji topnosti in hitrosti raztapljanja karvedilola v prečiščeni vodi. Vsebnost vlage v nanovlaknih, filmih in fizikalni zmesi ni vplivala na rezultate izvedenih testov, saj smo s TGA ugotovili, da je bila zanemarljivo nizka.

V magistrski nalogi smo pokazali, da so nanovlakna iz PEO in poloksamera 407 sodoben in učinkovit način za povečevanja topnosti in hitrosti raztapljanja težko topnih zdravilnih učinkovin. Njihova izdelava s postopkom elektrostatskega sukanja je hitra, ekonomična in kontinuirana. Zaključimo lahko, da s številnimi možnostmi nadaljnjega razvoja in optimizacije predstavlja izdelava nanovlaken obetaven tehnološki pristop za povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja učinkovin tudi na nivoju industrijske proizvodnje.



## 6 LITERATURA

- 1) Dokoumetzidis A, Macheras P: A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm* 2006; 321: 1–11.
- 2) Wairkar SM, Gaud RS: Solid Dispersions: Solubility Enhancement Technique for Poorly Soluble Drugs. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2013; 4 (3): 847–854.
- 3) Leuner C, Dressman J: Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50: 47–60.
- 4) Vo CLN, Park C, Lee BJ: Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85: 799–813.
- 5) Kocbek P: Novelties in the field of pharmaceutical nanotechnology. *Farm Vestn* 2012; 63: 75–81.
- 6) European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2013: 5.
- 7) Navodila za vaje pri predmetu Industrijska farmacija, Biofarmacija s farmakokinetiko. [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Biofarmacija\\_s\\_farmakokinetiko\\_IF/Vaje/Topnost\\_hitrost\\_raztapljanja.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Biofarmacija_s_farmakokinetiko_IF/Vaje/Topnost_hitrost_raztapljanja.pdf), dostop: avgust 2014.
- 8) European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2013: 727–729.
- 9) Vyas V, Sancheti P, Karekar P, Shah M, Pore Y: Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. *Acta Pharm* 2009; 59: 453–461.
- 10) Brettmann BK, Cheng K, Myerson AS, Trout BL: Electrospun Formulations Containing Crystalline Active Pharmaceutical Ingredients. *Pharm Res* 2013; 30: 238–246.
- 11) Bhardwaj N, Kundu SC: Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 2010; 28: 325–347.
- 12) Yu DG, Zhu LM, White K, White CB: Electrospun nanofiber-based drug delivery systems. *Health* 2009; 1: 67–75.

- 13) Yu DG, Gao LD, White K, White CB, Lu WY, Zhu LM: Multicomponent Amorphous Nanofibers Electrospun from Hot Aqueous Solutions of a Poorly Soluble Drug. *Pharm Res* 2010; 27: 2466–2477.
- 14) Okutan N, Terzi P, Altay F: Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocoll* 2014; 39: 19–26.
- 15) Sill TJ, von Recum HA: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008; 29: 1989–2006.
- 16) Canbolata MF, Celebioglu A, Uyara T: Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2014; 115: 15–21.
- 17) Frenot A, Chronakis IS: Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid and Interface Sci* 2003; 8: 64–75.
- 18) Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 2003; 63: 2223–2253.
- 19) Hu X, Liu S, Zhou G, Huang Y, Xie Z, Jing X: Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *J Control Release* 2014; 185: 12–21.
- 20) Diagram elektrostatskega sukanja. [http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning#mediaviewer/File:Electrospinning\\_Diagram.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning#mediaviewer/File:Electrospinning_Diagram.jpg), dostop: avgust 2014.
- 21) Deitzel JM, Kleinmeyer J, Harris D, Beck Tan NC: The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001; 42: 261–272.
- 22) Li X, Kanjwala MA, Lind L, Chronakisa IS: Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2013; 103: 182–188.
- 23) Ki CS, Baek DH, Gang DK, Lee KH, Um IC, Park YH: Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer* 2005; 46: 5094–5102.
- 24) Rogina A: Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Appl Surf Sci* 2014; 296: 221–230.

- 25) Uyar T, Besenbacher F: Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer* 2008; 49: 5336–5343.
- 26) Yördem OS, Papila M, Menceloğlu YZ: Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology. *Mater Des* 2008; 29: 34–44.
- 27) Pelipenko J, Kristl J, Janković B, Baumgartner S, Kocbek P: The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *Int J Pharm* 2013; 456: 125–134.
- 28) Rošić R, Kocbek P, Pelipenko J, Kristl J, Baumgartner S: Nanofibers and their biomedical use. *Acta Pharm* 2013; 63: 295–304.
- 29) Verreck G, Chun I, Rosenblatt J, Peeters J, van Dijk A, Mensch J, Noppe M, Brewster ME: Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J Control Release* 2003; 92: 349–360.
- 30) Yua DG, Yang JM, White CB, Lu P, Zhang L, Zhu LM: Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. *Int J Pharm* 2010; 400: 158–164.
- 31) European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2013: 2665–2667.
- 32) Polietilenoksid (PEO).  
<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html>,  
dostop: avgust 2014.
- 33) Shah AP, Bhandary SR: POLYOX (Polyethylene Oxide)–Applications in Pharma Industry.  
<http://www.pharmainfo.net/reviews/polyox-polyethylene-oxide-applications-pharma-industry>, dostop: avgust 2014.
- 34) European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2013: 3052–3054.
- 35) Technical Information, BASF 2010, Lutrol® L and Lutrol® F-Grades. [http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03\\_100102e\\_Lutrol%20L%20and%20Lutrol%20F-Grades.pdf](http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_100102e_Lutrol%20L%20and%20Lutrol%20F-Grades.pdf), dostop: avgust 2014.

- 36) Kabanov A, Batrakova EV, Alakhov VY: Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 2002; 82: 189–212.
- 37) Poloksameri, strukturna formula. [http://en.wikipedia.org/wiki/Poloxamer#mediaviewer/File:Poloxamere\\_General\\_Formula\\_V2.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Poloxamer#mediaviewer/File:Poloxamere_General_Formula_V2.svg), dostop: avgust 2014.
- 38) European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2013: 1781–1782.
- 39) Karvedilol, strukturna formula. <http://en.wikipedia.org/wiki/Carvedilol#mediaviewer/File:Carvedilol.svg>, dostop: avgust 2014.
- 40) Murthy TEGK, Sowjanya G: Development of Discriminatory Method for Dissolution of Carvedilol Marketed Formulations. *Int J ChemTech Res* 2010; 2: 1047–1050.
- 41) Brook CS, Chen W, Dell'Orco PC, Katrincic LM, Louvet AM, Oh CK, Spoons PG, Werner C: Carvedilol phosphate salts, which include novel crystalline forms of carvedilol dihydrogen phosphate (i.e., dihydrogen phosphate salt of 1-(carbazol-4-yloxy-3-[[2-(o-methoxyphenoxy) ethyl]amino]-2-propanol) and/or carvedilol hydrogen phosphate, etc.), and/or solvates, compositions containing compounds. United States Patent, Patent number 7893100 B2, date of patent Jun 25, 2007.
- 42) Carvedilol. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvedilol#section=Top>, dostop: januar 2015.
- 43) Coryol SmPC. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm?SearchView](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView), dostop: avgust 2014.
- 44) Noltea K, Backfisch G, Neidleina R: In vitro Absorption Studies with Carvedilol Using a New Model with Porcine Intestine Called BM-RIMO (Boehringer-Mannheim Ring Model). *Drug Res* 1999; 49: 745–749.
- 45) 45McTavish D, Campoli-Richards D, Eugene M: Carvedilol A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy. *Drugs* 1993; 2: 232-258.
- 46) 46Biccard BM, Sear JW, Foëx P: Are lipophilic beta-blockers preferable for peri-operative cardioprotection?. *South Afr J Anaesth Analg* 2006: 141–146.

- 47) Chen W, Gallop M, Oh CK: Carvedilol polymorph. WIPO Patent Application, Patent number WO2003005970 A2, date of patent Jul 15, 2002.
- 48) Pokharkar VB, Mandpe LP, Padamwar MN, Ambike AA, Mahadik KR, Paradkar A: Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. *Powder Technol* 2006; 167: 20–25.
- 49) Zhao Q, Wang T, Wang J, Zheng L, Jiang T, Cheng G, Wang S: Template-directed hydrothermal synthesis of hydroxyapatite as a drug delivery system for the poorly water-soluble drug carvedilol. *Appl Surf Sci* 2011; 257: 10126–10133.
- 50) European Pharmacopoeia 8.0, 8th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2013: 288–295.