

Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava

**Příprava nanočástic léčiv s využitím superkritické
tekutiny**

Synthesis of drug nanoparticles using supercritical fluid

Autor:

Tomáš Sosna

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Daniela Plachá Ph.D.

Ostrava 2014

Zadání bakalářské práce

Student: **Tomáš Sosna**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: **Příprava nanočástic léčiv s využitím superkritické tekutiny**
Synthesis of drug nanoparticles using supercritical fluid

Zásady pro vypracování:

Příprava nanočástic léčiv s využitím superkritické fluidní tekutiny je velmi perspektivní přípravou nanočástic, představující alternativu k přípravě nanočástic metodou precipitační. Cílem bakalářské práce je získání širokého teoretického přehledu studenta o postupech přípravy nanočástic s využitím superkritické tekutiny, výběr vhodného postupu použití superkritické fluidní kapaliny v podmínkách laboratoře a příprava metody pro přípravu nanočástic léčiv.

Osnova bakalářské práce:

1. Úvod
2. Teorie superkritických tekutin
3. Aplikace superkritických tekutin
4. Metody přípravy nanočástic s využitím superkritických tekutin
5. Příprava nanočástic léčiv s využitím superkritických tekutin
6. Aplikace SFE pro přípravu nanočástic
7. Diskuze
8. Závěr

Synthesis of drug nanoparticles using supercritical fluids is very perspective method of nanoparticle preparation representing an alternative to nanoparticle preparation using precipitation method. The goal of this bachelor thesis is an acquirement of wide overview of the student in the sphere of procedures for nanoparticle preparation using supercritical fluid, further a selection of the supercritical fluid procedure applicable in the laboratory and a preparation of the method for drug nanoparticle preparation.

1. Introduction
2. Theory of supercritical fluids
3. Application of supercritical fluids
4. Methods of nanoparticle synthesis using supercritical fluids
5. Synthesis of drug nanoparticles using supercritical fluids
6. SFE application for nanoparticle synthesis
7. Discussion
8. Conclusion

Seznam doporučené odborné literatury:

1. BYRAPPA, K., S. OHARA a T. ADSCHIRI. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications. *Drug Delivery Applications of Supercritical Fluid Technology*. 2008, 60 (3), 299-327.
2. JUNG, J., PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. 2001, 20 (3), 179-219.
3. KNEZ, Z., WEIDNER, E. Particles formation and particle design using supercritical fluids. 2003, 7 (4-5), 353-361.

4. YASUJI, T., TAKEUCHI, H., KAWASHIMA, Y. Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies. *Drug Delivery Applications of Supercritical Fluid Technology*. 2008, 60 (3), 388-398.
5. PARK, S.J., YEO, S.D. Recrystallization of caffeine using gas antisolvent process. 2008, 47 (1), 85-92.
6. *Applied Separations, Spe-ed™ SFE, Návod k použití, Verze 4.3.*

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**

Datum zadání: 21.10.2013

Datum odevzdání: 15.05.2014



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Petr Noskovič, CSc.
prorektor pro studium

Místopřísežné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem celou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedl jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě 15. 5. 2014

Podpis studenta:

.....

Prohlášení

- Byl jsem seznámen s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití školního díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla a §60 – školní dílo
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále VŠB – TUO) má právo nevýdělečné ke vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§35 odst. 3).
- Souhlasím s tím, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB – TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona.
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby.

V Ostravě 15. 5. 2014

.....

podpis studenta

Jméno a příjmení autora práce: Tomáš Sosna

Adresa trvalého pobytu autora práce: Gen. Sochora 1203, Ostrava - Poruba, 708 00



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Poděkování

Tato práce byla vypracována s podporou projektu Nanotechnologie – báze pro mezinárodní spolupráci, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/20.0074 podpořeného Operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost, financovaného ze strukturálních fondů EU a státního rozpočtu ČR.

Děkuji především paní doc. Ing. Plaché Ph.D. za poskytnuté konzultace a pomoc při přípravě mé bakalářské práce a panu doc. RNDr. Richardu Dvorskému za provedení analýzy distribuce velikosti částic.

Dále bych chtěl poděkovat pracovníkům CNT VŠB-TUO za provedení analýz.

Anotace

Bakalářská práce je zaměřena na přípravu nanočástic léčiv, zejména nanočástic léčiv pomocí superkritických tekutin (SCFs). Cílem této práce je příprava nanočástic kofeinu, aspirinu, nifedipinu a cimetidinu pomocí superkritických tekutin. K přípravě bylo využito komerčně dodávaného přístroje Spe-ed SFE-4 (firma Applied separations). Příprava byla uskutečněna metodou rychlé expanze superkritickou směsí (RESS). Bylo zjištěno, že nanočástice kofeinu lze pomocí tohoto postupu připravit. Dále byly touto metodou připraveny částice aspirinu. Vznik částic nifedipinu a cimetidinu nebyl pozorován. Zároveň bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou klesá velikost nanočástic kofeinu a vlivem teploty lze ovlivnit i tvar výsledných částic. Přístroj Spe-ed SFE-4 je využitelný k výrobě částic a nanočástic léčiv metodou RESS.

Klíčová slova: Superkritické tekutiny (SCFs), rychlá expanze superkritické směsi (RESS), nanočástice, léčiva, Spe-ed SFE-4

Abstrakt

The bachelor thesis is focused on preparation of drugs nanoparticles, especially using supercritical fluids (SCFs). The aim of this thesis is preparation of nanoparticles of caffeine, aspirin, nifedipine and cimetidine using supercritical fluids. For preparation was used an Applied Separations Spe-ed SFE-4 device. As a preparation method was used rapid expansion of supercritical solution (RESS). It was found that using this procedure, nanoparticles of caffeine and particles of aspirin can be prepared. No signs of nifedipine and cimetidine nanoparticles formation were observed. Also was discovered that with rising temperature, the size of caffeine and aspirin nanoparticles is decreasing, thus, it is possible to affect the size of nanoparticles by controlling the temperature. The Spe-ed SFE-4 is capable of preparation of drugs nanoparticles using RESS method.

Keywords: Supercritical fluids (SCFs), rapid expansion of supercritical solution (RESS), nanoparticles, drugs, Spe-ed SFE-4

SOSNA, Tomáš. *Příprava nanočástic léčiv pomocí superkritické tekutiny*. Ostrava, 2014. Bakalářská práce. VŠB – Technická univerzita Ostrava. Univerzitní studijní programy

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek	10
1. Úvod.....	11
2. Teorie superkritických tekutin	13
2.1 Vlastnosti superkritických tekutin	13
2.2 Používané SCFs	14
3. Aplikace superkritických tekutin	16
4. Metody přípravy nanočástic s využitím superkritických tekutin	18
4.1 SCF jako rozpouštědlo.....	19
4.1.1 RESS.....	19
4.1.2 Modifikace RESS	20
4.2 SCF jako anti-rozpouštědlo	20
4.2.1 GAS	21
4.2.2 SAS.....	22
4.2.3 ASES	22
4.2.4 SEDS	23
5. Příprava nanočástic léčiv s využitím superkritických tekutin.....	24
5.1 Léčiva připravená pomocí SCFs.....	24
6. Aplikace SFE pro přípravu nanočástic léčiv	26
6.1 Použité chemikálie.....	26
6.2 Použité přístroje	26
6.3 Přístroj SFE-4	26
6.3.1 Provoz přístroje	28
6.3.2 Plnění patron.....	28
6.4 Příprava nanočástic kofeinu.....	29
6.4.1 Kofein	29
6.4.2 Postup přípravy.....	29

6.4.3	Podmínky přípravy	30
6.5	Příprava nanočástic léčiv	31
6.5.1	Aspirin	31
6.5.2	Nifedipin	31
6.5.3	Cimetidin	32
6.5.4	Podmínky přípravy	32
7.	Výsledky a diskuze	33
7.1	Příprava nanočástic kofeinu	33
7.1.1	SEM	33
7.1.2	FTIR spektroskopie	34
7.1.3	XRD	35
7.1.4	Měření velikosti částic	37
7.2	Příprava částic léčiv	39
7.3	Práce s přístrojem	39
8.	Závěr	41
9.	Citovaná literatura	43
10.	Seznam obrázků	46

Seznam použitých symbolů a zkratk

ASES – metoda využívající superkritické anti-rozpouštědlo systém s rozpouštědlem ve stavu aerosolu

CO₂ – oxid uhličitý

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GAS – metoda využívající anti-rozpouštědla v plynném stavu

RESS – rychlá expanze superkritické směsi

SAS – metoda využívající superkritické anti-rozpouštědlo

scCO₂ – oxid uhličitý v superkritickém stavu

SCF – superkritická tekutina

SCFs – superkritické tekutiny

scH₂O – voda v superkritickém stavu

SEDS – metoda využívající směsi disperzně obohacené superkritickou tekutinou

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

SFE-4 – přístroj Spe-ed SFE-4

XRD – rentgenová difrakční analýza

1. Úvod

Supekritické tekutiny (SCFs) se v poslední době často využívají k přípravě nebo charakterizaci nejrůznějších materiálů. Je to zejména z důvodu jejich specifických a snadno regulovatelných vlastností. Jedním z důležitých odvětví je příprava nanočástic, zejména pak příprava nanočástic léčiv.

Většina léčiv je jen málo rozpustná v oběhovém systému lidského těla. Tím klesá jejich efektivita, a proto se hledají způsoby, jak jejich rozpustnost zvýšit. Jedním ze způsobů, jak toho dosáhnout, je zmenšení jejich velikosti. Tím dochází ke zvětšení specifického povrchu a ke zvýšení reaktivity a rozpustnosti.

Klasické techniky jako drcení nebo mletí většinou nezaručují úzkou distribuci velikosti částic, která je u léčiv často vyžadována. Ostatní využívané techniky pro přípravu částic léčiv většinou používají organická rozpouštědla, která se z výsledných částic velmi náročně odstraňují nebo je nelze úplně odstranit.

Z výše uvedených důvodů je aplikace superkritických tekutin, zejména pak superkritického oxidu uhličitého ($scCO_2$) nebo superkritické vody (scH_2O) velmi vhodnou technikou k přípravě nanočástic léčiv. Umožňují totiž přípravu částic v úzké distribuci velikosti a zároveň na nich nezanechávají žádná nežádoucí rezidua rozpouštědel či jiných chemikálií.

Tato práce shrnuje základní vlastnosti a přehled nejvíce využívaných superkritických tekutin. Dále představuje jejich obecnou aplikaci v různých průmyslových odvětvích. Její hlavní část se zabývá metodami k přípravě nanočástic, zejména pak přípravě nanočástic léčiv. Existuje mnoho různých metod pro přípravu nanočástic pomocí SCFs, avšak záměrem této práce je pouze popis základních a nejvíce využívaných. Ostatní techniky přesahují rozsah a úroveň této práce, a proto budou pouze zmíněny.

První část experimentální práce je věnována přípravě nanočástic kofeinu pomocí komerčně vyráběného přístroje Spe-ed SFE-4 (firma Applied Separation), který je primárně určený k extrakcím organických látek z různých matric vyskytujících se v životním prostředí nebo v potravinářství. Za metodu přípravy byla zvolena tzv. rychlá expanze superkritické směsi (rapid expansion of supercritical solution – RESS), při které je připravovaná látka rozpuštěna v superkritické tekutině (SCF) a výsledné částice jsou následně získávány vlivem skokové změny tlaku. Cílem této části práce je připravit nanočástice kofeinu a stanovit podmínky, při kterých budou nejmenší a v co nejmenším distribučním rozsahu velikosti. Výsledky by mohly být použity pro výzkum vlivu velikosti

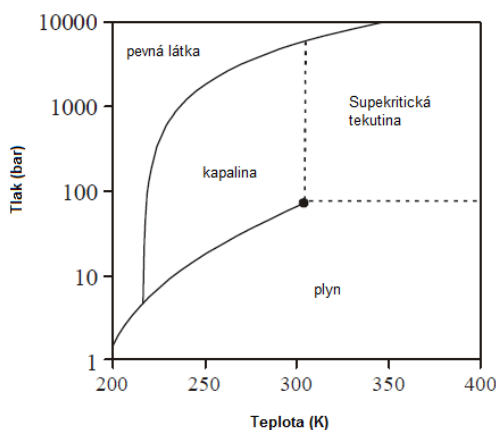
částic kofeinu na jejich rozpustnost v oběhovém systému lidského těla a schopnosti prostupu skrz buněčné membrány. Dále by mohly být využity v průmyslové výrobě pro optimalizaci operačních podmínek pro přípravu nanočástic touto metodou.

Druhou částí experimentální práce byla příprava nanočástic vybraných léčiv, kterými jsou aspirin, nifedipin a cimetidin. Tato léčiva byla připravována aplikací stejného přístroje a metody jsou totožné jako v případě přípravy nanočástic kofeinu. Cílem této části práce bylo pouze zjištění, zda nanočástice vybraných léčiv lze pomocí uvedeného přístroje a metody připravit. Výsledky budou využity k provádění následné optimalizace podmínek pro jejich přípravu.

Vzhledem k tomu, že přístroj Spe-ed SFE-4 obsahuje modul umožňující aplikaci přídavného rozpouštědla, jehož koncentrace by mohla vhodně ovlivňovat vznik výsledných částic, pokračování této práce by mohlo spočívat v jeho připojení a aplikaci vhodného rozpouštědla pro dosažení lepších výsledků.

2. Teorie superkritických tekutin

Supekritické tekutiny jsou sloučeniny, směsi nebo prvky nad svou kritickou teplotou (T_c) a tlakem (p_c), ale zároveň pod tlakem vedoucím k přeměně na pevnou látku. Supekritická oblast je dobře patrná z fázového diagramu (Obr. 1) oxidu uhličitého (CO_2) [1].



Obr. 1: Fázový diagram CO_2 [2].

2.1 Vlastnosti superkritických tekutin

Vlastnosti SCFs jsou často popisovány jako vlastnosti pohybující se mezi vlastnostmi kapalin a plynů. Všechny vlastnosti tomuto popisu však nevyhovují. Příkladem jsou stlačitelnost a tepelná kapacita, které jsou podstatně vyšší než u kapalin a plynů, pokud se pohybují v blízkosti kritického bodu (dále od něj se snižují). Většina vlastností se však v blízkosti kritického bodu mění souvisle, proto je tento popis často používán.

Nejzajímavějšími vlastnostmi SCFs jsou:

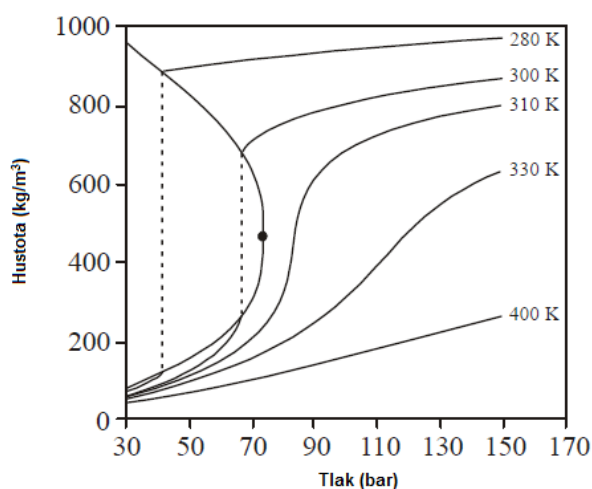
- vysoká difúzní rychlost
- nízká viskozita
- nastavitelná solvatační síla a hustota pomocí změny tlaku a teploty
- vysoká mísitelnost s plyny
- vysoká stlačitelnost
- téměř žádné povrchové napětí.

Výhody vycházející z fyzikálních vlastností SCFs, zejména vysoké difuzivity, nízké viskozity a přechodné hustoty umožňují využití SCFs k procesům s jejich nepřetržitým tokem. Vysoká rychlost průtoku SCFs a rychlé reakce, ke kterým s nimi často dochází, umožňují návrh vysoce propustných reakcí v relativně malých reaktorech.

Největší výhodou SCFs při chemických syntézách je jejich nastavitelná solvatační síla a hustota. Rozsáhlý soubor poznatků o extrakcích a rozpustnosti v SCFs umožňuje řešit problémy v separačních a purifikačních krocích průmyslových procesů. Například extrakční vlastnosti SCFs mohou být použity k separaci látek z vedlejších produktů nebo k obnovení aktivity homogenních katalyzátorů.

Další výhodou některých SCFs je jejich těkavost, která umožňuje jejich snadné odstranění z výsledných produktů bez použití ekonomicky a energeticky náročných sušících procesů. Díky toho je možné se vyhnout reziduíům SCFs ve výsledných produktech, čehož se využívá zejména při přípravě kosmetických přípravků, léčiv, přísad do potravin nebo materiálů využívaných v elektronice [1].

Důležitou vlastností SCFs je jejich regulovatelná hustota pomocí teploty a tlaku, která může ovlivňovat průběh mnoha reakcí. Závislost hustoty CO₂ na teplotě a tlaku je znázorněna v grafu (Obr. 2).



Obr. 2: Závislost hustoty CO₂ na teplotě a tlaku [2].

2.2 Používané SCFs

Existuje mnoho používaných SCFs, některé však nemají potenciál komerčního využití. Například xenon a fluorid sírový (SF₆) mají nízké kritické hodnoty (pokud jsou dostatečně čisté), ale jejich použití je velmi ekonomicky nákladné. Plyny jako oxid dusný (N₂O) nebo ethan (C₂H₆) mají nízké kritické hodnoty, ale mohou s připravovanými látkami tvořit výbušné směsi, a proto je jejich použití nebezpečné [3].

V tabulce (Tab. 1) jsou uvedeny kritické teploty a tlaky některých SCFs a jejich hustoty v těchto bodech [2].

Tab. 1: Kritické teploty, tlaky a hustoty vybraných superkritických tekutin:

Superkritická tekutina	T_c (K)	P_c (MPa / bar)	ρ_c (g·cm ⁻³)
Oxid uhličitý (CO ₂)	304,1	7,38 / 73,8	0,469
Voda (H ₂ O)	647,1	22,06 / 220,6	0,322
Methan (CH ₄)	190,4	4,60 / 46,0	0,162
Ethan (C ₂ H ₆)	305,3	4,87 / 48,7	0,203
Propan (C ₃ H ₈)	369,8	4,25 / 42,5	0,217
Ethylen (C ₂ H ₄)	282,4	5,04 / 50,4	0,215
Propylen (C ₃ H ₆)	364,9	4,60 / 46,0	0,232
Methanol (CH ₃ OH)	512,6	8,09 / 80,9	0,272
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	513,9	6,14 / 61,4	0,276
Aceton (C ₃ H ₆ O)	508,1	4,70 / 46,4	0,278

Nejvíce využívanou superkritickou tekutinou (SCF) je CO₂. Je to zejména kvůli jeho netoxickým vlastnostem, nehořlavosti, nekarcinogenitě, snadné dostupnosti, recyklovatelnosti, snadné separaci produktů a nízkým ekonomickým nákladům. Další hojně využívanou SCF je voda (H₂O), která má mnoho výhod stejných jako CO₂, nicméně má vysoké kritické hodnoty, a proto se využívá v menší míře než CO₂ [1].

3. Aplikace superkritických tekutin

Největší potenciál superkritických tekutin, zejména scCO_2 je v dynamicky se rozvíjejícím oboru tzv. „Zelené chemie“ (Green chemistry). „Zelená chemie“ je odvětví využívající soubor zásad, které snižují nebo eliminují použití nebo vznik nebezpečných látek při návrhu, výrobě a použití dalších chemických produktů [4]. „Zelená chemie“ se snaží vyhnout použití toxických chemikálií, produkci odpadů a polutantů životního prostředí. Zároveň se snaží snížit energetické a ekonomické náklady při přípravě nejrůznějších produktů [5].

Supekritická fluidní extrakce (SFE) se využívá k přípravě vzorků pro analýzu farmaceutických produktů. Jedná se zejména o přípravu tablet a kapslí, veterinárních krmiv, krémů a mastí, vodných roztoků a odvarů. SFE se ukázala být vhodnou pro extrakci relativně nepolárních látek z pevných matric. S úspěchem však byla využita i u polárních látek nebo látek obsažených v infuzích nebo jiných vzorků na vodné bázi. Dále je možnost i tzv. obrácené SFE, to znamená extrakce matric místo extrahovaných látek [6].

SCFs se používají v supekritické kapalinové chromatografii (SFC). Tato separační technika využívá SCF jako hlavní složku mobilní fáze. Vlivem změn teploty, tlaku nebo složení mobilní fáze umožňuje SFC separaci mnoha látek v přijatelném čase. SCF umožňuje vysoké průtoky mobilní fáze a tedy rychlou extrakci. Zároveň široká škála organických modifikátorů usnadňuje vývoj této metody a výrazně urychluje optimalizaci separací. Výhodou SFC je v neposlední řadě i lepší rozpustnost látek ve směsích SCFs s organickými rozpouštědly než v čistých organických rozpouštědlech [7].

Unikátní vlastnosti superkritických tekutin se dají využít na přípravu kompozitů, pro přípravu pevných emulzí, při extrakcích a přípravě nanočástic léčiv, oxidů kovů nebo polovodičů [8].

SCFs se dále uplatňují v heterogenních katalýzách, které zahrnují reaktanty a produkty v plynné fázi ve spojení s katalyzátory v pevné fázi. Uplatňují se i v enzymatických katalýzách, kde jsou jako katalyzátory využívány enzymy, nazývané též bio-katalyzátory [1].

V lékařství se SCFs mohou využívat k povlakování chirurgických nástrojů (např. stentů) polymerními vrstvami, polymerními vrstvami s farmaceutickými či terapeutickými agenty nebo léčivy [9]. Dalším zajímavou aplikací v lékařství je impregnace vhodné matrice nitroočními protizánětlivými léčivy používanými v oční chirurgii [10].

SCFs se mohou využívat i k přípravě polymerních částic z čistých polymerů nebo k přípravě polymerních částic obsahujících účinné látky, což se týká zejména farmaceutických přípravků [11]. ScCO_2 se využívá i při syntéze samotných polymerů [1].

Pomocí techniky zvané nanorozměrné odlévání (nanoscale casting - NC-SCF) mohou být připravena nanovlákna a nanodráty. Tato technika spočívá v rozpuštění prekurzorů v SCFs a jejich následné depozici do forem z aktivního uhlíku (pokrytého organickou maticí). Poté je aktivní uhlík eliminován (například kalcinací) a deponovaný materiál kopíruje nejenom makroskopický tvar, ale i nanometrickou porézní strukturu. Kopírování nanometrické struktury při této technice nebylo dříve dosaženo z důvodu vysoké viskozity používaných kapalin nebo kapilární kondenzace používaných plynů. Použitím SCFs však byly tyto problémy překonány [12].

Nanofilmy mohou být připraveny metodou zvanou chemická fluidní depozice (chemical fluid deposition – CFD), což je superkritická alternativa komerčně využívané chemické depozice par (chemical vapour deposition – CVD). Touto technikou byly připraveny nanofilmy platiny, mědi, niklu, zlata, kobaltu nebo paladia [12].

4. Metody přípravy nanočástic s využitím superkritických tekutin

Existuje mnoho metod pro přípravu nanočástic pomocí SCFs. Tyto metody lze zařadit do dvou hlavních skupin:

1. Využití SCF jako rozpouštědla. V tomto případě představuje SCF rozpouštědlo, ve kterém je daná látka rozpuštěna a následně krystalizuje vlivem prudké změny tlaku. Do této skupiny patří rychlá expanze superkritické směsi (rapid expansion of supercritical solution – RESS), rychlá expanze superkritické směsi do rozpouštědla (rapid expansion of supercritical solution into an aqueous solution – REESSAS), rychlá expanze superkritické směsi do vodného roztoku (rapid expansion of supercritical solution into an aqueous solution – RESSAS) a rychlá expanze superkritické směsi s „non-solventem“ (rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent – RESS-N).
2. Využití SCF jako tzv. anti-rozpouštědla. V tomto případě přichází SCF do kontaktu s látkou rozpuštěnou v organickém rozpouštědle. Do této skupiny patří metody využívající anti-rozpouštědla v plynném stavu (gas antisolvent - GAS), superkritické anti-rozpouštědlo (supercritical antisolvent - SAS), extrakční systém s rozpouštědlem ve stavu aerosolu (aerosol solvent extraction system - ASES), směsi disperzně obohacené superkritickou tekutinou (solution enhanced dispersion by supercritical fluid - SEDS), stlačené anti-rozpouštědlo (particles by compressed antisolvent - PCA) nebo atomizaci rychlým vstřikováním určenou pro extrakci rozpouštědlem (atomized rapid injection for solvent extraction - ARISE).

K těmto dvěma skupinám lze v odborné literatuře najít ještě další čtyři [13]:

1. Využití SCF jako pomocného rozpouštědla ke snížení bodu tání připravované pevné látky. Při těchto metodách je roztok látek (nebo pouze rozpuštěné látky) přidán k SCF a následně je rychlým snížením tlaku využito Joule-Thomsonova efektu, kdy dochází ke snížení teploty a stejnoměrnému přesycení. Do této skupiny patří vznik částic z roztoku nasyceného plynem (particles from gas saturated solutions - PGSS), PGSS-sušení (PGSS-drying), tavící atomizace s využitím plynu (gas assisted melting atomization - GAMA) a metoda odtlakování expandovaného kapalného organického roztoku (depressurization of an expanded liquid organic solution - DELOS), která může být také zařazena

do této skupiny. Podobnou metodou jako DELOS je tzv. metoda precipitace pomocí snížení tlaku kapalin expandovaných plynem (precipitation by pressure reduction of gas-expanded liquids - PPRGEL).

2. Využití SCF k výrobě částic rozprašováním. Do této skupiny patří metoda vysušení kapek vzniklých rozprašováním (carbon dioxide assisted nebulization with a bubble dryer - CAN-BD) a atomizace za pomoci SCF (supercritical fluid-assisted atomization - SAA). V SAA, je SCF využívána také jako pomocné rozpouštědlo.
3. Využití SCF jako extrakční a anti-rozpouštěcí tekutiny. Do této skupiny patří superkritická fluidní extrakce emulzí (supercritical fluid extraction of emulsions - SFEE), která kombinuje extrakci s anti-rozpouštěcím efektem SCFs.
4. Poslední skupinou jsou procesy, které využívají různých dalších vlastností SCFs k výrobě směsí pro farmaceutické aplikace.

V této práci budou podrobněji rozebrány pouze první dvě skupiny, ostatní přesahují její rámec [3], [8].

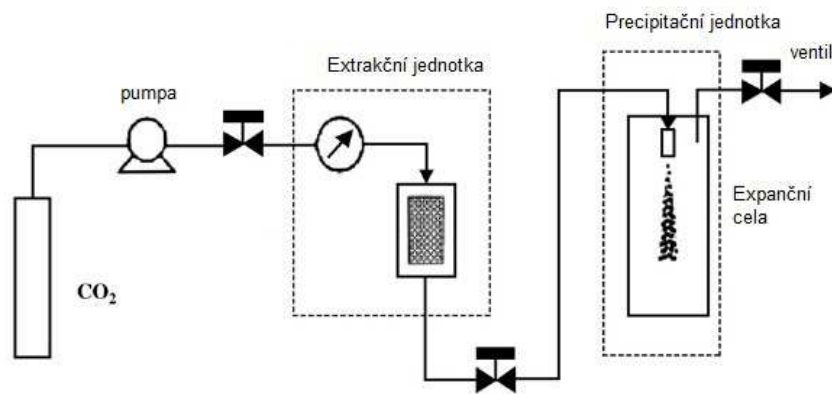
4.1 SCF jako rozpouštědlo

Nejběžnější metodou využívající SCF jako rozpouštědlo je RESS, která bude popsána níže. Dále budou zmíněny principy metod, které jsou modifikací RESS. Jedná se o RESOLV, RESAS a RESS-N [13].

4.1.1 RESS

RESS (Obr. 3) je metoda založená na precipitaci částic rozpuštěných v superkritické tekutině vlivem náhlé změny tlaku. Tato metoda se sestává ze saturace matrice SCF a z následného odtlačování roztoku přes úzkou trysku do komory o nižším (většinou atmosférickém) tlaku. Tímto přístupem je zajištěna rychlá nukleace velmi malých částic. Tato metoda je někdy označována i jako superkritická fluidní nukleace (supercritical fluid nucleation - SFN). RESS je využitelná pouze pro částice/materiály, které jsou rozpustné v použité superkritické tekutině. Morfologie výsledných částic závisí zejména na teplotě, velikosti skokové změny tlaku a geometrii trysky (délce, průměru, tvaru).

Hlavní nevýhodou RESS metody je její aplikace pouze na materiály, které jsou rozpustné ve zvolené SCF. Většina pevných látek, které mají vysokou molekulovou hmotnost, polární vazby a jsou vhodné pro přípravu nanočástic, se jen velmi málo nebo vůbec nerozpouštějí v CO_2 , který je nejpoužívanější SCF [8], [14].



Obr. 3: Schéma principu RESS [8].

4.1.2 Modifikace RESS

Ostatní metody využívající SCF jako rozpouštědlo jsou většinou modifikací RESS metody. Jedná se o metody RESOLV, RESAS a RESS-N.

V případě RESOLV se do expanzní cely přidává kapalné rozpouštědlo k zabránění růstu částic v expanzní trysce. Při této metodě je nutné použití stabilizačního agenta, který znesnadňuje pochopení některých kroků procesu.

Metoda RESAS je jednoduchou modifikací RESOLV s tím rozdílem, že jako stabilizačního agenta využívá vodný roztok se surfaktantem, který ovlivňuje rozpustnost rozpouštěných látek.

RESS-N metoda byly připraveny mikročástice a mikrokapsule polymerů. Metoda využívá tzv. „non-solvent“ ke zvýšení rozpustnosti pevných látek v SCF. Non-solvent je pomocné rozpouštědlo, které nesmí rozpouštět čistý polymer nebo způsobovat bobtnání polymeru [13].

4.2 SCF jako anti-rozpouštědlo

V těchto metodách je připravovaná látka rozpuštěna v rozpouštědle za tvorby směsi. Následnou interakcí SCF s připravenou směsí vznikají výsledné částice. Důležité je, aby SCF byla rozpustná v použitém rozpouštědle, ale zároveň rozpuštěná látka se v SCF nesmí vůbec rozpouštět. Kvůli rozpouštění SCF v rozpouštědle dochází k objemové expanzi, která redukuje hustotu rozpouštědla a tím jeho solvataci. Nejpoužívanější metody řazené

do této skupiny jsou GAS a SAS. Metody ASES a SEDS se od těchto metod liší pouze jiným tvarem trysky nebo způsobem vstřikování [8], [13].

Precipitační mechanismy při těchto metodách mohou být vysvětleny třemi různými způsoby:

- Prvním je tzv. jedna kapka-jedna částice (one droplet-one particle) mechanismus. V něm se předpokládá atomizace kapalně směsi injektorem, způsobující tvoření kapek. Následně vlivem rychlého rozpuštění SCF v rozpouštědle vznikají pevné částice, které zůstávají ve tvaru původních kapek.
- Druhý mechanismus je modifikací předchozího. Kapky jsou v něm formovány stejně, nicméně rychlým přenosem hmoty rozpouštědla a anti-rozpouštědla dochází k vysokému přesycení rozpuštěné látky. To způsobuje tvorbu více jader uvnitř jediné kapky. Výsledkem je růst více částic z jedné kapky.
- Třetí mechanismus je způsoben vymizením povrchového napětí mezi rozpouštědlem a anti-rozpouštědlem v kratším čase než při tryskovém rozpadu kapalného roztoku [15].

4.2.1 GAS

V metodě GAS (Obr. 4) je precipitační patrona naplněna určitým množstvím připravované látky rozpuštěné v kapalném rozpouštědle. Následně je přidána SCF, která zastupuje pozici anti-rozpouštědla [8], [13], [14].

GAS je velmi probádaná metoda, jejímž nejdůležitějším parametrem je objemová molární expanze, dána vztahem:

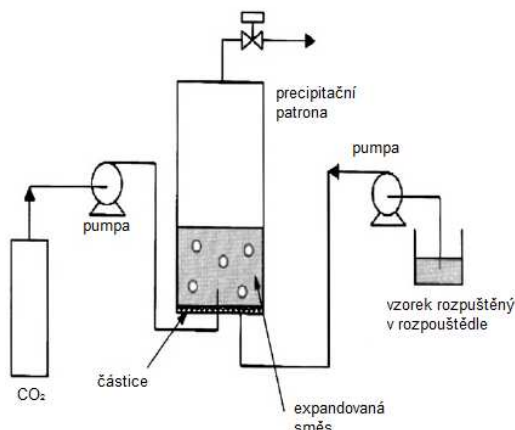
$$\frac{\Delta V}{V} = \frac{V_L(T, P, x_1)}{V_2(T, P_0)} - 1,$$

kde V_L je celkový objem kapalně fáze a V_2 je celkový objem čistého rozpouštědla při stejné teplotě a příslušném tlaku, x_1 představuje molární zlomek anti-rozpouštědla ve směsi.

Hlavní výhodou GAS metody je schopnost mikronizace polárních vzorků a získání mikrokapslí. Nevýhodou je použití organických rozpouštědel, jejichž stopy se mohou vyskytovat ve vzniklých částicích [8], [14].

4.2.2 SAS

Metoda SAS (Obr. 4) je velmi podobná GAS, liší se pouze v tom, že precipitační patrona je nejdříve naplněna SCF a následně je do ní vpuštěna připravovaná látka rozpuštěná v rozpouštědle [8], [14].

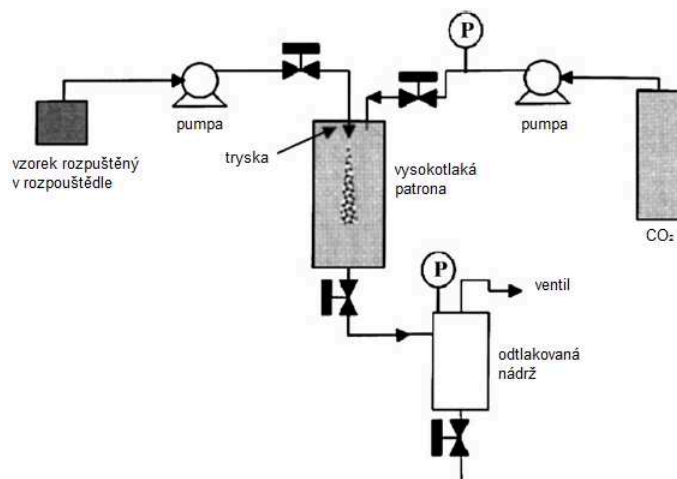


Obr. 4: Schéma principu GAS/SAS metody [8].

4.2.3 ASES

Tato metoda (Obr. 5) zahrnuje vstřikování směsi atomizační tryskou do stlačeného CO₂. Princip této metody je velmi podobný principu SAS metody. Rozpuštění SCF ve formě kapalných kapiček je doprovázeno prudkou expanzí objemu. V důsledku této skutečnosti dochází ke snížení rozpouštěcí schopnosti rozpouštědla, což způsobuje prudký nárůst přesycení v kapalně směsi a následné formování malých a jednotných částic. SCF je pumpována shora do patrony pomocí vysokotlaké pumpy. Směs připravované látky rozpuštěné v rozpouštědle je do patrony přivedena tryskou při ustáleném stavu systému. Směs musí být do patrony přivedena pod vyšším tlakem, než je operační tlak, z důvodu získání kapalných kapiček, a vzniklé částice jsou shromažďovány na dně patrony.

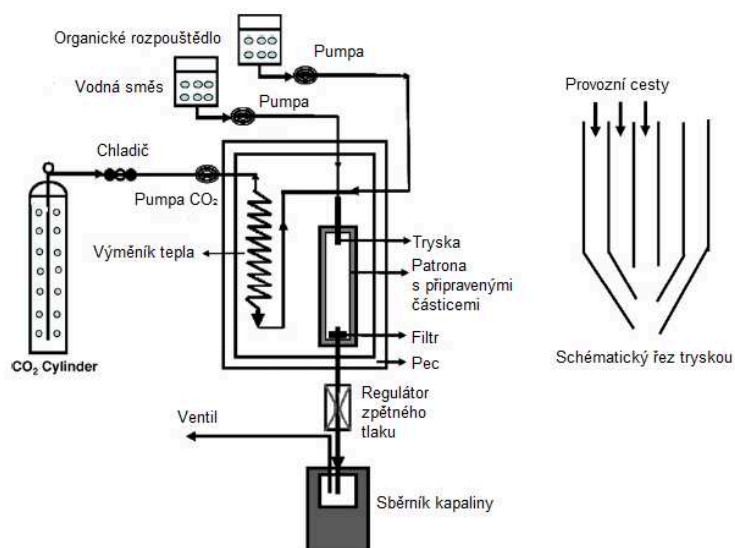
SCF společně s rozpouštědlem je následně odváděna do nádrže o nižším tlaku, kde jsou dále separovány. Pumpování kapalně směsi musí být zastaveno po nashromáždění dostatečného množství částic. SCF je však čerpána po zastavení čerpání směsi, aby byly odstraněny zbytky rozpouštědla [8], [14].



Obr. 5: Schéma principu ASES metody [8].

4.2.4 SEDS

Základním principem SEDS (Obr. 6) metody je dispergování vodné směsi, která obsahuje biomateriály s CO_2 v superkritickém stavu a polární organická rozpouštědla v tříkanálové koaxiální trysce. Dále je CO_2 používán k extrakci vodné fáze z produktu. Organické rozpouštědlo slouží jako precipitační agent a modifikátor umožňující nepolárnímu CO_2 odstranit vodu [8], [14].



Obr. 6: Schéma principu SEDS metody a schéma trysky [8].

5. Příprava nanočástic léčiv s využitím superkritických tekutin

Více než 60% farmaceutických molekul je málo rozpustných nebo nerozpustných v oběhovém systému lidského těla [16]. Je to z důvodu jejich typické struktury vyplývající z nutnosti připojení specifických vazeb na cílové receptory nebo enzymy. Z tohoto důvodu má většina léčiv velkou molekulovou hmotnost a mnoho substituentů [17].

Ke zvýšení rozpustnosti léčiv se využívá třech přístupů:

- První možností je mikronizace léčiv, vyplývající z Noyes-Whitneyho rovnosti, která vyjadřuje přímou závislost rozpustnosti na specifickém povrchu. Dále je tato možnost podporována Ostwald-Freundlichovou rovností, která vyjadřuje exponenciální závislost rozpustnosti na velikosti částic.
- Druhým přístupem je výroba kompozitních materiálů. Tento přístup se snaží modifikovat fyzikální strukturu krystalů za účelem zvýšení jejich entropie a entalpie, než má jejich původní krystalická forma, a snaží se připravit jejich amorfní nebo polymorfní formy. Tento přístup se však časem stal náročným ve vývojové a marketingové fázi.
- Třetí přístup spočívá v přípravě kapalných forem zahrnujících komplexy, měkké želatiny, tekuté emulze a micely [17].

Výroba částic léčiv musí dále splňovat vysoké požadavky na fyzikálně-chemické vlastnosti zahrnující jejich velikost, tvar a povrchové vlastnosti [3]. Důležitou vlastností těchto částic je jejich čistota. Zjistilo se, že tradiční metody používající k přípravě léčiv různá rozpouštědla mají omezenou aplikaci z důvodu zbytkových množství rozpouštědla. Z tohoto důvodu nahradila v posledním desetiletí SCF technologie tradiční přípravu léčiv pomocí organických rozpouštědel. Je tomu tak zejména v přípravě nanočástic, přípravě jídla (bezkofeinová káva), extrakcím, čištění, přípravě polymerů a dalších [3], [8], [13].

5.1 Léčiva připravená pomocí SCFs

Metodami využívající SCF jako rozpouštědlo bylo připraveno mnoho léčiv, o kterých byla publikována řada odborných článků. Mezi nejzajímavější patří příprava aspirinu, cholesterolu, ibuprofenu, lecithinu, kofeinu [14], raloxifenu [16] nebo cefuroximu [18].

Zajímavým využitím metody RESS byla koprecipitace aktivních farmaceutických látek (API) s aditivou, která mohou poskytnout schopnost přidat vlastnosti API v raných fázích výzkumu a syntézy léčiv. S tímto cílem byla připravena léčiva rekrystalizací za přítomnosti strukturně příbuzných přísad. Pomocí RESS metody bylo připraveno dvanáct

směsí léčiv s aditivou a bylo objeveno několik zajímavých jevů. Patří mezi ně zvýšení rozpustnosti, redukce velikosti částic, eutektické formování, redukce krystalinity, amorfni přeměna, tvorba hydrátů, polymorfni přeměna a selektivita extrakce. Bylo však zjištěno, že rychlé krystalizace pomocí SCF nezaručuje konzistentní dopování krystalů aditivou. Proto musí být vzaty v úvahu konkurenční mechanismy založené na relativní rozpustnosti léčiv a aditiv, stejně jako selektivitu SCF rozpouštědel [19].

Metodami využívajícími SCF jako anti-rozpouštědlo byly připraveny částice insulinu, lecithinu, lysozymu, myoglobinu a dalších. Využívanými rozpouštědly jsou voda, ethanol, aceton a dimethylsulfoxid. Jako SCF se využívá hlavně CO₂ nebo jeho směs s ethanolem. Nejvíce využívanými metodami jsou GAS, ASES a SEDS [14].

6. Aplikace SFE pro přípravu nanočástic léčiv

Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na přípravu nanočástic kofeinu s využitím komerčně dodávaného přístroje Spe-ed SFE-4 (firma Applied Separation). Cílem práce byla příprava nanočástic kofeinu v co nejužším distribučním rozsahu velikostí a stanovení podmínek, za jakých je distribuce velikosti částic co nejužší a velikost nanočástic je nejnižší. Druhou částí experimentální práce byla příprava částic aspirinu, nifedipinu a cimetidinu stejným způsobem jako v případě kofeinu. Vzniklé částice byly hodnoceny pouze vizuálním způsobem.

6.1 Použité chemikálie

- Kofein – prášek, Dr. Kulich Pharma, s.r.o
- Aspirin - tablety (Acidum acetylsalicylium), Bayer, s.r.o
- Nifedipin - prášek, Sigma-Aldrich
- Cimetidin – prášek, Sigma-Aldrich

6.2 Použité přístroje

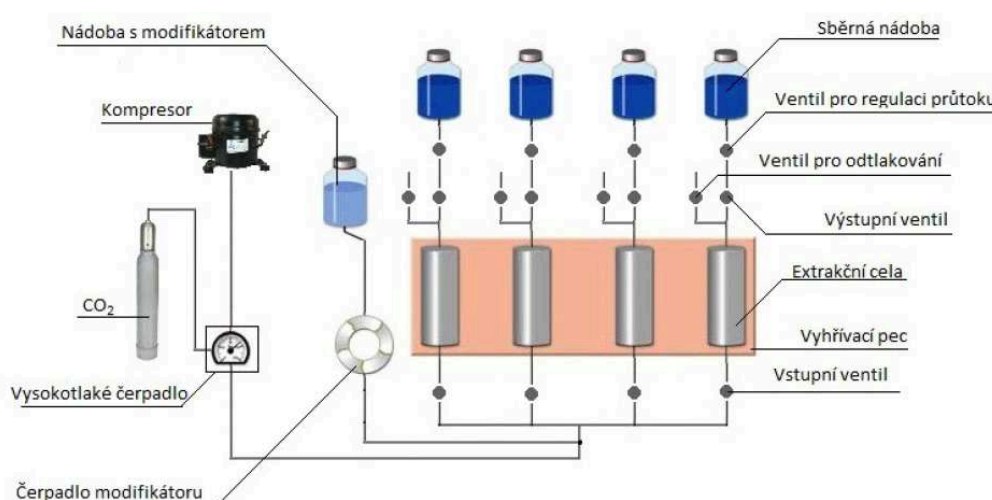
- Spe-ed SFE-4 – Applied separation
- SEM – Quanta FEG 450
 - o EDS detektor APPOLO X (EDAX)
 - o EBSD HIKARI kamera (EDAX)
 - o ETD detektor pro SE
 - o 4-segmentový BSE detektor
 - o zařízení spadá pod působnost RMTVC – Regionálně materiálově technické výzkumné centrum (<http://rmtvc.fmmi.vsb.cz/>)
- FTIR NICOLET 6700 Thermo USA
- Zetasizer Nano ZS – Malvern
- XRD – Rigaku UltimaIV

6.3 Přístroj SFE-4

Pro přípravu nanočástic byl využit přístroj Spe-ed SFE-4 (dále SFE-4). Tento přístroj je primárně určen k extrakcím látek z různých matric (vzorky životního prostředí, potravinářství, polymerní materiály). Přístroj využívá jako superkritickou tekutinu CO₂.

Skládá se z těchto částí:

- Láhev s CO₂ – pomocí nerezové kapiláry je připojena k vysokotlakému čerpadlu. Je vybavena otočným ventilem.
- Kompresor – je připojen k vysokotlakému čerpadlu SCF a slouží k přívodu stlačeného vzduchu nutnému k jeho pohonu.
- Chladicí zařízení – je připojeno k vysokotlakému čerpadlu, kterému dodává oběhovou chladicí kapalinu nutnou pro zvyšování tlaku CO₂. Chladicí kapalinou je voda s přísávkem nemrznoucí směsi.
- Vysokotlaké čerpadlo – slouží k pumpování CO₂ při požadovaném tlaku. Na jeho přední straně je umístěno ovládání k nastavení požadovaného tlaku.
- Vyhřívací pec – v ní jsou umístěny patrony se vzorky. Pomocí otočných vstupních ventilů je k ní připojeno vysokotlaké čerpadlo, které do patron vpouští CO₂ pod zvoleným tlakem. Pod ní je umístěna jednotka umožňující nastavení teploty v peci a teploty sběrného zařízení. Pec disponuje čtyřmi pozicemi, ke kterým je možno připojit patrony.
- Sběrné zařízení s výstupními hroty – je připojeno k vyhřívací peci pomocí otočných výstupních ventilů. Vedou z něj hroty, ke kterým jsou připojeny sběrné nádoby. K citlivému nastavení průtoku skrz hroty slouží přesné dávkovací ventily.
- Průtokoměr – pomocí potrubí zakončeného hrotem je připojen ke sběrným nádobám a umožňuje sledovat průtok CO₂ celým zařízením.



Obr. 7: Schéma přístroje SFE-4 [20].

K tomuto přístroji je k dispozici i modul pro přidání vhodného rozpouštědla k CO₂. Tento modul rozšiřuje možnosti využití SFE-4, v této práci však nebyl použit.

Operační parametry přístroje jsou:

- Maximální tlak – 690 bar.
- Maximální teplota – 240 °C.
- Maximální průtok SCF – 20 l·h⁻¹
- Kapacita patron – k dispozici byly patrony pouze o objemu 50 ml, přístroj však umožňuje použití patron o objemu až 1 l
- Délka výstupních hrotů – 9 cm

6.3.1 Provoz přístroje

Přístroj je schopen pracovat ve dvou režimech:

- Statický režim – při tomto režimu jsou uzavřeny výstupní ventily, SCF neproudí ven a zůstává se vzorkem uvnitř patrony.
- Dynamický režim – při tomto režimu jsou výstupní ventily otevřeny a vzorek po interakci s SCF uvnitř patrony proudí ven skrz sběrné zařízení a výstupní hroty do sběrných nádob.

6.3.2 Plnění patron

Důležitým krokem práce s přístrojem je plnění patron. Patrona je nejdříve uzavřena z jednoho konce šroubovatelnou hlavicí. Tento konec je vhodné označit, protože je do pece vkládán směrem nahoru. Do patrony je následně vložen kousek skelné vaty, který se musí stěsnat pomocí pěchovací tyče. Následně je vložen vzorek. Zbývající prostor je vyplněn skleněnými kuličkami o průměru 1,5 mm. Dále je vložen další kousek skelné vaty, který je nutno opět stěsnat. Nakonec je patrona uzavřena z druhé strany šroubovatelnou hlavicí. Patrona je poté vložena do vyhřívací pece do příslušné pozice. Schéma naplněné patrony před jejím uzavřením druhé strany je na následujícím obrázku (Obr. 8):



Obr. 8: Schéma naplněné patrony.

6.4 Příprava nanočástic kofeinu

V této části budou popsány současné výsledky přípravy částic kofeinu, základní vlastnosti kofeinu, postup a podmínky přípravy aplikované pomocí přístroje SFE-4.

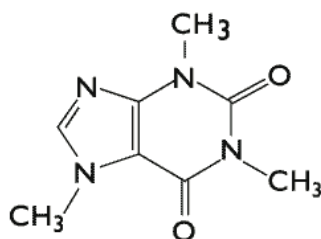
Částice kofeinu společně s anthracenem metodou RESS byly již dříve připraveny. Přípravě částic čistého kofeinu však byla v této práci věnována jen malá část, kde částice dosahovaly řádově mikroskopických rozměrů [21].

Rozsáhlejší práce byla zaměřena na přípravu nanočástic kofeinu metodou GAS. Při této metodě byly částice rozpuštěny v chloroformu nebo dichlormethanu a jako anti-rozpouštědlo byl použit scCO_2 . V této práci byl hlavně zjišťován vliv rozpouštědel, rychlost vstřikování a vliv růstového retardantu, který ovlivňuje velikost a krystalinitu výsledných částic. Dále byl v této práci zjišťován i vliv teploty na výslednou velikost částic. Bylo zjištěno, že při zvyšování teploty docházelo ke snížení velikosti výsledných částic, nicméně nejvyšší použitá teplota byla 50°C . Výsledné částice tvořily jehličky a dosahovaly řádově mikrometrů [22].

6.4.1 Kofein

Kofein ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$, Obr. 9) je látka tvořící bílý krystalický prášek nebo jemné bílé krystalky, snadno sublimuje. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě, těžce rozpustný v ethanolu a v etheru. Rozpouští se v koncentrovaných roztocích alkalických benzoanů a salicylanů [23].

Kofein je stimulant centrálního nervového systému, který se přirozeně vyskytuje ve více než 60-ti druzích rostlin, a je používán v několika potravinách, nápojích a lécích [24].



Obr. 9: Strukturální vzorec kofeinu [25].

6.4.2 Postup přípravy

Příprava částic probíhala v těchto krocích:

- Plnění patron vzorkem (viz 6.3.2)
- Vložení patron do zahřívací pece a zahřátí na zvolenou teplotu

- Vpuštění CO₂ pod zvoleným tlakem do patron
- Podrobení vzorku statickému režimu SFE po zvolenou dobu
- Dokončení procesu dynamickým režimem SFE po zvolenou dobu a jímání do vialek
- Odebrání a analýza připravených vzorků

6.4.3 Podmínky přípravy

Množství původního vzorku kofeinu použitého při přípravách bylo zvoleno na 0,2 g z důvodu jeho omezeného množství. Toto množství bylo do patron umístováno dříve popsaným způsobem (viz 6.3.2).

Jak bylo popsáno výše, parametrem, který ovlivňuje velikost částic, je tlak. Při přípravě pomocí uvedeného přístroje však jeho vliv na velikost vzniklých částic nebyl zjišťován z důvodu ucpávání potrubí při jeho nižších hodnotách. Při vyšších tlacích často docházelo k netěsnosti patron, kvůli které musela být příprava přerušena a opakována po opětovném utěsnění patron. Z těchto důvodů nebyla zkoumána závislost velikosti částic na tlaku scCO₂. Jako pracovní hodnota tlaku byla zvolena hodnota 150 bar, při které docházelo pouze k občasnému ucpání potrubí, a měření nemuselo být přerušováno z důvodu netěsnosti patron.

Dalším parametrem ovlivňujícím velikost částic je teplota. Částice kofeinu byly připravovány při teplotách 45, 50, 80 a 100°C. Teplota sběrného zařízení byla při všech měřeních nastavena na konstantní hodnotu 110°C, protože při nižších teplotách docházelo k výraznému zamrznání výstupních hrotů. Toto zamrznání je přirozenou reakcí způsobenou poklesem tlaku [13]. Abychom tomuto problému zamezili, museli bychom hroty také zahřívat nebo je alespoň zkrátit, aby jejich konec byl co nejbližší zahřátému sběrnému modulu.

Doba statického režimu by mohla také ovlivnit velikost částic, nicméně v této práci byla zvolena na 10 min a její vliv bude předmětem další práce. Doba dynamického režimu byla stanovena na 60 min, protože při této době bylo již dostatečné množství vzorku k některým analýzám. Avšak při této době se značně snižoval výtěžek vzorků, proto nebyla tato doba prodlužována.

Průtok CO₂ byl nastavován přibližně na 5 l·h⁻¹. Tento údaj je pouze přibližný z důvodu malého rozlišení průtokoměru. Zároveň tato hodnota často kolísala z důvodu občasného ucpání potrubí, po kterém musela být vždy zkorigována pomocí přesných dávkovacích ventilů.

6.5 Příprava nanočástic léčiv

Druhou částí práce byla příprava nanočástic dalších léčiv. K dispozici byla celá řada léčiv, ze kterých byla možnost výběru. K přípravě byly použity tři z nich – aspirin, nifedipin a cimetidin. Postup přípravy byl stejný jako v případě přípravy nanočástic kofeinu.

6.5.1 Aspirin

Aspirin je komerční název léčiva s účinnou látkou v podobě kyseliny acetylsalicylové ($C_9H_8O_4$, Obr. 10a). Tvoří bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v lihu 96%, dobře rozpustný v etheru [23].

Aspirin se používá na tišení bolesti hlavy, zubů, bolesti v krku spojených s nachlazením, menstruačních bolestech, bolestech svalů nebo zad. Dále při zánětlivých onemocněních horních cest dýchacích nebo chřipce, k úlevě od bolesti a horečky [26].

Aspirin byl vybrán, protože příprava jeho mikročástic o velikostech 2-5 μm pomocí metody RESS byla popsána dříve a jedná se o snadno dostupné léčivo [14].

6.5.2 Nifedipin

Nifedipin ($C_{17}H_{18}N_2O_6$, Obr. 10b) tvoří žlutý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, těžce rozpustný v ethanolu. Působením denního a umělého osvětlení určitých vlnových délek se snadno mění v nitrofenylpyridinový derivát. Působením ultrafialového světla vzniká nitrofenylpyridinový derivát. Roztoky se připravují těsně před použitím v temnu nebo za použití světla dlouhých vlnových délek ($> 420 \text{ nm}$) a chrání se před světlem [23].

Nifedipin se používá k léčbě vysokého krevního tlaku a angíny pectoris (bolest na hrudi). Nifedipin je zařazen do třídy léků zvaných blokátory vápníkových kanálů. Uvolňuje cévy, tím snižuje zatížení srdce, a také zvyšuje přísun krve a kyslíku do srdce [26].

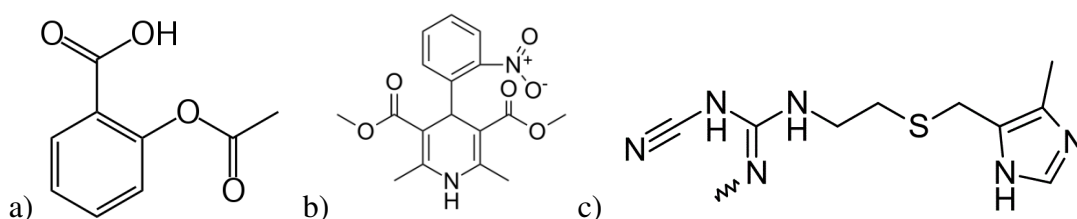
Ze stejného důvodu jako aspirin byl vybrán nifedipin, jehož připravené částice popsané v odborné literatuře dosahovaly velikosti 1-3 μm . Částice nifedipinu byly mimo metodu RESS připraveny také metodou PGSS a dosahovaly velikosti 15,4 μm [14].

6.5.3 Cimetidin

Cimetidin ($C_{10}H_{16}N_6S$, Obr. 10c) tvoří bílý nebo téměř bílý prášek. Je těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v etheru a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách [23].

Cimetidin se používal k léčbě vředů. Patří do třídy léků nazývaných blokátory H_2 . Snižuje množství kyseliny vyrobené v žaludku [26].

Příprava cimetidinu nebyla touto metodou dříve popsána. Nicméně byl vybrán z důvodu jeho možného dalšího využití v laboratoři CNT.



Obr. 10: Strukturální vzorec a) aspirinu, b) nifedipinu a c) cimetidinu [25].

6.5.4 Podmínky přípravy

K přípravě nanočástic bylo použito 0,2 g původních vzorků zmíněných léčiv, která byla do patron umístěna dříve popsaným způsobem (viz 6.3.2) a postupovalo se stejným způsobem, jako při přípravě nanočástic kofeinu (viz 6.4.2.).

Teplota v peci během přípravy byla zvolena na 45°C. I když bylo při přípravě kofeinu zjištěno, že při vyšší teplotě vznikaly menší částice (viz 7.1), nemusí to platit obecně. Zároveň v této části práce nebyla zjišťována závislost velikosti výsledných částic na teplotě, proto byla tato teplota zvolena čistě z časových důvodů, protože je jí dosaženo rychleji.

Přivedený CO_2 byl pod tlakem 150 bar. Hodnota tlaku byla zvolena na základě předchozích zkušeností při přípravě nanočástic kofeinu. Ze stejných důvodů byl průtok CO_2 nastaven na 5 l·h⁻¹. Doba statického provozu byla nastavena na 10 min. Doba dynamického provozu byla nastavena na 60 min.

7. Výsledky a diskuze

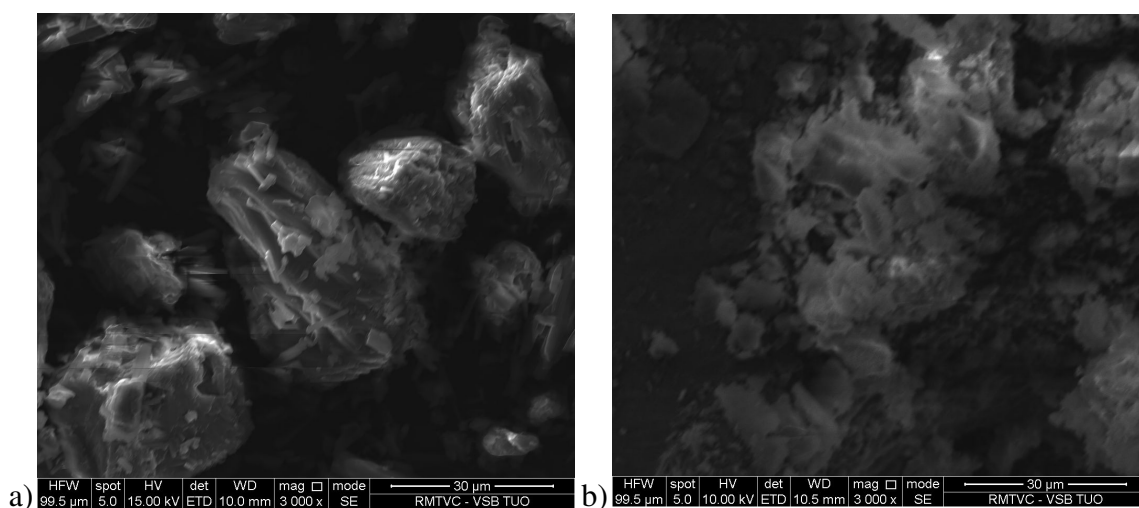
Podarilo se připravit částice a nanočástice kofeinu. Avšak z důvodu malé výtěžnosti přípravy touto metodou nebyly všechny vzniklé částice a nanočástice podrobeny všem analýzám. Dále vznikly částice aspirinu, které byly zkoumány pouze vizuálním způsobem. Částice nifedipinu a cimetidinu nebyly pozorovány.

7.1 Příprava nanočástic kofeinu

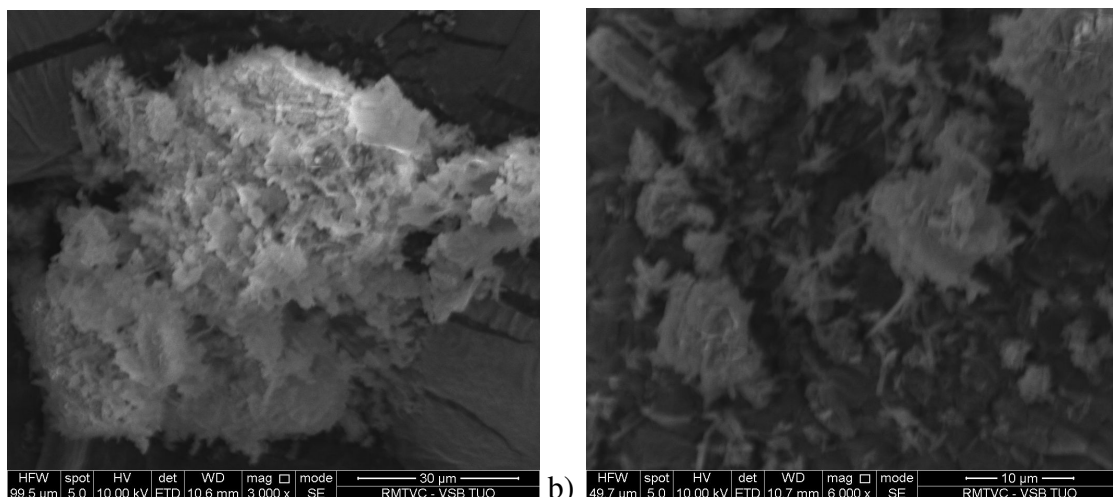
Z dříve uvedeného důvodu ucpávání potrubí a netěsnosti patron nebyla vyšetřována závislost vzniklých částic na tlaku a průtoku CO₂. To značně omezilo optimalizaci této metody pro přípravu nanočástic kofeinu. Připravené částice a nanočástice společně s původním vzorkem byly podrobeny charakterizaci s využitím metod SEM, FTIR, XRD a zjištěním distribuce velikosti částic.

7.1.1 SEM

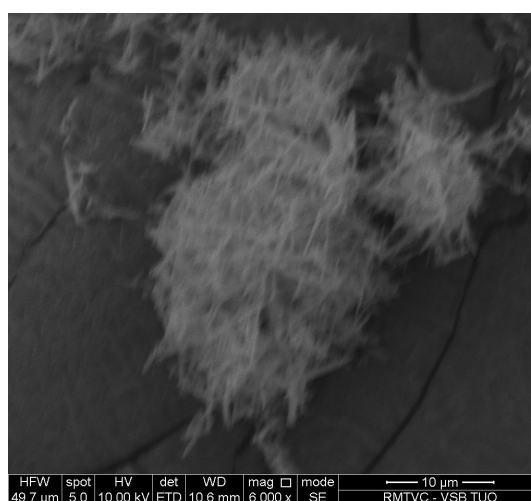
Ke zjištění tvaru částic bylo využito skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Částice čistého kofeinu před použitím SFE-4 tvořily krystaly o přibližné velikosti 10-30 μm (Obr. 11a). Částice připravené metodou RESS při teplotách 45°C (Obr. 11b) a 50°C (Obr. 12a) tvořily třídídimenzionální částice a nanočástice, které aglomerovaly do větších celků. Kofein připravený metodou RESS při teplotách 80°C (Obr. 12b) a 100°C (Obr. 13) tvořil jehličkovité nanočástice, které také aglomerovaly do větších celků.



Obr. 11: SEM snímek částice a) původního vzorku kofeinu a b) částic připravených metodou RESS při teplotě 45°C.



Obr. 12: SEM snímky a) částic kofeinu připravených metodou RESS při teplotě 50°C a b) částic připravených metodou RESS při teplotě 80°C.

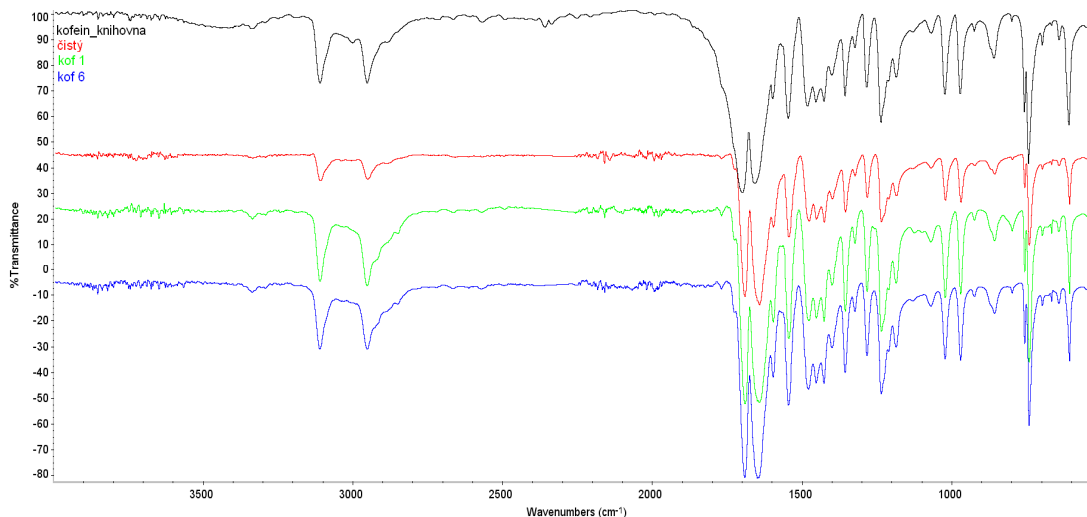


Obr. 13: SEM snímek částic připravených metodou RESS při teplotě 100°C.

7.1.2 FTIR spektroskopie

K vyšetření vazebné struktury vzorků byla využita infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). IR spektra (Obr. 14) všech připravených vzorků se shodují se spektrem čistého vzorku i se spektrem uloženým v knihovně spekter. Z této skutečnosti vyplývá, že při přípravě vzorků nedošlo k žádným změnám vazeb ve struktuře kofeinu.

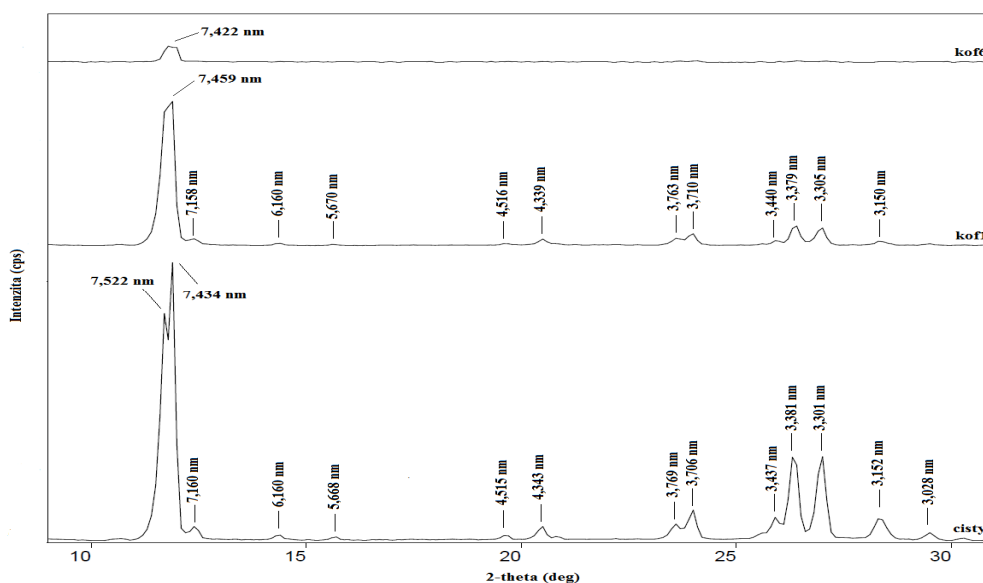
Pokud porovnáme strukturu kofeinu (Obr. 9) s IR záznamem (Obr. 14), můžeme rozlišit absorpční pásy odpovídajících funkčních skupin. V oblasti mezi 1500-2000 cm^{-1} jsou charakteristické pásy pro vibrace vazeb C=O, C=N a C=C skupin. V oblasti kolem 3000 cm^{-1} valenční vibrace vazeb C-H a N-H skupin. Výrazná je shoda v oblasti 400-1500 cm^{-1} , což je oblast tzv. „otisku palce,“ typická pro každou sloučeninu [27].



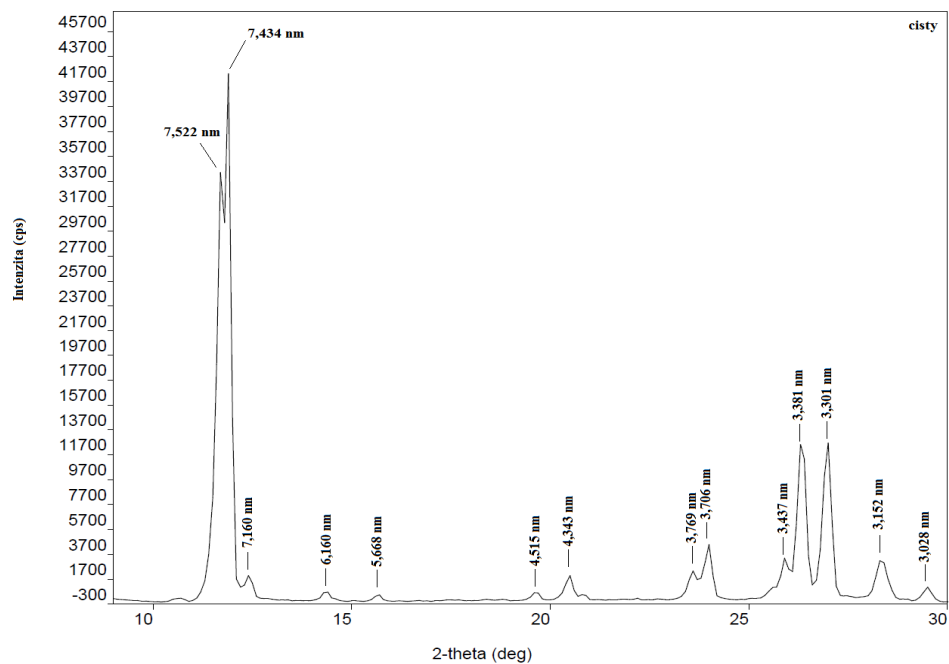
Obr. 14: Spektrum z knihovny (černá), spektrum původního vzorku (červená), spektrum vzorku připraveného metodou RESS při 45°C (zelená) a při 100°C (modrá).

7.1.3 XRD

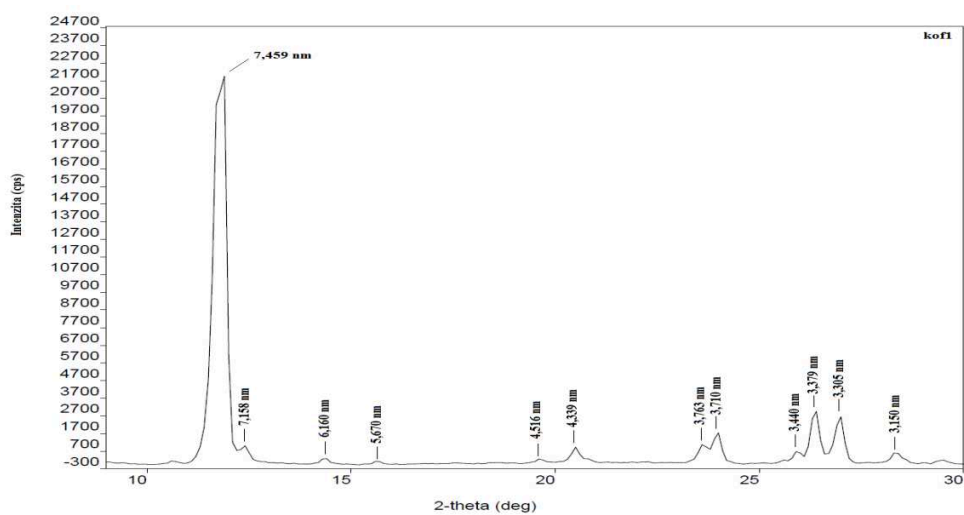
K vyšetření krystalinity bylo využito rentgenové difrakční (XRD) analýzy. Krystalinita ovlivňuje stabilitu materiálu a fyzikálně-chemické vlastnosti částic. V záznamu (Obr. 15) je patrné, že polohy bazálních difrakcí původního vzorku i připravených vzorků se shodují, zároveň došlo k vymizení některých bazálních difrakcí u připravených vzorků. Intenzita bazálních difrakcí vzorku připraveného metodou RESS při teplotě 45°C (Obr. 15) oproti difrakcím původního vzorku (Obr. 16) poklesla. Výraznější pokles je pozorován u intenzity bazálních difrakcí vzorku připraveného metodou RESS při 100°C (Obr. 17). Toto snížení intenzity může být způsobeno snížením krystalinity [16].



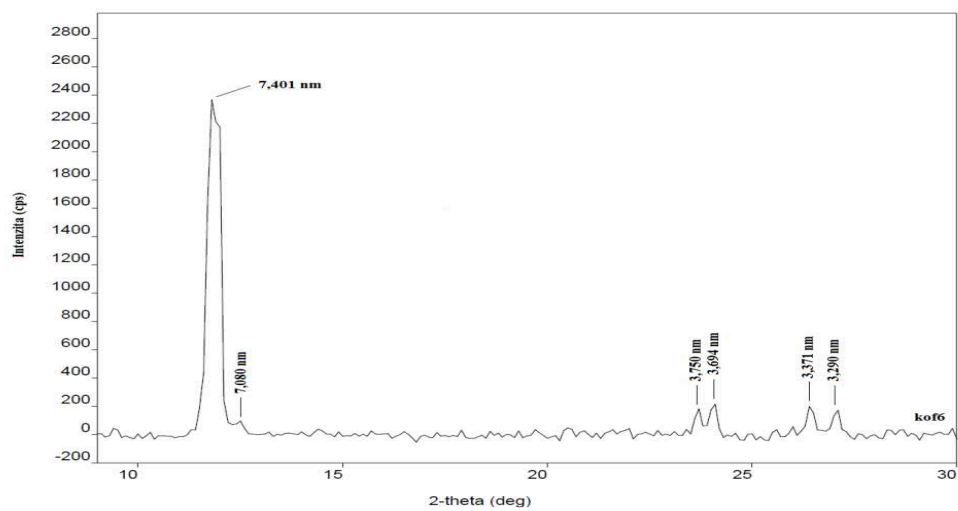
Obr. 15: XRD záznam původního vzorku (cisty), vzorku připraveného metodou RESS při 45°C (kof1) a při 100°C (kof6).



Obr. 16: XRD záznam vzorku připraveného metodou RESS při 45°C.



Obr. 17: XRD záznam původního vzorku.



Obr. 18: XRD záznam vzorku připraveného metodou RESS při 100°C.

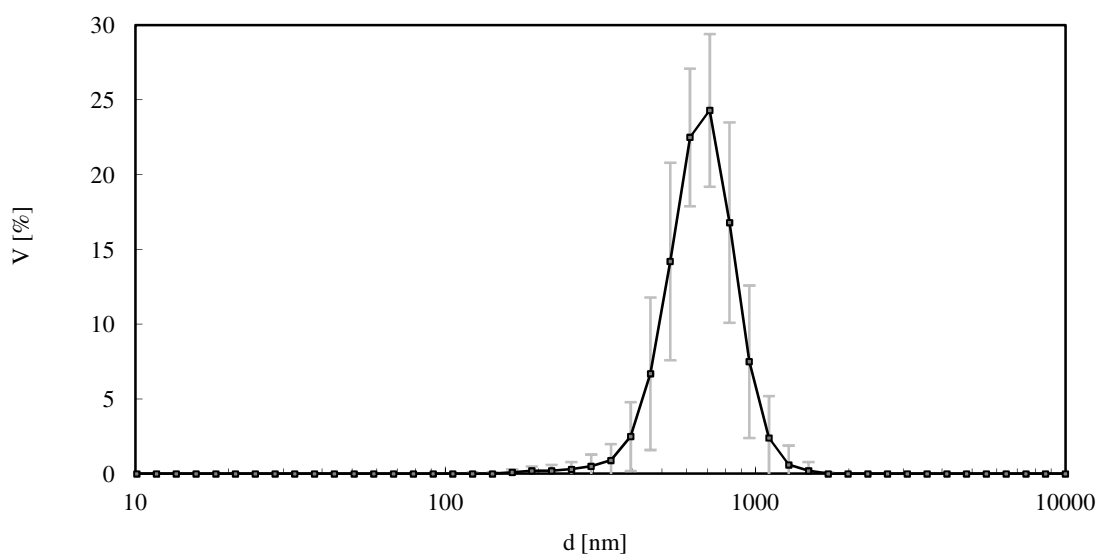
7.1.4 Měření velikosti částic

Při tomto měření byly částice rozdispergovány v toluenu. Velikosti částic (d) byly stanoveny metodou dynamického rozptylu světla (DLS) a odpovídají tzv. hydrodynamickému průměru, který je podle Einsteinovy rovnice ekvivalentní průměru koule se stejným koeficientem difúze.

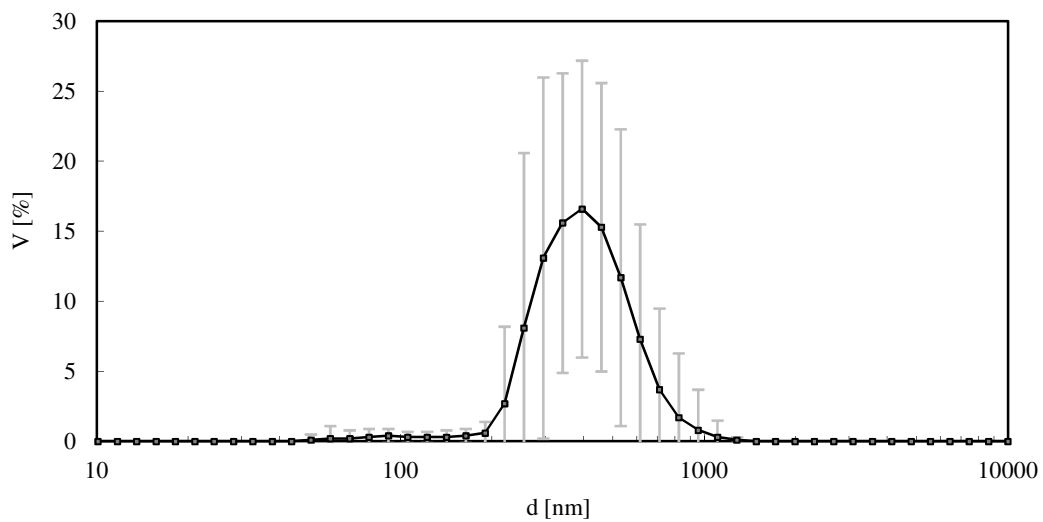
Velikosti připravených částic se pohybují v rozmezí 50-1500 nm. Z grafů distribuce velikosti částic (Obr. 19-22) je patrné, že při vyšších teplotách se objemová distribuce posunovala k nižším velikostem. Zároveň je patrné, že při přípravě částic metodou RESS při teplotách 50°C a 80°C (Obr. 20, 21) vznikla malá část nanočástic. Naopak při přípravě částic metodou RESS při teplotě 100°C (Obr. 22) vznikly částice nad 1 μ m, ty však mohou představovat nerozdispergované shluky částic, které tyto částice vytvářely (Obr. 13).

Při vyhodnocení distribuční křivky velikosti částic připravených metodou RESS při 45°C a 50°C (Obr. 19, 20) musíme brát v úvahu jejich třídímenzionální tvar zjištěný z příslušných snímků ze SEM (Obr. 11b, 12a). Zároveň při vyhodnocení distribuční křivky velikosti částic připravených při 80°C a 100°C (Obr. 21, 22) musíme brát v úvahu jejich jehličkový tvar zjištěný ze snímku SEM (Obr 12b, 13). Z toho vyplývá vhodnost kombinace DSL a SEM pro měření velikosti a tvaru částic.

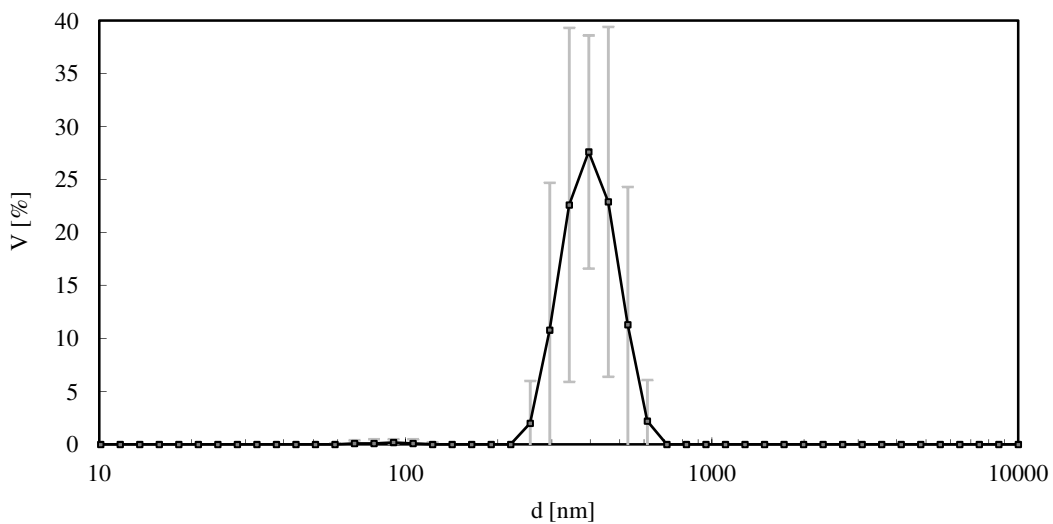
Nejužší distribuční rozsah velikosti částic byl pozorován u částic připravených metodou RESS při teplotách 45°C a 80°C. Avšak při tomto tvrzení musíme mít na paměti tvar částic zjištěný při analýze SEM (viz 7.1.1).



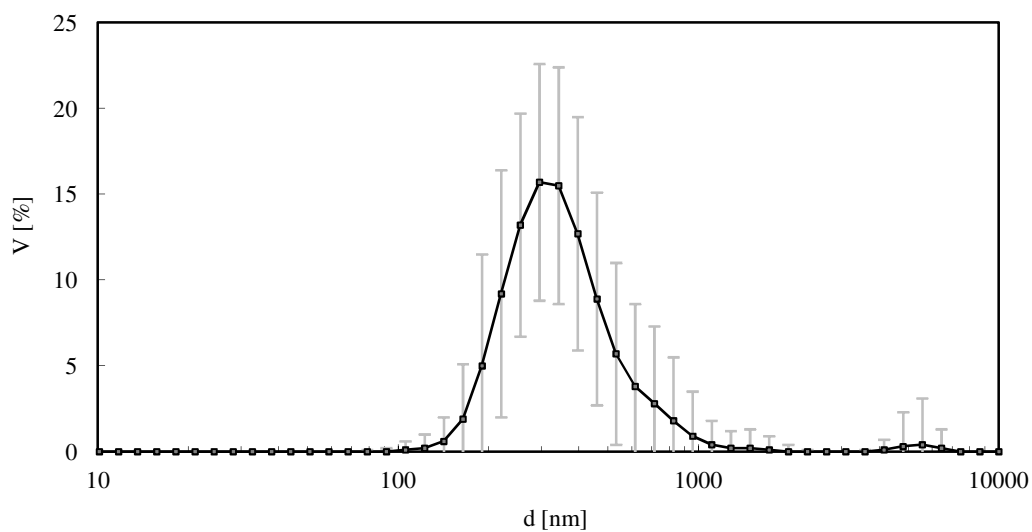
Obr. 19: Objemová distribuce velikosti částic připravených metodou RESS při 45°C.



Obr. 20: Objemová distribuce velikosti částic připravených metodou RESS při 50°C.



Obr. 21: Objemová distribuce velikosti částic připravených metodou RESS při 80°C.



Obr. 22: Objemová distribuce velikosti částic připravených metodou RESS při 100°C.

7.2 Příprava částic léčiv

Při přípravě nanočástic aspirinu vznikly částice, které však nebyly nijak analyzovány, protože cílem této práce bylo pouze zjištění, zda použitím této metody vznikají. Jejich analýza bude předmětem další práce.

Při přípravě nanočástic nifedipinu nebyl pozorován vznik jakýchkoli částic touto metodou, i když jejich vznik za použití metody RESS byl v literatuře popsán [14]. Hlavním důvodem je pravděpodobně volba nevhodných pracovních podmínek. Dalším důvodem by mohla být přeměna nifedipinu na jeho deriváty vlivem světla přítomného v laboratoři. Přestože byla práce v laboratoři prováděna s ohledem na tento fakt, nedokázalo se zcela zabránit vystavení nifedipinu světelnému záření.

Při přípravě nanočástic cimetidinu nevznikaly žádné částice. Tato metoda proto nebude pro přípravu jeho nanočástic vhodná. K jejich přípravě se bude muset využít jiná metoda, popř. zvolit jiné pracovní podmínky přípravy RESS metodou, při kterých by mohl být vznik nanočástic pozorován.

7.3 Práce s přístrojem

Jedním z cílů práce bylo ověření, zda je možné použít komerčně dodávaný přístroj Spe-ed SFE-4 pro přípravu nanočástic metodou RESS. Bylo zjištěno, že nanočástice lze pomocí přístroje a zvolené metody připravit. Přístroj však není vhodný v průmyslovém měřítku, a to z důvodů uvedených níže.

Největší nevýhodou při práci s uvedeným SFE systémem byla častá netěsnost patron, kvůli níž musela být příprava mnohokrát zastavena a znovu opakována. Tento problém byl způsoben pravděpodobně rychlým opotřebením těsnících kroužků, jejichž obnova zvyšuje náklady na přípravu částic.

Další nevýhody se týkají časové náročnosti při práci s přístrojem. První z nich je zdoluhavé ruční čištění, které se musí provádět po každém měření z důvodu zajištění spolehlivých výsledků. Druhou je pak pomalé zahřátí patrony na provozní teplotu, i když dosažení požadované teploty v peci je rychlé.

Naopak výhodou přístroje byla jednoduchá manipulace s jejími částmi, zejména se samotnými patronami a jejich zapojením do přístroje. Další výhodou byla snadná nastavitelnost provozních podmínek pomocí přehledných ovládacích panelů.

Při přípravě částic došlo k problému, kdy vysokotlaké čerpadlo provádělo opakované cykly, a nedokázalo uvést CO₂ pod požadovaný tlak. Tento problém byl způsoben

nedostatkem CO₂ v tlakové láhvi. Po výměně tlakových láhví byl tento nedostatek vyřešen. Tuto poznámku zmiňuji z důvodu zamezení tohoto problému při další manipulaci s přístrojem.

8. Závěr

V práci byly shrnuty základní vlastnosti SCFs. Dále byly představeny jejich různé průmyslové aplikace, které jsou možné vzhledem k jejich vlastnostem pohybujícím se mezi vlastnostmi kapalin a plynů. Práce byla zaměřena hlavně na přípravu nanočástic a zejména nanočástic léčiv pomocí metod využívajících SCFs jako rozpouštědlo nebo takzvané anti-rozpouštědlo. Experimentální část práce byla věnována přípravě nanočástic kofeinu, aspirinu, nifedipinu a cimetidinu.

V experimentální části se podařilo připravit částice a nanočástice kofeinu pomocí komerčně dodávaného přístroje Spe-ed SFE-4 metodou RESS. Velikost připravených částic se pohybovala v rozmezí 50-1400 nm, kdy největší část byla v rozmezí 300-700 nm. Bylo zjištěno, že při vyšších teplotách docházelo k většímu zmenšení částic, což odpovídá výsledkům v literatuře, avšak za využití metody GAS [22]. Při teplotách 45°C a 50°C vznikaly trojdimenzionální částice a nanočástice, při teplotách 80°C a 100°C vznikaly jehličkovité částice a nanočástice. Nejužší distribuci velikosti částic měly částice připravené při 45°C. Při tomto tvrzení však musíme vzít v potaz jehličkovitý tvar částic připravených při teplotách 80°C a 100°C, který může ovlivňovat výsledný tvar jejich distribučních křivek. Při přípravě nedocházelo k žádné změně vazebné struktury kofeinu. Krystalinita částic připravených částic s rostoucí teplotou klesala.

Další část experimentální práce byla zaměřena na přípravu nanočástic aspirinu, nifedipinu a cimetidinu stejnou metodou jako při přípravě kofeinu. Z vybraných léčiv byly vizuálně připraveny pouze částice aspirinu, které budou předmětem další analýzy. Částice nifedipinu nebyly připraveny, i když jejich vznik byl dříve pozorován. Částice nevznikly pravděpodobně kvůli zvolení nevhodných provozních podmínek nebo možné přeměny nifedipinu na jeho deriváty vlivem světla přítomného při práci v laboratoři. Částice cimetidinu také nebyly připraveny, kvůli jejich pravděpodobné nerozpustnosti v scCO₂ a tedy jejich nevhodnosti pro přípravu touto metodou nebo z důvodu zvolení nevhodných provozních podmínek.

Bylo zjištěno, že pomocí přístroje Spe-ed SFE-4 lze připravit nanočástice kofeinu a částice aspirinu metodou RESS. Při přípravě však může nastat řada problému, kterým se musí předcházet. Je to zejména ucpávání potrubí a občasné netěsnosti patron při jejich přípravě. Nevýhodou přístroje je jeho zdlouhavé čištění a dlouhá doba ohřevu patrony na zvolenou teplotu. Výhodou je naopak snadná práce s jejími částmi a snadná nastavitelnost provozních podmínek. Zároveň tento přístroj umožňuje připojení modulu k připojení

rozpouštědla k SCF, což značně rozšiřuje možnosti práce s tímto přístrojem. V neposlední řadě přístroj umožňuje připojení jiných výstupních hrotů, které mohou také ovlivnit morfologii výsledných částic. Na výrobu vhodných hrotů mohou být oslovena jiná pracoviště VŠB-TUO. Z těchto důvodů může být přístroj Spe-ed SFE-4 využit pro laboratorní přípravy a výzkumu částic a nanočástic léčiv metodou RESS.

9. Citovaná literatura

- [1]. LEITHNER, W.; JESSOP, P. G.: *Handbook of Green Chemistry, Volume 4: Supercritical Solvents*. Weinheim : WILEY-VCH, 2010. ISBN: 978-3-527-32590-0.
- [2]. SAPKALE, G. N. aj.: Supercritical fluid extraction. *Int. J. Chem. Sci.*, 2010, č. 8(2), s. 729-743.
- [3]. PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F.: Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, č. 60, s. 399-410.
- [4]. Royal society of chemistry. [Online] [cit. 23. 3. 2014.]. Dostupné na: <http://www.rsc.org/publishing/journals/gc/about.asp>.
- [5]. MATLACK; A. S.: *Introduction to green chemistry*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010, ISBN 14-200-7811-9.
- [6]. KARLSSON, L.; TORSTENSSON, A.; LARRY, T.: The use of supercritical fluid extraction for sample preparation of pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, č. 15, s. 601-611.
- [7]. TESAŘOVÁ, E; KALÍKOVÁ, K., ŠLECHTOVÁ, T., VOZKA, J.: Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation; a review. *Analytica Chimica Acta*, 2014, č.821, s. 1-33.
- [8]. BYRAPPA, K.; OHARA, S.; ADSCHIRI, T.: Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, č. 60, s. 299–327.
- [9]. SEKHON, B. S.: Supercritical Fluid Technology: An Overview of Pharmaceutical Applications. *International Journal of PharmTech Research*, 2010 č.1, s. 810-826.
- [10]. DUARTE, A. R. C.: Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophthalmic drug delivery. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2007, č. 42, s. 3.
- [11]. YEOB, S.; KIRANA, E.: Formation of polymer particles with supercritical fluids: a review. *J. of Supercritical Fluids*, 2005, č.34, s. 287-308.
- [12]. REVERCHON, E.; ADAMIA, R.: Nanomaterials and supercritical fluids. *J. of Supercritical Fluids*, 2006, č. 37, s. 1-22.

- [13]. TABARNERO, A.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALÁN, M. A.: Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling. *Chemical Engineering and Processing*, 2012, č. 60, s. 9-25.
- [14]. JUNG, J.; PERRUT, M.: Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *Journal of Supercritical Fluids*, 2001, č. 20, s. 179-219.
- [15]. REVERCHON, E. M.; IOLANDE DE a TORINO, E.: Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: a general interpretation. *J. of Supercritical Fluids*, 2007, č. 43, s. 126–138.
- [16]. KESHAVARZ, F. A.; KARIMI-SABET, J.; FATTAHI, A.; GOLZARY, A.; RAFIEE-TEHRANI, M.: Preparation and characterization of raloxifene nanoparticles using Rapid Expansion of Supercritical Solution (RESS). *Journal of Supercritical Fluid*, 2012, č. 63, s. 169–179.
- [17]. YASUJI, T.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y.: Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, č. 60, s. 388–398.
- [18]. VARSHOSAZ, J.; HASSANZAHEH, F.; MAHMOUDZAHED, M.; SADEGHI, A.: Preparation of cefuroxime axetil nanoparticles by rapid expansion of supercritical fluid technology. *Powder Technology*, 2009, č. 189, s. 97-102.
- [19]. VEMAVARAPU, Ch.; MOLLAN, M. J.; NEEDHAM, T. E.: Coprecipitation of pharmaceutical actives and their structurally related additives by the RESS process. *Powder Technology*, 2009, č. 189, s. 444–453.
- [20]. PROSKE, P.: *Optimalizace a validace extrakčních metod pro stanovení organických látek z pevných matric*. Ostrava : VŠB-TUO, 2012.
- [21]. SUBRA, P.; BOISSINOT, P.; BENZAGHOU, S.: *Precipitation of pure and mixed caffeine and anthracene by rapid expansion of supercritical solution*. Nice : Institut National Polytechnique de Lorraine, 1998. 29-052-6728-3.
- [22]. PARK, S.; YEO, S.: Recrystallization of caffeine using gas antisolvent process. *J. of Supercritical Fluids*, 2008, č. 47, s. 85-92.
- [23]. PISKAČ, P; CHALUPOVÁ, M.; PROKOPCOVÁ, Š.: Český lékopis 1997. [Online]. [cit. 23. 3. 2014.] Dostupné na: <http://www.lekopis.cz/>.
- [24]. News-medical. [Online]. [cit. 29. 3. 2014.]. Dostupné na: <http://www.news-medical.net/health/Caffeine-Pharmacology.aspx>

- [25]. Wikipedia. [Online]. [cit. 3. 4. 2014.]. Dostupné na: <<http://en.wikipedia.org>>
- [26]. MedlinePlus. [Online]. [cit. 7. 4. 2014.]. Dostupné na:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginformation.html>.
- [27]. VERMA, R. a KUMAR, L.: Characterization of Caffeine Isolated from *Camellia Sinensis* Leaves of Sikkim Himalayan Region. *J. Chem. Pharm. Res*, 2010, č. 2(4), s. 194-198.
- [28]. TSUTSUMI, A., NAKAMOTO, S.; MINEO, T.; YOSHIDA, K.: a novel fluidized-bed coating of fine particles by rapid expansion of supercritical fluid solutions. *Powder Technology*, 1995, č. 85, s. 275–278.

10. Seznam obrázků

Obr. 1: Fázový diagram CO ₂	13
Obr. 2: Závislost hustoty CO ₂ na teplotě a tlaku.....	14
Obr. 3: Schéma principu RESS	20
Obr. 4: Schéma principu GAS/SAS metody.....	22
Obr. 5: Schéma principu ASES metody.	23
Obr. 6: Schéma principu SEDS metody a schéma trysky.....	23
Obr. 7: Schéma přístroje SFE-4.....	27
Obr. 8: Schéma naplněné patrony.....	28
Obr. 9: Strukturální vzorec kofeinu	29
Obr. 10: Strukturální vzorec a) aspirinu, b) nifedipinu a c) cimetidinu	32
Obr. 11: SEM snímek částice a) původního vzorku kofeinu a b) částic připravených metodou RESS při teplotě 45°C.	33
Obr. 12: SEM snímky a) částic kofeinu připravených metodou RESS při teplotě 50°C a b) částic připravených při teplotě 80°C.....	34
Obr. 13: SEM snímek částic připravených při metodou RESS teplotě 100°C.....	34
Obr. 14: Spektrum z knihovny (černá), spektrum původního vzorku (červená), spektrum vzorku připraveného metodou RESS při 45°C (zelená) a při 100°C (modrá).....	35
Obr. 15: XRD záznam původního vzorku (cisty), vzorku připraveného metodou RESS při 45°C (kof1) a při 100°C (kof6).....	35
Obr. 16: XRD záznam vzorku připraveného metodou RESS při 45°C.....	36
Obr. 17: XRD záznam původního vzorku.	36
Obr. 18: XRD záznam vzorku připraveného metodou RESS při 100°C.....	36
Obr. 19: Objemová distribuce velikosti částic připravených metodou RESS při 45°C.	37
Obr. 20: Objemová distribuce velikosti částic připravených metodou RESS při 50°C.	38
Obr. 21: Objemová distribuce velikosti částic připravených metodou RESS při 80°C.	38
Obr. 22: Objemová distribuce velikosti částic připravených při metodou RESS 100°C.	38