

# Aplikacija mikroskopije na atomsko silo v farmacevtsko tehnoloških raziskavah

## Application of Atomic Force Microscopy in Pharmaceutical Technology Studies

Biljana Govedarica, Janez Kerč, Stane Srčič

**Povzetek:** Razvoj novih formulacij in dostavnih sistemov narekuje tudi razvoj novih metod za vrednotenje površinskih lastnosti na nanometriškem nivoju, še posebej nedestruktivnih tehnik, kot je vrstična preiskovalna mikroskopija, med katere sodijo mikroskopija na atomsko silo, preiskovalna tunelska mikroskopija ter bližnja vrstična optična mikroskopija. Mikroskopija na atomsko silo omogoča vpogled in razumevanje fizikalno-kemijskih in mehanskih lastnosti učinkovin in pomožnih snovi, kar je izjemnega pomena za razvoj in načrtovanje farmacevtskih oblik. Mikroskopija na atomsko silo lahko poleg topografskih slik da je še kvantitativne informacije o hrapavosti, trdnosti ter elastičnosti/plastičnosti preiskovanih površin. Navedene aplikacije mikroskopije na atomsko silo zagotavljajo uporabnost te tehnike predvsem v predformulacijskih študijah, pri načrtovanju izdelave delcev, proučevanju njihovih »bulk« in površinskih lastnosti ter interakcij med njimi. Poleg tega, ta tehnika omogoča pregled in vrednotenje površin nekaterih farmacevtskih oblik, npr. filmsko obloženih tablet in pelet, aplikacijo pa je našla tudi pri analizi sprememb površin primarne (stične) ovojnine, izdelanih npr. iz polimernih ali steklenih materialov.

**Abstract:** Novel drug formulations and delivery systems involve development of new methods for characterization of surface properties at the nanometer level. This is especially evident in case of non-destructive techniques such as scanning probe microscopes (atomic force microscopy, scanning tunnelling microscopy and near-field scanning optical microscopy). Atomic force microscopy provides the investigation and understanding of physico-chemical and mechanical attributes of pharmaceutical solids that is essential for research and development of solid dosage forms. Besides the topographic images, it is possible to obtain quantitative data about roughness, hardness and elastic/plastic properties of investigated surfaces. According to that, atomic force microscopy is used in preformulation studies, particle engineering, and investigations of material's "bulk" and surface properties as well as particle interactions. Additionally, this technique is practical in characterization of surface properties of solid forms such as film coated pellets and tablets and analysis of primary packaging made from polymeric and glass materials.

**Keywords:** atomic force microscopy, surface and mechanical properties, preformulation studies

### 1 Uvod

V farmaciji uporabljamo številne pristope za vrednotenje farmacevtskih snovi, predvsem in najprej v predformulacijskih študijah, kar omogoča razvoj in proizvodnjo ustrezno kakovostnih farmacevtskih oblik. Različne učinkovine ter pomožne snovi, praviloma v trdnem stanju, zahtevajo različne pristope ter tehnike vrednotenja: optična in elektronska mikroskopija, rengentska praškovna difraktometrija, različne spektroskopske tehnike (FTIR - Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija, Ramanska spektroskopija, NMR – Jedrska magnetna resonanca), termične (DSC - Diferenčna dinamična kalorimetrija, TGA – Termogravimetrična analiza, TMA – Termomehanična analiza) in druge (1).

Razvoj novih farmacevtskih oblik in dostavnih sistemov zahteva tudi razvoj novih metod za vrednotenje površinskih lastnosti na nanometriškem nivoju, še posebej nedestruktivnih tehnik, kot je npr. vrstična preiskovalna mikroskopija (ang.: *Scanning Probe Microscopy* – SPM). Osnovne vrste SPM tehnik so mikroskopija na atomsko silo (ang.: *Atomic Force Microscopy*, AFM), vrstična tunelska mikroskopija (ang.: *Scanning Tunneling Microscopy*, STM) ter bližnja vrstična optična mikroskopija (ang.: *Near-field Scanning Optical Microscopy*, NSOM). Mikroskopija na atomsko silo daje vpogled in omogoča razumevanje fizikalno-kemijskih in mehanskih lastnosti učinkovin in pomožnih snovi, kar je izjemnega pomena za razvoj in načrtovanje farmacevtskih oblik, predvsem pa trdih (2).

V primerjavi z ostalimi SPM tehnikami se je AFM izkazala kot bolj zmogljiva in vsestranska tehnika, ker omogoča vizualizacijo neprevodnih in prevodnih vzorcev v tekočinah, zraku in vakuumu (preglednica 1) (2).

**Preglednica 1:** Značilnosti AFM in drugih mikroskopskih tehnik (2).

**Table 1:** Main characteristics of AFM and other microscopic techniques (2).

| Značilnosti                | SEM/TEM                       | AFM                   |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Vzorec                     | Neprevoden/Prevoden           | Neprevoden/Prevoden   |
| Merjenje                   | 2D                            | 3D višine, hrapavost  |
| Pogoji snemanja            | Vakuum                        | Vakuum/Zrak/Teškočina |
| Čas snemanja               | 0.1- 1 min                    | 1-5 min               |
| Ločljivost v ravnini slike | 0.2 nm (TEM)<br>5 nm (FE-SEM) | 0.2 nm                |
| Velikost površin snemanja  | 100 nm (TEM)<br>1 mm (SEM)    | 100 $\mu$ m           |

## 2 Princip delovanja AFM

Princip delovanja AFM je prikazan na sliki 1 in temelji na merjenju odmika tipala (nosilec + konica), ki ga po površini vzorca premikamo. Odmik tipala je posledica delovanja različnih sil, t.j. van der Waalsovih, elektrostatskih, magnetnih, ionskih in kapilarnih med površino vzorca in vrhom konice tipala. Gibanje tipala omogoča piezoelektrično vodilo. Laserski žarek, ki se odbija od tipala, detektiramo s krajevno občutljivim fotodetektorjem (angl.: *position sensitive photodetector*) ter merimo vertikalni (topografija) in tudi lateralni premik konice tipala (trenje). Zelo velika občutljivost detektorja zagotavlja zaznavanje spremembe položaja konice, ki je manjša od 10 Å. Povratna zanka med fotodiodo in piezoelektričnim vodilom zagotavlja vzdrževanje konstantne sile, amplitude ali faze nihanja v ravnovesni legi (angl.: *set point*). AFM slika oziroma kontrastiv slikah nastanejo zaradi številnih interakcij med atomi na vrhu konice z atomi na površini vzorca (3).

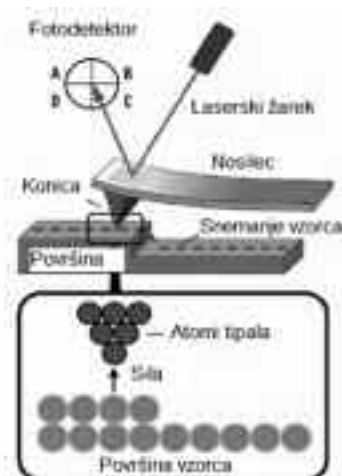
## 3 Načini vizualizacije površin vzorcev z AFM

Osnovni načini preiskovanja površin vzorcev z uporabo AFM so naslednji:

- Kontaktni način snemanja (angl.: *Contact mode*) – CM AFM
- Tipalni način snemanja (angl.: *Tapping mode*) - TM AFM
- Nekontaktni način snemanja (angl.: *Non-contact mode*) - NC AFM

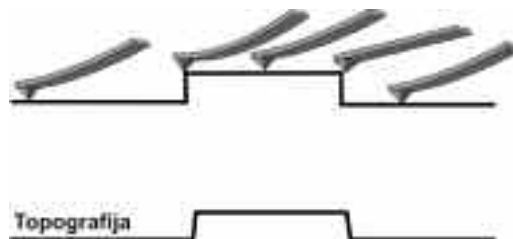
### 3.1 Kontaktni način snemanja

Konica tipala je med preiskovanjem v direktnem stiku s površino vzorca, tako da med njima prevladujejo medatomske odbojne sile. Rezultat stika med konico in vzorcem predstavlja upogib tipala pri čemer s spremljanjem lege ročice nad površino vzorca dobimo sliko oziroma topografijo površine (Slika 2) (4,5).



**Slika 1:** Shematski prikaz delovanja mikroskopa na atomsko silo (AFM) (3).

**Figure 1:** Basic principle of AFM (3).

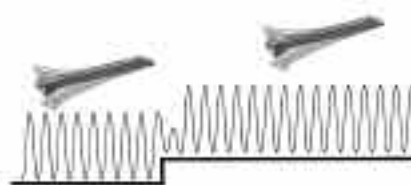


**Slika 2:** Kontaktni način AFM snemanja.

**Figure 2:** Contact mode AFM.

### 3.2 Tipalni način snemanja

V tem načinu konica tipala oscilira z lastno frekvenco in se v določenem delu svojega nihalnega cikla dotakne površine vzorca (Slika 3). Dvigovanje in spuščanje konice je posledica nihanja nosilca konice, ki ga z lastno frekvenco vzbuja piezoelektrično vodilo. Pri dotiku se amplituda osciliranja zmanjša, kar predstavlja merilo za ohranjanje konstantne razdalje med konico tipala in površino vzorca (4,5).

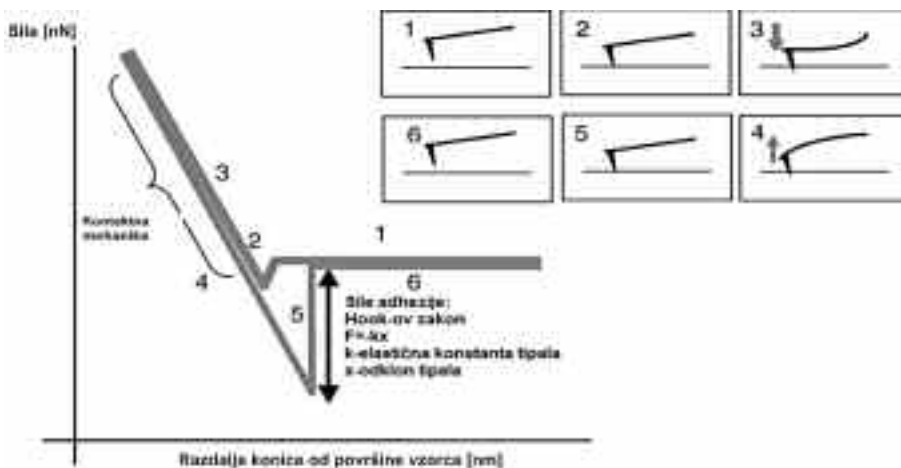


**Slika 3:** Tipalni način AFM snemanja.

**Figure 3:** Tapping mode AFM.

### 3.3 Nekontaktni način

Pri nekontaktnem načinu tipalo niha nad površino vzorca z majhno amplitudo in določeno lastno frekvenco (Slika 4). Na majhnih razdaljah (1-10 nm) so med konico tipala in površino vzorca prisotne van der

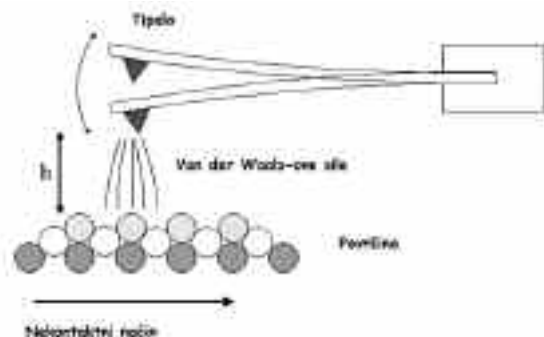


Slika 5: Odvisnost sile od razdalje konice od površine vzorca (2).

Figure 5: Force – distance curve (2).

Waalsove, elektrostatske, magnetne in/ali kapilarne sile. Frekvenca osciliranja se zato zniža, amplituda pa zmanjša (2).

V nadaljevanju so predstavljene AFM tehnike za vrednotenje mehanskih lastnosti trdnih snovi, ki so pomembne predvsem v farmacevtsko-tehnoloških procesih, kot so npr. mletje, mešanje in stiskanje.



Slika 4: Nekontaktni način AFM snemanja.

Figure 4: Non-contact mode AFM.

### 3.4 AFM tehnike za določanje mehanskih lastnosti

#### Spektroskopija sil

Spektroskopija sil, »Force Spectroscopy«, predstavlja merjenje sil, ki so prisotne med konico tipala in površino preiskovanega vzorca, v odvisnosti od razdalje med njima. Na ta način je možno poleg merjenja adhezije določati tudi nano-mehanske lastnosti snovi (npr. elastičnost, slika 5). Na začetku je tipalo oddaljeno od površine vzorca in zato ni interakcij med konico in preiskovano površino (Slika 5-1, 5-2). S približevanjem konice pa kapilarne sile staknejo konico s površino (angl.: *jump to contact*) (Slika 5-3). Ta stik je odvisen tudi od debeline plasti kondenzirane vode na površini vzorca, ki je praviloma vselej prisotna, razen če ne izvajamo eksperimenta v vakuumu oz. popolnoma posušenem zraku (plinu). Kadar pride do prekrivanja elektronskih

oblakov atomov konice zatomina površini vzorca, se pojavijo odbojne sile, ki povzročijo odboj tipala od površine (Slika 5-4, 5-5, 5-6) (2).

#### Nanoindentacija (angl.: Nanoindentation)

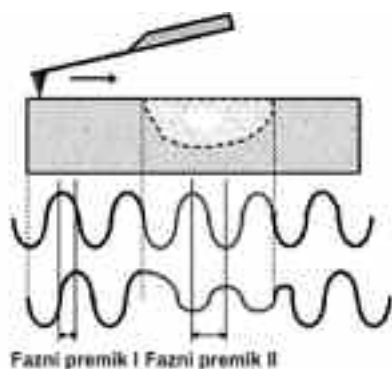
Nanoindentacija je tehnika, ki omogoča pregledovanje površine vzorcev in študijo lokalnih mehanskih lastnosti s pomočjo merjenja sil v odvisnosti od položaja konice. Metoda temeljna deformaciji površine vzorca z AFM tipalom. Iz dobljenih podatkov določimo parametre kot so Young-ov modul elastičnosti, trdnost snovi (angl.: *hardness*), mejno silo (angl.: *yield stress*) in lomno trdnost (angl.: *fracture toughness*) (2).

Nanoindentacijoin spektroskopijosil praviloma izvajamo v kontaktnem načinu snemanja (CM-AFM). Za določanje razlik v teksturi materialov uporabljamo:

- Mikroskopijo na vzdolžno silo (angl.: **Lateral force/Frictional forcemicroscopy**) – omogoča določitev koeficienta trenja na osnovi ukrivljanja tipala med snemanjem. V temu primerju lahko npr. z merjenjem torzijske obremenitve ročice identificiramo sestavine polimernih oblog, ki imajo različne koeficiente trenja, izmerimo debelino polimernih oblog (filmov) in detektiramo v njih eventualno prisotne nečistote.
- Fazno slikanje (angl.: **Phase imaging**)

Kontrast na AFM slikah je posledica razlik v mehanskih lastnostih preiskovanih površin, kot sta npr. adhezivnost in elastičnost. Da bi dobili jasno sliko topografije površine, mora biti analizirani material relativno tog v primerjavi s tipalom. Če je material mehek, je kakovost nastale slike odvisna od elastičnih lastnosti površine vzorca. V ekstremnih primerih lahko interakcija v obliki direktnega kontakta med tipalom in vzorcem povzroči tudi spremembo površine.

Med preiskovanjem s tipalnim načinom, se zmanjšanje amplitude in sprememba frekvence nihanja kaže v zmanjšanju energije osciliranja zaradi prenosa energije v vzorec. Znižanje amplitude osciliranja povzroči premik faze osciliranja tipala. Fazni premik kot funkcija različno absorbirane energije je značilnost trdnih in mehkih materialov (slika 6) (2).



**Slika 6:** Tipalni način: tipalo oscilira z lastnofrekvenco. Ko se dotakne vzorca, pride do zmanjšanja amplitude nihanja kot tudi faznega premika fazni premik II (2).

**Figure 6:** Tapping mode AFM: cantilever oscillates with its resonance frequency. When brought into contact with the sample, a damping of the lower amplitude as well as a phase shift are observed (2).

## 4 AFM preiskave materialov, farmacevtskih oblik in ovojnine

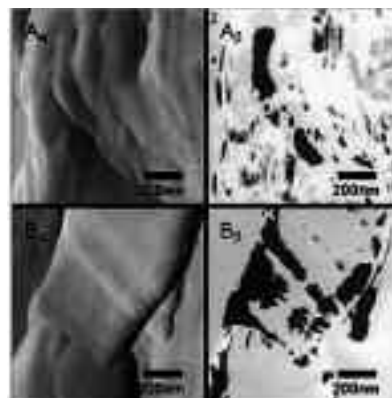
### 4.1 Predformulacijske študije

Razvoj optimalnih farmacevtskih oblik zahteva podrobne raziskave materialov v času predformulacijskih študij, kot so npr. določitev števila polimorfnih oblik, prisotnost amorfne snovi, ugotavljanje interakcij med učinkovinami in pomožnimi snovmi, določitev oblike in velikosti delcev, proučevanje stabilnosti in topnosti ter procesa raztapljanja.

Mletje trdnih snovi je visoko energijski proces in lahko povzroči nastanek amorfne oblike. Amorfna oblika je termodinamsko nestabilna in lahko pri določenih atmosferskih pogojih (T, RV), ki zagotavljajo primerno visoko mobilnost molekul, prehaja v kristalno obliko. Znano je, da je po procesu mletja (mikronizacije) prisoten praviloma zelo majhen odstotek amorfne oblike, ki je locirana na površini trdnih delcev, katerih notranjost pa je še vedno lahko popolnoma kristalinična (6). Iz tega razloga se takšna snov lahko obnaša kot popolnoma amorfna, in predvsem tedaj, ko gre za pojave, ki so omejeni izključno na mejne površine (npr. adsorpcija vlage ali drugih plinov). AFM je tehnika, ki omogoča direktno vizualizacijo amorfne regije na površini kristalinične snovi po mletju oz. mikronizaciji. Poleg uporabe tipalnega načina (TM-AFM) za preiskavo površin, se je za fazno slikanje (ang.: *Phase Imaging*) izkazala kot dodatna tehnika, ki omogoča vrednotenje površine trdnih snovi. S svetlimi toni so prikazana trša kristalinična mesta in s temnimi mehkejša amorfna področja. Na ta način je lahko npr. postaviti korelacijo med časom mletja kristalinične snovi in tvorbo amorfne oblike na površini delcev (slika 7). *Begat s sodelavci* (7) so na ta način ugotavljali optimalen čas mikronizacije salbutamola (kot sulfata), ki se sicer uporablja v inhalacijskih farmacevtskih oblikah za bronhodilatacijo.

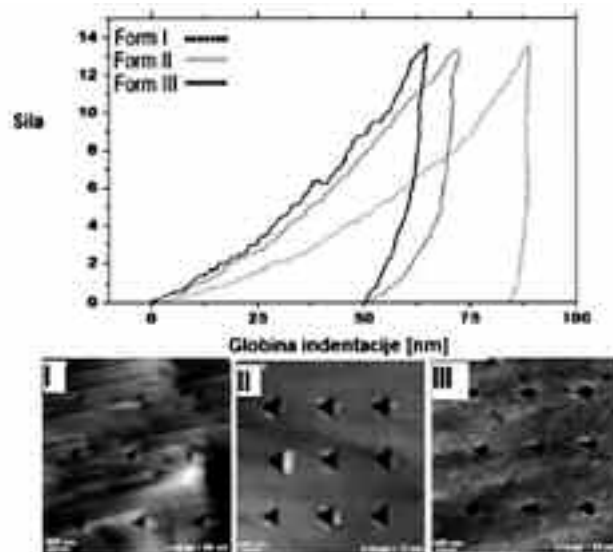
Površinsko aktivacijo v amorfne regijah, ki je nastala zaradi mehanske deformacije in spremembe kristalov salbutamola med procesom mletja,

je posledica razlik fizikalno-mehanskih lastnosti površin. Vzrok temu so lokalno različno urejena področja molekul in različnih interakcij med njimi (7).



**Slika 7:** Topografija površine delcev salbutamolijevega sulfata (Aa, Ba) ter primerjava s faznimi slikami (A<sub>β</sub>, B<sub>β</sub>) po 6-min (A) in 12-min (B) mletja (7).

**Figure 7:** Topographical AFM amplitude images (Aa, Ba) with accompanying phase shift data (A<sub>β</sub>, B<sub>β</sub>) for salbutamol sulfate crystal surfaces after exposure to (A) 6-min and (B) 12-min milling times (7).



**Slika 8:** Odvisnosti sile od globine indentacije treh polimorfnih modifikacij karbamazepina -zgoraj; Topografije površin polimorfne oblike karbamazepina I, II, III po nanoindentaciji – spodaj (10).

**Figure 8:** An illustration of the force-indentation plots for three forms of carbamazepine. The respective AFM images are also shown highlighting the indentation profiles (10).

Poleg merjenja adhezije z uporabo krivulj sila/razdalja (slika 5), lahko informacije o mehanskih lastnostih površine vzorca pridobimo tudi s tehniko nanoindentacije. Mehanske lastnosti posameznih sestavin



določajo njihovo obnašanje med drobljenjem, mešanjem ali/in stiskanjem (npr. kompaktiranje ali tabletiranje). Relevantne parametre sestavin določamo na osnovi odvisnosti sile od odmika tipala z uporabo različnih modelov, kot sta npr. Hertz-ov in Oliver/Pharr-ov. Hertz-ov model popisuje elastično deformacijo dveh homogenih površin (konice ter vzorca) pri določeni sili, pri čemer upošteva, da med konico in tipalom ne pride do adhezije. Ta model se najpogosteje uporablja za izračun Young-ovega modula elastičnosti proučevanega vzorca in idealno trde (referenčne) površine, kot je npr. sljuda ali steklo(8). Oliver/Pharr-ov model pa omogoča na osnovi stične površine in sile indentacije izračun trdnosti, togosti ter mejne sile (ang.: *yield stress*), pri kateri pride do plastične deformacije (9).

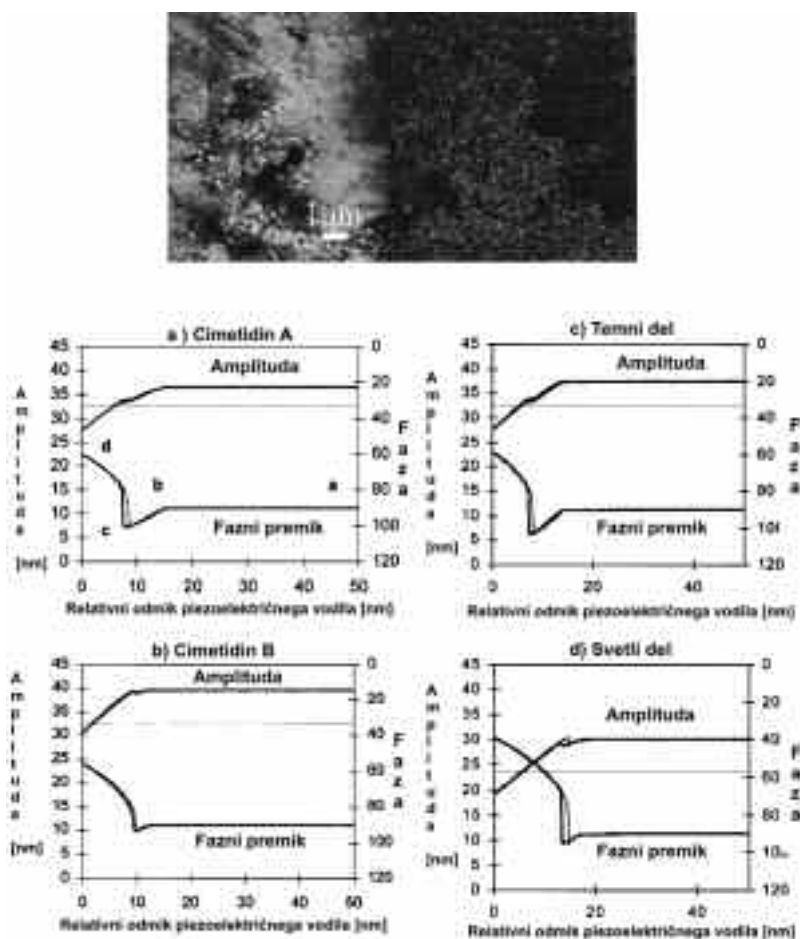
Praktična uporabnost nanoindentacije je npr. ugotavljanje povezave med mehanskimi lastnostmi materialov in spremembe površinskih ter »bulk« lastnosti pri drobljenju ali mešanju (10).

Perkins *et al.* so z nanoindentacijo proučevali povezavo med mehanskimi lastnostmi, površinsko energijo in mletjem polimorfnih oblik karbamazepina. Karbamazepin obstaja v treh polimorfnih modifikacijah, ki se medsebojno razlikujejo v mehanskih lastnostih in po adheziji. Največji Young-ov modul elastičnosti ter največjo trdnost kaže oblika III. Primerjava materialov na osnovi površinske energije je pomembna v fazi razvoja farmacevtske oblike, ker daje informacije o njihovih adhezivnih in kohezivnih lastnostih. Na splošno velja, da materiali z višjo površinsko

energijo izkazujejo močnejšo adhezijo in kohezijo. Na osnovi raziskave površinske energije z AFM so ugotovili, da ima oblika III karbamazepina najnižjo površinsko energijo in zato posledično šibko ad(ko)hezivnost (slika 8) (10).

Najpogosteje se razlike med polimorfnimi modifikacijami učinkovin izražajo kot razlike v biološki uporabnosti zaradi različne topnosti (ampicilin, ritonavir) ter različnih profilov raztapljanja (prednizolon). TM-AFM se je pokazal kot ustrezno orodje za razlikovanje med polimorfnimi oblikami cimetidina (A in B), specifičnega kompetitivnega antagonist – receptorjev  $H_2$ . S tehniko faznega slikanja so ugotovili prisotnost več kot enega polimorfa v zmesi, s pomočjo meritev amplitude/razdalje pa so identificirali polimorfni obliki A in B na osnovi njunih različnih adhezivnih lastnosti (slika 9) (1).

V točki *a* na krivulji amplituda/razdalja tipalo niha z določeno resonančno frekvenco in na določeni razdalji od površine vzorca (Slika 6a). V točki *b* se tipalo nahaja na razdalji, ko so že prisotne privlačne sile med njim in molekulami na površini vzorca. Posledično pride do zmanjšanja amplitude nihanja ter povečanja faznega zamika. V stiku konice z vzorcem (točka *c*) se pojavijo odbojne (repulzivne) sile, kar se kaže v dodatnem znižanju amplitude nihanja ter dodatnem faznemu zamiku. Iz grafov (slika 9) je razvidno, da ima polimorfna oblika A bolj izražen privlačni (adhezivni) del (b) v primerjavi s polimorfno obliko B. To



**Slika 9:** Odvisnost amplitude tipala od relativne razdalje in krivulje faznega zamika: (a) Polimorf A; (b) Polimorf B; (c) temna regija zmesi polimorfov (50:50) in (d) svetla regija zmesi polimorfov (50:50).

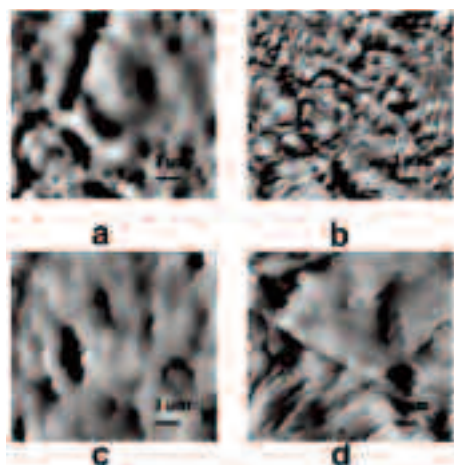
**Figure 9:** Amplitude and phase to distance (a-p,d) curves from (a) polymorph A disk, (b) polymorph B disk, (c) dark region of a 50:50 mixed disk, and (d) light region of a 50:50 mixed disk.

pripisujejo različni porazdelitvi molekul na površini te modifikacije v primerjavi z drugo (1).

## 4.2 AFM vrednotenje površin trdnih farmacevtskih oblik

### 4.2.1. Vrednotenje površine tablet

Optična in elektronska mikroskopija podajata kvalitativne informacije o lastnostih površin, kvantitativnih podatkov, npr. hrapavosti površin, pa z njima ni možno pridobiti. Hrapavost površin je npr. izjemnega pomena pri interakcijah med delci (npr. pri mešanju ali drobljenju) ali pa pri procesih oblaganja pelet in tablet. Ena od uporabljanih metod za določanje površinske hrapavosti je laserska profilometrija (11). Danes se za to uporablja tudi AFM, ki kvantificira hrapavost površin z visoko lateralno (1 nm) in višinsko ločljivostjo (0,1 nm). Pomanjkljivost tehnike je majhna velikosti analizirane površine vzorca, daljši čas analize in nujnost ravnih površin. (12).



**Slika 10:** Topografija površine tablet. (a) KCl tablete stisnjene s silo 80 kN (površina 10 µm x 10 µm, višina 100 nm). (b) 30 kN KCl tablete (površina 10 µm x 10 µm, višina 320 nm). (c) 80 kN NaCl tablete (površina 10 µm x 10 µm, višina 300 nm). (d) 30 kN NaCl tablete (površina 10 µm x 10 µm, višina 350 nm) (12).

**Figure 10:** AFM micrographs of the tablets. (a) 80 kN KCl tablet measurement area 10 µm x 10 µm, height 100 nm. (b) 30 kN KCl tablet measurement area 10 µm x 10 µm, height 320 nm. (c) 80 kN NaCl tablet measurement area 10 µm x 10 µm, height 300 nm. (d) 30 kN NaCl tablet measurement area 10 µm x 10 µm, height 350 nm (12).

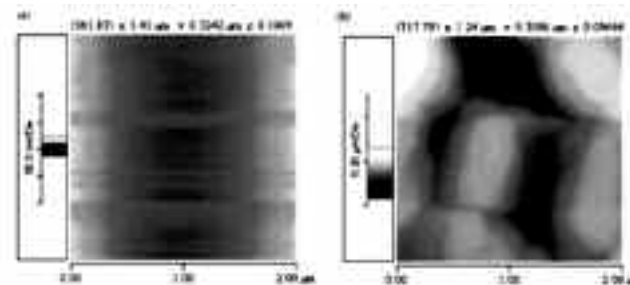
Površine tablet KCl in NaCl, stisnjene pri dveh različnih silah stiskanja (30 kN in 80 kN), so vrednotili z lasersko profilometrijo, elektronsko mikroskopijo in AFM. Parametri hrapavosti kot so Ra (angl.: *roughness average*), Rms (angl.: *root mean square roughness*) in Rp-v (angl.: *peak to valley height*), dobljeni z AFM tehniko, so potrdili višjo hrapavost površine tablet NaCl. To je potrdila tudi laserska profilometrija. Večja sila stiskanja je po pričakovanju zagotovila nastanek bolj gladkih površin tablet. Sila stiskanja 80 kN je povzročila nastanek plastne strukture, ki bi lahko bila rezultat sintranja delcev NaCl (Slika 10). AFM meritve hrapavosti na majhnih površinah tablet (10 µm x 10 µm) odslikavajo bolj

hrapavost posameznih kristaliničnih delcev in njihovo deformacijo zaradi sile stiskanja. Ne dobimo pa s tem pristopom hrapavosti celotne površine tablet, kar sicer zagotavlja laserska profilometrija (12).

### 4.2.2. Vrednotenje filmsko obloženih pelet

Filmsko oblaganje pelet in tablet predstavlja pogost način nadzora hitrosti sproščanja zdravilnih učinkovin. Funkcionalnost obloženih farmacevtskih oblik je zelo odvisna od kakovosti polimerne obloge.

Znana je raziskava, ko so spomočjo CM-AFM proučevali (ne)kompatibilne snovi v polimernih oblogah iz Eudragit® RS 30 D. Na osnovi SEM in AFM podatkov so ugotovili, da dodatek hidrofilnega polimera hidroksietilceluloze (HEC) prepreči koalescenco med polimernimi molekulami ter zgoščevanje in homogenost nastalega filma (Slika 11). Ker HEC v Eudragit® RS 30 D ni netopna, nastane bolj porozen film, ki ima večjo permeabilnost in zato zagotavlja hitrejše sproščanje teofilina iz obloženih pelet (13).



**Slika 11:** AFM topografija polimernega filma. (a) Eudragit RS 30 D; (b) Eudragit RS 30 D in 10% hidroksietilceluloze (13).

**Figure 11:** AFM topography of polymeric films. (a) Eudragit RS 30 D; (b) Eudragit RS 30 D and 10% hydroxyethyl cellulose (13).

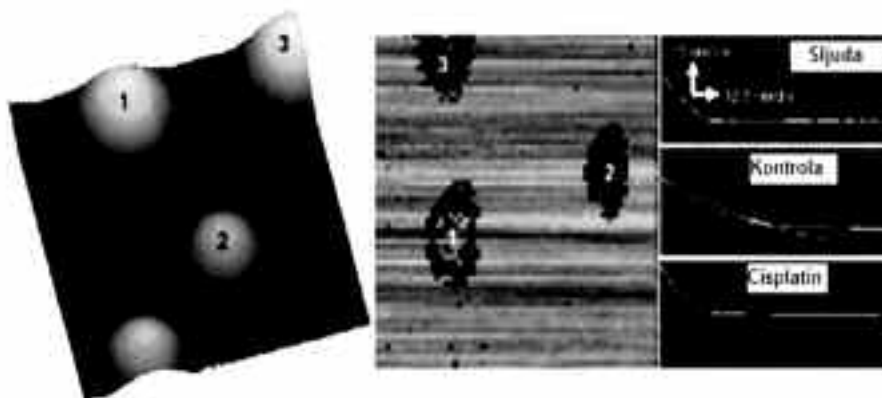
## 4.3 AFM študije liposomov

Rigidnost liposomov je ključnega pomena za sproščanje enkapsuliranih učinkovin. Meritve rigidnosti (togosti) liposomov je mogoče izvesti z nanoindentacijo, za vrednotenje površinskih lastnosti ter velikosti in oblike liposomov pa je primeren tipalni način AFM, predvsem zaradi zelo občutljive strukture liposomov. Raziskovalci so na primeru vgrajenega cisplatinu, alkilirajočega citostatika, z AFM potrdili 100% povečanje rigidnosti površine glede na liposome brez učinkovine. Preko spremembe togosti so zato lahko ocenjevali učinkovitost učinkovine vgrajevanja v liposomsko strukturo (14).

Krivulje odvisnosti sile od razdalje določene na sljudi, idealno trdni površini (sestavljene iz silikatov aluminija, magnezija ter kalija), liposomih brez vgrajenega cisplatinu ter liposomih z vgrajenim cisplatinom potrjujejo zmanjšanje elastičnosti po vgradnji učinkovine (slika 12)(14).

## 4.4 Uporaba AFM pri inhalacijskih aerosolih za lokalno in sistemsko dostavo učinkovin

Inhalacija predstavlja način dostave zdravilnih učinkovin v pljuča z namenom doseganja lokalnega ali sistemskega učinka. Uporabljajo se inhalatorji pod tlakom z odmernim ventilom (angl.: *pressurized metered dose inhalers*) ter inhalatorji za suhe praške (angl.: *dry powder inhalers*).



**Slika 12:** Fizikalne lastnosti liposomov z vgrajenim cisplatinom. Topografija površine 4 različnih liposomov (levo). Mapiranje adhezije pri analizi »Force-Volume« (v sredini). Krivulje sila razdalja na idealno trdi površini- sljuda, liposomu brez cisplatinu ter liposomu z vgrajenim cisplatinom (desno).

**Figure 12:** Physical properties of cisplatin-encapsulated liposomes. Left panel: AFM height mode image of different liposomes. Middle panel: Adhesion map of liposomes acquired during force volume mapping. Right panels: AFM force curves on a hard mica surface (top), liposome without cisplatin (middle), and liposome encapsulated cisplatin (bottom).

V obeh primerih je dostava učinkovine v pljuča primarno vezana na lastnosti trdnih sestavin, tako učinkovin kot pomožnih snovi. Adhezija oziroma interakcija učinkovine s pomožnimi snovmi ter ovojnino je kritični parameter. Adhezijske sile namreč odločajo o hidrodinamskih lastnostih, kar je pomembno za proizvodnjo ter odmerjanje. Primarne interakcije, ki zagotavljajo adhezijo so privlačne van der Walsove ali elektrostatske sile, če so prisotni tudi nabiti delci (15).

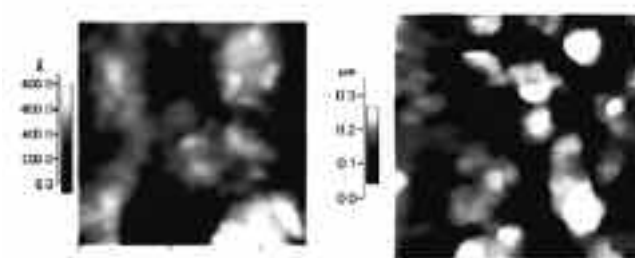
*Eve in sodelavci* so proučevali adhezijo salbutamola (pritrjenem na AFM tipalu) z laktozo, salbutamolom, steklom ter fluoropolimerom (PTFE). Fluoropolimeri se pogosto uporabljajo kot obloga v inhalatorjih z namenom zmanjšati adhezijo na stenah ovojnine inhalatorja. Laktoza monohidrat se uporablja za izdelavo suhih praškov za inhalacijo kot diluent ali kot nosilec zdravilne učinkovine za izboljšanje hidrodinamskih lastnosti ter zmanjšanja nastanka aglomeratov (16).

Z analizo spektroskopije sil so ugotovili naslednje zaporedje interakcij med salbutamolom in preiskovanimi snovmi: steklo>laktoza>salbutamol>PTFE. Iz tega lahko sklepamo, da je laktoza najprimernejši nosilec za salbutamol, ter da je PTFE najbolj primeren material za ovojnino. Visoka vrednost adhezije med salbutamolom in steklom kaže, da le-to pri teh inhalatorjih ni primerno kot ovojnina (16).

#### 4.5 AFM preiskave ovojnine

Infuzije za popolno parenteralno prehrano (angl.: Total Parenteral Nutrition –TPN), ki vsebujejo aminokislino, elektrolite ter glukozo, se praviloma pakirajo kot suhi praški v stekleni obojnini. Z AFM študijami so potrjevali primernost alternativne polimerne ovojnine, in kot najbolj primerni materiali so se pokazali kopolimer etilen-vinilacetata (EVA), polietilen (PE) in poli-vinilklorid (PVC). Osnovni problem uporabe polimerne ovojnine predstavlja adsorpcija sestavin infuzijskih raztopin. Shranjevanje TPN v polimernih vrečkah vpliva na polarni del površinske energije, kar se kaže v povečani močljivosti ovojnine. Disperzijski prispevek se ob tem bistveno ni spremenil. Sprememba površine zaradi adsorpcije sestavin iz TPN je odvisna od časa shranjevanja in hidrofobnih ter hidrofilnih lastnosti sestavin. Nizka hidrofilnost PE zagotavlja majhne

spremembe njegovih površinskih lastnosti po daljšem času shranjevanja TPN raztopin. Nasprotno pa se obnašajo polimerne vrečke iz PVC ali EVA. Z AFM so ugotovili povečanje hrapavosti površin ovojnin iz PVC in EVA, kar je povezano s povečanjem polarne prispevka površinske energije. Topografski sliki površin PVC-ja kaže na nastanek velikih agregatov po šestih mesecih shranjevanja raztopin z aminokisljinami in glukozo (Slika 13). Iz teh rezultatov so sklepali, da so plastične vrečke iz PE zato najbolj primena ovojnina za shranjevanje infuzijskih raztopin aminokisljin, glukoze ter elektrolitov (17).



**Slika 13:** AFM slika notranje površine PVC vrečk pred polnjenjem z raztopino za totalno parenteralno prehrano (levo) in po 6 mesecih po polnjenju z raztopino aminokisljin (17).

**Figure 13:** AFM images of inner surface of plastic bags (PVC) before filling with the TPN solution (left) and after storage for 6 months with amino acid solution (17).

## 5 Sklep

Pomen vrstične preiskovalne mikroskopije, in predvsem mikroskopije na atomsko silo postaja v farmaciji vse bolj evidenten. Ta tehnika predstavlja močno in izjemno orodje za proučevanje površinskih lastnosti različnih farmacevtskih snovi, končnih izdelkov in materialov za ovojnino. Osnovne prednosti AFM so visoka ločljivost, enostavna priprava vzorcev ter proučevanje površinskih lastnosti vzorcev v realnih pogojih.

AFM je uporabna v vseh fazah raziskav in industrijske izdelave zdravil: študijedelcev sestavin in interakcij med njimi, preiskave mejnih površin različnih dostavnih sistemov in primernost primarnih ovojnin, predvsem v povezavi s stabilnostjo. AFM omogoča tudi pridobivanje kvantitativnih podatkov o hrapavosti, trdnosti ter elastičnosti preiskovanih površin, kar je izjemnega pomena pri optimizaciji nekaterih tehnoloških procesov (npr. drobljenja, stiskanja).

### 6 Literatura

1. Danesh A, Chen X, Davies MC, Roberts CJ, Sanders GHW, Tandler SJB, et al. Polymorphic Discrimination Using Atomic Force Microscopy: Distinguishing between Two Polymorphs of the Drug Cimetidine. *Pharm Res* 2000; 17 (7): 887-890.
2. Butt H, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep* 2005;59(1-6):1-152.
3. Blanchard CR. Atomic Force Microscopy. *Chem Educator* 1996;1(5):1-8.
4. Jalili N, Laxminarayana K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics* 2004;14(8):907-945.
5. Tivadar A, Kočevar K, Mušević I, Srčić S. Mikroskopija na atomsko silo. *Farm Vest* 2002; (53):277-291.
6. Ward GH, Schultz RK. Process-induced crystallinity changes in albuterol sulfate and its effect on powder physical stability. *Pharm Res* 1995;12(5):773-779.
7. Begat P, Young PM, Edge S, Kaerger JS, Price R. The effect of mechanical processing on surface stability of pharmaceutical powders: visualization by atomic force microscopy. *J Pharm Sci* 2003;92(3):611-620.
8. Heim L, Blum J, Preuss M, Butt H. Adhesion and Friction Forces between Spherical Micrometer-Sized Particles. *Phys Rev Lett* 1999;83(16):3328.
9. Taylor LJ, Papadopoulos DG, Dunn PJ, Bentham AC, Mitchell JC, Snowden MJ. Mechanical characterisation of powders using nanoindentation. *Powder Technol* 2004;143-144:179-185.
10. Perkins MC, Bunker M, James J, Rigby-Singleton S, Ledru J, Madden-Smith C, et al. Towards the understanding and prediction of material changes during micronisation using atomic force microscopy. *Eur J Pharm Sci* 2009;38(1):1-8.
11. Luo X-, Silikas N, Allaf M, Wilson NHF, Watts DC. AFM and SEM study of the effects of etching on IPS-Empress 2TM dental ceramic. *Surf Sci* 2001;491(3):388-394.
12. Seitavuopio P, Rantanen J, Yliruusi J. Tablet surface characterisation by various imaging techniques. *Inter J Pharm* 2003;254(2):281-286.
13. Zheng W, Sauer D, McGinity JW. Influence of hydroxyethylcellulose on the drug release properties of theophylline pellets coated with Eudragit RS 30 D. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;59(1):147-154.
14. Ramachandran S, Quist AP, Kumar S, Lal R. Cisplatin Nanoliposomes for Cancer Therapy: AFM and Fluorescence Imaging of Cisplatin Encapsulation, Stability, Cellular Uptake, and Toxicity. *Langmuir* 2006;22(19):8156-8162.
15. Staniforth JN. Performance-Modifying Influences in Dry Powder Inhalation Systems. *Aerosol Sci Tech* 1995;22(4):346.
16. Eve JK, Patel N, Luk SY, Ebbens SJ, Roberts CJ. A study of single drug particle adhesion interactions using atomic force microscopy. *Inter J Pharm* 2002;238(1-2):17-27.
17. Realdon N, Zennaro L, Perin F, Bettero A, Bortoluzzi S, Rigo A, et al. Surface characterisation of bags for total parenteral nutrition by tensiometry and atomic force microscopy. *Int J Pharm*;265(1-2):27-35.