

## PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

VALIDACE VÝROBY JEDNODÁVKOVÝCH  
MEDIKOVANÝCH NANOVLÁKENNÝCH  
PŘÍPRAVKŮ PRODUKOVANÝCH  
ELEKTROSPININGEMDENISA STRÁNSKÁ<sup>a,b</sup>, PAVEL BERKA<sup>a,b</sup>  
a PAVEL DOLEŽAL<sup>b</sup><sup>a</sup> *InStar Technologies a.s., Mrštíkova 399/2a, 460 07 Liberec,* <sup>b</sup> *Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Ak. Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové*  
pavel.dolezal@faf.cuni.cz

Došlo 17.7.18, přepracováno 10.1.19, přijato 16.1.19.

Klíčová slova: hmotnostní stejnoměrnost, obsahová stejnoměrnost, rizatriptan, nanotechnologie

## Úvod

Nanotechnologie prodělávají od konce dvacátého století velký rozvoj ve sféře akademického výzkumu a vývoje, návazně také v oblasti průmyslové a komerční. Odpovídá tomu dnes již velmi rozsáhlá časopisecká, knižní i patentová literatura, počet publikačních výstupů přitom neustále roste.

Podle nejjednodušší a široce akceptované definice se nanomateriály vyznačují alespoň jedním externím rozměrem v oblasti 1 až 100 nanometrů<sup>1</sup>. Vykazují neobvyklé fyzikálně-chemické vlastnosti související zejména s velmi vysokou hodnotou poměru jejich specifického povrchu k objemu póru (větší než 60 m<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>)<sup>1</sup>. Mohou mít velmi odlišné geometrické uspořádání a vnější i vnitřní strukturu, terminologicky se dosud jednoznačně neukotvily. Z velikostních a tvarových variant nanomateriálů popisovaných v souvislosti s podáváním léčiv lze uvést například bezrozměrné nanotečky (nanodots), jednorozměrné nanočástice (nanoparticles), nanodrátky (nanowires), nanotrubičky (nanotubes) nebo nanolupínky (nanochips), ale také dendrimery a některé liposomy. Zvláště zajímavou podskupinu nanomateriálů představují nanovlákná (nanofibers, nanofibres), zejména polymerní, z nichž se připravují různé komponované vrstvy.

Existuje několik možných metod přípravy polymerních nanovláken, v zásadě je lze rozdělit na tvorbu z roztoků a tvorbu z tavenin. Některé metody zůstávají v oblasti laboratorní přípravy, např. metoda dloužení<sup>2</sup>, metoda fázové separace<sup>3</sup> či metoda šablonové syntézy<sup>4</sup>, jiné se podařilo vyvinout do úrovně využitelné k průmyslové produkci. K nim patří metody elektrostatického zvlákňování<sup>5</sup>, odstředivého sprádání<sup>6</sup> a metoda foukání tavenin<sup>7</sup>.

Elektrostatické zvlákňování, elektrospinning (ES),

které patří k elektrohydrodynamickým metodám<sup>8</sup>, v současné době poskytuje pro výrobu nanovláken nejširší možnosti, umožňuje jejich tvorbu z různých materiálů (např. organických polymerů, keramických materiálů, polovodičů i kovů), tvorbu různých morfologií, struktur a funkcí.

ES z roztoku polymerů byl pro průmyslové provedení v originálním bezjehlovém provedení úspěšně rozpracován před patnácti lety prof. O. Jirsákem na Technické univerzitě v Liberci<sup>9</sup> a technicky realizován v podobě zařízení Nanospider™ tamní firmou Elmarco<sup>10</sup>.

Stručně řečeno, při ES jde o proces, při kterém vlivem silného elektrického pole na roztok (případně emulzi, suspenzi či taveninu) dochází na jeho povrchu v důsledku elektrostatických odpuzivých sil k tvorbě velmi jemných vláken o průměrech v desítkách až stovkách nanometrů, která jsou za okamžitého odpařování rozpouštědla unášena ke sběrné elektrodě<sup>11</sup>.

Elektrody pro ES rozdělujeme podle funkce na zvlákňovací, na kterou je nanášena zvlákňovaná soustava (nejčastěji roztok polymeru) a sběrnou, neboli kolektor. ES může probíhat z jehly (trny), zvlákňovacích elektrod typu váleček či struna, a elektrod řady dalších geometrií, včetně koncentricky uspořádaných trysek<sup>12</sup>. Před sběrnou elektrodou je umístěna podkladová textilie, tj. substrát, na který dopadají vytvořená nanovlákná. Rychlostí posunu substrátu lze nastavovat finální tloušťku nanovláknenné vrstvy, která se běžně pohybuje řádově v desítkách mikrometrů.

ES z roztoků je mezi metodami směřujícími k podávání, případně dávkování léčiv nanovláknenným nosičem popisován nejčastěji, přičemž zcela převažují akademické práce vycházející z využití laboratorních zařízení typu píst-jehla. Publikací směřujících v této oblasti k průmyslovým aplikacím<sup>13–15</sup> je dosud minimum, přičemž se převážně jedná o produkci nanovláken pro zevní lokální aplikaci léčiv.

Léčiva lze do nanovláknenné matrice inkorporovat pomocí ES poměrně jednoduše. Velký měrný povrch, elasticita nanovláknenných vrstev a možnost volby složení polymerních nosičů na základě požadovaných farmakokinetických aplikačních požadavků předurčují nanovláknům vyšší přidanou hodnotu, například ve srovnání s příliš tvrdými a křehkými medikovanými filmy<sup>16</sup>. Z hlediska možnosti podstatně zvýšit rychlost rozpouštění a někdy i rozpustnost léčiva<sup>17</sup> je zásadní také možnost amorfizace léčiva a fyzikální stabilizace tohoto stavu uvnitř nanovlákná mezi řetězci polymeru<sup>18</sup>.

V souvislosti s ES již bylo zkoumáno velké množství léčiv, od vodorozpustných, omezeně rozpustných až po ve vodě nerozpustná léčiva<sup>19,20</sup>. Dosavadní práce se týkaly především ES z jehel, který nelze považovat za průmyslově použitelnou metodu jak z hlediska hodinové kapacity výroby (řádově miligramy za hodinu), tak především pokud jde o stejnorodost produktu zásadně potřebnou pro dávkování léčiv. Ačkoliv byly zaznamenány pokusy o multistryskový elektrospinning, zatím nedošlo k jeho průmyslové aplikaci, a to jak z důvodu ucpávání, tak především obtížné čistitelnosti trysek<sup>21</sup>, která ovšem je pro výrobu medikovaných přípravků zásadním problémem.

Za průmyslově použitelnou verzi zařízení pro ES lze v tomto kontextu považovat zmiňovaný Nanospider™, který dokáže v šíři až 1,6 metru dlouhodobě produkovat za 24 hodin asi 2 000 gramů kvalitní nanovlákněné vrstvy<sup>22</sup>.

Předkládaná práce má za cíl experimentálně pomocí validačních přístupů prověřit a zdokumentovat, zdali výrobní proces, provozovaný v rámci parametrů stanovených pro léčiva, může efektivně a reprodukovatelně vyrábět produkt splňující specifikace a atributy jakosti definované příslušnou zdravotnickou legislativou<sup>23,24</sup>.

Jako modelové léčivo byl zvolen rizatriptan benzoát (RZTB), resp. rizatriptan (RZT), jako zástupce antimigrénových léčiv. Testovaný produkt byl vyroben jako dvouvrstvý nanovlákněný kompozit potenciálně sloužící pro systémové transmukosální podání léčiv<sup>25</sup> terapeuticky dávkovaných v miligramech.

## Experimentální část

### Použité látky

Rizatriptan InStar 5 mg, nanovlákněný strip, šarže V1, V2 a V3, Rizatriptan benzoát (INKE S.A., Španělsko), hypromelosa (Shin Etsu, Japonsko), hydroxypropylcelulóza HPC-SL (Nippon Soda, Japonsko), polyethylenoxid (Dow Chemicals, USA), čištěná voda (Fagron, ČR), Kollicoat IR Red (BASF, Německo). Všechny látky byly v kvalitě "čistý" (pure) nebo kvality lékopisné (USP 37, PhEur 8.0).

### Příprava polymerních roztoků

Protektivní vrstva nanovlákněného kompozitu byla pro ES složena z vodného roztoku hydroxypropylcelulózy (HPC) a polyethylenoxidu (PEO), do kterého byl přidán Kollicoat IR Red v množství 0,5 hm.% jako barvivo. Tento roztok byl míchán na magnetické míchače po dobu 60 min při 750 ot./min.

Pro ES tvorbu nanovlákněné vrstvy s léčivem (aktivní vrstvy) byl k vodnému roztoku hypromelózy (HPMC) a PEO přidán za stálého míchání rizatriptan benzoát (RZTB) v množství 4 hm.%. Vzniklý roztok byl míchán na magnetické míchače Hei-Standard (Heidolph, Německo) po dobu 120 minut při 1400 ot./min.

### Výroba kusových nanovlákněných přípravků

Výroba kompozitních nanovlákněných vrstev probíhala na zařízení Nanospider™. Nejprve byla vyrobena protektivní vrstva složená z HPC, PEO a Kollicoatu, která byla následně překryta aktivní vrstvou obsahující léčivo (RZTB). Vyrobený nanovlákněný materiál v podobě pásu o šířce 30 cm nanosený na podkladovou textilii byl v rovnoměrném rozložení příčně i podélně vysekán kruhovým výsečником o průměru 2,76 mm. Plocha jednotlivých nanovlákněných kompozitních stripů, tedy přípravku Rizatriptan InStar 5 mg, výsledně činila 6,0 cm<sup>2</sup>. Vysekávání probíhalo tak, aby podkladová textilie zůstala nedotčena. V případě, že k vyseknutí podkladové textilie došlo, byl z ní nanovlákněný vzorek pro následné hodnocení sejmut

pomocí pinzety.

Vzhledem k tomu, že dosud nebyla popsána ES výroba kusových medikovaných nanovlákněných matic v poloprovozním či provozním měřítku podle pravidel správné výrobní praxe (SVP), bylo pro validaci provedeno kompletní vysekání vyrobených šarží, vždy v celé výrobní ploše nanovlákněného pásu. V rámci validace proběhla výroba tří po sobě jdoucích šarží stripů, každá o 800 kusech.

### Hodnocení produktu

Morfologie vyrobených vláken byla sledována a charakterizována pomocí snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Phenom Pure (Phenom-World BV, Nizozemí), a to pro každou konkrétní šarži u 5 náhodně vybraných vzorků.

Hmotnost každého vyrobeného stripu byla jednotlivě u všech 800 vzorků z každé šarže ověřena vážením s přesností na 0,01 mg na analytických vahách Mettler-Toledo XSE105DU (Mettler-Toledo, Švýcarsko).

Obsah RZT byl jednotlivě stanovován ve 32 vzorcích stripů z každé šarže. Vzorek byl po zvažení rozpuštěn ve 100 ml čištěné vody. HPLC stanovení bylo provedeno na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 (Agilent, USA) vybaveném kvartérním čerpadlem, autosamplerem, kolonovým termostatem a DAD detektorem. Nastříkaný objem k HPLC analýze činil 5 µl, kolona Poroshell 120 EC-C18 (3,0 × 150 mm, 2,7 µm core-shell, Agilent, USA) s 5 mm předkolonkou obsahující stejný sorbent byla temperována na 45 °C. Mobilní fázi tvořila směs vodného roztoku 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o pH 2,4 a acetonitrilu (84:16 v/v). Detekce byla prováděna při vlnové délce 280 nm. Při průtoku 0,6 ml/min trvala analýza jednoho vzorku 9 min.

Aritmetický průměr hodnot obsahu RZTB v nanovlákněných stripech byl použit jako 100% úroveň obsahu (dávky) léčivé látky v každé z příslušných šarží. Limity 85 % a 115 % definují interval pro přípustné odchylky individuálních procentních hodnot obsahu léčivé látky v jednotlivých nanovlákněných stripech (viz obr. 3).

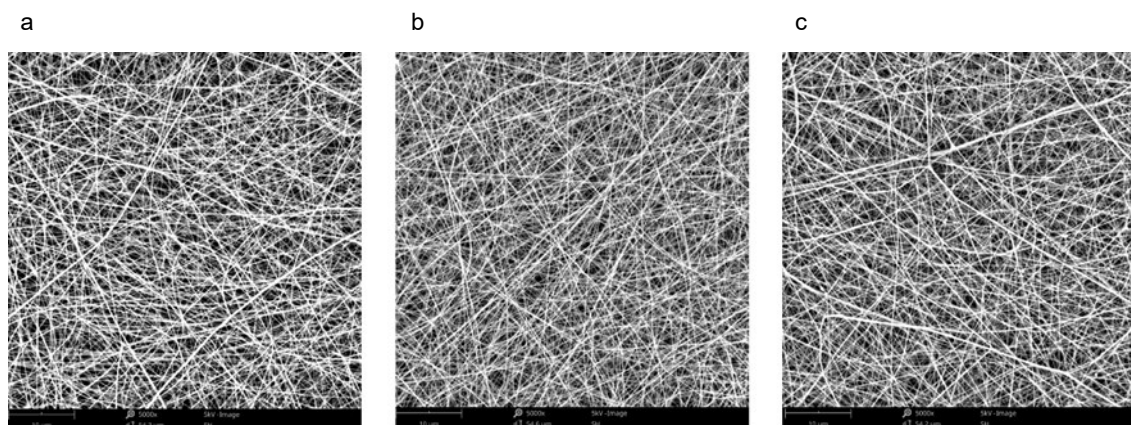
## Výsledky a diskuse

V rámci interního validačního postupu byla pomocí elektronového mikroskopu nejprve charakterizována aktivní vrstva vyrobených stripů Rizatriptan InStar 5 mg. Získané snímky jsou prezentovány na obr. 1.

Na snímcích je patrné, že zobrazovaná vlákna jsou rozložena náhodně, bez hustěji nanesených okrásků, mají pravidelnou tloušťku, rozměrově v oblasti cca 100 nm až 300 nm, nevyskytují se na nich ztlustělá místa, uzlíky, známky krystalizace (léčiva, polymeru) nebo jiné nepravdivosti, nejsou patrné ani delší těsně přilehlé úseky nanovláken. Taková zobrazení předběžně signalizují správné nastavení ES procesu a dobrou kvalitu nanovlákněného produktu.

Podrobnější informace o ustálenosti procesu ES a uniformitě výsledných produktů byla získána sledováním hmotnostní variability stripů.

K tomuto účelu byly po zvažení každého jednotlivého vzorku s přesností na 0,01 mg pro každou šarži vytvořeny

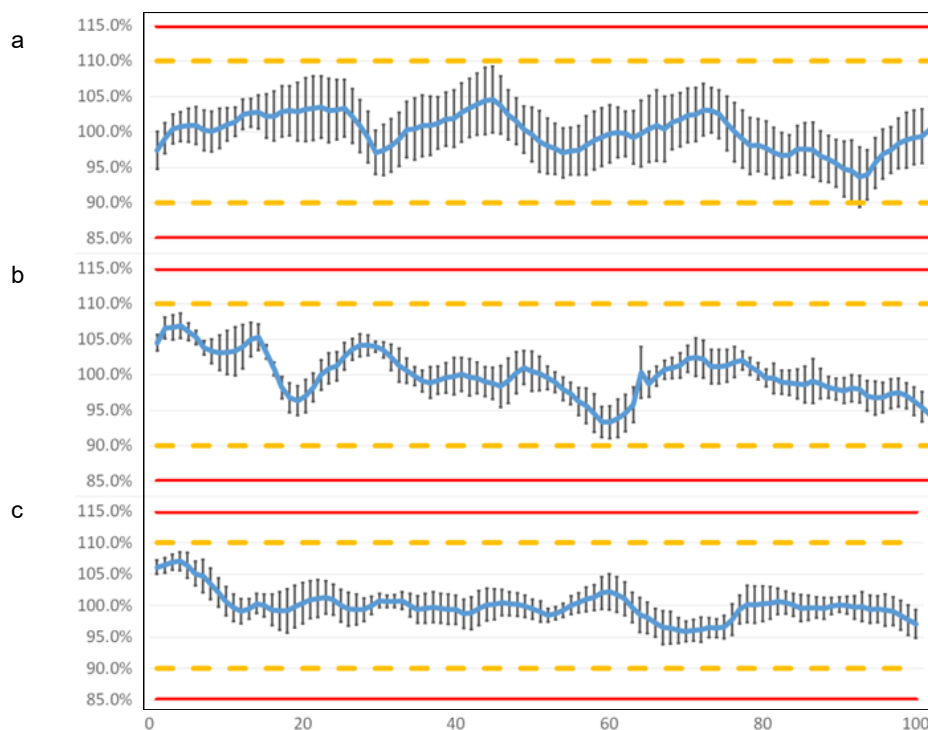


Obr. 1. SEM snímky aktivní nanovlákněné vrstvy při 5000násobném zvětšení. a) šarže V1, b) šarže V2, c) šarže V3

hmotnostní mapy (obr. 2). V nich jsou ve vodorovném směru postupně vyneseny průměrné hmotnosti stripů (střední linka) ve vysekávaných řádcích po 8 kusech a hodnoty příslušných směrdatných odchylek (svíslé chybové úsečky) v jednotlivých vysekávaných řádcích (celkem 100 v každé šarži), a to od počátku do konce výrobního procesu. Nepřerušované linie vyznačují limitní úroveň hmotnosti stripů ( $\pm 15\%$ ). Tato úroveň byla zvolena tak, aby stripy o vyhovujících hmotnostech mohly splňovat požadavek daný lékopisným článkem Obsahová stejnoměrnost jedno-

dávkových lékových forem<sup>26</sup>. Byla totiž předpokládána a následně ověřována úzká korelace mezi hmotností stripu a obsahem léčiva. Pomocná pracovní přerušovaná linie vyznačující úroveň  $\pm 10\%$  od průměrné hmotnosti odpovídá požadavku lékopisného článku Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem<sup>27</sup>, a je definována lékopisem pro přípravky o průměrné hmotnosti nižší než 80 mg. Hodnocené stripy o hmotnosti cca 30 mg právě do této podskupiny patří.

Zobrazené mapy ukazují, že u všech tří vyrobených

Obr. 2. Hmotnostní profily vyrobených šarží s vyznačenými limity ( $\pm 15\%$ ) pro přípustnou hmotnost stripu; a) šarže V1 b) šarže V2 c) šarže V3

po sobě jdoucích šarží stripů se jejich hmotnost udržovala ve stanoveném limitu. Toto zjištění je z hlediska praktického využití validace ES v daném kontextu nejvýznamnější. Vyplyvá z něj důležitý závěr v tom smyslu, že použité procesní parametry výroby kusových dávkových nanovlákných přípravků, stripů, umožňují jejich stabilizovanou produkci jak v rámci jednotlivých šarží, tak i při opakované produkci v poloprovozním rozsahu. Vzhledem principiálně snadné škálovatelnosti použité technologie ESLze očekávat analogické pozitivní výsledky také ve velkoprodučním měřítku.

V detailnějším pohledu zaujal zvlněný charakter do jisté míry pravidelného kolísání průměrných hmotností v podskupinách hodnocených vzorků. Tento jev byl impulzem pro hledání jeho příčin. Jako hlavní příčina bylo identifikováno krátkodobé zastavování výrobního stroje Nanospider™ při dolévání čerstvého polymerního roztoku. Je tudíž nasnadě uplatnit konstrukční vylepšení spočívající v kontinuálním doplňování zásobníku roztoku v celém průběhu ES výroby.

Další důležitou otázkou bylo, jak bude při poloprovozní výrobě reálně vycházet předpoklad vysoké korelace mezi hmotností dvouvrstvých stripů a obsahem léčiva v nich. Z náhodně vybraných míst vyrobeného nanovlákného pásu bylo v každé šarži odebráno 32 stripů (výšeků). Každý z nich byl nejprve zvážěn, následně bylo provedeno HPLC stanovení obsahu RZT a jako validační parametr vyhodnocena obsahová stejnoměrnost stripů. Stanovený limit pro validaci na úrovni  $\pm 15\%$  průměrného obsahu byl převzat z lékopisného článku Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem<sup>25</sup>. Výsledky shrnuje tab. I.

U šarže V2 byly nalezeny poněkud nižší hodnoty obsahu RZT, které nicméně stále ještě spadaly do přípustného rozmezí, což samo o sobě bylo uspokojivé. Přesto byl v rámci validace posun hodnot obsahu RTZ v této šarži dále věcně analyzován. Jeho zdroj byl identifikován v kolísání gramáže protektivní vrstvy (bez obsahu léčiva), které bylo zapříčiněno nepřesným chodem motoru řídicím posun podkladové textilie. Pro výrobu šarže V3 došlo k operativní opravě a tento rušivý faktor se v ní již výrazněji neprojevil. Z uvedeného lze ovšem pro další výrobu dvouvrstevných (a vícevrstevných) jednodávkových přípravků vyvodit důležité upozornění v tom smyslu, že i kolísání gramáže vrstvy bez obsahu léčiva může mít pro kvalitu produktu kritickou roli.

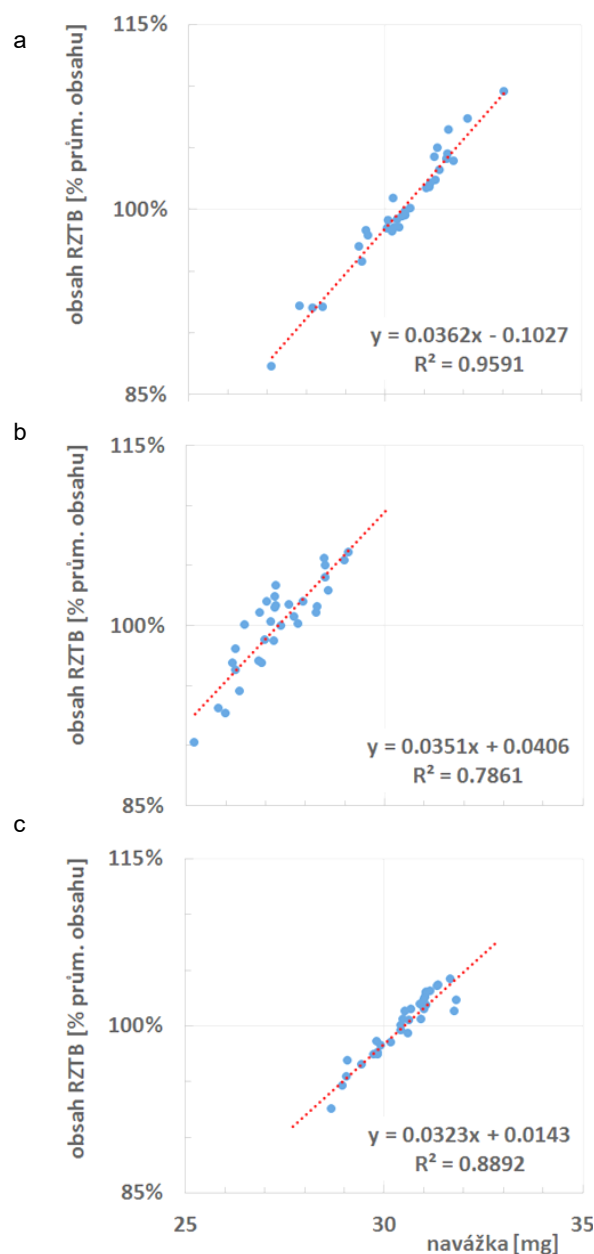
Pro stabilizovanou výrobu dávkovaného přípravku s jednou aktivní a jednou protektivní nanovláknou vrstvou bylo dále v rámci validační procedury potřebné ozřejmit vztah mezi hmotností stripů a aktuálním obsahem léčiva.

Tabulka I  
Obsah RZT v jednotlivých šaržích

Šarže	Obsah RZT [mg]			
	průměr	limit ( $\pm 15\%$ )	minimum	maximum
V1	4,92	4,18–5,66	4,29	5,39
V2	4,51	3,83–5,18	4,04	4,79
V3	4,95	4,21–5,69	4,58	5,16

Ze získaných údajů o hmotnosti analyzovaných stripů a obsahu RZTB v nich byly sestrojeny grafy (obr. 3), provedena lineární regrese a vyčísleny příslušné hodnoty daného proložení včetně hodnot  $R^2$  příslušných koeficientů determinace.

Lineární regresní model se ukázal pro danou situaci jako plně vyhovující. Předpoklad těsného vztahu mezi hmotností a obsahem potvrzují vyčíslené hodnoty  $R^2$ . V základní interpretaci pro validaci vysvětlují tyto hodnoty celkově přípustnou variabilitu obsahu léčiva v analyzovaných stripech variabilitou jejich hmotnosti, a to z 0,9591 %



Obr. 3. Vztah hmotnosti nanovlákného stripu a obsahu RZTB pro a) šarži V1 b) šarži V2 c) šarži V3

u šarže V1, 0,7860 % u šarže V2 a 0,8891 % u šarže V3. Z tohoto zjištění vyplývají dva poznatky. První z nich potvrzuje, že pro operační kontrolu ustálenosti výrobního ES procesu bude možné toto technicky jednoduché a časově nenáročné stanovení hmotnosti stripů využít i pro průběžné odhady obsahové stejnoměrnosti.

Můžeme-li validaci definovat jako proceduru, při níž má být demonstrována a dokumentována kvalita technologie či metody, lze další a závěrečný poznatek shrnout tak, že u dvojrstevných nanovlákných stripů s obsahem léčiva na úrovni jednotek miligramů byla potvrzena použitelnost testované technologie ES k výrobě jednodávkových léčivých přípravků.

*Tato práce vznikla za finanční podpory Specifického vysokoškolského výzkumu, projektu SVV 260 401 Univerzity Karlovy v Praze a podpory projektu P40, 190/11/1110-3 programu PRVOUK Univerzity Karlovy v Praze.*

#### Symboly a zkratky

SVP	správná výrobní praxe
SEM	skenovací elektronový mikroskop
ES	elektrospinning
RZT	rizatriptan
RZTB	rizatriptan benzoát

#### LITERATURA

- Doporučení komise ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu. Úřední věstník Evropské unie. 2011/696/EU. L 275/38. (20.10.2011).
- Bognitzki M., Czado W., Frese T., Schaper A., Hellwig M., Steinhart M., Greiner A., Wendorff J. H.: *Adv. Mater.* 13, 70 (2001).
- Nain A. S., Wong J. C., Amon C., Sitti M.: *Appl. Phys. Lett.* 89, 183105 (2006).
- Ma P. X., Zhang R.: *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 60 (1999).
- Poinern G. E. J., Le X. T., O'Dea M., Becker T., Fawcett D.: *BioMed Res. Int.* 238762, 1 (2014).
- Badrossamay M. R., McIlwee H. A., Goss J. A., Kevin K. P.: *Nano Lett.* 10, 2257 (2010).
- He J.-H., Wan Y.-Q., Xu L.: *Chaos, Solitons, Fractals* 33, 26 (2007).
- Zamani M., Prabhakaran M. P., Ramakrishna S.: *Int. J. Nanomedicine* 8, 2997 (2013).
- Jirsák O., Sanetník F., Lukáš D., Kotek V., Martínová L., Chaloupek J.: *Patent USA 20060290031* (2006).
- Elmarco, company overview : <https://www.slideshare.net/ElmarcoCompany/elmarco-company-overview-11984905>, staženo 12.7.2018.
- Lukáš D., Sarkar A., Pokorný P.: *J. Appl. Phys.* 103, 084309 (2008).
- Lee B.-S., Jeon S.-Y., Park H. I., Lee G., Yang H.-S., Yu W.-R.: *Sci. Reports* 4, 675 (2014).
- Nagy Z. K., Balogh A., Démuth B., Pataki H., Vigh T., Szabó B., Molnár K., Schmidt B. T., Horák P., Marosi G., Verreck G., Van Assche I., Brewster M. E.: *Int. J. Pharm.* 480, 137 (2015).
- Vrbata P., Berka P., Stránská D., Doležal P., Musilová M., Čížinská L.: *Int. J. Pharm.* 457, 168 (2013).
- Blakney A. K., Krogstad E. A., Jiang Y. H., Woodrow K. A.: *Int. J. Nanomedicine* 9, 2967 (2014).
- Kajal G., Chandra A., Praveen G., Snigdha S., Roy S., Agatemor C., Thomas S., Provazník I.: *Sci. Reports* 8, 5058 (2018).
- Vrbata P., Berka P., Stránská D., Doležal P., Lázníček M.: *Int. J. Pharm.* 473, 407 (2014).
- Nagy Z. K., Balogh A., Démuth B., Pataki H., Vigh T., Szabó B., Molnár K., Schmidt B. T., Horák P., Marosi G., Verreck G., Van Assche I., Brewster M. E.: *Int. J. Pharm.* 480, 137 (2015).
- Kenawy E.-R., Bowlin G. L., Mansfield K., Layman J., Simpson D. G., Sanders E. H., Wnek G. E.: *J. Controlled Release* 81, 57 (2002).
- Verreck G., Chun I., Rosenblatt J., Peeters J., Van-Dijck A., Mensch J., Noppe M., Brewster M. E.: *J. Controlled Release* 92, 349 (2003).
- SalehHudin H. S., Mohamad E. N., Mahadi W. N. L., Afifi A. M.: *Mater. Manuf. Processes* 33, 479 (2018).
- Elmarco s.r.o.: Elmarco's Nanospider™ NS 8S1600U. [www.elmarco.cz/.../136-1-ns-8s1600u-profile-160530-72dpi.pdf](http://www.elmarco.cz/.../136-1-ns-8s1600u-profile-160530-72dpi.pdf), staženo 12.7.2018.
- Státní ústav pro kontrolu léčiv Praha: Pokyny pro správnou výrobní praxi. Pokyn Vyr-32-verze-3, <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-verze-3> (2011), staženo 12.7.2018.
- Státní ústav pro kontrolu léčiv Praha: Pokyny pro správnou výrobní praxi – kvalifikace a validace. Pokyn Vyr-32-doplněk 15-verze-1 (2015). <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-doplněk-15-verze-1>, staženo 12.7.2018.
- Stránská D., Klabanová A., Doležal P., Vrbata P., Berka P., Musilová M.: *Patent USA 9789060B2* (2017).
- Český lékopis 2009, doplněk 2013 str. 350 (2.9.6 Obsahová stejnoměrnost jednodávkových lékových forem).
- Český lékopis 2009, doplněk 2013 str. 349 (2.9.5 Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem).

**D. Stránská<sup>a,b</sup>, P. Berka<sup>a,b</sup>, and P. Doležal<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *InStar Technologies a.s., Liberec*, <sup>b</sup> *Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague*): **Validation of Production of Single-dose Medicated Nanofiber Matrices Manufactured by Electrospinning**

A considerable obstacle of the real nanofiber use in drug dosage forms consists in the low weight of the doses and in the content non-uniformity of medicated nanofiber products, especially of those manufactured on a large scale. The electrospinning nanofiber technology is the most promising in this context; however, no results obtained by validated production have been published so far. Here we present the results of the validation study of electrospun medicated strips intended for administration of rizatriptan as a drug medicated in milligrams per dose. The results obtained demonstrate a compliance with the good manufacturing practice and pharmacopoeial requirements

on weight and content uniformity. We have concluded that the tested Nanospider™ electrospinning technology is validable and thus suitable for a wide number of drugs intended for single-dose administration of small drug quantities.

English translation available in the on-line version.

Keywords: weight uniformity, content uniformity, rizatriptan, nanotechnology

*Acknowledgements*

*The paper was financially supported by the Specific University Research, project SVV 260 401, and by the program PRVOUK, the project P40, 190/11/1110-3, both of Charles University, Prague, Czech Republic.*



## VALIDATION OF PRODUCTION OF SINGLE-DOSE MEDICATED NANO-FIBER MATRICES MANUFACTURED BY ELECTROSPINNING

DENISA STRÁNSKÁ<sup>a,b</sup>, PAVEL BERKA<sup>a,b</sup>,  
and PAVEL DOLEŽAL<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *InStar Technologies a.s., Mrštíkova 399/2a, 460 07 Liberec, Czech Republic*, <sup>b</sup> *Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Ak. Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*  
pavel.dolezal@faf.cuni.cz

Keywords: weight uniformity, content uniformity, rizatriptan, nanotechnology

### Introduction

Since the end of the twentieth century, nanotechnologies have undergone great advances in the academic research and development, followed up also in the industrial and commercial fields. Accordingly, very extensive literature in journals and patents already exists and the number of publications continually increases.

According to the simplest and widely accepted definition, nanomaterials are characterized by at least one external dimension in the range between 1 and 100 nanometers<sup>1</sup>. They possess unusual physico-chemical properties connected particularly with a very high volume specific surface area (larger than 60 m<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>)<sup>1</sup>. They may have a very variable geometric arrangement, differing in outer and inner structures, and their terminology is not standardized yet. Of the size and form variants of nanomaterials described in connection with drug administration, it is possible to mention, e.g., dimensionless nanodots, one-dimensional nanoparticles, nanowires, nanotubes and/or nanochips, as well as dendrimers and some liposomes. A particularly interesting subgroup of nanomaterials consists of nanofibers, especially polymeric ones, from which layers of various composition are prepared.

There exist several possible methods of preparation of polymeric nanofibers; they can be classified into the formation of nanofibers from solutions and that from melts. Some methods are limited to the laboratory scale (lengthening<sup>2</sup>, phase separation<sup>3</sup>, or stencil/template synthesis<sup>4</sup>); others were developed up to the level usable for industrial production. The latter include the methods of electrostatic spinning<sup>5</sup>, centrifugal spinning<sup>6</sup> and melt blowing<sup>7</sup>.

Electrostatic spinning, or electrospinning (ES) for short, which belongs to electrohydrodynamic methods<sup>8</sup>, provides at present the widest possibilities for the production of nanofibers, enabling the formation of nanofibers from various materials (e.g. organic polymers, ceramic materials, semiconductors and metals), as well as the formation of nanofibers of various morphologies, structures

and functions.

ES from a solution of polymers for industrial performance in an original needleless design was successfully developed fifteen years ago by Prof. O. Jirsák of the Technical University in Liberec<sup>9</sup> and technically realized as the Nanospider™ device by the local firm Elmarco<sup>10</sup>.

In short, ES is a process in which, by the action of strong electric field on the solution (or an emulsion, suspension or melt) through electrostatic repulsive forces on its surface, very fine fibers of diameters in tens to hundreds of nanometers are formed. The fibers are transported to the collecting electrode with simultaneous immediate and very fast evaporation of the solvent<sup>11</sup>.

Electrodes for ES are divided, according to their function, into the spinning electrode, onto which the spinning system (most frequently a polymeric solution) is applied, and the collecting electrode, a collector for short. ES can run from a needle (a pin), a roller, a string or a series of electrodes of other geometries, including concentrically arranged nozzles<sup>12</sup>. In front of the collecting electrode there is a supporting textile, i.e. a substrate, on which the produced nanofibers are collected. The rapidity of the movement of the substrate makes it possible to adjust the final thickness of the nanofiber layer, which commonly ranges in the order of tens of micrometers.

Of the methods aiming at the administration or dosing of drugs by a nanofiber carrier, ES from the solutions is the most frequently described method; its application, based on the laboratory devices of the piston-needle type, however, is mainly found in academic papers. Publications focused on industrial applications<sup>13–15</sup> are scarce so far; they mostly deal with the production of nanofibers for external local administration of drugs.

Active ingredients can be incorporated into the nanofiber matrix by means of ES quite simply. The large specific surface and elasticity of nanofiber layers, as well as the possibility to choose the composition of polymeric carriers according to the pharmacokinetic requirements for administration predetermine nanofibers to have a higher added value, in comparison with, e.g., too hard and fragile medicated films<sup>16</sup>. The possibility to substantially increase the rate of dissolution and sometimes even the solubility of the active ingredient<sup>17</sup> through the amorphization of the active ingredient, as well as a physical stabilization of this state within the nanofiber between the chains of the polymer<sup>18</sup> is also of fundamental importance.

A large number of active ingredients, ranging from water-soluble, via sparingly soluble to insoluble in water have been investigated so far in connection with ES<sup>19,20</sup>. The hitherto published papers have been primarily concerned with ES from needles, which cannot be considered a method industrially usable from the standpoint of both the hourly production rate (in the order of milligrams per hour) and the homogeneity of the product which is essentially necessary for dosing of drugs. Though attempts have been recorded to perform multi-nozzle electrospinning, its industrial application have not been implemented for the time being, due to nozzle blockage and also due to difficult cleanliness of nozzles<sup>21</sup> which is, of course, the major problem for the manufacture of medicated preparations.

In this context, an industrially usable version of the device for ES could be the already mentioned Nanospider™, which is able to sustainably produce approximately

2 000 grams of quality nanofiber layer in the width up to 1.6 meters in 24 hours<sup>22</sup>.

The present study aims to experimentally verify and document, by means of the validation approach, whether the manufacturing process run, within the parameters prescribed for drugs, can effectively and reproducibly yield a product fulfilling the specifications and attributes of the quality, as defined by the pertinent health legislation<sup>23,24</sup>.

Rizatriptan benzoate (RZTB), or rizatriptan (RZT), a representative of antimigrainous drugs, was selected as a model active ingredient. The tested product was manufactured as a two-layer nanofiber composite, potentially usable for pro-systemic transmucosal administration of drugs<sup>25</sup> therapeutically dosed in milligrams.

## Experimental Part

### Material

Rizatriptan InStar 5 mg, a nanofiber strip, batches V1, V2 and V3, Rizatriptan benzoate (INKE S.A., Spain), hypromellose (Shin Etsu, Japan), hydroxypropyl cellulose HPC-SL (Nippon Soda, Japan), polyethylene oxide (Dow Chemicals, USA), purified water (Fagron, Czech Republic), Kollicoat IR Red (BASF, Germany). All substances were of pure or pharmacopoeial quality (USP 37, PhEur 8.0)

### Preparation of polymeric solutions

The mixture for the ES production of the protective layer of the nanofiber composite was composed of an aqueous solution of hydroxypropyl cellulose (HPC) and polyethylene oxide (PEO), with Kollicoat IR Red (0.5 wt.%) added as a coloring agent. This solution was mixed using a magnetic stirrer for 60 minutes at 750 RPM.

For the ES production of a nanofiber layer with an active ingredient (active layer), rizatriptan benzoate (RZTB) in a concentration of 4 wt.% was added to an aqueous solution of hypromellose (HPMC) and PEO under constant stirring. The resulting solution was mixed on a magnetic stirrer Hei-Standard (Heidolph, Germany) for 120 minutes at 1400 RPM.

### Manufacture of units of nanofiber preparations (strips)

The manufacture of the composite nanofiber layers was carried out on the Nanospider™ device. A protective layer composed of HPC, PEO and Kollicoat was manufactured first, and then it was covered with a further layer containing an active ingredient (RZTB). The manufactured nanofiber material in the form of a 30 cm wide band lying on the supporting textile was both transversally and longitudinally equidistantly cut with a circular punch of a diameter of 2.76 mm. The area of each of the individual nanofiber composite strips, i.e. the preparation Rizatriptan InStar 5 mg, amounted to 6.0 cm<sup>2</sup>. Cutting was carried out in such a way as to keep the supporting textile intact. In the case that the supporting textile was cut, the nanofiber sample was separated from it for the subsequent evaluation by means of a pair of tweezers.

With regard to the fact that the ES manufacture of medicated nanofiber matrix strips in pilot-plant or produc-

tion scale according to the rules of Good Manufacturing Practice (GMP) has not been described so far, a complete cutting of the manufactured batches was performed for the sake of validation, each time on the whole area of the manufactured nanofiber band. Within validation, three subsequent batches of strips, each consisting of 800 pieces, were manufactured.

### Product evaluation

Morphology of manufactured fibers was monitored and characterized using a scanning electron microscope (SEM) Phenom Pure (Phenom-World BV, the Netherlands), on 5 random samples for each batch.

Each manufactured strip was individually weighed (i.e. all 800 samples from each batch) with a precision of 0.01 mg on analytical balance Mettler-Toledo XSE105DU (Mettler-Toledo, Switzerland).

The content of RZT was determined individually in 32 samples of strips from each batch. The weighed samples were dissolved in 100 mL of purified water. HPLC analysis was carried out on a liquid chromatograph Agilent 1260 (Agilent, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler, a column thermostat, and a DAD detector. The injected volume was 5 µL; a Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 150 mm, 2.7 µm core-shell, Agilent, USA) column with a 5 mm guard column containing the identical stationary phase was tempered at 45 °C. The mobile phase was composed of a mixture of an aqueous solution of 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> adjusted to pH 2.4 and acetonitrile (84:16 v/v). Detection was performed at the wavelength of 280 nm. At the flow rate of 0.6 mL/min, an analysis of one sample lasted for 9 min.

The arithmetic mean of these values in each batch was always used as the 100% drug content level in the batch. The tolerance limits for individual percentage values of RZTB in strips were set to 85 % and 115 % (see Figure 3).

## Results and Discussion

As the first step within the framework of the internal validation procedure, the active layer of the manufactured strips of Rizatriptan InStar 5 mg was characterized by means of an electron microscope. The results obtained are presented in Fig. 1.

The images clearly show that the fibers are randomly distributed, without more thickly layered districts. They possess a regular thickness, the dimensions ranging from ca. 100 to 300 nm; no thickened spots, knots, signs of crystallization (of the active ingredient, polymer) or any other irregularities occur; further, all longer densely contiguous stretches of nanofibers are absent. Such pictures preliminarily signalize a correct adjustment of the ES process and a good quality of the nanofiber product.

Evaluation of weight variability makes it possible to determine the stability of the ES process and the uniformity of individual nanofiber products in greater detail and more precisely. For this purpose, weight maps (Fig. 2) were constructed for each batch after weighing each individual sample with a precision of 0.01 mg. Average weights of strips in the cut rows of 8 pieces (middle line) are sequentially plotted on the axis of abscissae, while the



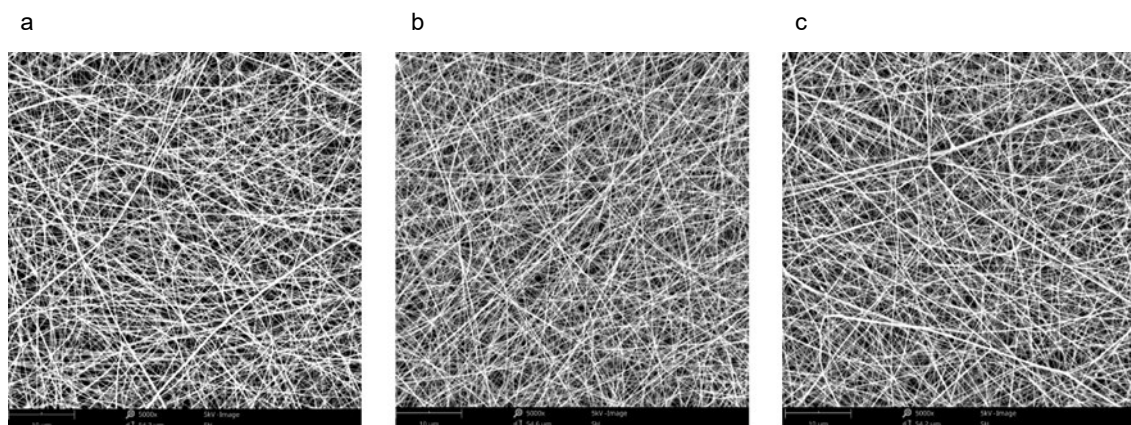


Fig. 1. SEM pictures of the active nanofiber layer at 5000-fold magnification. a) batch V1, b) batch V2, c) batch V3

values of the pertinent standard deviations (vertical error bars) in the individual cut rows (altogether 100 in each batch) are given on the axis of ordinates, being recorded from the beginning to the end of the manufacturing process. Uninterrupted lines mark the limit level of the weights of strips ( $\pm 15\%$ ). This limit was selected in such a way so that the strips of satisfactory weights could fulfil the requirement prescribed by the pharmacopoeial monograph Uniformity of Content of Single-Dose Preparations<sup>26</sup> because a close correlation between the weight of

the strip and the content of the active ingredient had been assumed and subsequently verified. The auxiliary dashed line marking the level of  $\pm 10\%$  from the average weight corresponds with the requirements of the pharmacopoeial monograph Uniformity of Mass of Single-Dose Preparations<sup>27</sup>; it is defined by the European Pharmacopoeia for the preparations of the average weight lower than 80 mg. The evaluated strips of the weight of ca. 30 mg belong just into this group.

The maps presented show that in all the three consec-

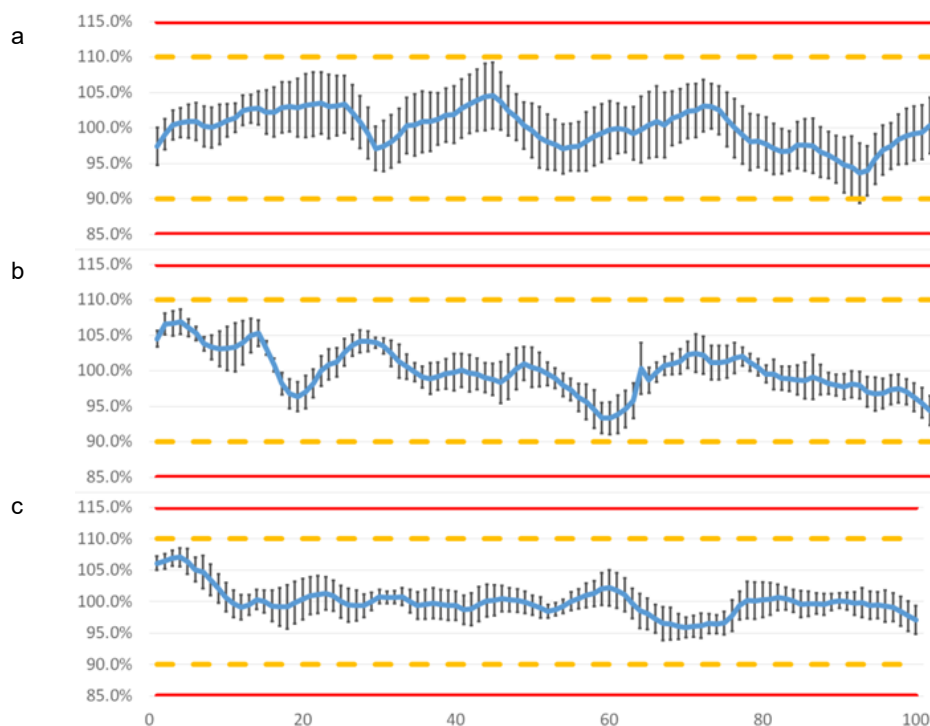


Fig. 2. Weight profiles of the manufactured batches with marked limits ( $\pm 15\%$ ) for the permissible weight of the strip; a) batch V1 b) batch V2 c) batch V3

utive batches, the weights of manufactured strips were kept within the prescribed limit. From the standpoint of the practical use of the ES validation, this finding is most important in the given context. An important conclusion can be done that the employed procedural parameters of the production of unit dose nanofiber preparations, i.e. strips, make their stable production possible, both within the individual batches and in repeated pilot-plant manufacture. Since the scalability of the employed ES technology is essentially easy, analogous positive results also in mass-production scale can be expected.

A more detailed view revealed an oscillating character of the more or less regular fluctuation of average weights in the subgroups (rows) of the samples under evaluation. This phenomenon prompted us to find its causes. The main cause was identified as short-time stops of the manufacturing device Nanospider™ during replenishment with a fresh polymeric solution. Obviously, this constructional imperfection should be remedied by continuous refilling the dispenser with the solution during the whole course of the ES production.

There is another important question: in the pilot-plant production, is the assumption of high correlation between the weight of the two-layer strips and the content of the active ingredient in them realistic? To decide this, 32 strips (cuttings) in each batch were sampled from randomly selected spots of the manufactured nanofiber band. Each of them was weighed, then the RZT content was determined by HPLC, and the content uniformity of strips was assessed as a validation parameter. The prescribed limit for validation at the level of  $\pm 15\%$  of the average content was taken from the pharmacopoeial monograph Uniformity of Content of Single-Dose Preparations<sup>26</sup>. The results are summed up in Table I.

Somewhat lower values of the RZT content were found in the batch V2; nevertheless, satisfactorily, they still lay within the permissible range. In spite of it, the shift in the values of the RTZ content in this batch was further analyzed within the framework of validation. Its source was identified as a fluctuation of the basis weight of the protective layer (without the active ingredient), which was caused by an irregular running of the engine regulating the movement of the supporting textile. This was flexibly repaired before the production of the batch V3 and the disturbing factor mentioned above did not manifest as markedly as in the batch V2. It follows from these findings that, for further production of the two-layer (and multi-layer) single-dose preparations, even the fluctuation of the basis weight of the layer not containing the active ingredient may play a critical role for the quality of the product.

For a stable production of a single-dose preparation

Table I  
Content of RZT in individual batches

Batch	Content of RZT [mg]			
	average	limit ( $\pm 15\%$ )	minimum	maximum
V1	4.92	4.18–5.66	4.29	5.39
V2	4.51	3.83–5.18	4.04	4.79
V3	4.95	4.21–5.69	4.58	5.16

with one active and one passive protective nanofiber layer it was necessary – within the validation procedure – to elucidate the relationship between the weight of strips and the content of the active ingredient.

The data obtained on the weight and the RZT content of analyzed strips were plotted (Fig. 3). A linear regression was performed to quantify the parameters of the given fit including the values of the regression coefficient ( $R^2$ ).

The linear regression model proved to be fully sufficient for the given plots. The assumption of a close relationship between weight and content was confirmed by the  $R^2$  values obtained. In basic interpretation for validation,

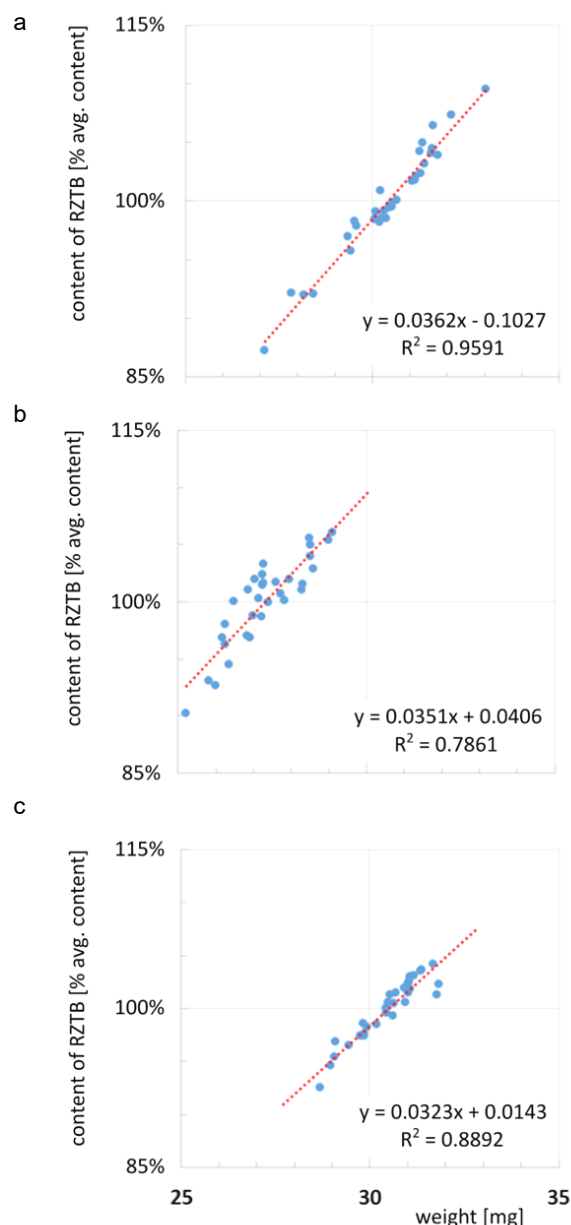


Fig. 3. Relation between the weight of the nanofiber strip and the RZTB content for a) batch V1 b) batch V2 c) batch V3

they confirm that the overall variability of the content of the active ingredient in analyzed strips is permissible (0.9591 in batch V1, 0.7860 in batch V2, and 0.8891 in batch V3). It follows from this finding that (1) for operational control of stability of the manufacturing ES process, the technically simple and rapid determination of the weight of stripes can be used also for continuous monitoring the content uniformity; (2) if the validation is defined as a procedure to demonstrate and document the quality of a technology or methods, then, for the two-layer nanofiber strips containing the active ingredient at the level of units of milligrams, the usability of the tested ES technology for the manufacture of single-dose medicinal preparations was confirmed.

*The paper was financially supported by the Specific University Research, project SVV 260 401, and by the program PRVOUK, the project P40, 190/11/1110-3, both of Charles University, Prague, Czech Republic.*

## REFERENCES

1. <http://data.europa.eu/eli/reco/2011/696/oj> (October 20, 2011), downloaded July 12, 2019.
2. Bognitzki M., Czado W., Frese T., Schaper A., Hellwig M., Steinhart M., Greiner A., Wendorff J. H.: *Adv. Mater.* 13, 70 (2001).
3. Nain A. S., Wong J. C., Amon C., Sitti M.: *Appl. Phys. Lett.* 89, 183105 (2006).
4. Ma P. X., Zhang R.: *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 60 (1999).
5. Poinern G. E. J., Le X. T., O'Dea M., Becker T., Fawcett D.: *BioMed Res. Int.* 238762, 1 (2014).
6. Badrossamay M. R., McIlwee H. A., Goss J. A., Kevin K. P.: *Nano Lett.* 10, 2257 (2010).
7. He J.-H., Wan Y.-Q., Xu L.: *Chaos, Solitons, Fractals* 33, 26 (2007).
8. Zamani M., Prabhakaran M. P., Ramakrishna S.: *Int. J. Nanomedicine* 8, 2997 (2013).
9. Jirsák O., Sanetník F., Lukáš D., Kotek V., Martínová L., Chaloupek J.: *Patent USA 20060290031* (2006).
10. Elmarco, company overview: <https://www.slideshare.net/ElmarcoCompany/elmarco-company-overview-11984905>, downloaded July 12, 2018.
11. Lukáš D., Sarkar A., Pokorný P.: *J. Appl. Phys.* 103, 084309 (2008).
12. Lee B.-S., Jeon S.-Y., Park H. I., Lee G., Yang H.-S., Yu W.-R.: *Sci. Reports* 4, 675 (2014).
13. Nagy Z. K., Balogh A., Démuth B., Pataki H., Vigh T., Szabó B., Molnár K., Schmidt B. T., Horák P., Marosi G., Verreck G., Van Assche I., Brewster M. E.: *Int. J. Pharm.* 480, 137 (2015).
14. Vrbata P., Berka P., Stránská D., Doležal P., Musilová M., Čížinská L.: *Int. J. Pharm.* 457, 168 (2013).
15. Blakney A. K., Krogstad E. A., Jiang Y. H., Woodrow K. A.: *Int. J. Nanomedicine* 9, 2967 (2014).
16. Kajal G., Chandra A., Praveen G., Snigdha S., Roy S., Agatemor C., Thomas S., Provaznik I.: *Sci. Reports* 8, 5058 (2018).
17. Vrbata P., Berka P., Stránská D., Doležal P., Lázníček M.: *Int. J. Pharm.* 473, 407 (2014).
18. Nagy Z. K., Balogh A., Démuth B., Pataki H., Vigh T., Szabó B., Molnár K., Schmidt B. T., Horák P., Marosi G., Verreck G., Van Assche I., Brewster M. E.: *Int. J. Pharm.* 480, 137 (2015).
19. Kenawy E.-R., Bowlin G. L., Mansfield K., Layman J., Simpson D. G., Sanders E. H., Wnek G. E.: *J. Controlled Release* 81, 57 (2002).
20. Verreck G., Chun I., Rosenblatt J., Peeters J., Van-Dijck A., Mensch J., Noppe M., Brewster M. E.: *J. Controlled Release* 92, 349 (2003).
21. SalehHudin H. S., Mohamad E. N., Mahadi W. N. L., Afifi A. M.: *Mater. Manuf. Processes* 33, 479 (2018).
22. Elmarco s.r.o.: Elmarco's Nanospider™ NS 8S1600U. [www.elmarco.cz/.../136-1-ns-8s1600u-profile-160530-72dpi.pdf](http://www.elmarco.cz/.../136-1-ns-8s1600u-profile-160530-72dpi.pdf), downloaded July 12, 2018.
23. European Commission: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use – Annex 15: Qualification and Validation. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2015-10\\_annex15.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2015-10_annex15.pdf), downloaded July 12, 2018.
24. <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-doplnek-15-verze-1>, downloaded July 12, 2018.
25. Stránská D., Klabanová A., Doležal P., Vrbata P., Berka P., Musilová M.: *Patent USA 9789060B2* (2017).
26. European Pharmacopoeia, 8th ed., 2013. 2.9.6. Uniformity of Content of Single-Dose Preparations, p. 298.
27. European Pharmacopoeia, 8th ed., 2013. 2.9.5 Uniformity of Mass of Single-Dose Preparations. p. 297.

## Abstract

A considerable obstacle of the real nanofiber use in drug dosage forms consists in the low weight of the doses and in the content non-uniformity of medicated nanofiber products, especially of those manufactured on a large scale. The electrospinning nanofiber technology is the most promising in this context; however, no results obtained by validated production have been published so far. Here we present the results of the validation study of electrospun medicated strips intended for administration of rizatriptan as a drug medicated in milligrams per dose. The results obtained demonstrate a compliance with the good manufacturing practice and pharmacopoeial requirements on weight and content uniformity. We have concluded that the tested Nanospider™ electrospinning technology is validable and thus suitable for a wide number of drugs intended for single-dose administration of small drug quantities.