

Využití droplet-based mikrofluidních technik při přípravě mikročástic

Use of droplet-based microfluidic techniques in the preparation of microparticles

Martina Naiserová • Jakub Vysloužil • Kateřina Kubová • Martina Holická • David Vetchý • Josef Mašek • Eliška Mašková

Došlo 20. července 2021 / Přijato 1. září 2021

Souhrn

Mikročástice jsou široce používány v nesčetných oblastech průmyslu, jako jsou farmaceutika, potravin, kosmetika a další. Ve srovnání s tradičními metodami pro syntézu mikročástic poskytují mikrofluidní techniky výkonné platformy pro vytváření vysoce kontrolovatelných kapek emulze jako šablon pro výrobu uniformních mikročástic s pokročilými strukturami a funkcemi. Mikrofluidní techniky mohou generovat kapky emulze s přesně řízenou velikostí, tvarem a složením. Přesnější proces přípravy je účinným nástroj ke kontrole profilu uvolňování léčiva a přináší také snadno dostupnou reprodukovatelnost. Článek poskytuje informace o základních nastaveních droplet-based techniky a příklady typů mikročástic připravených touto metodou.

Klíčová slova: mikročástice • mikrofluidní technika • metoda odpaření rozpouštědla • PDMS • mikrokanálky

Summary

Microparticles are widely used in myriad fields such as pharmaceuticals, foods, cosmetics, and other industrial fields. Compared with traditional methods for synthesizing microparticles, microfluidic techniques provide very powerful platforms for creating highly controllable emulsion droplets as templates for fabricating uniform microparticles with advanced

structures and functions. Microfluidic techniques can generate emulsion droplets with precisely controlled size, shape, and composition. A more precise preparation process brings an effective tool to control the release profile of the drug and introduces an easily accessible reproducibility. The paper gives information about basic droplet-based set-ups and examples of attainable microparticle types preparable by this method.

Key words: microparticles • microfluidic technique • solvent evaporation method • PDMS • microchannels

Úvod

Během posledních desetiletí došlo k obrovskému vývoji v oblasti miniaturizovaných systémů pro manipulaci s tekutinami, známých jako mikrofluidní systémy¹⁾. Mikrofluidika se tak stala jedním z nově se vyvíjejících oborů mechaniky tekutin. Zabývá se technikou generování a řízení pohybů velmi malých objemů tekutin v prostředí kanálek a dutin, jejichž rozměry se pohybují od jednotek milimetrů až po jednotky mikrometrů²⁾. Tyto miniaturizované systémy umožňují provádět velké množství experimentů v krátkém čase, při velmi malé spotřebě surovin. Ze specializované oblasti výzkumu v rámci mikroelektronického průmyslu se v posledních letech rozrostla do vysoce interdisciplinárního odvětví, které kombinuje prvky strojírenství, fyziky, chemie, biologie a nanotechnologie²⁾. Mikrofluidní systémy nacházejí uplatnění při většině chemických reakcí, při práci se vzorky potravin, paliv a olejů, při vývoji nových sloučenin, léků, katalyzátorů a v analytice^{1, 2)}. Kromě snížení spotřeby surovin patří mezi výhody také zrychlení procesu, vyšší výkonnost a efektivnost^{3, 4)}. Při využití charakteristik mikrofluidního zařízení v kombinaci se dvěma nemísitelnými kapalinami je pak možné získat emulzi s úzkou velikostní distribucí definovanou průměrem kanálek zařízení. Toho je možné využít k přípravě polymerních mikročástic jako nosičů léčiva.

M. Naiserová • PharmDr. Jakub Vysloužil, Ph.D. (✉) • K. Kubová • M. Holická • D. Vetchý
Masarykova Univerzita, Farmaceutická fakulta
Ústav farmaceutické technologie
Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno
e-mail: vyslouzilj@pharm.muni.cz

J. Mašek • E. Mašková
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno
Oddělení farmakologie a toxikologie

Mikročástečkové lékové formy jsou v dnešní době pevnou součástí nabídky komerčně dostupných léků pro humánní terapii a i z tohoto důvodu nadále patří mezi intenzivně studovanou skupinu. Kromě již tradiční enkapsulace různých analogů GnRH (z ang. gonadotropin-releasing hormon)⁵⁾ se používají také jako nosiče řady jiných léčiv, jako např. bromokryptinu nebo dokonce inzulinu⁶⁾. Vzhledem k nejčastějším typům podání (subkutánní, intramuskulární, perorální či inhalační podání) by se velikost mikročásteček měla pohybovat v jednotkách až desítkách $\mu\text{m}^{7-10)$. Polymerní mikročástečky se připravují celou řadou postupů, a to především metodou odpaření rozpouštědla, sprejovým sušením nebo chemickými metodami (polymerové jevy)¹¹⁾. V praxi je však u používaných metod problematické získat vzorek s uniformní distribucí velikosti částic, což může vést ke komplikacím s disolučním profilem léčiva nebo k nerovnoměrnému odbourávání použitých biodegradovatelných polymerů.

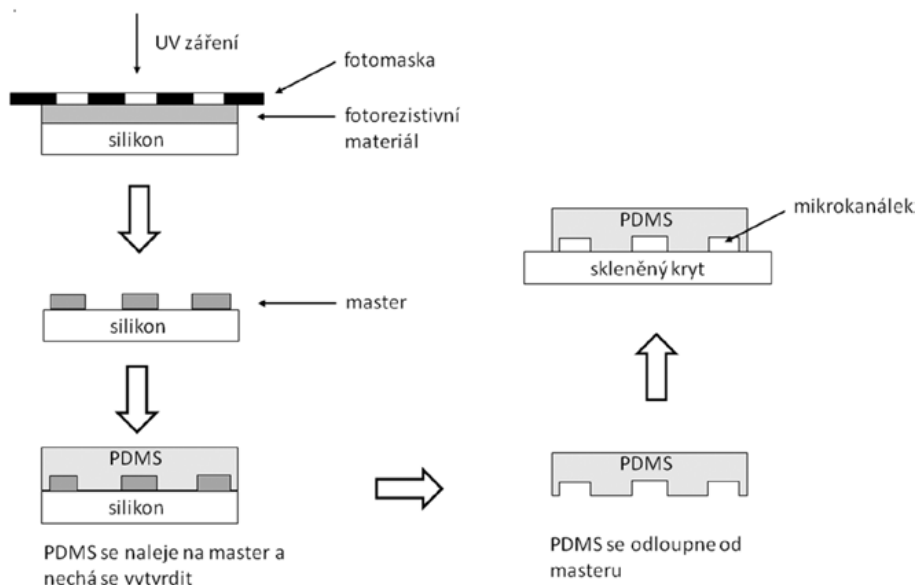
Předkládaný přehledový článek uvádí informace o základních uspořádáních mikrofluidní soustavy používaných k tvorbě emulzních kapek a možném využití mikrofluidní soustavy jako podstavy pro tradiční techniky přípravy mikročásteček za účelem zisku mikročásteček s definovanou velikostí a úzkou distribucí.

Mikrofluidní generování emulzí

Původní uspořádání mikrofluidních systémů počítalo s použitím mísitelných kapalin. Hlavní myšlenkou bylo významné zmenšení měřítka chemických a biochemických reakcí, z čehož plyne nízká spotřeba reakčního materiálu, rychlost procesu a možnost skládat několik podobných provedení za sebou. Vzhledem k tomu se technika řadí mezi tzv. „A lab on a chip“ metody¹²⁾. Teprve později se začalo uvažovat o použití dvou a více nemísitelných kapalin, což následně umožnilo vznik směru droplet-based mikrofluidiky.

Celá mikrofluidní soustava se skládá z několika komponentů: dávkujícího zdroje kapalin ve formě injekční

stříkačky v lineárním dávkovači či specializované mikrofluidní pumpy, spojovacích elementů a mikrofluidních čipů, které představují samotné srdce metody. V těchto čípech se nacházejí mikrokanálky různých prostorových uspořádáních, délek a průměrů. Dříve se v mikrofluidních čípech využíval zejména křemík, sklo a kovy. Tyto materiály měly řadu výhod, například vynikající stabilitu povrchu, kompatibilitu s rozpouštědly a vhodné optické vlastnosti. Hlavní nevýhodou byly vysoké náklady spojené s cenou materiálu a způsobem výroby¹⁾. Proto byly tradičně používané materiály nahrazeny polymery. Vzhledem ke své jednoduchosti výroby, poměrně nízké fluorescenci pozadí (což usnadňuje vizualizaci tvorby částic při využití fotoluminiscenčních metod) a dobré biologické kompatibilitě je standardním materiálem používaným pro výzkumné účely poly(dimethylsiloxan) (PDMS), a to jak pro kontinuální tok, tak pro droplet-based techniky²⁾. PDMS je biokompatibilní, transparentní a snadno tvarovatelný elastický polymer, který je elektricky nevodivý a propustný pro kyslík i oxid uhličitý. Nevýhodou PDMS je jeho deformace v přítomnosti silných organických rozpouštědel. Proto se v některých případech používají i materiály odolnější vůči rozpouštědlům, například polykarbonát, cyklický kopolymer olefinu, polyamidová plastická pryskyřice a thiolen^{13,14)}. K výrobě čipů se v současnosti používají především soft-litografické techniky. Pro přípravu PDMS čipů se obvykle pomocí standardní kontaktní fotolitografie vyrobí tzv. master (předloha) a z tohoto masteru se generuje replika nalitím již namíchané směsi PDMS, s následným odplyněním a vytvrzováním (obr. 1). Pokud se pro mikrofluidní experimenty používají vodná rozpouštědla, není obvykle nutné další řešení utěsnění hadiček a spojů, protože gumový charakter PDMS velmi těsně uzavírá všechny mezery. Pokud se však používají kapaliny olejové povahy, je často nutné materiál čipu ještě dále upravit, např. ošetřením čipu kyslíkovou plazmou pro získání OH⁻ terminálních zakončení,



Obr. 1. Zjednodušené schéma přípravy PDMS čipu kontaktní fotolitografií (upraveno dle²⁾)

což vede k vytvoření kovalentní vazby PDMS těla čipu a skleněného krytu²⁾.

Povrchovou modifikací mikrofluidních kanálků mohou být změněny jejich smáčivé vlastnosti. Obdobně se dá využít i změna koncentrace povrchově aktivní látky rozpuštěné v kontinuální fázi¹⁵⁾. Monodisperzní emulze typu o/v i v/o mohou být připraveny ve stejném zařízení, ale je nezbytné správně zvolit povrchově aktivní činidlo, které je přidáváno do vodné nebo olejové fáze¹⁶⁾. Pro droplet-based techniku je smáčivost stěn a jejich odolnost proti organickým rozpouštědlům obzvláště důležitá. Důležitými faktory pro řízenou tvorbu kapek jsou fyzikální vlastnosti využitých kapalin, geometrie mikrofluidního zařízení a procesní podmínky. Tvorba kapek v mikrofluidním zařízení může být ovlivněna např. regulací průtoku a vstupního tlaku obou fází¹⁷⁾. Zvýšením průtoku kontinuální fáze může být snížena velikost kapek. Zvýšením průtoku olejové fáze se zase zvyšuje frekvence tvorby kapek¹⁸⁾. Existují tři základní typy mikrofluidních geometrií, které se používají pro tvorbu kapek, a to uspořádání ve tvaru T (T-junction), soustředný tok (flow focusing) a souběžné uspořádání (co-flowing)¹⁹⁾.

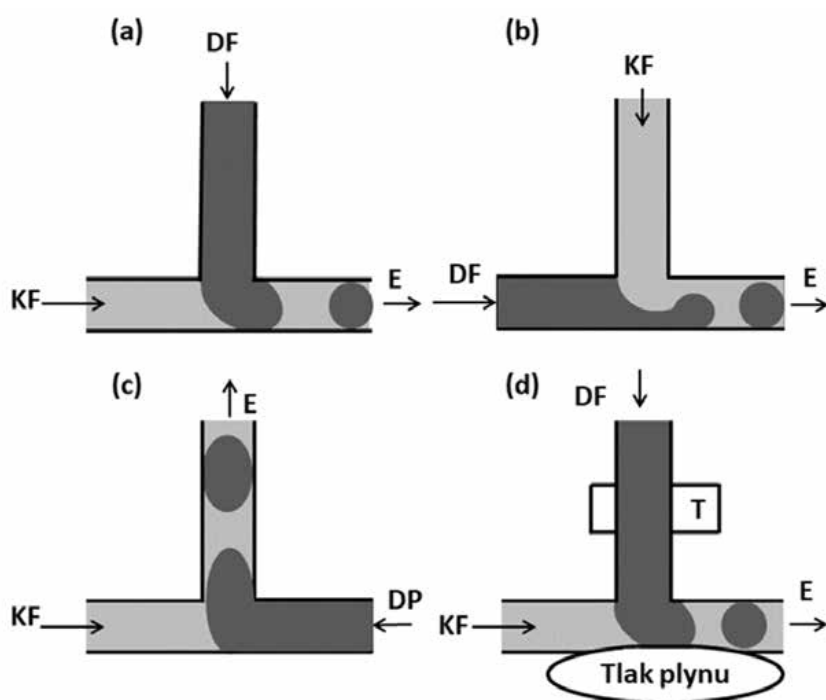
Uspořádání typu „T“

Geometrické uspořádání typu T představuje nejjednodušší mikrofluidní strukturu pro tvorbu emulzních kapek¹⁶⁾. Uspořádání je tvořeno horizontálním kanálem a kanálem na něj kolmým²⁰⁾. Hlavním kanálem proudí kapalina kontinuální (vodné) fáze a disperzní kapalina (lipofilní fáze) se vstříkuje přes kolmý kanál (tzv. cross-flowing)²¹⁾. Nejdříve dispergovaná kapalina z kolmého kanálku zaplní část horizontálního kanálku. Na tuto část

dispergované kapaliny ale okamžitě působí tok kontinuální fáze, a tedy i vyvolané smykové napětí. Tlak proti proudu vyvíjející se kapky způsobí, že se čelo dispergované fáze naruší směrem dolů a dojde k rozpadu za vzniku kapky¹⁶⁾, kdy proud kontinuální fáze v horizontálním kanálku v podstatě odstříhne část dispergované fáze o hranu kanálku (obr. 2a)²²⁾. Používají se i uspořádání, kde jsou fáze prohozeny. V horizontálním kanálku je dispergovaná fáze a v kolmém kanálku je kontinuální fáze (tzv. perpendicular flowing). Obvykle se používají dva kolmé kanálky k lepšímu odstřížení. V tomto uspořádání je kapka odstřížena jen pomocí proudění kontinuální fáze (obr. 2b)²²⁾. Velikost kapek lze měnit změnou průtoku kapaliny, šířkou kanálu nebo změnou poměru viskozit mezi oběma fázemi¹³⁾. Zvýšení teploty se projevuje vznikem větších kapek vzhledem ke změně viskozity a mezifázového napětí kapalin²³⁾.

Dále však existuje celá řada úprav tohoto uspořádání. Jedním z nich je např. tzv. „head-on“ geometrie, u které jsou dvě tekutiny vstříkovány ze dvou protilehlých stran hlavního kanálu a vznikající kapky jsou odstřihovány do ortogonálního (kolmého) kanálu (obr. 2c). Existují i varianty klasického uspořádání s pohyblivými stěnami, což umožňuje regulaci průsvitu, a tedy i lepší možnost regulace velikosti částic (obr. 2d)¹⁶⁾.

Dříve se většina studií zabývajících se tvorbou kapek v mikrokanálech věnovala především tradičním systémům, ve kterých se vyskytovaly pouze Newtonské kapaliny. S rozšířením mikrofluidní techniky do nejrůznějších odvětví je třeba zohlednit také využití nenevtonských kapalin. Jedná se o kapaliny, u kterých není rychlost deformace úměrná napětí. Zkoumáním procesu emulgace

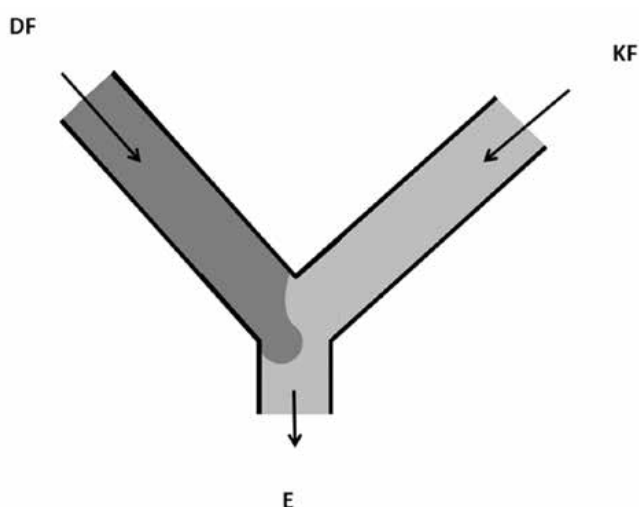


Obr. 2. Uspořádání typu T (přepřacováno dle¹⁶⁾): a – standardní T uspořádání, b – T uspořádání se vstříkovaním disperzní fáze přes hlavní kanál, c – T uspořádání s „head-on“ geometrií, d – aktivní T geometrie s řízenou pohyblivou konstrukcí stěn, zde zvýšením tlaku vzduchu/plynu v přiléhající struktuře
 DF – dispergovaná fáze, KF – kontinuální fáze, E – emulze

v T uspořádání pro neneutonské/newtonské systémy se zabývali například Husny a Cooper-White²⁴). Autoři srovnávali tvorbu polymerních kapek a rozpadovou dynamiku u nízko viskózních polyethylenoxidových tekutin a newtonských tekutin²⁴). Gu a Liow²⁵) zkoumali tvorbu kapek xanthanové klovatiny v oleji při různých průtokových podmínkách. Se vrůstajícím průtokem roztoku xanthanové klovatiny exponenciálně klesala doba tvorby kapek. Kritická rychlost průtoku roztoku byla stanovena na 0,35 ml/h. Nad touto hodnotou již doba tvorby kapek neklesala exponenciálně. Zjištěno také bylo, že se vzrůstající viskozitou roztoku klovatiny se také zvětšuje průměr kapek a doba jejich vzniku²⁵).

Uspořádání typu „Y“

Geometrické uspořádání Y je modifikací geometrie T. V tomto uspořádání jsou kontinuální a dispergová-

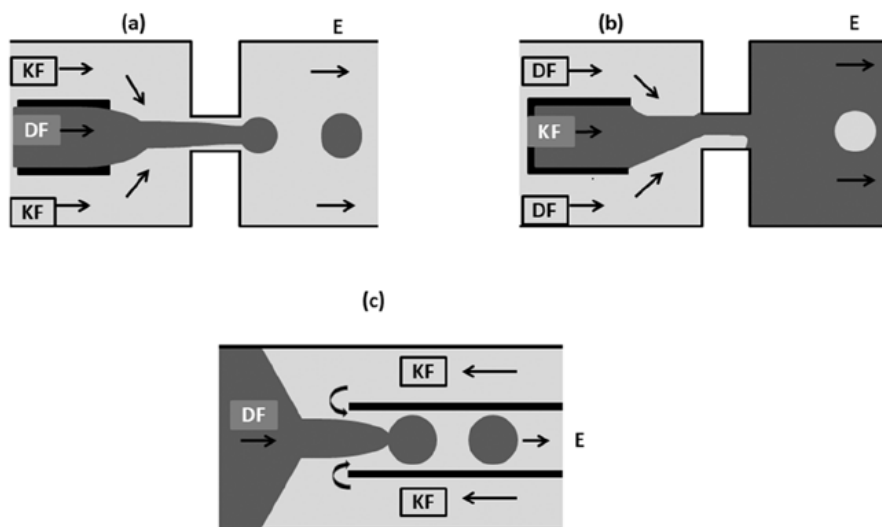


Obr. 3. Uspořádání typu Y (přepřacováno dle¹⁶)
DF – dispergovaná fáze, KF – kontinuální fáze, E – emulze

ná fáze také přiváděny dvěma oddělenými vstupními kanály a emulze odchází prostřednictvím společného výstupního kanálu (obr. 3). Velikost kapek vytvořených v tomto uspořádání není závislá na průtokové rychlosti a viskozitě dispergované fáze, což je odlišnost od uspořádání tvaru T. Při použití dvou kapalin s nízkým Reynoldsovým číslem dochází ve společném kanálu k paralelnímu laminárnímu proudu obou kapalin. Mísení těchto dvou proudů může probíhat pouze difuzí a je omezeno na šířku středu kanálu. Tento jev je využit v řadě oblastí, např. diagnostika krve, tvorba anizotropních (Janusových) částic atd.¹⁶).

Uspořádání typu soustředného toku (flow-focusing)

Další velmi často používanou strukturou je soustředné uspořádání (obr. 4). Je široce využíváno pro tvorbu sférických monodisperzních kapek²²). V této geometrii dochází k rychlé a kontinuální tvorbě kapek za využití proudu nemísitelných kapalin²⁶). Princip tvorby kapky se poněkud liší od těch, které byly vytvořeny v geometrii T. Za normálních podmínek by při soustředném toku vznikala kapka s významně větší délkou, než je průměr kanálku, a bez další regulace pak mohou vznikat příliš velké částice, což je samozřejmě nežádoucí. Proto se při této metodě využívají průtokové otvory, které v kombinaci s dalšími faktory, jako jsou viskozita a rychlost toku, slouží jako nástroj k regulaci velikosti částic²⁷). Disperzní fáze proudí středovým kanálem a kontinuální fáze je přiváděna přes dva vnější kanály. Obě kapaliny jsou nuceny společně protéci malým otvorem umístěným po proudu toku. Kontinuální fáze způsobuje tlakové a smykové napětí, které stlačuje disperzní fázi do velmi tenkého niťovitého proudu, který se rozkládá v nebo za průtokovým otvorem¹⁶). U pomalého proudění vzniká hned za průtokovým otvorem kulatá kapka. Se zvyšující se rychlostí dochází za průtokovým otvorem k pro-



Obr. 4. Uspořádání typu soustředného toku (přepřacováno dle¹⁶): a – standardní uspořádání, b – uspořádání soustředného toku s kontinuální fází dodávanou přes středový kanál, c – soustředný tok s protiproudem
DF – dispergovaná fáze, KF – kontinuální fáze, E – emulze

nikání disperzní fáze do odtokového kanálku. Kapky se tvoří na konci takto vzniklého proudu v odtokovém kanálku (obr. 4a). V tomto základním uspořádání kapalina ve středním kanálu nesmáčí stěny otvoru, a proto jsou k přípravě emulzí potřeba hydrofilní či hydrofobní stěny. Pokud kapalina ve středním kanálu smáčí stěny otvoru, jsou kapky vytvářeny z kapaliny protékající vnějšími kanály, a to po proudu od ústí (obr. 4b). Existuje také alternativní uspořádání s počátečním protiproudem (obr. 4c). Kontinuální a dispergovaná fáze nejprve proudí v hlavním kanálu proti sobě, čímž dochází k deformaci středového toku dispergované fáze a odstříhnutí kapek, aby následně obě fáze protékaly soustředně menším koaxiálním kanálem, dispergovaná fáze již tedy ve formě kapek¹⁶⁾.

Při metodě soustředného toku se objevují dva režimy: odkapávání a tryskání. Režim odkapávání probíhá při nízkých průtokových rychlostech a vznikají při něm vysoce uniformní sférické kapky. K tryskání dochází při vyšších rychlostech průtoku a jeho výhodou je rychlejší příprava²²⁾.

Uspořádání typu souběžného toku (co-flowing)

Další technika používaná ke generování kapek je mikrofluidní systém souběžného toku. Tato metoda je podobná metodě soustředného toku, kde je disperzní fáze umístěna v kapiláře nebo jehle, kolem které proudí kontinuální fáze, tentokrát však bez zúžení průtokového otvoru (obr. 5). Kapky se tvoří přímo na hrotu jehly nebo kapiláry. Tvorba kapek je způsobena viskózním tlakem vyvíjeným na rozhraní vnějším proudem²⁸⁾. Kapky mohou být vytvořeny přímo na špičce trubice nebo jehly, k čemuž dochází v kapacím režimu, nebo se kapky generují do hlavního kanálu ke konci proudění tekutiny v režimu tryskání. Při režimu tryskání dochází k rychlejšímu toku a disperzní fáze vytváří tenký proud, který se rozpadá na kapky²²⁾.

Všechny zmíněné metody jsou základními možnostmi pro přípravu jednoduchých emulzí, a to jak přímých, tak i obrácených. Kombinací dvou a více jednotek generujících kapky mohou být částice vytvořené v první

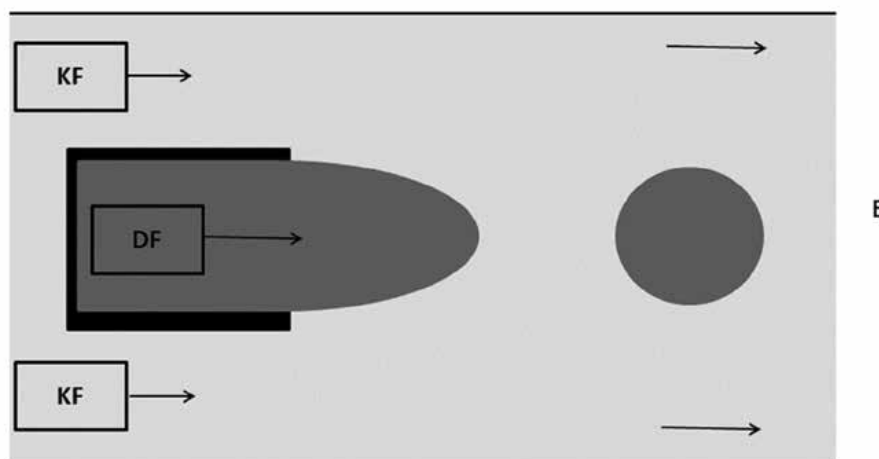
jednotce, zapouzdřeny uvnitř kapek tvořících se v dalších připojených jednotkách. Generují se tedy kapky tvořené dvojitou, trojitou nebo vícenásobnou emulzí. Přesného a individuálního řízení velikosti vnitřních a vnějších kapiček lze dosáhnout úpravou průtokových rychlostí v každém kroku generujícím kapky. Zatímco jsou kapky pravidelně vytvářeny v každé jednotce, může být také počet vnitřních kapiček uvnitř vnější kapky přesně regulován tím, že se v každé jednotce upraví frekvence tvorby kapek²⁹⁾.

Mikrofluidní příprava mikročastic

Využití mikrofluidní techniky se přímo nabízí například při přípravě mikročastic metodou odpaření rozpouštědla. Metoda využívá dvou téměř nemísitelných fází, ze kterých se připravuje velice jemná emulze³⁰⁾. Problematická je fáze homogenizace emulze, kdy lze využitím mechanických homogenizátorů dosáhnout velmi malých rozměrů kapek (a následně tedy i částic), velikostní distribuce je ale poměrně široká³¹⁾. Z podobných důvodů v úvahu připadají i další techniky přípravy, např. příprava lipofilních částic ve vodném prostředí nebo příprava mikročastic z gelotvorných látek. Zapojení mikrofluidní techniky umožňuje vytvářet emulzní kapky s přesně kontrolovanou velikostí (v některých případech méně než 1% variace, v rozměrech milimetrů až mikrometrů a dokonce i stovek nanometrů), tvarem a složením³²⁾. Mikrofluidní techniky navíc umožňují tvorbu vícefázových a anizotropních částic³³⁾. Příprava založená na této technice je omezena z hlediska rychlosti přípravy, protože mikročástice jsou generovány v jediném kanálku³⁴⁾. Tento problém je ale možné částečně odstranit zapojením většího množství mikrofluidních zařízení.

Příprava sférických mikročastic

Jako jedni z prvních demonstrovali tvorbu mikrosfér pomocí mikrofluidního zařízení Nakajima et al. Připravovali pevné lipidové mikrosféry vyrobené z hydrogenovaného rybího oleje. Kapky oleje ve vodě byly vy-



Obr. 5. Uspořádání typu souběžného toku (přepřacováno dle¹⁶⁾)

DF – dispergovaná fáze, KF – kontinuální fáze, E – emulze

tvořeny za pomoci mikrofluidního zařízení při teplotě 70 °C, při nižší teplotě poté ztuhly a byly lyofilizovány za vzniku pevných mikrosfér o rozměrech 20 µm. Variační koeficient velikosti částic byl menší než 5 %, což bylo významné zlepšení oproti tradičně používaným metodám³⁵.

Využití mikrofluidní techniky je možné také při přípravě monodisperzní částic gelačními metodami. Příkladem mohou být mikročástice tvořené poly(*N*-isopropylakrylamidem); vodná fáze obsahovala monomer *N*-isopropylakrylamid, síťující látka byla *N,N*-metylenbisakrylamid a kontinuální fázi tvořil roztok peroxidisíranu amonného³⁶. Tohoto principu bylo využito i ve studii Hwang et al., kdy byly připraveny prostřednictvím mikrofluidní techniky soustředného toku částice s poly(*N*-isopropylakrylamidem) s nízkým variačním koeficientem velikosti (1,2 %) ³⁷.

Monodisperzní mikročástice je vzhledem k mikrofluidní sestavě možné připravit také u metody odpaření rozpouštědla. Ve studii Xu et al. byly soustředným tokem připraveny částice o dvou definovaných velikostech 11 a 41 µm, přičemž nejvyšší hodnota polydisperzního indexu dosahovala pouze 3,9 %. Jako modelové léčivo byl použit bupivakain, který byl rozpuštěn ve vnitřní dispergované fázi PLGA/dichlormethan, kontinuální fáze byl vodný Tris pufr s polyvinyl alkoholem (1%) jako emulgátorem³⁸.

Pro léčbu proliferativní vitreoretinopatie byly syntetizovány mikročástice obsahující kortikoid dexamethason. Byla využita mikrofluidní geometrie typu T pro vytvoření částic na bázi oxidu křemičitého s velkým povrchem a porézní strukturou. Kontinuální fáze byla tvořena minerálním olejem obsahujícím 2 % Span® 80 a disperzní fází byla 20% suspenze nanočástic oxidu křemičitého. Po odpaření vody a kalcinaci byl na krystalové mikročástice nanesen polymerní roztok PLGA obsahující dexamethason, který vyplnil všechny póry mikročástice³⁹.

Manipulací s mezifázovou nestabilitou emulzních kapek během procesu odpařování rozpouštědla mohou být vyrobeny mikročástice se zvrásněným povrchem⁴⁰.

Příprava nesférických mikročástic

Kromě velmi přesné kontroly nad velikostí částic v mikrometrovém měřítku poskytuje mikrofluidika také ojedinelou možnost vytvářet nesférické částice kontrolovaného tvaru. Takové částice je velmi náročné připravit pomocí tradičních metod. Problémem je zejména vliv povrchového napětí, které nutí tvořící se částici zaujmout pravidelný tvar koule⁴¹.

Nesférické mikročástice mohou být produkovány prostřednictvím změny vnitřních rozměrů kanálku a současného využití UV zářiče, který působí na částice obsahující polymer citlivý na tento typ záření (UV polymerizace). Působením UV záření je možné získat částice ve tvaru tyčinek nebo disků. Pomocí mikrokanálku, který má rozměry menší než velikost tvořící se emulzní kapky, můžeme získat částice ve tvaru disku nebo kolíku (plug shape) v závislosti na dimenzích prostoru ka-

nálku⁴². Ke tvarování částic v kanálku se využívá také snížení teploty nosné kapaliny, které vede ke vzniku diskovitých částic. Při zvýšení průtokové rychlosti je možné získat také částice ve tvaru elipsoidu⁴³.

Nesférické částice mohou být také tvořeny z kapek obsahujících dvě nemísitelné fáze, přičemž jednu z fází je možné posléze vytvrdit. Tyto kapky mohou být dvoufázové organické útvary, které jsou dispergované v kontinuální vodní fázi nebo dvojité emulzní kapky (v/o/v). Kapky obsahující dvě organické fáze (fotopolymerizovatelný akrylát a silikonový olej) byly připraveny pomocí mikrofluidního zařízení uspořádaného v Y geometrii. Organické fáze byly přiváděny odděleně pomocí dvou ramen kanálku. Na Y křižovatce se vytvořil paralelní proud dvou organických fází. Tento dvoufázový proud následně vstoupil do proudu vodné fáze, která obklopuje proud organických fází z vnějších stran. Jako vodná fáze byl použit 0,3% roztok dodecylsulfátu sodného. Vlivem působení povrchově aktivní látky a UV polymerizací vytvrditelné části kapek se tvořily částice ve tvaru kukuřičných zrn. Částice vykazovaly vlastnosti tzv. Janusových částic (viz dále)⁴⁴. U dvojitých emulzních kapek v/o/v může manipulace s mezifázovou energií pomocí povrchově aktivní látky způsobit tvorbu asférických kapek typu jádro-plášť ve tvaru žaludu. UV polymerizací střední olejové fáze dochází k produkci miskovitých částic, které mají tvar závislý na objemu a složení olejové fáze. Tyto mikročástice mohou být využity jako řízené mikrokontejnery pro uvolnění nebo vychytání další substance⁴⁵.

Janusovy mikročástice

Janusovy částice jsou nejjednodušším případem nepravidelných nebo středově nesymetrických částic. Jsou pojmenovány podle římského boha Januse, který měl dvě různé tváře. Tyto anizotropní částice totiž mají dvě nebo více prostorových oblastí, které mají různé povrchové, strukturní nebo materiálové vlastnosti. Částice se dále mohou lišit z hlediska magnetických, fluorescenčních a optických charakteristik⁴⁶. Obecně se dají Janusovy mikročástice vyrobit mikrofluidní technikou pomocí řízeného toku. Rovnoměrné mikročástice se vytvoří současným odříznutím dvou paralelních proudů. Následná UV polymerizace kapiček (obě části mikročástice jsou vytvrditelné) zajišťuje jejich ztuhnutí dříve, než se obě fáze promíchají⁴⁷. Janusovy částice mohou napodobovat chování povrchově aktivních látek a mohou být využity jako nové nosiče pro doručení léků do specifických míst v těle. Příkladem mohou být anizotropní částice obsahující v jedné části pouze PLGA a v druhé PLGA a modifikovaný (acetalovaný) dextran s navázaným cytostatikem irinotekanem. Vlivem kyseleho pH prostředí dochází k odštěpení dextranu a uvolnění léčiva⁴⁸.

Příprava porézních mikročástic

Mikročástice s porézní strukturou se jeví jako slibné systémy pro dodávání léků, adsorpční materiály a senzory. Pórovité mikročástice mohou být vyráběny vytvořením

pórů ze seskupení povrchově aktivní látky, emulzních kapiček, bublin a prostorů pro separaci fází v prekurzorech mikročastic. Takové šablony pórů lze jednoduše aplikovat na kapky mikrofluidní emulze za vzniku mikročastic s řízenou porézní strukturou²⁹. Porézní částice je možné vyrobit z poly(*N*-isopropylakrylamid) pomocí mikrofluidní emulgace. K polymerizaci vodné fáze o/v/o umístěné v ledové vodní lázni dochází vlivem působení UV záření. Vytvoří se mikrogel poly(*N*-isopropylakrylamidu) s rovnoměrně rozptýlenými jemnými olejovými kapičkami, které slouží jako porogeny. Olejové kapičky jsou následně vytlačeny z mikrogelu promýváním isopropanolem a deionizovanou vodou⁴⁹. Porézní struktury mohou být vytvořeny v mikročasticích pomocí kombinace generování plynových bublin s procesem ztuhnutí mikročastic. Příkladem může být včlenění H₂O₂ do vodných kapek obsahujících fotopolymer NOA 61 (Norland Optical Adhesive 61). Působením UV záření dochází k rozkladu peroxidu vodíku na O₂ a H₂O. Následným zahřátím na 60 °C dochází k úniku bublinek kyslíku a vzniku mikročastic s porézní strukturou⁵⁰.

Přesné ovlivnění porézní struktury umožňuje efektivní cestu k modulaci profilu uvolňování léčiva z mikročastic.

Příprava core-shell mikročastic

Pro vytvoření částic s vnitřním jádrem poskytují dvojité emulze ideální šablonu. Vnitřní kapičky mohou sloužit jako šablony pro tvorbu jádrového prostoru a vnější kapičky pro tvorbu vnějšího pláště. Využití mikrofluidní techniky umožňuje přesné ovlivnění velikosti vnitřních a vnějších kapek pro jemné doladění velikosti jádra a pláště. Taková metoda umožňuje vytvořit komorové částice s pláštěm s různými složeními a funkcemi²⁹. Tyto částice mohou poskytnout účinnou kontrolu kinetiky uvolňování léčiva a zabránit náhlému počátečnímu uvolnění léčiva. Léčivo je zpravidla umístěno v jádru mikročastic a plášť podporuje difuzi média směrem k jádru a tok léčiva do okolí. Plášť umožňuje omezení *burst efektu*⁵¹.

Khan et al. vyvinuli vícesložkové částice methylakrylátu typu jádro-plášť. V jádru se nacházelo nesteroidní antiflogistikum ketoprofen a v plášti bylo umístěno antiulcerózum ranitidin. Pro přípravu mikročastic byla využita mikrofluidní geometrie typu T. Vzniklé mikročastice byly polymerizovány UV zářením, což zajistilo integritu dvou aktivních molekul léčiva. Pro zapouzdření jádra bylo nutné zvolit vhodnou koncentraci hydrofilního monomeru a povrchově aktivní látky⁵². Kombinace dvou léčiv byla použita také při výrobě částic obsahujících kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) a polymléčnou kyselinu (PLA). V plášti byl umístěn doxorubicin a PLGA a jádro bylo tvořeno paklitaxelem a PLA⁵³.

Závěr

Mikrofluidní techniky představují novou moderní metodu vhodnou pro přípravu mikro- a nanočastic. Jed-

ná se o možnou inovaci již známé metody odpaření rozpouštědla pro přípravu mikročastic. Pořízení mikrofluidního zařízení přitom nemusí představovat výrazné finanční náklady. Jednoduché zařízení je možné vyrobit v laboratorních podmínkách za využití běžných pomůcek, jako jsou například jehly, stříkačky a hadičky. Vzhledem k vynikající schopnosti mikrofluidní strategie přesně řídit velikost, tvar, počet a složení emulzních šablon lze flexibilně vyrábět pokročilé mikročastice s kontrolovanou strukturou a funkcemi. Další intenzivní výzkum této metody a také použitelných materiálů by mohl přispět k využití této metody v průmyslu a vést k vytvoření vysoce hodnotných částic.

Publikace vznikla v rámci projektu QK1810221, NAZV – Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ČR na období 2017–2025, ZEMĚ; a projektu CZ.02.1.0 1/0,0/0,0/15_003/0000495 – Operační program výzkum, vývoj, vzdělávání, Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Střet zájmů: žádný.

Literatura

1. **Pihl J., Karlsson M., Chiu D. T.** Microfluidic technologies in drug discovery. *Drug Discov. Today* 2005; 10, 1377–1383.
2. **Seemann R., Brinkmann M., Pfohl T., Herminghaus S.** Droplet based microfluidics. *Rep. Prog. Phys.* 2001; 75, 016601.
3. **Grym J., Foret F.** Mikrofluidika: Nový způsob úpravy a vnášení vzorku pro hmotnostní spektrometrii. *Chem. Listy* 2005; 99, 915–921.
4. **Minteer S. D.** (ed.). *Microfluidic techniques: reviews and protocols.* Springer Science & Business Media 2006.
5. **Šnejdrová E., Dittrich M.** Poly (α -hydroxyacids) as Drug Carriers. *Chem. Listy* 2011; 105, 27–33.
6. **Cai Y., Wei L., Ma L., Huang X., Tao A., Liu Z., Yuan W.** Long-acting preparations of exenatide. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013; 7, 963–970.
7. **Mohamed F., van Der Walle C. F.** Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97, 71–87.
8. **Gaumet M., Gurny R., Delie F.** Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009; 36, 465–473.
9. **Gasparini G., Kosvintsev S. R., Stillwell M. T.** Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification. *Colloids Surf. B* 2008; 61, 199–207.
10. **Vasiliauskas R., Liu D., Cito S., Zhang H., Shahbazi M. A., Sikanen, T.** Simple microfluidic approach to fabricate monodisperse hollow microparticles for multidrug delivery. *ACS Appl. Mater.* 2015; 7, 14822–14832.
11. **Bajerová M., Dvořáčková K., Gajdziok J., Masteiková R., Rabišková M.** Metody přípravy mikročastic ve

- farmaceutické technologii. *Čes. slov. Farm.* 2009; 58, 191–199.
12. **Klusoň P., Stavárek P., Hejda S., Pěnkavová V., Bendová M., Vychodilová H.** Mikroreaktory a mikrofluidní reaktory pro syntézu speciálních chemikálií. *Chem. Listy* 2016; 110, 892–899.
 13. **Teh S. Y., Lin R., Hung L. H., Lee A. P.** Droplet microfluidics. *Lab. Chip.* 2008; 8, 198–220.
 14. **Fontana F., Ferreira M. P. A., Correia A., Hirvonen J., Santos H. A.** Microfluidics as a cutting-edge technique for drug delivery applications. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016; 34, 76–87.
 15. **Xu J. H., Li S. W., Tan J., Wang Y. J., Luo G. S.** Controllable preparation of monodisperse O/W and W/O emulsions in the same microfluidic device. *Langmuir* 2006; 22, 7943–7946.
 16. **Vladislavjevic G. T., Khalid N., Neves M. A., Kuroiwa T., Nakajima M., Uemura K.** Industrial lab-on-a-chip: design, applications and scale-up for drug discovery and delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65, 1626–1663.
 17. **Ward T., Faivre M., Manouk A., Stone H. A.** Microfluidic flow focusing: Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis* 2005; 26, 3716–3724.
 18. **Bashir S., Rees J. M., Zimmerman W. B.** Simulations of microfluidic droplet formation using the two-phase level set method. *Chem. Eng. Sci.* 2011; 66, 4733–4741.
 19. **Utada A. S., Fernandez-Nieves A., Stone H. A., Weitz D. A.** Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams. *Phys. Rev. Lett.* 2007; 99, 094502.
 20. **Zhao C. X.** Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65(11), 1420–1446.
 21. **Garstecki P., Fuersteman M. J., Stone H. A., Whitesides G. M.** Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction – scaling and mechanism of break-up. *Lab. Chip.* 2006; 6, 437–446.
 22. **Zhao C. X., Middelberger A. P. J.** Two-phase microfluidic flows. *Chem. Eng. Sci.* 2011; 66, 1394–1411.
 23. **Hoa P. C., Yap Y. F., Nguyen N. T., Chee-Kiong Ch. J.** Thermally mediated droplet formation at a microfluidic T-junction. *Micro Nanosyst.* 2011; 3, 65–75.
 24. **Husny J., Cooper-White J. J.** The effect of elasticity on drop creation in T-shaped microchannels. *J. Nonnewton Fluid Mech.* 2006; 137, 121–136.
 25. **Gu Z., Liow J. L.** Microdroplet formation in a T-junction with xanthan gum solutions. *Chemeca 2011: Engineering a Better World: Sydney Hilton Hotel, NSW, Australia 18–21 September 2011*; 1442.
 26. **Weinmeister R., Freeman E., Eperon I. C., Stuart A. M., Hudson A. J.** Single-Fluorophore Detection in Femtoliter Droplets Generated by Flow Focusing. *ACS Nano.* 2015; 9, 9718–9730.
 27. **Chen X., Glawdel T., Cui N., Ren C. L.** Model of droplet generation in flow focusing generators operating in the squeezing regime. *MICROFLUID NANOFLUID* 2015; 18, 1341–1353.
 28. **Gañán-Calvo A. M., Montanero J. M., Martín-Banderas L., Flores-Mosquera M.** Building functional materials for health care and pharmacy from microfluidic principles and flow focusing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65, 1447–1469.
 29. **Zhang M., Wang W., Xie R., Ju X., Liu Z., Jiang L., Chu L.** Controllable microfluidic strategies for fabricating microparticles using emulsions as templates. *Particuology* 2016; 24, 18–31.
 30. **Vysloužil J., Dvořáčková K., Kejdušová M., Rabišková M.** Příprava léčivých mikročásteček metodou odpařování rozpouštědla. *Chem. Listy* 2013; 107, 16–23.
 31. **Vysloužil J., Doležel P., Kejdušová M., Košťál V., Beneš L., Dvořáčková K.** Long-term controlled release of PLGA microparticles containing antidepressant mirtazapine. *Pharm. Dev. Technol.* 2016; 21, 214–221.
 32. **Chu L. Y., Utada A. S., Shah R. K., Kim J. W., Weitz D. A.** Controllable monodisperse multiple emulsions. *Angewandte Chemie* 2007; 119, 9128–9132.
 33. **Hood R. R., Wyderko T., Devoe D. L.** Programmable digital droplet microfluidics using a multibarrel capillary bundle. *Sens. Actuators B Chem.* 2015; 220, 992–999.
 34. **Kim C. M., Park S. J., Kim G. M.** Applications of PLGA microcarriers prepared using geometrically passive breakup on microfluidic chip. *Int. J. Precis. Eng. Manuf.* 2015; 16, 2545–2551.
 35. **Sugiura S., Nakajima M., Tong J., Nabetani H., Seki M.** Preparation of monodispersed solid lipid microspheres using a microchannel emulsification technique. *J. Colloid Interface Sci.* 2000; 227, 95–103.
 36. **Shah R. K., Kim J. W., Agresti J. J., Weitz D. A., Chu L. Y.** Fabrication of monodisperse thermosensitive microgels and gel capsules in microfluidic devices. *Soft Matter.* 2008; 4, 2303–2309.
 37. **Hwang M. Y., Kim S. G., Lee H. S., Muller S. J.** Generation and characterization of monodisperse deformable alginate and pNIPAM microparticles with a wide range of shear moduli. *Soft Matter.* 2017; 13, 5785–5794.
 38. **Xu Q., Hashimoto M., Dang T. T., Hoare T., Kohane D. S., Whitesides G. M., Anderson D. G.** Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery. *Small* 2009; 5, 1575–1581.
 39. **Guo R., Sun X. T., Zhang Y., Wang D. N., Yang C. G., Xu Z. R.** Three-dimensional poly (lactic-co-glycolic acid)/silica colloidal crystal microparticles for sustained drug release and visualized monitoring. *J. Colloid Interface Sci.* 2018; 530, 465–472.
 40. **Liu S., Deng R., Li W., Zhu J.** Polymer microparticles with controllable surface textures generated through interfacial instabilities of emulsion droplets. *Adv. Funct. Mater.* 2012; 22, 1692–1697.
 41. **Dendukuri D., Doyle P. S.** The synthesis and assembly of polymeric microparticles using microfluidics. *Adv. Mater.* 2009; 21, 4071–4086.
 42. **Dendukuri D., Tsoi K., Hatton T. A., Doyle P. S.** Controlled synthesis of nonspherical microparticles using microfluidics. *Langmuir* 2005; 21, 2113–2116.
 43. **Xu S., Nie Z., Seo M., Lewis P., Kumacheva E., Stone H. A., Whitesides G. M.** Generation of monodisperse particles by using microfluidics: control over size, sha-

- pe, and composition. *Angewandte Chemie* 2005; 117, 734–738.
44. **Nisisako T., Torii T.** Formation of Biphasic Janus Droplets in a Microfabricated Channel for the Synthesis of Shape-Controlled Polymer Microparticles. *Advanced materials* 2007; 19, 1489–1493.
45. **Wang W., Zhang M. J., Xie R., Ju X. J., Yang C., Mou C. L., Chu L. Y.** Hole-shell microparticles from controllably evolved double emulsions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013; 52, 8084–8087.
46. **Yáñez-Sedeño P., Campuzano S., Pingarrón J. M.** Janus particles for (bio) sensing. *Appl. Mater. Today* 2017; 9, 276–288.
47. **Nie Z., Li W., Seo M., Xu S., Kumacheva E.** Janus and ternary particles generated by microfluidic synthesis: design, synthesis, and self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128, 9408–9412.
48. **Rahmani S., Park T. H., Dishman A. F., Lahann J.** Multi-modal delivery of irinotecan from microparticles with two distinct compartments. *J. Control. Rel.* 2013; 172, 239–245.
49. **Mou C. L., Ju X. J., Zhang L., Xie R., Wang W., Deng N. N., Chu L. Y.** Monodisperse and fast-responsive poly (N-isopropyl acrylamide) microgels with open-celled porous structure. *Langmuir* 2014; 30, 1455–1464.
50. **Gong X., Wen W., Sheng P.** Microfluidic fabrication of porous polymer microspheres: dual reactions in single droplets. *Langmuir* 2009; 25, 7072–7077.
51. **Misra A. C., Lahann J.** Progress of Multicompartmental Particles for Medical Applications. *Adv. Healthc. Mater.* 2018; 7, 1701319.
52. **Khan I. U., Stolch L., Serra C. A., Anton N., Akasov R., Vandamme T. F.** Microfluidic conceived pH sensitive core-shell particles for dual drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2015; 478, 78–87.
53. **Lee W. L., Guo W. M., Ho V. H., Saha A., Chong H. C., Tan N. S., Loo S. C. J.** Delivery of doxorubicin and paclitaxel from double-layered microparticles: The effects of layer thickness and dual-drug vs. Single-drug loading. *Acta Biomater.* 2015; 27, 53–65.