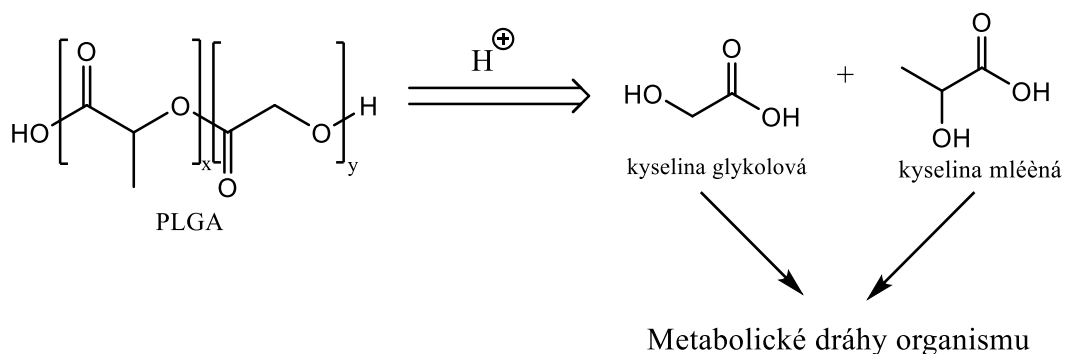


(PLGA). Reakcí těchto kyselin vznikají lineární řetězce polymeru, z kterých lze reakcí s vícesytnými alkoholy získat polymery větvené. Větvené polymery mají oproti lineárním nižší viskozitu a kontinuálnější průběh degradace, které lze využít při uvolňování inkorporovaného léčiva. Dalšími molekulami vhodnými pro přípravu nanočástic mohou být například poly(kaprolakton) nebo poly(alkylkyanoakrylát), také to mohou být polysacharidy, algináty nebo chitosan.<sup>13 14</sup>

Nejvíce používané jsou polymléčná kyselina a poly(laktidy-co-glykolidy). Jsou to lineární alifatické polyestery, které jsou relativně hydrofobní. Při srovnání PLA a PLGA je PLA více hydrofobní než kopolymer PLGA.<sup>15</sup>

PLGA je pro použití vhodná také z důvodu, že se v organismu rozkládá hydrolyzou na monomery, ze kterých dále vzniká kyselina mléčná a glykolová, kdy obě tyto kyseliny jsou endogenní a tedy snadno metabolizovatelné v Krebsově cyklu (viz obrázek 7). Částice se nikde v organismu nekumulují. Polymery, které se komerčně využívají, je možné získat v několika možných molekulových hmotnostech a uspořádání polymeru v řetězci. PLGA je specifikovaná pomocí čísla, které udává procento jednotlivých zastoupených monomerů v polymeru.<sup>14 16</sup>



Obrázek 1: rozklad polymeru PLGA v organismu

Další možností pro přípravu nanočástic je Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), je to také polyester, který je syntetizovaný polymerací z  $\epsilon$ -kaprolaktonu, otevřením jeho kruhu za současné katalýzy. V organismu je hydrolyzován, toho se využívá i v procesu uvolňování léčiva, které se při rozkladu polymeru uvolňuje do okolí. Hydrolyzován je v několika stupních až na

polymeru, které se od sebe liší poměrem jednotlivých monomerů. V práci byl použit polymer PLGA 5/5 (polymer složený z 50 % kyseliny mléčné a 50 % kyseliny glykolové).<sup>9</sup>

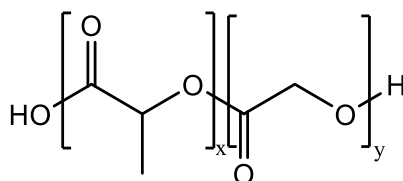
$M_w = 2400 \text{ g/mol}$

$PDI = 1,41$

Polymer A2 je kopolymer PLGA a kyseliny polyakrylové, která zde byla použita jako větvicí složka v 2% koncentraci.

$M_w = 14\,400 \text{ g/mol}$

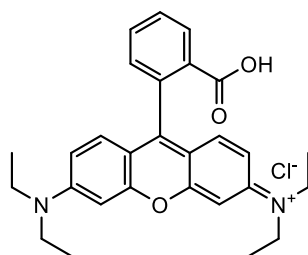
$PDI = 1,67$



Obrázek 2: polymer PLGA

### 2.1.4 Rhodamin B

Rhodamin je krystalická látka zelené barvy krystalů nebo červeno-fialový prášek. Používá se hlavně jako barvivo, je také účinným chelátorem kovů. Je dobře rozpustný ve vodě, jeho roztoky jsou silně fluorescenční. Díky těmto vlastnostem se používá jako fluorochrom v histologii, ve fluorescenční mikroskopii a průtokové cytometrii. Také jako stopovací barvivo pro laserové určení rychlosti proudění a směru proudění vody.<sup>36 37</sup>



Obrázek 3: vzorec Rhodamin B

### 2.3.3 Vznik emulze

Emulze byla tvořena sonifikací ultrazvukovou vysokofrekvenční sondou po dobu 1 minuty při výkonu 100 % za současného chlazení ledem. Emulze vznikala vždy z 1 ml vnitřní organické fáze (2.3.2.), ke které bylo přidáno 0,25 mg Rhodaminu B k enkapsulaci a z 5 ml vnější vodné fáze (2.3.1). Bylo zkoušeno několik způsobů sonifikace do optimalizace podmínek (viz 3.1.1). Po sonifikaci došlo k odpaření organického rozpouštědla, za stálého míchání na magnetické míchače, čímž vznikla suspenze nanočástic. Odpařování trvalo cca 75 min.

### 2.3.4 Měření parametrů částic

Po odpaření rozpouštědla byl připraven vzorek pro měření velikosti částic a zeta potenciálu částic. Vzorek se připravoval ze 100 µl vzniklé suspenze a 4 ml vody. Vzorek byl měřen na Zetasizer ZS 90.

### 2.3.5 Parametry EE, RY, DL

Po změření velikosti, polydisperzity (PDI) a zeta potenciálu byla suspenze nanočástic rozdělena na 4 x 2ml do mikrozkušavek a byla zcentrifugována. Centrifugace byla prováděna po dobu 3 x 15 minut na 7200g/10000 RPM, vždy mezi jednotlivými cykly byl odebrán supernatant a byly přidány 2 ml vody k rozdispergování sedimentu. Po třetím cyklu byl odebrán supernatant a přidán 1 ml acetonitrilu k rozpuštění polymeru. Následně byla u vzorku měřena absorbance při 556 nm proti acetonitrilu a vypočítána koncentrace Rhodaminu B ve vzorku z kalibrační křivky. (viz 2.3.6)

Po měření absorbance byl celý vzorek získaný rozpuštěním centrifugovaného sedimentu vysušen v sušárně při 60°C a následně byla lahvička zvážena pro zjištění hmotnosti využitého polymeru. Ze získaných hodnot byly podle následujících vzorců vypočítány parametry EE, DL, RY.

EE (encapsulation effectivity) enkapsulační efektivita, jaké množství Rhodaminu B bylo enkapsulováno ve vzniklých částicích.

$$EE(\%) = \frac{m(RhB \text{ experimentální})}{m(RhB \text{ navážka})} * 100$$

DL (drug loading) jakou část nanočástice zaujímal navázaný Rhodamin B.

$$DL(\%) = \frac{m(RhB \text{ experimentálně})}{m(po \text{ vysušení vzorku POLYMER} + RHODAMIN B)} * 100$$

RY (recovery yield) výtěžnost polymeru, kolik bylo využito polymeru na vznik nanočástic.

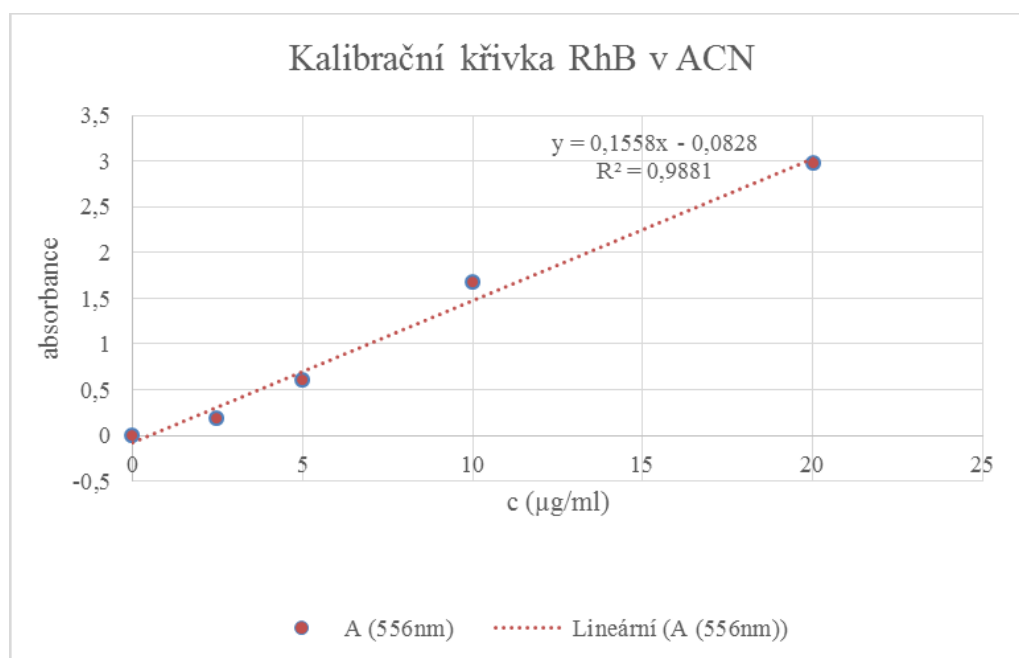
$$RY(\%) = \frac{m(\text{NANOČÁSTICE po vysušení}) - m(\text{RHODAMIN B experimentálně})}{m(\text{POLYMER navážka})} * 100$$

### 2.3.6 Kvantifikace množství Rhodaminu B

Do měrné kyvety byl vložen vzniklý roztok ze sedimentu nanočástic v acetonitrilu a byla měřena absorbance na spektrofotometru při absorpčním maximu Rhodaminu B 556 nm. Ze získané absorbance byla pomocí rovnice kalibrační křivky vypočítána koncentrace enkapsulovaného Rhodaminu B.

$$y = 0,1558x - 0,0828$$

Kde  $y$  je naměřená absorbance a  $x$  je koncentrace enkapsulovaného Rhodaminu B



Obrázek 4: Kalibrační křivka Rhodaminu B v acetonitrilu

## 2.4 Gelová chromatografie

Byl proveden experiment, kdy po vzniku nanočástic emulzní ultrazvukovou metodou byla použita gelová chromatografie pro vyčištění suspenze nanočástic k centrifugaci a dalšímu měření. Pro tento experiment byl pro přípravu nanočástic použit polymer A2 a jako surfaktant 1% Pluronic® F127. (popis metody viz kapitola 2.3) Zde se předpokládala velikost nanočástic 55 nm.

### 2.4.1 Průběh experimentu

Pro přípravu kolony byl použit gel **Sephadex 75** o hmotnosti 2,4 g a 75 ml fosfátového pufru 0,01M. Kolona byla sestavena z vaty a písku u kolíku byrety, dále byl nalitý gel a na vrchu kolony opět písek. Kolona měřila 14 cm.

Po připravení kolony v byretě se několikrát propláchl vodou pro odplavení případných nečistot z použitého písku. Po nalití vzorku nanočástic se po průchodu kolonou zachytávaly jednotlivé frakce po 2 ml do mikrozkušavek, zde se provedlo měření velikosti nanočástic a byly vybrány frakce pro centrifugaci.

Centrifugace byla prováděna při 21380g za stálé teploty 9 °C po dobu 20 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a přidán acetonitril a následně byla měřena abasorbance vzniklého roztoku, stejným výše popsaným způsobem (viz. 2.3.6)

## 2.5 Spontánní emulgace (SEDS)

Další zkoušenou metodou přípravy nanočástic byla metoda spontánní emulgace. Kde byla používána dvě rozpouštědla s odlišnou hydrofilitou. Rozpouštědla byla použita k rozpuštění polymeru v různých poměrech. Jako druhá fáze emulze byl použit vodný roztok PVA nebo Pluronicu F 127 v různých koncentracích. Jako polymer byl použit PLGA 5/5 a enkapsulován byl Rhodamin B. U všech částic byla zjišťována velikost, PDI a zeta potenciál a dále parametry EE, DL, RY.

### 2.5.1 Příprava vnější fáze

Jako vnější vodná fáze byl používán roztok Pluronic® F127 v koncentraci 0,1 % a 1 %. Dále byl používán roztok PVA v koncentracích 1 %, 2 % a 5 %. Vždy bylo použito 10 ml těchto

přidána obě rozpouštědla podle stejného schématu jako v experimentech bez Rhodaminu B.

### 2.5.5 Měření parametrů částic

Po odpaření rozpouštědla byl připraven vzorek pro měření velikosti a zeta potenciálu částic. Vzorek se připravoval ze 100  $\mu$ l vzniklé suspenze a 4 ml vody. Tento vzorek byl měřen na Zetasizeru ZS 90.

### 2.5.6 Výpočet parametrů EE, RY, DL

Po měření parametrů byly vzniklé částice centrifugovány a následně byla zjišťována absorbance roztoku polymeru s Rhodaminem B v acetonitrilu, pro zjištění enkapsulační aktivity.

Suspenze nanočástic byla rozdělena po 4 x 2 ml do mikrozkušavek. Centrifugace byla prováděna po dobu 3 x 15 minut na 7200g/10000 RPM, vždy mezi jednotlivými cykly byl odebrán supernatant a byly přidány 2 ml vody k rozdispergování sedimentu. Po třetím cyklu byl odebrán supernatant a přidán 1 ml acetonitrilu k rozpuštění polymeru. Následně byla u vzorku měřena absorbance při 556 nm proti acetonitrilu a vypočítána koncentrace Rhodaminu B ve vzorku z kalibrační křivky. (viz obr. 17) Podle uvedené rovnice, kde  $y$  je absorbance a  $x$  koncentrace absorbovaného Rhodaminu B.

$$y = 0,1558x - 0,0828$$

Po měření byl vzorek vysušen v sušárně na 60 °C a lahvička zvážena pro zjištění hmotnosti využitého polymeru. Ze získaných hodnot byly podle následujících vzorců vypočítány parametry EE, DL, RY.

EE (encapsulation effectivity) jaké množství Rhodaminu B bylo enkapsulováno ve vzniklých částicích.

$$EE(\%) = \frac{m(RhB \text{ experimentální})}{m(RhB \text{ navážka})} * 100$$

DL (drug loading) jaké procento částice zaujímal navázaný Rhodamin B.

$$DL(\%) = \frac{m(\text{RhB experimentálně})}{m(\text{po vysušení vzorku POLYMER + RHODAMIN B})} * 100$$

RY (recovery yield) kolik bylo využito polymeru na vznik nanočástic.

$$RY(\%) = \frac{m(\text{NANOČÁSTICE po vysušení}) - m(\text{RHODAMIN B experimentálně})}{m(\text{POLYMER navážka})} * 100$$

## 2.6 Princip měření nanočástic

V této kapitole jsou popsány principy měření velikosti a zeta potenciálu na přístroji Zetasizer ZS90, používaného při měření částic v této práci.

### 2.6.1 Měření velikosti nanočástic

Pro měření velikosti částic se využívá proces DLS = Dynamic Light Scattering tzv. dynamický rozptyl světla. Kdy se vzorek osvítl zdrojem světla, které se na částicích odráží a následně se měří intenzita rozptýleného světla. Významný je Brownův pohyb, který každá částice vykonává, zde se vychází z toho, že malé částice se pohybují rychleji než částice větší. Toto popisuje Stokes – Einsteinova rovnice.<sup>38</sup>

Pokud by se částice nepohybovali, detektor by po rozptýlení světla vzorkem zaznamenal světlá a tmavá místa, podle toho kde se setká rozptýlené světlo s detektorem, tam vznikne světlé místo, a kde žádné světlo nebude, vznikne temná skvrna. Částice se ale ve vzorku pohybují Brownovým pohybem, zde je sledována změna intenzity tmavých a světlých skvrn na detektoru v závislosti na rychlosti pohybu částic, což vychází ze Stokes – Einsteinovy rovnice. Při měření velkých částic intenzita kolísá pomalu, naopak u malých částic intenzita kolísá rychleji. V přístroji se používá k tomuto měření tzv. digitální korelátor, který měří podobnost dvou signálů v čase, z těchto výsledků vzniká korelační funkce, z které se vypočítá velikostní distribuce částic.<sup>38</sup>

Přístroj je sestaven z několika komponent, zobrazených na obrázku 18. První je laser (1), který slouží jako zdroj světla, které prochází vzorkem umístěným v cele (2). Světlo je ve vzorku odraženo do všech směrů, detektory (3) jsou v závislosti na typu používaného přístroje umístěné pod úhly 90 ° a 175 °. Detektor měří intenzitu odraženého světla, důležitá je intenzita odraženého světla. Pokud je příliš velká, detektor je přetížen a měření není správné.

V tabulkách 12 a 13 jsou zaznamenány hodnoty zeta potenciálu nanočástic připravených při použití kombinace rozpouštědel EtOH:AC. V tabulce 12 jsou popsány nanočástice bez navázaného Rhodaminu B, zde se hodnoty zeta potenciálu pohybují od -14,3 do -6,97 mV. V tabulce 13 jsou popsány nanočástice s navázaným Rhodaminem B, zde jsou hodnoty zeta potenciálu od -18,9 do -10,0 mV. Graf 34 popisuje vliv přítomnosti Rhodaminu B na zeta potenciál nanočástic. Zde je patrné, že zeta potenciál se přítomností Rhodaminu B snižuje. V grafu můžeme dále vidět, že se zvyšující se koncentrací surfaktantu se zvyšuje i hodnota zeta potenciálu.

### 3.3 Enkapsulační efektivita

Při přípravě vzorků byl používán Rhodamin B pro zjištění enkapsulační aktivity částic. Na analytických váhách bylo naváženo 0,25 mg Rhodaminu B. K tomuto množství byl vždy přidán 1 ml zásobního roztoku polymeru v organickém rozpouštědle. Pro zjištění enkapsulační aktivity částic byla vzniklá suspenze centrifugována.

Suspenze nanočástic byla rozdělena na 4x 2 ml do mikrozkušavek. Centrifugace byla prováděna po dobu 3x 15 minut **na 7200g/10000 RPM**, vždy mezi jednotlivými cykly byl odebrán z každé mikrozkušavky supernatant a byly přidány 2 ml vody k rozdispergování sedimentu. Po třetím cyklu byl odebrán supernatant a přidán 1 ml acetonitrilu k rozpuštění polymeru. Všechny části vzorku z 8 mikrozkušavek byly spojeny a následně byla u vzorku měřena absorbance při vlnové délce 556 nm proti acetonitrilu jako slepému vzorku.

Enkapsulační efektivita byla zjišťována centrifugací získaných částic a následným měřením absorbance roztoku zcentrifugovaného polymeru s Rhodaminem B v acetonitrilu. Z naměřené absorbance podle kalibrační křivky byla získána koncentrace Rhodaminu B (viz obr.17 a vzorec v kapitole 2.3.6) a spočítána enkapsulační efektivita v procentech.