

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



**LIPIDICKÉ NANOČÁSTICE JAKO PLATFORMA PRO**  
**DODÁNÍ LÉČIV**

Diplomová práce

**Hradec Králové 2020**

**Lenka Voldřichová**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Lenka Voldřichová

Zde bych chtěla poděkovat PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále chci poděkovat konzultantce Mgr. Janě Kubačkové za čas, který se mi věnovala, cenné rady a připomínky při zpracování práce, velkou trpělivost a ochotu. Děkuji také paní Svobodové za pomoc a ochotu při měření a získávání výsledků.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jana Kubačková

Posluchač: Lenka Voldřichová

Název diplomové práce: Lipidické nanočástice jako platforma pro dodání léčiv

Lipické nanočástice, jako nově vyvíjené lékové formy, mohou překonat mnoho nedostatků běžných lékových forem. Jejich potenciál lze využít zejména při prodlouženém, kontrolovaném a cíleném uvolňování. Také mohou zvýšit biodostupnost léčiv, zejména u těch špatně rozpustných a umožňují také tzv. targeting, což způsobí zvýšené hromadění lipidických nanočástic v určité tkáni oproti ostatním tkáním.

Cílem práce bylo připravit lipidické nanočástice vhodnou metodou přípravy a optimalizovat složení lipidů a surfaktantů tak, aby byly připraveny nanočástice, vhodné pro enkapsulaci léčiva. Částice byly připravovány emulzní odpařovací metodou. Jejich charakterizace byla provedena pomocí přístroje Zetasizer, kterým byla měřena velikost částic a zeta potenciál. Vlastnosti formulací byly hodnoceny z hlediska velikosti nanočástic, jejich polydisperzity, zeta potenciálu i vlastností formulace. Dále byla prováděna analýza diferenciální skenovací kalorimetrie u vybraných formulací.

Vybraná finální formulace je složená z 25 mg glycerolmonostearátu, 10 mg isopropylmyristátu, 15 mg lecitinu a Kolliphoru P188 0,1% roztoku. Do této formulace byl dále enkapsulován indomethacin. Vznikly částice o velikosti kolem 140 nm, o hodnotě zeta potenciálu kolem -40 mV. Index polydisperzity označující šířku distribuce velikosti nanočástic byl 0,2 a méně, což znamená, že vznikaly monodisperzní vzorky. U vybrané finální formulace byla prováděna purifikace nanočástic pomocí centrifugačních koncentrátorů.

**Klíčová slova:** lipidické nanočástice, pevné lipidické nanočástice, nanostrukturované lipidické nosiče, nosiče léčiv, emulzní-odpařovací metoda

## **ABSTRAKT**

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Consultant: Mgr. Jana Kubačková

Student: Lenka Voldřichová

Title of thesis: Lipid based nanoparticles: drug delivery platform

Lipid nanoparticles, as newly developed dosage forms, can overcome many drawbacks of conventional dosage forms. Their potential can be utilized in particular for prolonged, controlled and targeted release. They can also increase the bioavailability of drugs, especially those with poor solubility and also allow targeting, which causes increased accumulation of lipid nanoparticles in certain tissues compared to other tissues. nanoparticles suitable for drug encapsulation.

The particles were prepared by the emulsion evaporation method. Their characterization was performed using a Zetasizer, which measured the particle size and the zeta potential. The properties of the formulations were evaluated in terms of nanoparticle size, polydispersity, zeta potential, and formulation properties. Differential scanning calorimetry analysis was also performed on selected formulations.

The selected final formulation was composed of 25 mg glycerol monostearate, 10 mg isopropyl myristate, 15 mg lecithin and Kolliphor P188 0,1% solution. Indomethacin was further encapsulated into this formulation. Particles of about 140 nm were formed, with a zeta potential value of about -40 mV. The polydispersity index, indicating the width of the nanoparticle size distribution, was 0.2 or less, indicating that monodisperse samples were formed. The selected final formulation was purified by nanoparticles using centrifugal concentrators.

**Keywords:** lipid nanoparticles, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, drug-delivery systems, emulsion-solvent evaporation method

# Obsah

1	Úvod .....	7
2	Cíl práce.....	8
3	Teoretická část.....	9
3.1	Lipidické nanočástice.....	9
3.2	Pevné lipidické nanočástice (Solid lipid nanoparticles).....	9
3.2.1	Nanostrukturované lipidové nosiče .....	12
3.2.2	Targeting .....	13
3.2.3	Polymorfnní změny.....	14
3.2.4	Uvolňování léčiva ze SLN .....	15
3.2.5	Stabilita LN.....	16
3.3	Aplikace LN .....	18
3.3.1	Kožní aplikace LN .....	18
3.3.2	Perorální aplikace .....	21
3.3.3	Parenterální aplikace.....	21
3.4	Metody přípravy lipidických nanočástic .....	23
3.4.1	Vysokotlaká homogenizace (HPH) .....	23
3.4.2	Metoda nanoprecipitace (solvent displacement).....	23
3.4.3	Emulzní odpařovací metoda .....	24
3.4.4	Emulzifikační metoda difuze rozpouštědla.....	24
3.4.5	Metoda fázové inverze.....	24
3.5	Charakterizace nanočástic .....	25
3.5.1	Velikost LN.....	25
3.5.2	Index polydisperzity .....	26
3.5.3	Zeta potenciál LN .....	26
3.5.4	Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) .....	27
3.5.5	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	28
4	Experimentální část .....	30
4.1	Použité přístroje: .....	30
4.2	Použité suroviny.....	30
4.3	Příprava nanočástic .....	31
4.3.1	Příprava metodou nanoprecipitace.....	31
4.3.2	Příprava emulzní odpařovací metodou za použití ultrazvuku .....	31
4.3.3	Použité metody sonikace .....	32
4.3.4	Stabilita závěrečné formulace .....	32
4.3.5	Rozpustnost Ind v lipidech .....	32

4.3.6	Příprava LN s Ind.....	33
4.4	DSC.....	34
4.4.1	Purifikace LN.....	35
4.5	HPLC.....	37
4.5.1	Příprava vzorků.....	37
4.5.2	Měření.....	38
4.6	Výsledky a diskuze.....	40
4.6.1	Metoda nanoprecipitace.....	40
4.6.2	Emulzní odpařovací metoda.....	42
4.6.3	DSC.....	64
4.6.4	HPLC.....	76
5	Závěr.....	84
6	Seznam zkratk:.....	86
7	Seznam tabulek.....	87
8	Seznam obrázků.....	88
9	Použitá literatura:.....	91

# 1 Úvod

Lipické nanočástice (LN) jsou nově vyvíjené lékové formy, které mohou překonat nedostatky běžných lékových forem. Můžeme je rozdělit na dva hlavní typy: Pevné lipidické nanočástice (solid lipid nanoparticles - SLN), které jsou tvořeny pouze pevným lipidem a nanostrukturované lipidické nosiče (nanostructured lipid carriers - NLC) obsahující kromě pevného lipidu ještě tekutý lipid, který ovlivňuje vlastnosti LN.<sup>1</sup> Velkým problémem u nově vyvíjených léčiv je velmi špatná rozpustnost, a tedy nízká biodostupnost. Dalším důvodem selhání léčby může být nízká absorpce léčiva, nedostatečná koncentrace léčiva v požadovaném místě, vysoký first-pass efekt a rychlá eliminace. Některá léčiva jsou také velmi nestabilní a dochází k jejich rozkladu buď, ještě před podáním do organismu, nebo mohou být rozložena až v organismu, například v kyselém prostředí žaludku nebo různými enzymy.<sup>2,3</sup> Slibným řešením by tedy mohly být lipidické nanočástice. Lipidy jsou přirozeně vyskytující se materiál, jejich velkou výhodou je také biokompatibilita a biodegradovatelnost. Díky uzavření léčiva do LN nedochází k jeho kontaktu s vnějším prostředím a zvýší se stabilita léčiva. Tato léková forma také výrazně ovlivní vlastnosti léčiva. Můžeme dosáhnout prodlouženého, kontrolovaného a cíleného uvolňování a dochází k výraznému zvýšení biodostupnosti léčiv, zejména u těch špatně rozpustných. LN umožňují také tzv. targeting, což způsobí zvýšené hromadění LN v určité tkáni oproti ostatním tkáním.<sup>4</sup>

Vlastnosti LN lze využít u různých cest podání. Při perorálním podání LN zvyšují setrvání léčiva v žaludku a zvyšují jeho biodostupnost.<sup>5</sup> U kožního podání je velkou výhodou okluzivní efekt lipidických nanočástic, snížení dráždivosti léčiv a také možnost transdermálního podání, kdy léčivo projde přes kůži do systémové cirkulace.<sup>6</sup> Při parenterálním podání mohou LN prodloužit dobu cirkulace v krevním řečišti a sníží se tak frekvence podání léčiv. Velký potenciál mají LN při léčbě nádorů, jelikož ovlivněním jejich vlastností lze zvýšit hromadění léčiva v nádorové tkáni a zvýšit tak účinnost léčby a zároveň snížit nežádoucí účinky léčby.<sup>7</sup>

Chování LN v organismu je ovlivněno vlastnostmi, jako jsou velikost částic, náboj, tvar a další. Proto je při jejich vývoji důležitá také charakterizace těchto vlastností. Například pomocí metody diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), mikroskopové analýzy, dynamického rozptylu světla a mnoha dalších.<sup>2</sup>



## 2 Cíl práce

Cílem této práce bylo připravit lipidické nanočástice emulzní odpařovací metodou, jako nosiče léčiv pro zvýšení biodostupnosti. Jako modelové léčivo byl zvolen indometacin s ohledem na fakt, že se jedná o léčivo prakticky nerozpustné ve vodě s problematickou biodostupností. Cílem bylo zjistit procesní parametry, jako použitá rozpouštědla, lipidy, surfaktanty a ko-surfaktanty a jejich koncentrace na výsledné charakteristiky nanoformulace. Těmito charakteristikami byly velikost, polydisperzita, povrchový náboj, stabilita a enkapsulační efektivita.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Lipidické nanočástice

Pevné lipidické nanočástice (SLN) a nanostrukturované lipidové nosiče (NLC) jsou dva hlavní typy lipidických nanočástic. Těmto typům nanočástic je v posledních letech věnována velká pozornost, jelikož jsou schopné překonávat nedostatky ostatních lékových forem. Častým problémem selhání léčby může být nízká absorpce léčiva a kvůli tomu nedostatečná koncentrace léčiva v požadovaném místě, vysoký first-pass efekt, rychlá eliminace, metabolismus (peptidy, proteiny) a nízká stabilita léčiv. U mnoha nově vyvíjených léčiv je problémem nízká rozpustnost ve vodě a nízká biologická dostupnost. (tudíž nemožnost intravenózního podání a nízká biodostupnost po perorálním podání).<sup>2, 8</sup> U protinádorové léčby je velký problém toxicita léčiv, která působí nejen na postiženou tkáň, ale i na celý organismus.<sup>9</sup> Slibným řešením by tedy mohly být lipidické nanočástice, u kterých můžeme ovlivnit rychlost a místo uvolňování léčiva, snížit toxicitu léčiv, ochránit je před degradací a tím zvýšit jejich stabilitu a biologickou dostupnost.<sup>4</sup> Velkou výhodou je také ochrana léčiv citlivých na chemickou degradaci. Léčivo je uzavřeno uvnitř částice, nedochází ke kontaktu s vnějším prostředím a je tak stabilizováno. Je zde také možnost cíleného uvolňování léčiva, to umožňuje dosáhnout vysokých koncentrací v cílové tkáni a minimalizovat nežádoucí a toxické účinky v ostatních tkáních. Velikost částic se pohybuje v rozmezí 50-1000 nm a výrazně ovlivňuje osud nanočástic.<sup>5</sup>

SLN se skládají z lipidu, který je v pevném stavu za teploty lidského těla a vhodného surfaktantu. Částice typu NLC obsahují pevný lipid, surfaktant a navíc lipid v tekutém stavu, za teploty těla zachovávají pevný stav. SLN a NLC mají vlastnosti, které jsou vhodné pro využití u mnoha cest podání (topická, parenterální, oční, orální a další). Jejich výhodou je schopnost procházet skrz biologické bariéry, a tím zvýšit dostupnost léčiv například v centrální nervové soustavě. Velký potenciál také mají v cílené léčbě. V závislosti na různých vlastnostech částic mohou být částice vychytávány v určitých tkáních, a tak působit cíleně – tzv. targeting. Výhodou LN je také velmi dobrá snášenlivost a biokompatibilita, jelikož používané materiály jsou netoxické.<sup>2, 5, 8, 10, 11</sup>

### 3.2 Pevné lipidické nanočástice (Solid lipid nanoparticles)

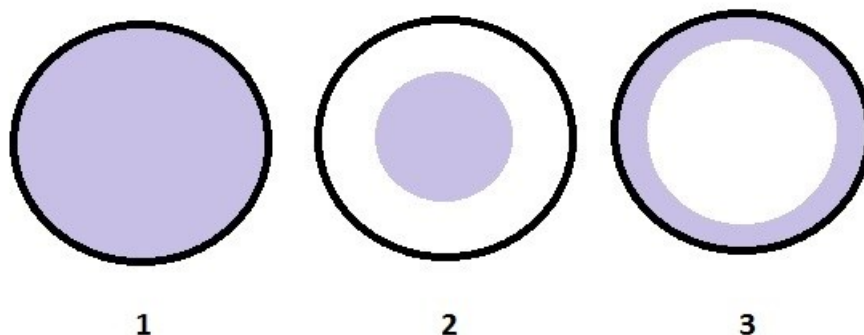
SLN jsou vyvíjeny od roku 1990 jako náhrada za liposomy a další polymerní nanočástice. Liposomy z fosfolipidové dvojvrstvy mají sice podobné vlastnosti jako LN (zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných léčiv, snížení toxicity a další), ale jejich nevýhodou je

nízká stabilita při uchovávání, agregace, rychlá eliminace z organismu a uvolňování léčiva během skladování.<sup>5, 8, 9</sup> Velikost SLN je v rozmezí 50-1000 nm.<sup>10</sup> Skládají se z pevného lipidu v koncentraci 0,1-30 %, který je rozptýlen ve vodné fázi. Další složkou je surfaktant v koncentraci od 0,5 % do 5 %. Výběr vhodného typu lipidu a surfaktantu ovlivňuje vlastnosti nanočástic (velikost částic, stabilita, uvolňování léčiva a jeho inkorporované množství). Používané lipidy jsou v tuhém stavu při teplotě těla a využívané jsou například monoacylglyceroly, diacylglyceroly, triacylglyceroly (tristearin, tripalmitin), mastné kyseliny, alkoholy s dlouhým řetězcem (cetylalkohol), vosky, steroly a další. U lipidů je také důležitá jejich krystalová modifikace, která ovlivňuje inkorporaci léčiv a vlastnosti SLN. Používané surfaktanty jsou poloxamery, sójový lecitin, tweeny, fosfatidylcholin a další.<sup>2, 9</sup> Správný výběr typu a koncentrace surfaktantu je velmi důležitý a má velký dopad na vlastnosti SLN. Během přípravy se velikost částic výrazně snižuje, ale dochází ke zvětšení plochy. Čím je vyšší koncentrace surfaktantu, tím se více snižuje povrchové napětí a zvyšuje se stabilita LN. Při vzniku nanočástic je důležité, aby byl nově vzniklý povrch rychle pokrytý surfaktantem, jinak mají částice tendenci se shlukovat. Delší dobu k pokrytí nově vzniklého povrchu potřebují surfaktanty s větší molekulovou hmotností a naopak kratší doba stačí surfaktantům s nižší molekulovou hmotností – jejich nevýhodou je ale vyšší toxicita. Ke stabilizaci SLN je tedy vhodné použít kombinaci surfaktantů, to vede ke zmenšení velikosti částic a ke zvýšení jejich stability.<sup>2, 11</sup>

Mezi výhody SLN patří snadná příprava, nižší cena než u polymerních částic, možnost přípravy ve velké množství v průmyslu, možnost přípravy bez organických rozpouštědel, nízká toxicita a biodegradovatelnost lipidů, možnost řízeného uvolňování a zvýšení stability léčiva. Stabilita je zvýšena díky tomu, že léčivá látka je fixována v LN a není tak v kontaktu s okolním prostředím. Nevýhodami jsou polymorfnní přeměny a zvětšování částic během skladování, inkorporace pouze malého množství léčiva nebo jeho uvolnění při skladování. Tyto změny vlastností vedou ke změně uvolňování léčiva z částic.<sup>2, 9, 12</sup>

Léčivo se vmezeřuje do volných míst v lipidové matici a množství léčiva, které může být inkorporováno, závisí na typu lipidu, rozpustnosti léčiva v lipidu, metodě přípravy a polymorfnních změnách, které probíhají v lipidu. SLN se nejčastěji používají pro enkapsulaci lipofilních léčiv, která mají v jiných lékových formách nízkou biodostupnost.

Rozlišujeme 3 možnosti inkorporace léčiva do SLN<sup>10</sup>. Tyto typy jsou zobrazeny na obrázku č. 1.



**Obrázek 1 - Možnosti inkorporace léčiva do SLN: 1 – Matricový model, léčivo rozptýlené v celém objemu, 2 - Léčivo v jádře, 3 - Léčivo v obalu**

- Matricový model – léčivo je rozptýleno v lipidové matrix v celém objemu. Vzniká při přípravě technikou homogenizace za chladu.<sup>11,12</sup>
- Léčivo v obalu – Nejvíce léčiva se nachází ve vnějším obalu částice. Vzniká při přípravě technikou homogenizace za tepla a při nízké koncentraci léčiva. Při ochlazování nejprve tuhne samotný lipid, který tvoří jádro bez účinné látky. To vede ke zvyšující se koncentraci léčiva ve zbývajícím roztaveném lipidu. Až dojde k nasycení taveniny lipidu léčivem, dochází k tuhnutí lipidu i s léčivou látkou, která je tak obsažena hlavně ve vnější části NL. Tento model umožňuje okamžité uvolňování léčivé látky.<sup>8,10</sup>
- Léčivo v jádře – Léčivo se nachází v jádru částice. Vzniká, pokud je léčivo v roztaveném lipidu ve vysoké koncentraci. Při ochlazování lipidu dochází k jeho tuhnutí, tím se sníží rozpustnost léčivé látky v tavenině lipidu a dojde k vysrážení léčivé látky ještě předtím, než dojde k rekrystalizaci lipidu.<sup>8,10</sup>

Množství inkorporovaného léčiva je ovlivněno rozpustností léčiva v lipidu, polymorfním stavem lipidu, koncentrací surfaktantu, metodou přípravy a vlastnostmi léčiva.<sup>10</sup> Naplnění částic léčivem se vyjadřuje v procentech, vzhledem k množství lipidu. K dostatečnému naplnění je potřeba, aby se léčivo rozpouštělo v tavenině lipidu. Lipidy vytvářející krystaly s vysoce uspořádanou krystalovou mřížkou pojmu menší množství léčiva a může dojít i k vypuzení léčiva z LN. Pokud jsou v krystalové mřížce nedokonalosti a

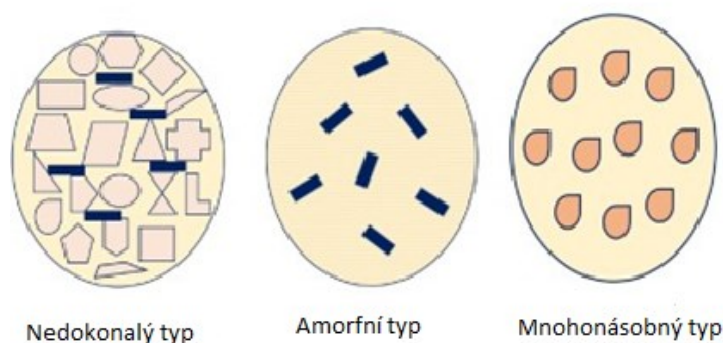
nepravidelnosti, v částicích jsou tak volné prostory, do kterých lze inkorporovat větší množství léčiva.<sup>11</sup>

### 3.2.1 Nanostrukturované lipidové nosiče

Tyto nanočástice jsou modifikací SLN. NLC obsahují pevný lipid, surfaktant a navíc lipid, který je tekutý za teploty lidského těla. Tuhý a tekutý lipid mohou být v poměrech 70:30 až 99,9:0,1.<sup>5, 7</sup> Používají se různé druhy lipidů, například isopropylmyristát, kyselina olejová a další. Metody přípravy jsou podobné jako u SLN. Významnou výhodou proti SLN je tedy větší inkorporace LN léčivem, nižší riziko uvolnění léčiva z nanočástic a vyšší stabilita. Tekutý lipid zvyšuje množství nedokonalostí ve struktuře LN a tím zvýší množství léčiva, které lze inkorporovat do částic.<sup>13</sup> NLC také mají schopnost modifikace uvolňování (cílené, prodloužené) a snáze překonávají biologické bariéry. Mohou být také použity jako nosiče peptidů, proteinů, protilátek a dalších.<sup>3, 6, 8, 9</sup>

Jak je vidět na obrázku č. 2 rozlišujeme 3 typy NLC:

- Nedokonalý typ – Struktura částic je neuspořádaná a má mnoho nedokonalostí. Vzniká smísením prostorově odlišných lipidů. Léčivo se nachází v mezerách mezi řetězci mastných kyselin. Dokážou pojmout velké množství léčiva.<sup>2, 5, 7, 12</sup>
- Beztvarý (amorfní) typ – Tento typ vzniká smísením speciálních druhů pevných lipidů (např. hydroxyoktacosanyl, hydroxystearát a isopropylmyristát), u kterých nedochází k rekrystalizaci po přípravě nanočástic. Lipidy se nachází v amorfním stavu a nedochází tak k předčasnému uvolnění léčiva z LN, kvůli polymorfním změnám.<sup>14</sup>
- Mnohonásobný typ - Vzniká při smísení tuhého a tekutého lipidu při jejich roztavení. Dochází k precipitaci tekutého lipidu v roztaveném tuhém lipidu na malé kapičky – vznikají nanokompartenty, ve kterých je obsaženo léčivo, které je více rozpustné v tekutém lipidu. Při následném ochlazení dochází k tuhnutí tuhého lipidu a tím k fixaci nanokompartentů s tekutým lipidem a léčivem.<sup>2, 5, 7, 12</sup>



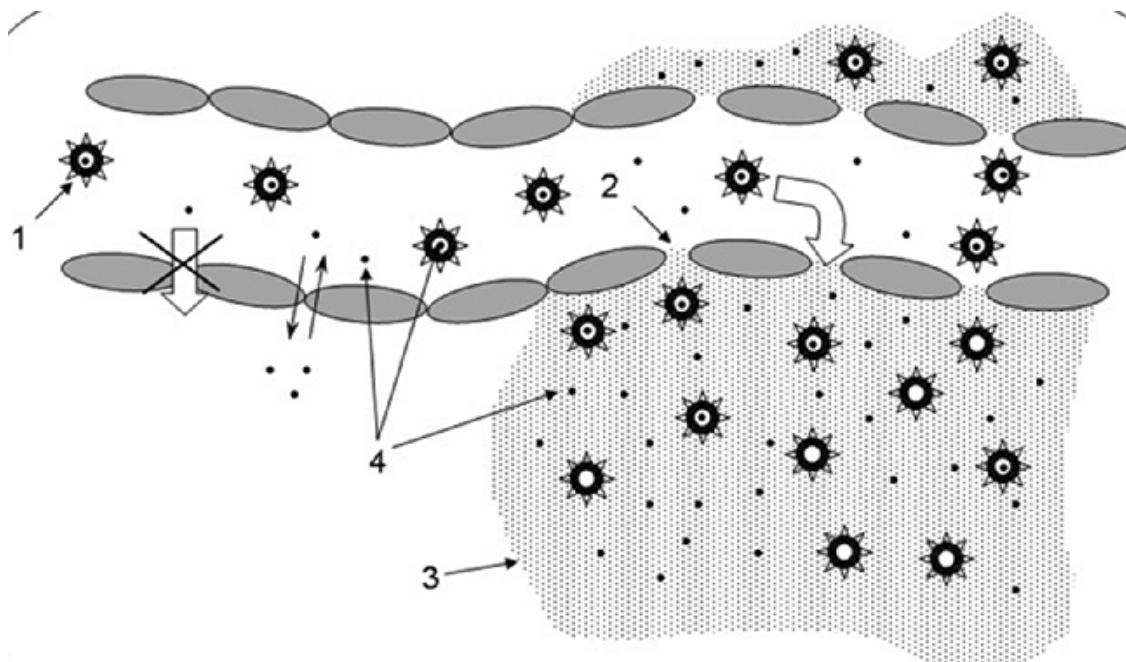
**Obrázek 2 - Typy NLC. Nedokonalý typ – neuspořádaná struktura. Amorfní typ. Mnohonásobný typ – vznikají nanokompartmenty.<sup>5</sup>**

Přidání tekutého lipidu výrazně mění vlastnosti LN, ale tyto změny závisí na typu a množství tohoto lipidu. Dochází ke zmenšení velikosti částic a ke snížení jejich polydisperzity. Snižuje se také teplota tání a krystalizace, jejich píky jsou také širší. To je způsobeno větší neuspořádaností v krystalové struktuře. Krystalická struktura lipidu u NLC ovlivňuje naplnění částic léčivem, stabilitu a profil uvolňování léčiva. Polymorfní přeměny jsou urychleny, protože tekutý lipid umožní větší pohyblivost tuhému lipidu, který může rychleji přeuspořádat své krystaly do modifikace  $\beta$ . Zpomalí ale změny tvaru částic, ke kterým jinak dochází. Tekutý lipid také zvyšuje mobilitu surfaktantu, který může při polymorfních změnách rychleji pokrýt nově vzniklé povrchy a zvyšuje tak stabilitu NLC.<sup>5, 12</sup>

### 3.2.2 Targeting

Při tomto jevu dochází ke zvýšenému hromadění nanočástic v žádané tkáni oproti ostatním tkáním. V cílové tkáni je tak více léčiva než při podání běžné lékové formulace, a naopak v ostatních částech těla dosahuje léčivo velmi nízkých koncentrací. Díky tomu může být sníženo celkové množství podaného léčiva a tím se sníží i náklady na léčbu a výskyt nežádoucích účinků. Tento targeting může být cílen na celý orgán, určité buňky nebo pouze na některé antigeny na buněčném povrchu. Targeting dělíme na pasivní a aktivní. Při pasivním targetingu je léčivo vycytáváno v určitém místě díky vlastnostem nanočástic a cílové tkáni (velikost, náboj, pH, teplota, hydrofilní a lipofilní vlastnosti, tvar částic). Například v zánětlivé tkáni je nižší pH a vyšší teplota. Další možností je extravazace, která je popsána na obrázku č. 3. K ní dochází, pokud je zvýšená propustnost cévní stěny, buňky mají mezi sebou mezery, které umožňují nanočásticím o určité

velikosti opustit cévní řečiště a dostat se tak k okolním tkáním. K extravazaci dochází například v zánětlivé tkáni nebo u nádorů.<sup>15</sup>



**Obrázek 3 - Extravazace v nádorové tkáni. 1 - Nanočástice nemohou prostupovat přes normální endotel. 4 - Velmi malé molekuly mohou prostoupit přes normální endotel. 2 - Nanočástice mohou prostoupit mezi endotelovými buňkami díky mezerám mezi nimi. 3 - Dochází ke kumulaci nanočástic v tkáni (nádor, zánět)<sup>15</sup>**

Vzhledem k tomu, že na některé tkáně a pro některá léčiva nemůže být použit pasivní targeting, jelikož nemají dostatečně odlišné vlastnosti, je zde možnost aktivního targetingu. Toho dosáhneme spojením nanočástice s další molekulou, která je schopná rozeznat cílovou tkáň. Jsou to například různé protilátky, hormony, polysacharidy a lektiny. Nanočástice s léčivem se pomocí této molekuly naváže na cílové místo a tím působí velmi selektivně pouze na konkrétní buňky. Toho je možné využít například v léčbě nádorů. Příkladem využití je například konjugace nanočástic s monoklonální protilátkou proti CD19 antigenu, což je protein který, se často vyskytuje na povrchu nádorových buněk. Dále monoklonální protilátka proti HER2 (tento receptor je často nadměrně exprimován u rakoviny prsu) a protilátka proti receptoru epidermálního růstového faktoru (nadměrně exprimováno u agresivních druhů rakoviny).<sup>15</sup>

### 3.2.3 Polymorfní změny

Polymorfie znamená schopnost dané látky existovat ve více krystalových modifikacích. Polymorfní forma lipidu významně ovlivňuje množství léčiva, které lze inkorporovat do LN. U lipidů se vyskytují tři krystalové modifikace:  $\alpha$  (nejméně stabilní),  $\beta'$  a  $\beta$  (stabilní,

destičkový tvar, menší velikost). Samotné lipidy rekrystalizují do modifikace  $\beta'$ , která velmi rychle přechází na  $\beta$ , a protože má velmi uspořádanou krystalovou mřížku, pro LN je nevhodná. Při přípravě LN dochází k přeměně lipidu na modifikaci  $\alpha$ , která má méně uspořádanou krystalovou mřížku, kulovitý tvar a schopnost inkorporovat větší množství léčiva. Během skladování může dojít k polymorfním změnám lipidů z méně stabilního do více stabilního krystalického stavu. Což v konečném důsledku vede k poklesu kapacity pro léčivo. Při polymorfní přeměně z  $\alpha$  na  $\beta$  dochází ke změně tvaru z kulovitého na destičkový, tím vznikají nové povrchy, které nejsou pokryté surfaktantem a zvyšuje se tendence částic k agregaci. Změny teplot během skladování a odpaření vody z formulace urychlují polymorfní přeměny a ty jsou často důvodem uvolnění léčiva z SLN. Pro další využití SLN je tedy důležité předcházet těmto polymorfním změnám během skladování a zamezit uvolňování léčiv ze SLN, aby byla zajištěna bezpečnost této lékové formy. Ke zpomalení těchto polymorfních změn napomáhá dostatečné množství surfaktantu, který stabilizuje nanočástice a dále uchovávání pod dusíkem. Další možností je výběr lipidů, které se po tvorbě nanočástic rychle přemění na stabilní formu a při uchovávání už ke změnám tolik neochází.<sup>5, 9, 10, 12</sup>

### **3.2.4 Uvolňování léčiva ze SLN**

Uvolňování léčiva ze SLN závisí na několika faktorech. Velký vliv má krystalová struktura lipidu, koncentrace surfaktantu, teplota při přípravě a umístění inkorporovaného léčiva v částici. Během přípravy SLN může docházet k polymorfním změnám lipidu, tyto změny vedou ke vzniku krystalových modifikací ve vyšším energetickém stavu, které mají v krystalové mřížce více nedokonalostí, a tedy i více prostoru pro léčivo. Během skladování mohou lipidy přecházet do jiného polymorfního stavu, který je stabilnější a má méně nedokonalostí v krystalové mřížce. Může tedy docházet k vypuzování léčiva z částice.<sup>2</sup> Rychlost uvolňování je také ovlivněna naplněním částice léčivou látkou – čím více léčiva částice obsahuje, tím je jeho uvolňování rychlejší. V některých případech to však neplatí a větší množství léčiva naopak zpomalí uvolňování, to je způsobeno krystalizací léčiva uvnitř LN.<sup>10</sup>

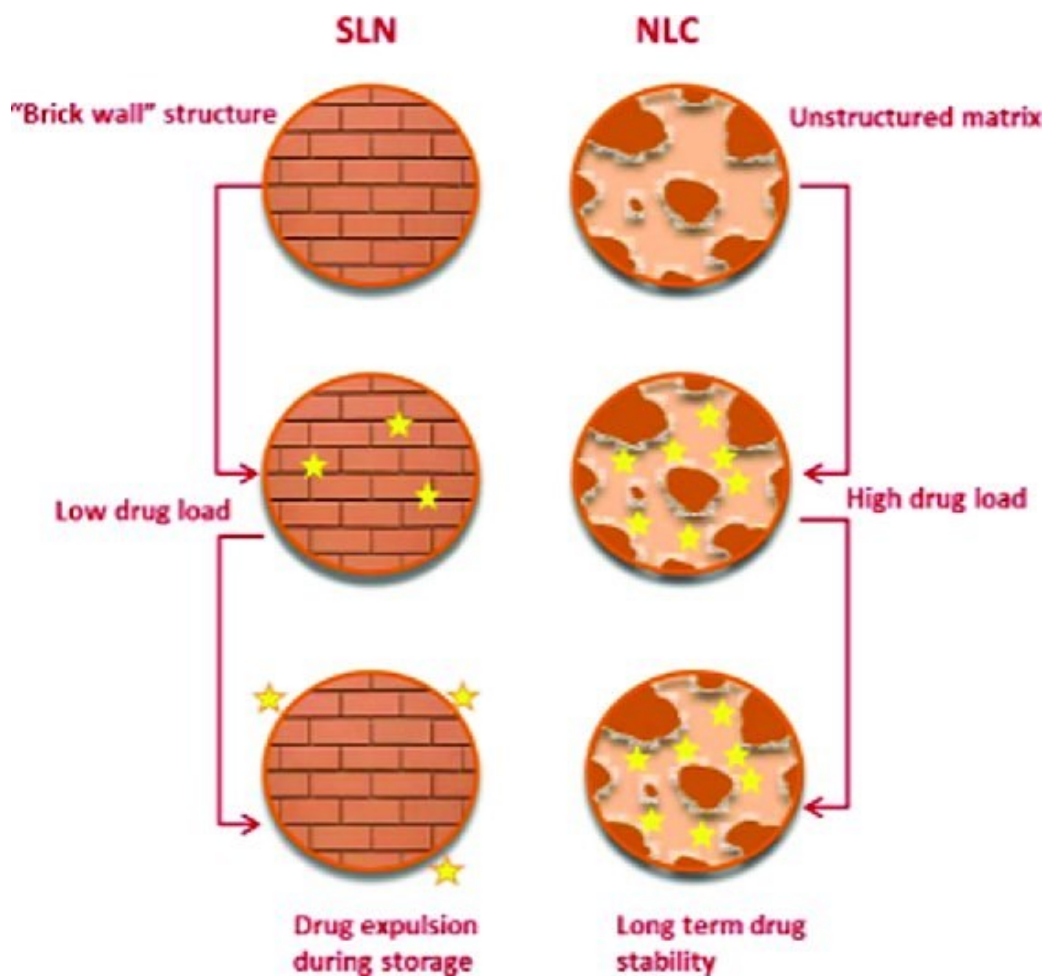
U LN můžeme modifikovat průběh uvolňování léčivé látky. Uvolnění může být okamžité, prodloužené nebo kombinované (nejprve se uvolní iniciální dávka, a pak následuje postupné uvolňování léčiva).<sup>2, 4</sup> Je také možné vyvinout formulaci s prodlouženým uvolňováním pro intravenózní podání. Pokud LN obsahují léčivo hlavně v plášti a na jeho povrchu, uvolňují ho okamžitě. Uvolnění je zpomaleno se zvyšující se



velikostí částic a se snižující koncentrací surfaktantu. Určité množství léčiva obsahuje i vodná fáze a toto množství je zvyšováno zahříváním, druhem a koncentrací surfaktantu. Čím je vyšší koncentrace surfaktantu, tím se zvyšuje rozpustnost léčiva ve vodné fázi a uvolněné léčivo má okamžitý účinek. SLN s léčivem v jádře mají spíše prodloužené uvolňování.<sup>7</sup>

### **3.2.5 Stabilita LN**

Na stabilitu LN má vliv druh lipidu, surfaktantu a jejich koncentrace, dále také skladovací podmínky a metoda přípravy. Částice jsou stabilizovány stericky pomocí surfaktantu a elektrostatickými repulzemi, které jsou způsobeny povrchovým nábojem částic.<sup>11</sup> Během skladování a manipulace se LN může dojít ke gelaci. Při gelaci dochází ke zvýšení viskozity a z disperze nanočástic se stane gel. Dochází také ke zvětšování velikosti částic a k uvolňování léčiva. Faktory, které podporují gelaci jsou vysoká teplota, světlo, mechanický stres. Tyto faktory zvyšují kinetickou energii částic a zvyšují tak srážky mezi částicemi. Dalšími vlivy jsou vysoká koncentrace lipidu ve formulaci, polymorfní přeměny a nízká hodnota zeta potenciálu. Pro stabilní LN je potřeba alespoň hodnota zeta potenciálu alespoň 25 mV, při poklesu pod 15 mV se zvyšuje riziko gelace. Tento jev také může vzniknout při kontaktu LN s dalšími povrchy a působením smykových sil (např. v injekční jehle).<sup>9</sup> Gelaci může být předcházeno dosažením dostatečné hodnoty zeta potenciálu a přidáním ko-surfaktantu, který bude schopný dostatečně rychle pokrýt nově vznikající povrchy a zamezí tak shlukování částic.<sup>5</sup> Jak je vidět na obrázku č. 4, stabilita je také ovlivněna typem LN. Částice typu NLC vykazují vyšší stabilitu, mají více nedokonalostí a nedochází tolik k předčasnému uvolňování léčiva, jako u SLN.<sup>13</sup>



Obrázek 4 - Porovnání SLN a NLC- NLC mají více nedokonalostí. Díky tomu pojmu větší množství léčiva než SLN a jsou více stabilní. <sup>13</sup>

Při přípravě LN mohou vznikat i další útvary, které mají vliv na stabilitu částic a uvolňování léčiv. Jelikož surfaktanty se nemusí nacházet pouze na povrchu částic, ale i ve vodné fázi, mohou tvořit micely a liposomy. Tyto útvary zvyšují solubilizaci léčiv ve vodné fázi a jsou také alternativním místem pro inkorporaci léčiv, která jsou tak více vystavena vodnému prostředí, nejsou schráněna tak, jako uvnitř LN proti vnějšímu prostředí a je zde vyšší riziko hydrolýzy a degradace léčiv. <sup>5,7</sup>

Jelikož je většina formulací z velké části tvořena vodným prostředím, je důležité ochránit LN před růstem bakterií. Toho docílíme odstraněním vody z formulace (např. lyofilizací) nebo přidáním konzervantů. Přidáním konzervantů může být také narušena stabilita, protože mohou ovlivnit zeta potenciál, interagovat s povrchem částic. Vhodný konzervant by měl být neiontový, hydrofilní a neměl by interagovat s povrchem částic ani snižovat zeta potenciál. <sup>5,13</sup> Lyofilizace zvyšuje fyzikální i chemickou stabilitu částic, jelikož LN nejsou ve vodném prostředí, nedochází k hydrolýze nebo k Ostwaldovu zrání.

Proces se skládá ze dvou fází – zmrazení vzorku a následně odpařování vody za sníženého tlaku. Při lyofilizaci může dojít ke změnám ve velikosti částic a k uvolnění léčiva a sníží se stabilizační účinek surfaktantu. Ke zvýšení stability je tedy důležité použít kryoprotektant, to jsou například trehalóza, sorbitol, manóza a glukóza.<sup>9</sup> V polotuhé formulaci (např. krémy) může být stabilita narušena rozpouštěním LN v olejích a lipofilních látkách.<sup>16</sup>

### **3.3 Aplikace LN**

Cesta podání LN závisí na vlastnostech vytvořené formulace a léčiva a zamýšleném účinky LN. Jsou různé možnosti podání: například perorální, kožní, parenterální a další.<sup>9</sup>

#### **3.3.1 Kožní aplikace LN**

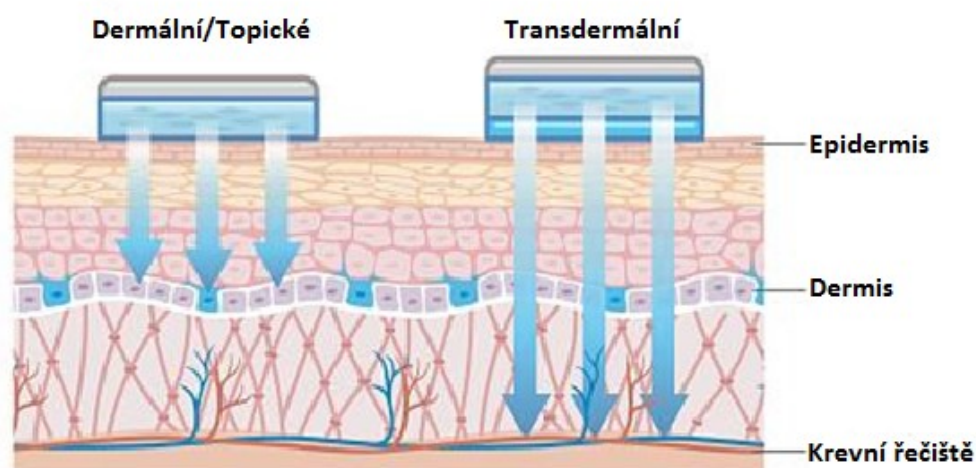
Nevýhodou běžných přípravků podávaných na kůži je variabilní prostup léčiva do kůže a tím i jeho účinek. LN obsahují lipidy, které jsou velmi dobře snášeny a mají nízké riziko dráždění pokožky a toxicity. Dalšími výhodami jsou zvýšení hydratace kůže, vyšší absorpce léčiva a zvýšená penetrace kontrolované uvolňování.<sup>10, 13</sup> Předvedeme také first-pass efektu a sníží se toxicita léčiv.<sup>2</sup> Pomocné látky přidané k formulaci mohou působit synergicky a významně zlepšit vlastnosti LN. Některé látky mohou napomáhat penetraci léčiva (enhancery), působit okluzivně a napomáhat k překonání kožní bariéry. Surfaktanty také ovlivňují průnik látek do kůže a mohou působit dráždivě.<sup>13</sup> Na kožní podání jsou vhodné neionické surfaktanty.<sup>11</sup> Jelikož tyto pomocné látky přicházejí do těsného kontaktu s kůží, musí být kladen velký důraz na jejich bezpečnost a nedráždivost. Při aplikaci na kůži musí být formulace obsahující LN upravena tak, aby ji mohl pacient snadno aplikovat. Formulace může být upravena pomocí vizkozifiantů za vzniku gelu (např. deriváty celulózy) nebo můžou být LN inkorporovány do již připraveného meziprojektu (krém, gel). Při přípravě gelu jsou preferovány neelektrolyty, například deriváty celulózy. Elektrolyty by mohly narušit stabilitu nanočástic snížením zeta potenciálu. Výhodou krémů je možnost vyšší koncentrace LN. Další možností je příprava zkoncentrovaných LN, které již není třeba dále upravovat. Výběr úpravy závisí na stabilitě přípravku a různých inkompatibilitách.<sup>4, 13, 7</sup>

Malá velikost částic umožňuje bližší kontakt léčiva s kůží, zvyšují se adhezivní vlastnosti a tím se zvyšuje i množství absorbované látky. Při podání na kůži se vytvoří z lipidů film, který má okluzní efekt – vytvoří neprodyšnou vrstvu. Tím se zvyšuje hydratace, pokožka ztrácí méně vody, dochází také k rozvolnění keratocytů, zvětší se mezibuněčné

prostory a tím je tak umožněna biodostupnost a penetrace léčiv do kůže a organismu.<sup>2, 10, 13, 18</sup> Vzniklý film také dokáže ochránit pokožku před chemikáliemi, které se vyskytují běžně v prostředí a napomáhat přirozenému obnovování kůže. Okluzní efekt napomáhá k vyhlazování vrásek, což může být využito v kosmetických produktech.<sup>16, 19</sup>

Rozlišujeme tři druhy kožního podání (obrázek č. 5):

- Topické podání – Léčivo působí na, nebo v epidermis a nemá systémové účinky.
- Dermální podání – Léčivo prochází do hlubších vrstev kůže, působí v epidermis a dermis, ale nemá systémový účinek.
- Transdermální podání – Po podání léčiva na kůži dochází k jeho překonání kožní bariéry a léčivo působí systémově (prochází do krevního oběhu)<sup>16</sup>



Obrázek 5 - Topické podání – léčivo působí pouze v epidermis. Dermální podání – léčivo působí v dermis a epidermis. Transdermální podání – léčivo prostupuje přes kůži až do krevní cirkulace

### 3.3.1.1 Topické podání

Pro topické je možné využití pro LN například v kosmetických přípravcích. U nich není žádoucí systémová absorpce, ale jistý průstup látky do kůže je nutný pro žádaný účinek. Vzhledem k možnosti prodlouženého uvolňování jsou vhodné například pro inkorporaci parfémů nebo insekticidů, jelikož prodlouží jejich účinek. Jsou vhodné pro výrobu opalovacích krémů, protože chrání kůži proti slunečnímu UV záření. Látky působící jako ochranný faktor v opalovacích krémech mohou prostupovat do systémové cirkulace a způsobovat nežádoucí účinky a alergie (např. oxid titaničitý, benzofenon). Při inkorporaci látek blokujících UV záření dochází k synergickému účinku s LN, tím pádem můžeme snížit množství těchto látek, navíc se sníží jejich průstup do systémové cirkulace. Snížíme tak nežádoucí účinky i cenu přípravku.<sup>10, 13, 19, 20</sup>

### 3.3.1.2 Dermální podání

LN mohou být využité i při dermálním podání, jelikož mohou zlepšit absorpci léčiva kůží při léčbě lokálních kožních onemocnění, například alopecie, atopický ekzém, mykózy, záněty nebo seborhoická dermatitida.<sup>6, 21, 23</sup> Toto lokální podání léčiv je výhodné, protože se sníží zátěž organismu léčivem a dosáhneme vysoké koncentrace léčiva v místě zasaženém onemocněním. Využití pro léčbu alopecie se zkouší například u minoxidilu<sup>21, 22</sup> a spironolaktonu.<sup>24</sup> Proti běžným lékovým formám mají LN možnost prodlouženého uvolňování a cíleného uvolňování v různých částech kůže (targeting). Prostup léčiva je umožněn mazovými žlázami a vlasovými folikuly. Místo, kde je léčivo uvolněno, je ovlivněno velikostí LN.<sup>13, 17</sup> Léčiva, u kterých byla zkoušena enkapsulace do LN jsou například topické glukokortikoidy pro léčbu různých zánětů, zde se předpokládá snížení atrofie kůže. Cyproteron-acetát, který snižuje tvorbu akné, má antiandrogenní účinky a z nich odvozené nežádoucí účinky (ztráta libida, gynekomastie a další). Jeho lokální podání ve formulaci LN snižuje koncentraci v plazmě a tím i nežádoucí účinky. Deriváty vitamínu A používané při léčbě zánětů a akné se vyznačují vysokou dráždivostí kůže. Při jejich inkorporaci do LN se tento nežádoucí účinek snižuje.<sup>17</sup> Další potenciální využití LN by mohlo být u lokálních přípravků s nesteroidními antiflogistiky, např. celecoxib<sup>25</sup>, indometacin<sup>26</sup>, ketoprofen<sup>27</sup> a naproxen<sup>27</sup>, které se používají u lokální léčby bolesti a zánětu. Formulace těchto látek ve formě LN by měla snižovat jejich dráždivost, urychlit nástup účinku a umožnit prodloužené uvolňování, což by umožňovalo aplikaci v delších časových intervalech. Léčiva se také kumulují ve vrchní zrohovatělé vrstvě kůže a snižuje se prostup léčiva do systémové cirkulace.<sup>17, 27</sup>

### 3.3.1.3 Transdermální podání

Transdermální podání je neinvazivní podání, kdy léčivo difunduje přes kůži do cévního řečiště.<sup>6</sup> LN pomáhají překonat léčivu kožní bariéru zlepšením jeho absorpce a také mohou působit cíleně na určitá místa v těle. Další výhodou je snadnější podávání pro pacienta, snadnější dosažení ustálené koncentrace v plazmě a předcházení first-pass efektu.<sup>2, 10, 13, 18</sup> Parametry, které mají vliv na prostup léčiva, jsou kromě vlastností samotného léčiva i vlastnosti formulace, konkrétně typ a koncentrace surfaktantu, typ lipidu a formulace a metoda přípravy. Surfactanty napomáhají prostupu léčiv, ale na druhou stranu mohou způsobit podráždění kůže. Zvýšení prostupu léčiv mohou také pomoci tzv. enhancery, které působí synergicky s LN a zlepšují prostup léčiv. Jsou to například etanol a limonen.<sup>13, 28</sup> U transdermálního podání můžeme dosáhnout

prodlouženého účinku, což je velmi výhodné u léčiv, která jsou rychle eliminována z organismu.<sup>5</sup> Můžeme také vytvořit rezervoár léčiva, které je pak uvolňováno několik dní a snížíme tak frekvenci podávání. Vlastnosti ovlivňující interakci LN s buňkami v těle jsou velikost, tvar, povrchový náboj a pevnost částic.<sup>6, 18</sup> Modifikací velikosti částic a náboje můžeme skrýt částice před imunitním systémem a prodloužit jejich cirkulaci.<sup>6</sup> Čím jsou částice menší, tím se zvyšuje okluzivní efekt. Destičkovitý tvar LN napomáhá proniknout přes korneocyty. Transdermální podání formou LN bylo zkoušeno například u látek nitrendipin,<sup>29</sup> mirtazapin a simvastatin.<sup>30</sup>

### **3.3.2 Perorální aplikace**

Perorální podání léčivých látek enkapsulovaných do LN je výhodné hned z několika důvodů. LN dokážou ochránit citlivá léčiva před působením kyselého prostředí v žaludku a trávicích enzymů v trávicím traktu. Další výhodou je například prodloužené uvolňování léčiv a zvýšení jejich biodostupnosti.<sup>7</sup> U vysoce lipofilních a špatně ve vodě rozpustných léčiv může dojít při enkapsulaci do LN po perorálním podání k absorpci do lymfatického systému. Tím léčivo obejde také first-pass efekt. Toho je možné využít při léčbě metastází nádorů.<sup>31</sup> Tohoto mechanismu může být také využito u testosteronu, který je při perorálním podání velmi rychle metabolizován díky first-pass efektu v játrech. Při jeho enkapsulaci do LN se zvýší jeho biodostupnost.<sup>32</sup> Velmi výhodné je jejich využití při podání léčiv, která jsou jinak v žaludku ihned rozložena (peptidy a proteiny) a po perorálním podání jsou tak neúčinná. Příkladem může být inzulin, který musí být denně podáván pacientům subkutánně, což významně snižuje jejich kvalitu života. Inkorporace inzulinu do LN by ho mohla ochránit proti degradaci a zároveň zvýšit jeho absorpci ve střevě.<sup>33</sup>

### **3.3.3 Parenterální aplikace**

Díky malé velikosti částic můžeme LN aplikovat i parenterálně. Při této aplikaci LN s léčivem můžeme dosáhnout prodlouženého uvolňování léčiva z LN. Tím můžeme snížit četnost aplikací a snížit množství podaného léčiva.<sup>7</sup> V některých případech chceme dosáhnout cíleného uvolňování léčiva v určitém místě nebo orgánu v těle (např. nádor) – aktivní a pasivní targeting. Dosažení targetingu je ale obtížné, protože distribuce LN je v těle řízena mnoha faktory. Poté co se dostanou do systémové cirkulace, jsou často označeny imunitním systémem za cizorodé a vychytány. Díky lipofilním vlastnostem LN se na ně navážou tzv. opsoniny, to jsou různé proteiny a protilátky, které se vážou na

cizorodé a potenciálně nebezpečné látky. Poté jsou fagocytovány makrofágy, které tyto opsonizované částice rozpoznají pomocí svých receptorů a tím jsou odstraněny ze systémové cirkulace. Pro tyto účely se jako výhodná ukázala tzv. pegylace nanočástic. Jde o navázání polyethylenglykolu na povrch částic. Tato pegylace snižuje vazbu opsoninů na částice a stericky brání jejich navázání, zvýší hydrofilní vlastnosti, stabilitu LN, prodlouží se doba cirkulace v krevním oběhu a tím zvyšuje biodostupnost nanočástic.<sup>15, 30, 34, 35, 36</sup> Vhodná velikost částic pro prodloužení cirkulace je méně než 200 nm a elipsoidní tvar.<sup>37</sup> Částice menší než 150 nm nejsou rozpoznávány imunitním systémem a zůstávají déle v cirkulaci. Při snížení LN pod 30 nm dochází naopak k rychlému vyloučení ledvinami.<sup>38</sup> Nemodifikované LN jsou většinou pomocí pasivního targetingu vychytány v játrech a slezině a díky tomu jsou vhodné například pro léčbu jaterních onemocnění.<sup>38, 39</sup>

Velký potenciál mají LN při léčbě nádorů. Byla zkoušena enkapsulace různých látek, například kamptotecin, fluorouracyl, doxorubicin, paklitaxel, tamoxifen a některé další. Ukazuje se, že enkapsulace do LN snižuje jejich vychytávání imunitním systémem a často také mění distribuci léčiva v organismu. Často se LN používají na ulehčení přestupu hematoencefalickou bariérou, a tak je zvýšená koncentrace léčiva v mozku, což by umožnilo léčbu špatně dostupných nádorů v mozku. U doxorubicinu díky změně distribuce v organismu snižuje jeho kardiotoxicita.<sup>39</sup>

Pomocí úpravy vlastností částic můžeme dosáhnout zvýšeného vychytávání LN v určité tkáni (targeting). LN mohou být cíleny například na centrální nervovou soustavu, což je výhodné například u antipsychotik, antibiotik, nebo protinádorových léčiv.<sup>39</sup> Ukazuje se, že enkapsulace léčiva do LN může zvýšit jeho prostup do mozku v porovnání s běžným podáním léčiva. Ke zvýšení prostupu léčiv přes hematoencefalickou bariéru přispívají lipofilní vlastnosti LN, dále jejich modifikace vlastností (velikost, náboj) a využití aktivního targetingu. Na LN mohou být navázány specifické molekuly (ligandy), které se vážou k určitým receptorům, vyskytujícím se v cílovém místě. Tyto úpravy mohou zvýšit koncentraci léčiva v mozku, případně dokonce zvýšit jeho množství v konkrétní části mozku, například v nádoru.<sup>40</sup> Nejčastějšími cílovými buňkami jsou nádorové buňky, které jsou charakteristické svým nekontrolovaným růstem, vysokými metabolickými nároky, zvýšeným příjmem některých metabolitů nebo expresí charakteristických povrchových znaků. Ligandy pro targeting do těchto buněk, jsou pak specifické protilátky, aptamery, deriváty kyseliny listové, případně některé polysacharidy či peptidy.<sup>41</sup> LN mohou být upraveny tak, aby byly vychytávány i v dalších tkáních,

například v plicích, lymfatickém systému, buňkách imunitního systému nebo v zánětlivé tkáni. Potenciální využití by mohly LN najít také při zvýšení dostupnosti léčiv při očním podání.<sup>5</sup>

### **3.4 Metody přípravy lipidických nanočástic**

#### **3.4.1 Vysokotlaká homogenizace (HPH)**

Technika využívá působení vysokého tlaku k produkci nanočástic. Léčivo je dispergováno nebo rozpuštěno v roztaveném lipidu, který je poté dispergován ve vodném roztoku surfaktantu. Poté dochází k protlačení za vysokého tlaku přes úzký prostor. Smykové napětí a kavitační síly způsobené vysokým tlakem vedou ke snížení velikosti částic. Doba a tlak závisí na dané formulaci a požadované produkci. Velkou výhodou této metody je možnost průmyslové výroby a nízká koncentrace surfaktantů. Metoda nemusí být vhodná pro některé vysokomolekulární látky, jelikož vysoký tlak může způsobit degradaci některých látek (například polymerní látky, peptidy). HPH může být prováděna za tepla nebo za studena. Při HPH za tepla je tavenina lipidu s léčivem dispergována do horkého roztoku surfaktantu, po homogenizaci vzniká emulze, která je dále ochlazována na pokojovou teplotu. Ochlazením dochází k rekrystalizaci lipidu a vznikají LN. Při HPH za studena se léčivo přidá do taveniny lipidu, která je následně ochlazená a vzniká tuhý lipid. Ten je následně rozmělněn na mikročástice, které se přidávají do chladného roztoku surfaktantu. Poté následuje homogenizace a vznikají LN. Pro léčiva velmi citlivá na teplo je preferováno HPH za studena.<sup>2, 8, 9, 10</sup>

#### **3.4.2 Metoda nanoprecipitace (solvent displacement)**

Částice vznikají tak, že tuhý lipid je rozpuštěn v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou (např. aceton, etanol), k urychlení rozpuštění je možné použít zahřívání nebo ultrazvuk. Lipid a léčivo, které má být enkapsulováno, by měly být dobře rozpustné v organickém rozpouštědle, ale ve vodě špatně rozpustné. Po rozpuštění se roztok pomalu po kapkách přidává do vodného roztoku surfaktantu, který je neustále míchán na míchačce, a tak dochází k rychlé difuzi rozpouštědla. Lipid po přidání do vnější vodné fáze precipituje za vzniku nanočástic. Zbývající organické rozpouštědlo se dále odpaří.<sup>4</sup> Mechanismem tvorby nanočástic je rychlá difuze rozpouštědla, při které dochází k turbulencím na mezifázovém rozhraní.<sup>42</sup> Výhodou této metody je rychlá a jednoduchá produkce LN, nedochází ke zvyšování teploty a tlaku, proto je metoda vhodná i pro citlivé materiály a léčiva. Léčiva enkapsulována při této metodě by měla být špatně rozpustná



ve vodě, ale dobře rozpustná v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, což je nevýhodou této metody.<sup>43</sup>

### **3.4.3 Emulzní odpařovací metoda**

Léčivo, které má být enkapsulováno a lipidy jsou přidány do organického rozpouštědla, které je nemísitelné s vodou. Tato vnitřní fáze je přidána do vodného roztoku surfaktantu a následuje homogenizace pomocí ultrazvuku nebo homogenizátoru. Při působení ultrazvukových vln dochází ke kavitaci, malé bublinky plynu v kapalině se zvětšují a následně dochází k jejich kolapsu.<sup>28</sup> V těchto místech se významně zvyšuje tlak a teplota.<sup>44</sup> Dochází k míchání a homogenizaci v celém objemu kapaliny. Na výsledný produkt má velký vliv intenzita a trvání sonikace. Čím je delší trvání sonikace, tím se snižuje velikost částic, ale zároveň se zvyšuje teplota, může docházet k degradaci některých částic (polymery, peptidy) a vzniku volných radikálů.<sup>44, 45</sup> Výhodou této metody je snadná proveditelnost v laboratorních podmínkách. Nevýhodou je nízká koncentrace obsaženého lipidu ve formulaci, jelikož se zvyšujícím obsahem lipidu se snižuje účinnost sonikace.<sup>9</sup> Po homogenizaci vzniká emulze typu olej ve vodě (o/w). Za stálého míchání na magnetické míchačce se odpařuje organické rozpouštědlo a dochází k precipitaci lipidu a vznikají nanočástice.<sup>4,9</sup>

### **3.4.4 Emulzifikační metoda difuze rozpouštědla**

Vnitřní fáze se skládá z lipidu a léčiva rozpuštěného ve směsi organického rozpouštědla mísitelného s vodou a z organického rozpouštědla, které je s vodou nemísitelné. Tato vnitřní fáze je pomalu nalitá ke vnější vodné fázi, která je neustále míchaná a obsahuje surfaktant. Po smísení obou fází dochází k tvorbě kapének ve vodné fázi. S vodou mísitelné rozpouštědlo difunduje rychle z kapének a zmenšuje se tím jejich velikost. Následně dochází k odpařování rozpouštědla nemísitelného vodou, kapénky se zpevňují a vytváří nanočástice. Modifikací této metody je vnitřní fáze tvořená dvěma s vodou mísitelnými rozpouštědly, z nichž jedno má vyšší afinitu k lipidu a druhé má vyšší afinitu k surfaktantu.<sup>46</sup>

### **3.4.5 Metoda fázové inverze**

Nejprve se připraví vnější a vnitřní fáze, které jsou následně zahřáté na teplotu 75 °C, poté jsou smíseny a neustále míchány na magnetické míchačce. Poměr vodné a lipidové směsi je 2:1. Následně je tato směs vystavena změnám teplot, dochází ke třem cyklům

ohřívání a ochlazování. Poté se směs zředí vodou o teplotě 0 °C a během rychlého ochlazení a ředění dochází k fázové inverzi a vzniku LN.<sup>5, 47</sup>

### **3.5 Charakterizace nanočástic**

Charakterizace nanočástic je důležitá pro kontrolu jejich kvality. Jsou různé metody charakterizace:

#### **3.5.1 Velikost LN**

Techniky používané pro měření velikosti nanočástic jsou laserová difrakce, dynamický rozptyl světla (=fotonová korelační spektroskopie) a různé mikroskopové metody.<sup>9</sup>

Dynamický rozptyl světla je metoda používaná k měření průměrné velikosti částic menších než 3 μm a PDI těchto částic. Metoda spočívá v měření kolísání intenzity světla (z laserového zdroje) rozptýleného v disperzi LN. Rozptýlené světlo dopadá na detektor pod určitým úhlem a za určité intenzity. Kolísání intenzity světla a úhel dopadu se liší právě v závislosti na velikosti částic, jejich pohybu a také na jejich tvaru. Částice se neustále pohybují vlivem Brownova pohybu, menší částice se pohybují rychleji, a naopak větší částice se pohybují pomaleji. Výsledek je nejpřesnější u kulovitých částic, u destiček nebo tyčinek měření není tolik spolehlivé. Výhodou této metody je rychlé měření a možnost měřit vzorek v kapalném stavu.<sup>9, 48, 49</sup> Tuto techniku měření používá např. přístroj Zetasizer použitý k charakterizaci částic v této práci.

Laserová difrakce je založena na principu měření difrakčního úhlu, který závisí na poloměru částic. Částice způsobují rozptyl paprsku světla a vzniká difrakční obrazec, který je převeden na hodnoty velikosti částic. Menší částice způsobují větší rozptyl a větší částice způsobují menší rozptyl světla. Výhodou této metody je možnost měření velikosti částic ve větším rozsahu velikostí od několika nm až po 1 mm.<sup>9, 50</sup> Stejně jako u předchozí metody, měření velikosti částic není příliš přesné u částic, které nemají kulovitý tvar. Výsledkem je, podobně jako u dynamického rozptylu světla, objemově ekvivalentní průměr koule. U těchto typů nekulových částic je vhodné doplnit měření i o jinou metodou.<sup>9</sup>

Elektronová mikroskopie je další možností měření velikosti LN. Umožňuje zjistit přesné údaje o velikosti i tvaru částic. Nevýhodou je však nutná úprava vzorku, vzorek není možné měřit v kapalném stavu a musí být odstraněno rozpouštědlo. Tím může dojít ke změnám ve vlastnostech LN. Elektronovou mikroskopii lze rozdělit na dvě základní podskupiny: transmisní elektronovou mikroskopii, která poskytuje informace o vnitřní

strukturu vzorku, protože elektrony vzorkem procházejí. Skenovací elektronová mikroskopie se využívá pro detailní charakterizaci povrchu vzorku a vzorek proto musí být pokrytý vodivým materiálem. Typicky je to tenká vrstvička drahého kovu.<sup>9</sup>

Další možností je mikroskopie atomárních sil. Při této metodě je vzorek zkoumán pomocí hrotu sondy, který se pohybuje po povrchu vzorku. Měří se síla, která působí mezi povrchem vzorku a hrotem. Vzorek nemusí být vodivý, jeho příprava je jednodušší a měření je rychlé. Pro LN je vhodná nekontaktní metoda, kdy se sonda nedotýká vzorku a nedochází tak k jeho změnám.<sup>51</sup>

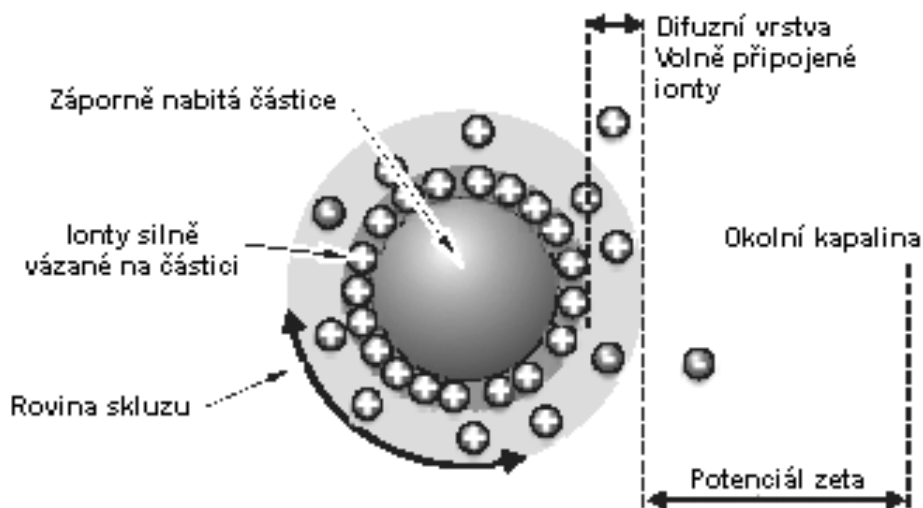
### **3.5.2 Index polydisperzity**

Index polydisperzity je číslo označující šířku distribuce velikosti nanočástic. Hodnota se pohybuje mezi hodnotami 0-1. Čím nižší hodnota indexu polydisperzity, tím je vzorek více stejnoměrný.<sup>52</sup>

### **3.5.3 Zeta potenciál LN**

Zeta potenciál je elektrokinetický potenciál u koloidních systémů. Kolem dispergované částice je elektrická dvojvrstva skládající se z pevné a difuzní vrstvy. Pevná vrstva má opačný náboj než samotná částice a v difuzní vrstvě převažuje opačný náboj, než má částice (obrázek č. 6). Zeta potenciál je definován rozdílem potenciálů mezi disperzním médiem a pevně vázanou vrstvou k dispergované částici. Hodnota zeta potenciálu se udává v jednotkách milivolt a významně ovlivňuje stabilitu disperzního systému. Pro stabilitu suspenze je důležité dostatečné odpuzování částic, aby nedocházelo k jejich shlukování. Pokud budou mít všechny částice dostatečně vysoký negativní či pozitivní zeta potenciál, budou se vzájemně odpuzovat a nebude docházet k jejich shlukování. Pro dostatečnou stabilitu je potřeba dosáhnout hodnot alespoň -30 mV nebo +30 mV.<sup>53, 54</sup>

Zeta potenciál je měřen působením elektrického proudu na suspenzi, přičemž dochází k migraci nabitých částic k opačně nabité elektrodě. Velikost náboje je přímo úměrná rychlosti pohybu nabitých částic. Metody pro měření jsou mikroeletroforéza nebo metoda elektroforetického rozptylu světla. Před měřením je potřeba vzorek naředit. Hodnoty zeta potenciálu mohou být ovlivněny různými faktory, například hodnotou pH či elektrolyty. Hodnoty zeta potenciálu významně ovlivňují stabilitu LN a jejich osud v těle.<sup>54</sup>

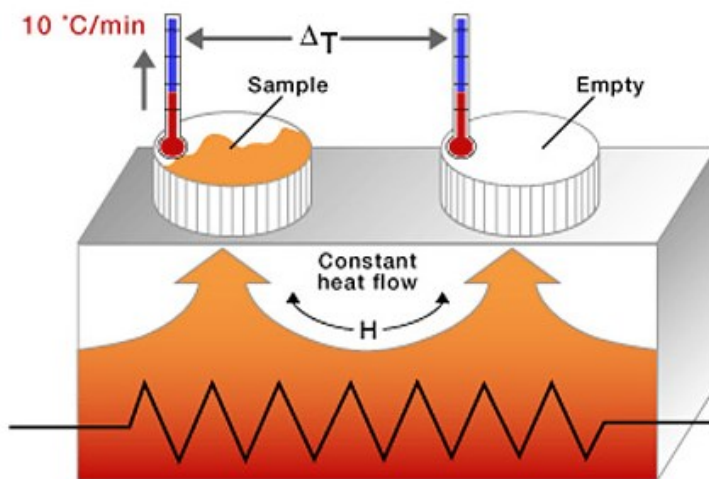


Obrázek 6 - Elektrická dvojvrstva koloidní částice a zeta potenciál<sup>55</sup>

### 3.5.4 Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

Tato metoda zkoumá různé fyzikální vlastnosti látek (teplota tání, krystalizace a skelné přechody). Měří se změna absorbovaného nebo uvolňovaného tepla danou látkou při změně teploty. U LN je využívána ke zkoumání teploty tání, krystalizace a polymorfních změn. Před měřením se do přístroje vloží dva hliníkové kelímky. Jeden kelímek obsahuje přesně naváženou zkoumanou látku, stačí pouze velmi malé množství vzorku. Druhý kelímek je tzv. referenční a je prázdný. Kelímky jsou před měřením zapečetěny a zváženy. Následně dochází k ochlazení nebo ohřívání vzorku konstantní rychlostí. (obrázek č.7).<sup>12, 56, 57</sup>

Rozsah teplot, ve kterém probíhá měření, a rychlost ohřívání vzorku je nastavena před měřením. Při změnách teplot dochází ve vzorku k různým změnám (např. tání, krystalizace) a také dochází ke změnám energie a teplot ve vzorku, které jsou pak měřeny. Při tání dosahuje zkoumaný vzorek nižší teploty než referenční vzorek a spotřebuje více tepla, jelikož dodávané teplo je spotřebováno na rozrušení vazeb v krystalové mřížce. Až zkoumaný vzorek kompletně roztaje, teploty obou vzorků se opět vyrovnají. Při tomto ději vzniká při měření pík a jeho vrchol označuje teplotu tání. Při teplotě skelného přechodu dochází hlavně ke změnám mechanických vlastností materiálu. Pod touto teplotou je materiál křehký a nad touto teplotou je materiál více pružný a ohebný. Při měření pozorujeme mírný nárůst tepelného toku. Při krystalizaci látky bude vznikat záporný pík a vzorek naopak spotřebuje méně tepla. Při měření LN pomocí této metody jsou také zkoumány různé polymorfní přeměny u lipidů.<sup>12, 56, 57</sup>

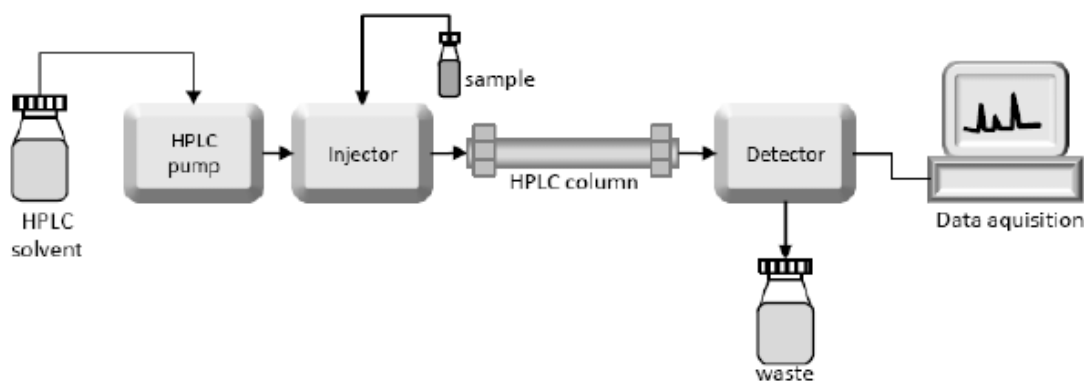


Obrázek 7 - Měření vzorků pomocí DSC. <sup>58</sup>

### 3.5.5 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je analytická separační metoda, založená na interakcích analytů v mobilní fázi se stacionární fází. Přístroj sloužící k této analýze se nazývá kapalinový chromatogram a skládá se z několika částí (obrázek č. 8): <sup>59</sup>

- Zásobník mobilní fáze
- Pumpa – umožňuje tok kapalin celým přístrojem
- Vstříkovač – vstříkuje vzorek do mobilní fáze, často jsou automatické a umožňují automatický odběr vzorků, dle naprogramovaného nastavení.
- Kolona – zde se setkávají stacionární a mobilní fáze dochází zde k vlastní separaci analytů. Trubice naplněná porézním materiálem.
- Detektor – toto zařízení analyzuje změny vlastností u kapaliny, vycházející z kolony. Nejčastěji se používá UV detektor, který sleduje změny absorbance.
- Počítač – zde jsou nastaveny parametry před měřením a vyhodnocovány a sbírány výsledky měření.
- Filtry, odplyňovače<sup>59</sup>



**Obrázek 8 - Schéma HPLC: Zásobník mobilní fáze (HPLC solvent), pumpa (HPLC pump), vstříkovač (injector), kolona (HPLC column), detektor, počítač (Data acquisition).<sup>60</sup>**

Při nastříknutí vzorku dochází k jeho rozptýlení v mobilní fázi a je dále unášen až ke stacionární fázi. Mezi mobilní a stacionární fází je velký povrch, dochází zde k interakcím analytů s těmito fázemi. Různé analyty jsou ve stacionární fázi zadržovány různě dlouhou dobu (dle jejich afinity k této fázi) a dochází tak k jejich separaci. HPLC dělíme na metodu na normální a reverzní fázi. Při HPLC na normální fázi je stacionární fáze polární (povrch je pokryt -OH skupinami) a mobilní fáze je nepolární. Při HPLC na reverzní fázi je naopak stacionární fáze nepolární (-OH skupiny jsou různě modifikovány, např. alkylací) a mobilní fáze je polární.<sup>58</sup> Při analýze nanočástic je tato metoda vhodná pro zjištění naplnění LN léčivem a jejich enkapsulační efektivity.<sup>1</sup>

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité přístroje:

Váhy CAHN 26, Cahn instruments Inc, výr. č. 39562 (USA)

Ultrazvuková sonda Microspitze MS73, Bandelin Electronic (Berlín, Německo)

HPLC: Agilent Technologies 1260 Infinity (Santa Clara, USA)

DSC 200 F3 Maia NETZSCH (Selb, Německo)

Zetasizer Nano-ZS, Zetasizer Nanoseries model ZEN3600, Malvern Instruments, (Malvern, Spojené Království)

Váhy Kern 440-53N, Kern&Sohn (Balingen, Německo) – max. 400 g, d = 0,01g

Analytické váhy Discovery, Ohaus (Greinfensee, Švýcarsko) – max. 210 g, d = 0,1mg

Sušárna Memmert, Memmert (Schwabach, Německo)

Centrifuga Micro 7, Fischer Scientific, Hampton, USA)

Centrifuga MPW-260R, MPW Instruments, Varšava, Polsko)

Magnetická míchačka IKA-WERKE RT 5 power, IKA (Staufen, Německo) 100-1000 ot./min.,

Dialyzační membrána Dialysis tubing Fisher brand, Fisher Scientific (Hampton, USA) – MWCO 3500

### 4.2 Použité suroviny

- Isopropyl myristát, (IPM) Sigma-Aldrich, Praha
- Indometacin, (Ind) SÚKL 2768/90
- Ethanol, PENTA, s.r.o
- Lecitin (lec), Rohm und Haas, Germany
- Aceton, (ACE) Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Kolliphor® P 188, Sigma-Aldrich (Praha, ČR)
- Čištěná voda, příprava na FaF UK
- chloroform (CHLO), PENTA, s.r.o
- dichlormethan (DCM), PENTA, s.r.o
- metanol (MET), PENTA, s.r.o
- Glyceroltristearát, Sigma-Aldrich, Praha
- glycerol monostearát (MS), Sigma-Aldrich, Praha

### 4.3 Příprava nanočástic

Částice byly připravovány metodou nanoprecipitace a emulzní odpařovací metodou za použití ultrazvuku. Metoda nanoprecipitace se však ukázala jako nevhodná pro použitý typ lipidu, proto je ve většině pokusů i ve finální formulaci použita emulzní odpařovací metoda.

#### 4.3.1 Příprava metodou nanoprecipitace

- Vnější fáze – Kolliphor P188 byl navážen v navážkách 0,05 g, 0,1 g a 0,2 g, následně k němu bylo přidáno 10 ml vody. Roztok byl míchán na míchačce při laboratorní teplotě. Vznikly roztoky Kolliphoru P188 o koncentracích 0,5%, 1% a 2%.
- Vnitřní fáze – Nejprve byl použit jako tuhý lipid glyceroltristearát. Na analytických vahách bylo naváženo 50 mg glyceroltristearátu, který byl smísen s 1 ml ACE. Lipid se však nepodařilo rozpustit ani po přidání dalšího 1 ml ACE, 1 ml CHLO, zahřívání a ani po použití ultrazvuku. Proto byl dále používán jako tuhý lipid MS. Bylo naváženo 50 mg MS, navážka byla připravena celkem třikrát. K vzorkům bylo přidáno 1 ml ACE. Dále byla třikrát připravena navážka 25 mg MS, k ní bylo přidáno 1 ml ACE a 1 ml CHLO. Směs byla zahřívána až do úplného rozpuštění lipidu.

Vnější fáze byla zahřátá na teplotu 50-60 °C a probíhalo neustálé míchání na magnetické míchačce. Do vnější fáze byla pomalu po kapkách přidávaná zahřátá vnitřní fáze. Po přidání celého objemu vnitřní fáze byla kádinka i s míchačkou přemístěna do digestoře, kde docházelo k odpařování organického rozpouštědla. Odpařování trvalo 2 hodiny. Poté byl obsah kádinky přefiltrován přes filtrační papír a následovalo měření velikosti částic a zeta potenciálu. Před měřením byl vzorek naředěn v poměru 1:10 destilovanou vodou.

#### 4.3.2 Příprava emulzní odpařovací metodou za použití ultrazvuku

- Vnější fáze – viz. příprava metodou nanoprecipitace. Navíc byl při některých pokusech připraven roztok Kolliphoru P188 i v koncentraci 0,1%.
- Vnitřní fáze – Na analytických vahách byly přichystány tři navážky 25 mg MS. Ke každé bylo vždy přidán 1 ml organického rozpouštědla. V případě potřeby byla směs zahřívána až do rozpuštění lipidů. Jako organická rozpouštědla byli použity CHLO, DCM, MET, ACE a jejich různé poměry. Použitá rozpouštědla a jejich poměry u všech vzorků jsou popsány v tabulce č. 9. V některých vzorcích



byl přidán k naváženému lipidu i ko-surfaktant – lecitin. U vybraných formulací byl přidán do vnitřní fáze isopropylmyritát v navážkách 5 mg nebo 10 mg. U finální formulace bylo enkapsulováno léčivo indometacin. Ten byl přidán při přípravě vzorku do vnitřní fáze.

5 ml vnější fáze bylo chlazeno na ledové lázni. Poté byla přidána vnitřní fáze a následovalo působení vysokofrekvenční ultrazvukové sondy po dobu jedné minuty. U vzorků č. 71 až 75 byla prodloužena doba sonikace na tři a pět minut. Poté byl obsah kádinky přelit do dalších 5 ml vnější fáze, která byla míchána. Následovalo odpařování organického rozpouštědla v digestoři. Odpařování trvalo 1-2 hodiny, dle použitého rozpouštědla. Po odpaření byl vzorek přefiltrován přes filtrační papír, naředěn 1:10 destilovanou vodou a byla měřena velikost částic a zeta potenciál. Měření probíhalo na přístroji Zetasizer, který proměřil každý vzorek třikrát. Z těchto tří měření byl vždy vypočítán průměr, který je uvedený v tabulkách.

### **4.3.3 Použité metody sonikace**

U dvou druhů vnitřních fází byly zkoušeny různé metody sonikace.

1. K vnitřní fázi se přidá celý objem vnější fáze (10 ml), poté následuje sonikace.
2. K vnitřní fázi se přidá polovina vnější fáze (5 ml), následuje sonikace. Poté je vzniklá emulze přidána do zbylého roztoku vnější fáze (5 ml), který je míchán na magnetické míchačce.

Metoda přípravy je u každého vzorku uvedena v tabulce č. 9.

### **4.3.4 Stabilita závěrečné formulace**

U vybrané finální formulace obsahující ve vnitřní fázi CHLO a MET v poměru 1:1, Kolliphor P188 0,1%, lec 15 mg a IPM 10 mg byla zkoumána její stabilita. U této formulace byly měřeny hodnoty PDI, velikost LN a zeta potenciál. Měření probíhalo 1., 4., 6., a 15. den po přípravě formulace. Vzorek byl mezi měřeními uchováván v lednici při teplotě 2-8 °C. Před měřením bylo odebráno potřebné množství k měření a směs byla naředěna destilovanou vodou v poměru 1:10.

### **4.3.5 Rozpustnost Ind v lipidech**

Pro určení množství Ind, které bude přidáno do formulace, se zjišťovala jeho rozpustnost v IPM a MS. Bylo naváženo 5 mg Ind a 200 mg MS. Tato směs byla zahřívána v sušárně při teplotě 80 °C. Po roztavení lipidu se sledovalo rozpouštění Ind v lipidu. Postupně byl přidáván další MS v navážkách 100 mg až do rozpuštění Ind v lipidu. Po každém přidání

MS byla směs protřepána a následně znovu zahřátá. Stejný postup pobíhal i u IPM. Bylo naváženo 500 mg IPM a k němu bylo přidáno 5 mg Ind. IPM byl přidáván v navážkách 50 mg až do rozpuštění Ind ve směsi. Byla také zkoumána rozpustnost Ind ve směsi MS, IPM a lec v poměru 5:2:3, což bylo vlastně složení vnitřní fáze ve finální formulaci. Směs lipidů a lec byla roztavena v daném poměru a důkladně promíchána. Poté bylo opět naváženo 5 mg Ind, ke kterému byla postupně přidávána tato směs, a zjišťovalo se množství, které je třeba přidat k rozpuštění Ind. Rozpuštění bylo indikováno opticky, vymizením viditelných částic Ind.

#### **4.3.6 Příprava LN s Ind**

Před přípravou samotné formulace byla zjišťována rozpustnost Ind ve směsi MS, IPM a lec. Směs těchto látek v poměru 5:2:3 byla předem roztavena v sušárně a řádně zamíchána. Následně bylo naváženo 5 mg Ind, ke kterému byla postupně přidávaná navážka této směsi při zahřívání v sušárně na teplotu 80 °C. Tato navážka Ind byla nakonec rozpuštěna ve 483 mg této směsi. Z této hodnoty byla vypočítána potřebná navážka Ind, který se rozpustí ve formulaci obsahující 50 mg směsi lipidů. Pro přípravu byla vybrána finální formulace obsahující ve vnitřní fázi 25 mg MS, 15 mg lec, 10 mg IPM a organická rozpouštědla CHLO a MET v poměrech 1:1 o celkovém objemu 1 ml. Vnější fáze byla 0,1% roztok Kolliphoru P188 o objemu 10 ml. Vypočítaná navážka Ind, který se rozpustí ve zkoumané směsi lipidů, byla 0,518 mg Ind.

Z této hmotnosti bylo vypočítáno množství Ind, které by se rozpustilo v 80 % a ve 200 % hmotnosti dané směsi lipidů. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 1. Vypočítané navážky Ind byly dále použity pro enkapsulaci různého množství Ind do LN, navážka směsi lipidů při přípravě LN byla vždy stejná (50 mg). Hodnota 80 % byla vybrána, aby bylo jisté, že bude všechen Ind enkapsulován uvnitř LN. Hodnota 200 % byla vybrána, abychom zjistili co se stane, pokud přidáme do LN více Ind, než je rozpustné ve směsi lipidů. Tedy zda jsou LN schopné enkapsulovat i větší množství Ind, než je rozpustné v samotné směsi lipidů.

Tabulka 1 – Navážky Ind, které se rozpustí v daném množství lipidů. 100 % množství lipidů je zde 50 mg.

Množství lipidů uvedené v %	Ind (mg)
80	0,414
100	0,518
200	1,035

#### 4.4 DSC

Pomocí DSC byly proměřeny vzorky s Ind, lec, MS, IPM, jejich směsi a různé formulace LN. Před měřením LN byla provedena nejprve jejich purifikace. Při přípravě před měřením bylo nutné velmi přesně navážit zkoumanou látku. Pro měření se používaly dva hliníkové kelímky, jeden byl zvážen prázdný a byl použit jako referenční vzorek. Druhý kelímek byl zvážen nejprve prázdný a poté se zkoumanou látkou, která byla navážena v množství 5-10 mg s přesností na pět desetinných míst. Pro lec byl použit větší kelímek, speciálně určen pro kapalné látky. Následně byly kelímky zapečetěny, zváženy a vloženy pinzetou do přístroje. Na počítači byl nastaven požadovaný rozsah měřených teplot a rychlost ohřívání na  $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ , u některých vzorků byla tato rychlost nastavena na  $1 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$ . Rozsah teplot byl nastaven v rozmezí  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  až  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ .

V tabulce č. 2 je uveden seznam všech měřených vzorků a jejich rychlostí měření. Směsi uvedené v tabulce jsou složeny z MS, IPM a lec v poměru 5:2:3. SLN jsou připraveny z 25 mg MS a 15 mg lec, navíc je při přípravě použit Kolliphor P188, NLC jsou totožné, akorát navíc obsahují 10 mg IPM.

**Tabulka 2 - Přehled měřených vzorků na DSC**

<b>Vzorek</b>	<b>Rychlost měření</b>
Ind	10 K.min <sup>-1</sup>
Ind	1 K.min <sup>-1</sup>
MS	10 K.min <sup>-1</sup>
MS	1 K.min <sup>-1</sup>
Lec	10 K.min <sup>-1</sup>
Směs	10 K.min <sup>-1</sup>
Směs	1 K.min <sup>-1</sup>
Směs + Ind	10 K.min <sup>-1</sup>
Směs + Ind	1 K.min <sup>-1</sup>
SLN bez Ind	10 K.min <sup>-1</sup>
SLN s Ind	10 K.min <sup>-1</sup>
NLC bez Ind	10 K.min <sup>-1</sup>
NLC bez Ind	1 K.min <sup>-1</sup>
NLC s Ind	10 K.min <sup>-1</sup>
NLC s Ind	1 K.min <sup>-1</sup>

#### **4.4.1 Purifikace LN**

Pro zkoumání LN bylo potřeba nejprve provést purifikaci připravených nanočástic. Připravená formulace byla nejprve proměřena na přístroji Zetasizer a následovala purifikace. Směs byla umístěna ve stejných objemech do vialek pro centrifugu. Centrifuga byla nejprve nastavena na 15 min, 4 °C a 7000 g, ale po centrifugaci vzorků se ukázalo toto nastavení jako nedostatečné, jelikož nedošlo k sedimentaci nanočástic a následoval další cyklus při nastavení na 15 min a 20000 g. Některé vzorky musely být separovány pomocí centrifugy i potřetí a to na dalších 30 minut a 20000 g. Poté byly na dně sedimentované LN. Supernatant byl odstraněn a sedimentované LN byly sušeny dva dny v digestoři za laboratorní teploty na vzduchu. Vysušené LN byli naváženy do hliníkového kelímku. Dále následovalo měření pomocí DSC.

Jelikož byla centrifugace u některých vzorků málo efektivní a výtěžek byl nízký, byla zkoušena purifikace LN pomocí dialýzy. Připravená formulace LN byla vpravena do dialyzační membrány, která byla uzavřena svorkou. Dialyzační membrána byla vložena

do kádinky s vodou, která byla míchaná na magnetické míchačce. Purifikace touto metodou však nebyla úspěšná, jelikož došlo k vysrážení LN v membráně (obrázek č. 9).



**Obrázek 9 - Vysrážení LN v dialyzační membráně**

Dále byly LN purifikovány pomocí centrifugy a centrifugačního membránového koncentrátoru Vivaspin. Skládá se z malé zkumavky rozdělené na dvě části ultrafiltrační membránou. V horní části se nachází vzorek, který má být zkoncentrován. Během centrifugace dochází pomocí membránové ultrafiltrace k oddělení rozpouštědla, které přechází do dolní části této zkumavky. Jsou různé druhy těchto filtrů, dle objemu zkoumaného vzorku a molekulové hmotnosti dané látky.<sup>66</sup> Pro naše účely jsme použili centrifugační filtr Vivaspin 500 MWCO 100 000 g.mol<sup>-1</sup>. Do každého filtru bylo umístěno 0,5 ml vzorku, následovala separace pomocí centrifugy. Získaný filtrát byl dále použit pro HPLC analýzu a koncentrát byl použit pro DSC.

## 4.5 HPLC

Pro zjištění enkapsulační efektivity a naplnění LN léčivem byly připravené vzorky zkoumány pomocí HPLC. Následovala příprava LN. Celkem byly připraveny tři druhy vzorků NLC. Vzorky jsou popsány v tabulce č. 3.

**Tabulka 3 - Vzorky měřené pomocí HPLC - formulace obsahuje organická rozpouštědla CHLO + MET v poměru 1:1, 10 mg IPM, surfaktanty lec 15 mg a Kolliphor P188 0,1% a dále množství Ind dle tabulky. Slepý vzorek je pouze NLC bez enkapsulovaného Ind.**

	<b>Množství Ind (mg)</b>	<b>Množství Ind v 1 mg LN</b>
1	Slepý vzorek	-
2	0,414	8,28 µg
3	1,035	20,7 µg

### 4.5.1 Příprava vzorků

Nejprve byly připraveny vnější a vnitřní fáze a následovala tvorba LN pomocí emulzní odpařovací metody. Vnitřní fáze byla tvořena rozpouštědly CHLO a MET v poměru 1:1 o celkovém objemu 1 ml. Dále obsahovala 25 mg MS, 10 mg IPM, 15 mg lec a Ind v navázce dle druhu vzorku. Vnější fáze byla tvořena 0,1% roztokem Kolliphoru P188. Připravené LN byly proměřeny na přístroji Zetasizer a následně přefiltrovány přes filtr 1,2 µm. Dalším krokem byla separace LN pomocí centrifugy, pro kterou byl použit centrifugační filtr Vivaspin 500, 100 000 MWCO. Do každé z těchto filtračních vialek bylo přidáno 0,5 ml vzorku. Centrifuga byla nejprve nastavena na 20 min, 12000 g při teplotě 4 °C. Po proběhnutí tohoto cyklu však nebylo získáno dostatečné množství vzorku. Další cyklus byl nastaven na 21000 g, 4 °C a 20 min a proběhl dvakrát. Po třetím cyklu bylo získáno dostatečné množství vzorku. U některých vzorků bylo nastavení centrifugy 12000 g a 40 min. Nastavení centrifugy bylo individuální, vždy dle výsledků separace LN. U některých vzorků trvala separace delší dobu, ze začátku byla doba separace nastavena na 20 min, nicméně cyklus musel být opakován, a tak byl později čas nastaven rovnou na 40 min.

Ze vzniklého filtrátu bylo odebráno 250 µl vzorku do vialky a k němu bylo přidáno 250 µl mobilní fáze, která byla předem připravena. Následně byly vzorky uchovány při teplotě -20 °C ve vialce až do měření HPLC. Další připravované vzorky byly roztok Kolliphoru P188 v destilované vodě o koncentraci 2,5 mg.ml<sup>-1</sup>, který byl dále ředěn. Jako testovací

vzorky byly použity roztok Kolliphoru P188 o koncentraci  $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$  a roztok Ind o koncentraci  $2,75 \text{ mg.ml}^{-1}$ .

Jelikož byly získané výsledky nedostačující pro vyhodnocení, pro upřesnění výsledků byly ještě následně připraveny další vzorky, dva vzorky NLC s navázkou Ind  $0,414 \text{ mg}$ , dva vzorky NLC bez Ind, spike (vzorek LN bez Ind smíchaný s mobilní fází, obsahující Ind v koncentraci  $2,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  v poměru 1:1). Dále byly analyzovány vzorky MS, IPM a lec rozpuštěné v mobilní fázi. Seznam všech měřených vzorků je uveden v tabulce č. 6 a 7.

#### 4.5.2 Měření

Před měřením byla připravena mobilní fáze, která byla složena z acetonitrilu, vody a kyseliny octové v poměru 90:60:5. Dále byly připraveny vzorky pro kalibrační křivku, navážka  $550 \text{ } \mu\text{g}$  Ind byla rozpuštěna ve 25 ml mobilní fáze, vznikl roztok Ind o koncentraci  $22 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ , který byl dále ředěn. Koncentrace roztoku jsou popsány v tabulce č. 4.

	<b>Koncentrace roztoku Ind pro kalibrační křivku (<math>\mu\text{g.ml}^{-1}</math>)</b>
1	22,000
2	11,000
3	5,5000
4	2,7500
5	1,3750
6	0,6875
7	0,3438

**Tabulka 4 - Rostoky pro kalibrační křivku.**

Parametry měření jsou shrnuty v tabulce č. 5. Před samotným měřením byla kolona promyta nejprve roztokem MET a vody v poměru 1:1 deset minut a následně mobilní fází až do ustálení tlaku. Pro kontrolu reprodukovatelnosti výsledků byl jako první proměřen třikrát stejný vzorek o koncentraci Ind  $1,375 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Následně byl analyzován vzorek Kolliphoru P188 o koncentraci  $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$  a poté roztok připravený smísením Kolliphoru P188 o koncentraci  $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$  a roztok Ind v mobilní fázi o koncentraci  $2,75 \text{ mg.ml}^{-1}$  v poměru 1:1. Dále byly proměřeny vzorky pro kalibrační křivku a poté

následovalo měření připravených zkoumaných vzorků NLC bez Ind, a s enkapsulovaným Ind v množství 0,414 mg a 1,035 mg. Tyto vzorky NLC byly připraveny vždy dvakrát.

**Tabulka 5 - Parametry měření <sup>61</sup>**

<b>Parametry HPLC</b>	
Kolona	LiChrospher 100 (LiChroCart 250-4) RP-18 endcapped (5 µm) – s reverzní fází
Mobilní fáze	acetonitril, voda a kyselina octová v poměru 90:60:5
Průtok	1 ml.min <sup>-1</sup>
Nastříkovaný objem	50 µl
Teplota kolony	40 °C
UV detekce	260 nm
Doba analýzy	20 min

**Tabulka 6 - Seznam měřených vzorků pomocí HPLC při první analýze**

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Složení vzoru</b>	<b>Počet vzorků</b>
1	NLC 0,414 mg Ind	2
2	NLC 1,035 mg Ind	2
3	NLC blank	2
4	Ind 2,5 µg.ml <sup>-1</sup>	3
5	Spike (2,75 µg.ml <sup>-1</sup> Ind + 1,25 mg.ml <sup>-1</sup> Kolliphor P188)	1
6	Kolliphor P188 1,25 mg.ml <sup>-1</sup>	1



Tabulka 7 - Seznam měřených vzorků pomocí HPLC při druhé analýze

Číslo vzorku	Složení měřeného vzorku	Počet vzorků
1	NLC 0,414 mg Ind	2
2	NLC 1,035 mg Ind	1
3	NLC blank	1
4	Spike (0,25 ml NLC blank + 0,25 ml MF s 2,5 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ Ind)	1
5	IPM 10,5 $\text{mg.ml}^{-1}$	1
6	Lec 13 $\text{mg.ml}^{-1}$	1
7	MS 11,5 $\text{mg.ml}^{-1}$	1

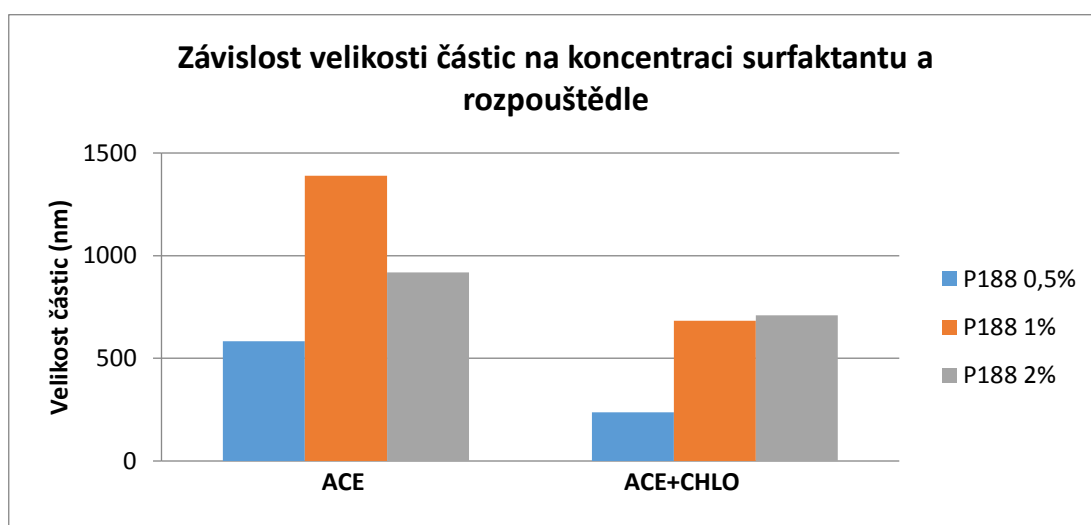
## 4.6 Výsledky a diskuze

### 4.6.1 Metoda nanoprecipitace

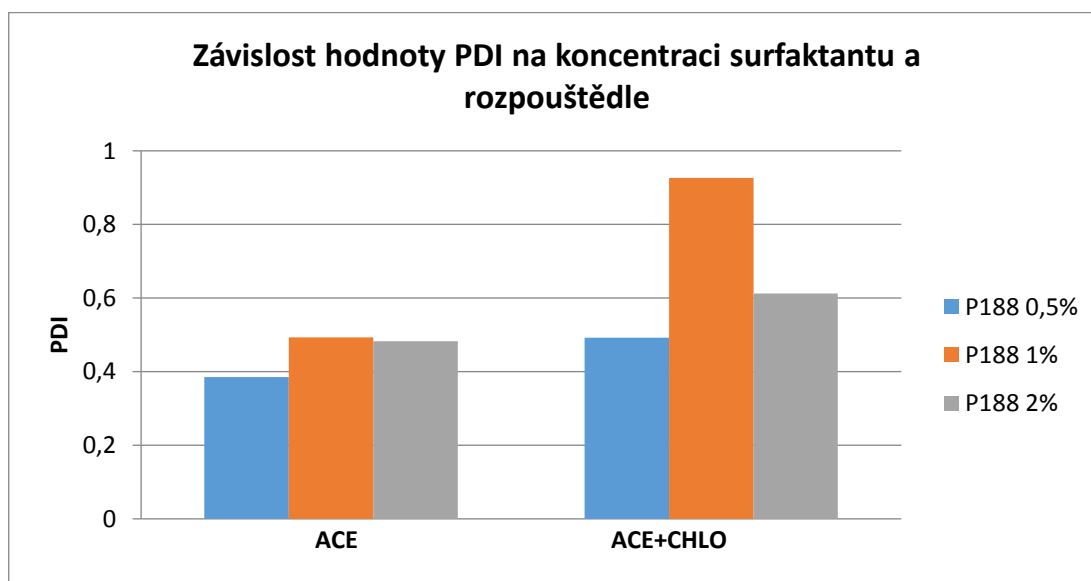
LN byly nejprve připraveny metodou nanoprecipitace. Hodnoceny byly parametry LN, jako jsou velikost částic, hodnota PDI a zeta potenciál. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 8 a na obrázku č. 10 a 11. Nejmenší částice o velikosti 236,4 nm vznikaly při koncentraci Kolliphoru P188 0,5% o hodnotě PDI 0,492 s vnitřní fází tvořenou ACE a CHLO v poměru 1:1. Polydisperzita byla nejnižší (0,385) při koncentraci surfaktantu 0,5%, ale při použití vnitřní fáze pouze s ACE. Metoda nanoprecipitace se ale ukázala jako nevhodná, jelikož po přidání vnitřní fáze do vnější fáze vznikaly na hladině velké shluky lipidu. Po filtraci zůstalo na filtračním papíře většina přidaného lipidu. Velikost částic a PDI byla příliš vysoká a hodnoty zeta potenciálu byly naopak nízké. Samotný ACE se ukázal jako nevhodný pro přípravu LN, protože použitý lipid MS byl špatně rozpustný v ACE. MS v ACE bylo potřeba zahřívát, ale i po mírném ochlazení lipid ihned krystalizoval v roztoku. Proto byla v následujících pokusech použita emulzní odpařovací metoda.

Tabulka 8 – LN připravené metodou nanoprecipitace

Vzorek	Rozpouštědlo	Surfaktant	Velikost (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)	Poznámka
1	ACE	P188 0,5%	582,8	0,385	-4,8	50 mg MS
2	ACE	P188 1%	1390,0	0,493	-22,0	50 mg MS
3	ACE	P188 2%	918,3	0,483	-21,6	50 mg MS
4	ACE + CHLO 1:1	P188 0,5%	236,4	0,492	-26,8	
5	ACE + CHLO 1:1	P188 1%	682,7	0,926	-17,2	
6	ACE + CHLO 1:1	P188 2%	710,0	0,612	-13,5	



Obrázek 10 – Závislost velikosti částic na koncentraci surfaktantu Kolliphor P188 a rozpouštědla



Obrázek 11 - Závislost hodnoty PDI na koncentraci surfaktantu Kolliphor P188 a rozpouštědla

## 4.6.2 Emulzní odpařovací metoda

U emulzní odpařovací metody byly zkoušeny různé druhy organických rozpouštědel a jejich poměry při přípravě vnitřní fáze. Konkrétní složení zkoušených vzorků a jejich parametry jsou uvedeny v následující kapitole.

### 4.6.2.1 Přehled vzorků

V tabulce č. 9 je uvedený seznam měřených vzorků, složení rozpouštědel, surfaktantů a parametry LN.

Tabulka 9 – Emulzní odpařovací (metoda 1 – k vnitřní fázi přidána celá vnější fáze najednou, metoda 2 – k vnitřní fázi přidána vnější fáze ve dvou krocích)

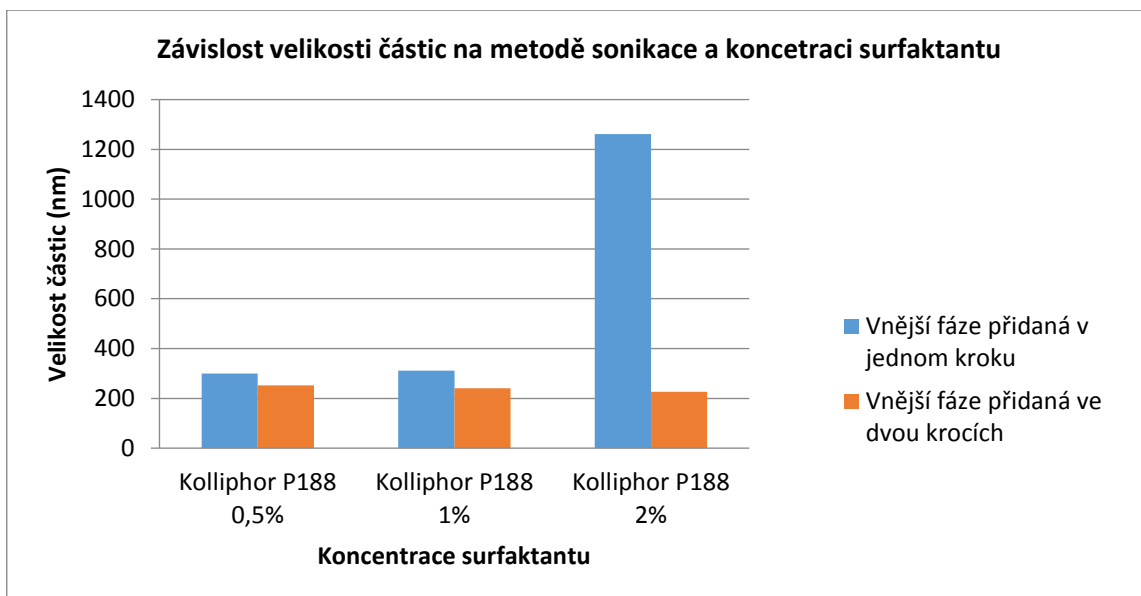
Vzorek	Rozpouštědlo	Surfaktant	Velikost (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)	Poznámka
7	CHLO	P188 0,5%	300,3	0,483	-5,1	Metoda 1
8	CHLO	P188 1%	310,7	0,813	-3,2	Metoda 1
9	CHLO	P188 2%	1261,0	0,747	-4,8	Metoda 1
10	CHLO	P188 0,5%	252,5	0,659	-8,7	Metoda 2
11	CHLO	P188 1%	241,0	0,613	-10,7	Metoda 2
12	CHLO	P188 2%	226,2	0,986	-4,3	Metoda 2
13	DCHLM	P188 0,5%	437,5	0,787	-8,8	Metoda 1
14	DCHLM	P188 1%	590,5	0,788	-5,5	Metoda 1
15	DCHLM	P188 2%	1514,0	0,845	-6,9	Metoda 1
16	DCHLM	P188 0,5%	853,3	0,910	-28,1	Metoda 2
17	DCHLM	P188 1%	1008,0	0,851	-16,3	Metoda 2
18	DCHLM	P188 2%	1988,0	1,000	-15,6	Metoda 2
19	CHLO	P188 0,5% + lec 7 mg	265,8	0,289	-29,1	Metoda 2
20	CHLO	P188 1% + lec 7 mg	231,9	0,306	-30,5	Metoda 2
21	CHLO	P188 2% + lec 7 mg	258,3	0,393	-28,0	Metoda 2
22	CHLO	P188 0,5% + lec 15mg	188,1	0,235	-33,0	Metoda 2
23	CHLO	P188 1% + lec 15 mg	330,6	0,479	-43,8	Metoda 2
24	CHLO	P188 2% + lec 15 mg	322,1	0,446	-33,6	Metoda 2
25	CHLO + MET	P188 0,5% + lec 7 mg	200,0	0,283	-41,3	Metoda 2

26	CHLO + MET	P188 1% + lec 7 mg	201,4	0,298	-30,3	Metoda 2
27	CHLO + MET	P188 2% + lec 7 mg	273,8	0,429	-27,5	Metoda 2
28	CHLO + MET	P188 0,5% + lec 15mg	150,2	0,237	-39,4	Metoda 2
29	CHLO + MET	P188 1% + lec 15 mg	154,4	0,282	-37,3	Metoda 2
30	CHLO + MET	P188 2% + lec 15 mg	195,2	0,364	-29,9	Metoda 2
31	CHLO + ACE	P188 0,5% + lec 7 mg	182,8	0,302	-33,5	Metoda 2
32	CHLO + ACE	P188 1% + lec 7 mg	197,4	0,318	-35,6	Metoda 2
33	CHLO + ACE	P188 2% + lec 7 mg	175,1	0,456	-29,5	Metoda 2
34	CHLO + ACE	P188 0,5% + lec 15mg	140,0	0,262	-42,7	Metoda 2
35	CHLO + ACE	P188 1% + lec 15 mg	142,2	0,332	-40,2	Metoda 2
36	CHLO + ACE	P188 2% + lec 15 mg	186,6	0,335	-40,9	Metoda 2
37	CHLO + MET 3:1	P188 0,5%	674,2	0,471	-23,4	Metoda 2
38	CHLO + MET 3:1	P188 1%	815,5	0,693	-23,9	Metoda 2
39	CHLO + MET 3:1	P188 2%	1520,0	0,814	-17,9	Metoda 2
40	CHLO + MET 3:1	P188 0,5% + lec 7 mg	197,5	0,290	-30,9	Metoda 2
41	CHLO + MET 3:1	P188 1% + lec 7 mg	203,2	0,344	-30,4	Metoda 2
42	CHLO + MET 3:1	P188 2% + lec 7 mg	210,0	0,431	-29,3	Metoda 2
43	CHLO + MET 3:1	P188 0,5% + lec 15mg	152,4	0,257	-33,9	Metoda 2
44	CHLO + MET 3:1	P188 1% + lec 15 mg	159,4	0,292	-35,5	Metoda 2
45	CHLO + MET 3:1	P188 2% + lec 15 mg	198,0	0,395	-31,5	Metoda 2
46	CHLO + ACE 1:3	P188 0,5% + lec 7 mg	148,8	0,401	-38,9	Metoda 2
47	CHLO + ACE 1:3	P188 1% + lec 7 mg	118,8	0,488	-36,6	Metoda 2

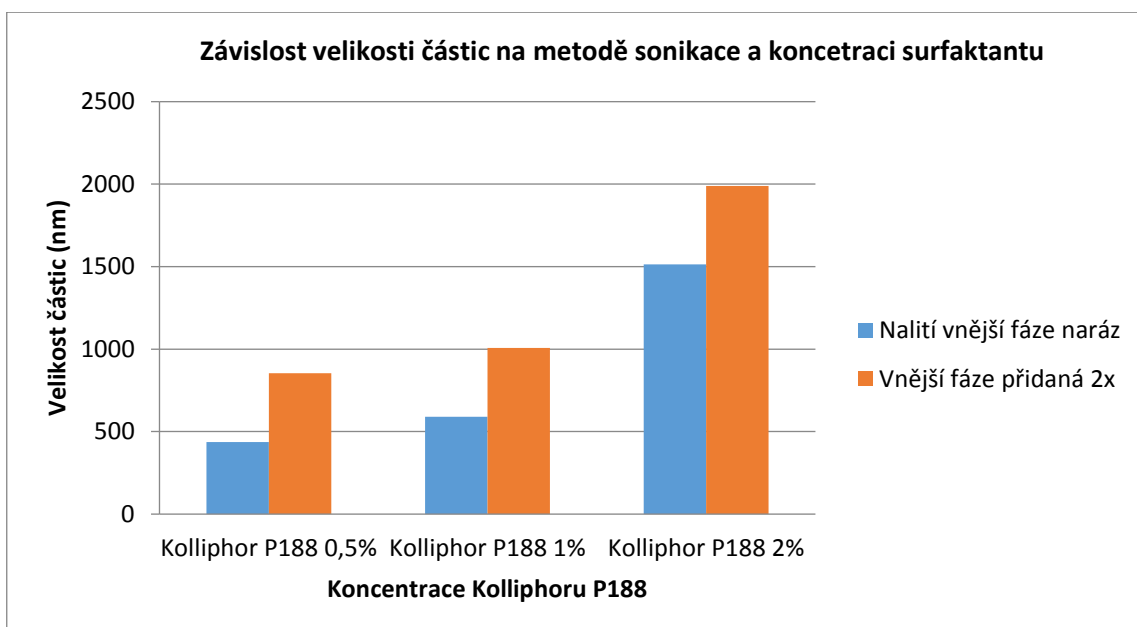
48	CHLO + ACE 1:3	P188 2% + lec 7 mg	153,2	0,557	-34,4	Metoda 2
49	CHLO + ACE 1:3	P188 0,5% + lec 15 mg	139,3	0,347	-41,9	Metoda 2
50	CHLO + ACE 1:3	P188 1% + lec 15 mg	113,3	0,444	-43,0	Metoda 2
51	CHLO + ACE 1:3	P188 2% + lec 15 mg	139,2	0,504	-39,5	Metoda 2
52	CHLO + MET 1:3	P188 0,5% + lec 7 mg	160,6	0,286	-33,2	Metoda 2
53	CHLO + MET 1:3	P188 1% + lec 7 mg	215,2	0,414	-34,6	Metoda 2
54	CHLO + MET 1:3	P188 2% + lec 7 mg	322,6	0,615	-28,9	Metoda 2
55	CHLO + MET 1:3	P188 0,5% + lec 15 mg	122,5	0,247	-28,1	Metoda 2
56	CHLO + MET 1:3	P188 1% + lec 15 mg	180,1	0,312	-35,9	Metoda 2
57	CHLO + MET 1:3	P188 2% + lec 15 mg	279,4	0,490	-37,4	Metoda 2
58	CHLO + MET 1:3	P188 0,1% + lec 7 mg	146,6	0,245	-35,7	Metoda 2
59	CHLO + MET 1:3	P188 0,1% + lec 15 mg	119,5	0,225	-38,0	Metoda 2
60	CHLO + ACE 1:3	P188 0,1% + lec 7 mg	195,1	0,269	-34,9	Metoda 2
61	CHLO + ACE 1:3	P188 0,1% + lec 15 mg	155,4	0,278	-43,4	Metoda 2
62	CHLO + MET 1:3	P188 0,1% + lec 7 mg	181,4	0,262	-37,3	Metoda 2
63	CHLO + MET 1:3	P188 0,5% + lec 7 mg	186,8	0,267	-35,5	Metoda 2
64	CHLO + MET 1:3	P188 1% + lec 7 mg	196,7	0,331	-32,5	Metoda 2
65	CHLO + MET 1:3	P188 0,1% + lec 15 mg	138,9	0,226	-41,6	Metoda 2
66	CHLO + MET 1:3	P188 0,5% + lec 15 mg	132,9	0,234	-40,9	Metoda 2
67	CHLO + MET 1:3	P188 1% + lec 15 mg	142,8	0,278	-38,2	Metoda 2

68	CHLO + MET 3:1	P188 0,1% + lec 7 mg	221,6	0,261	-36,9	Metoda 2
69	CHLO + MET 3:1	P188 0,1% + lec 7 mg	224,6	0,267	-40,8	Nefiltrované Metoda 2
70	CHLO + MET 3:1	P188 0,1% + lec 15 mg	185,2	0,249	-43,8	Metoda 2
76	CHLO + ACE 1:3	P188 0,1% + lec 7 mg	211,4	0,251	-38,7	2 ml rozpouštědla
77	CHLO + ACE 1:3	P188 0,1% + lec 15 mg	157,1	0,246	-40,2	2 ml rozpouštědla
78	CHLO + MET 1:3	P188 0,1% + lec 7 mg	187,8	0,258	-36,9	2 ml rozpouštědla
79	CHLO + MET 1:3	P188 0,1% + lec 15 mg	144,5	0,239	-44,0	2 ml rozpouštědla

U formulace obsahující ve vnitřní fázi pouze CHLO (vzorek č. 7-12) a DCM (vzorek č. 13-18) byl zjišťován vliv metody sonikace na vlastnosti částic (obrázek č. 12, 13). U formulace s CHLO měly částice menší velikost i PDI při přípravě metodou 2, u formulace s DCM byla závislost opačná. Formulace s CHLO však vycházela v porovnání s formulací s DCM lépe. Nejmenší částice byly ve vzorku č. 12 o velikosti 226,2 nm, hodnota PDI vycházela nejnižší u vzorku č. 13. o hodnotě 0,613. Ve druhé formulaci byly nejmenší částice ve vzorku č. 13. o velikosti 437,5 nm a PDI 0,787. U následujících vzorků (č. 19-58) byla proto použita metoda 2 a jako rozpouštědlo do vnitřní fáze byl použit CHLO.



Obrázek 12 – Závislost velikosti částic LN na metodě sonikace a koncentraci surfaktantu. Formulace s CHLO



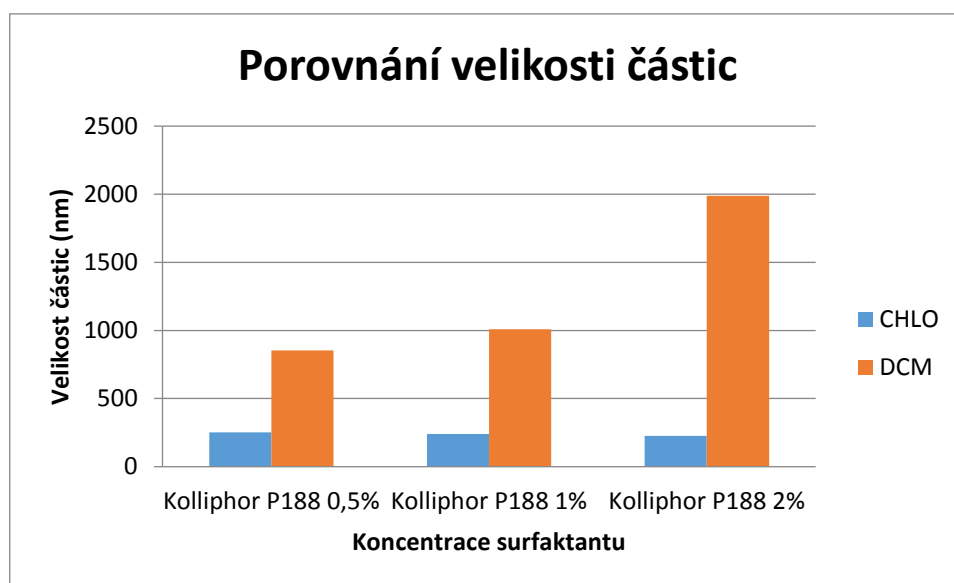
Obrázek 13 - Závislost velikosti částic na metodě sonikace a koncentraci surfaktantu. Formulace s DCM.

#### 4.6.2.2 Vliv surfaktantů na vlastnosti částic

U vzorků č. 7-18 byl použit jako surfaktant pouze Kolliphor P188. Je to poloxamer 188, který se skládá z jednotek polypropylenoxidu a polyethylenoxidu. Slouží ve formulaci jako stabilizátor vzniklých částic a solubilizátor. Číslo v názvu označuje obsah polyetylenoxidu v % a molekulovou hmotnost polypropylenoxidu. Kritická micelární koncentrace tohoto surfaktantu je  $0,48 \text{ mmol.l}^{-1}$  ( $\text{pH} = 7,4$ ).<sup>62</sup> Je to hodnota koncentrace surfaktantu, při které se začínají tvořit v roztoku micely. Po dosažení této koncentrace, další přidávání surfaktantu nesnižuje povrchové napětí, ale vznikají micely. CMC je ovlivněna různými vlivy (např. teplota, tlak, přidané elektrolyty).<sup>63, 64</sup>

Pokud byl použit pouze Kolliphor P188, ve formulaci docházelo ke shlukování lipidů během odpařování rozpouštědla, lipidy vytvářely shluky na hladině. Po filtraci zůstávalo na filtračním papíře velké množství lipidu. Nejvíce hluků lipidu na hladině se vyskytovalo při koncentraci Kolliphoru P188 0,5%.

K porovnání na obrázku č. 14 je využita metoda sonikace 2, která byla využívána při dalších pokusech. Nejmenší částice u formulace s CHLO měly velikost 226,2 nm při koncentraci P188 2% Nejmenší částice u formulace s DCM měly velikost 853,3 nm při koncentraci surfaktantu P188 0,5%.



Obrázek 14 - Porovnání velikosti částic při použití rozpouštědel CHLO a DCHLM ve vnitřní fázi

Ke zvýšení stability byl přidán další surfaktant lecitin. Přidání dalšího surfaktantu by mělo zmenšit velikost částic a zvýšit jejich stabilitu při skladování.<sup>9</sup> Lecitin se skládá ze zbytku mastných kyselin, glycerolu, cholinu a kyseliny fosforečné. a vzhledem k jeho hydrofilním i lipofilním vlastnostem působí emulgačně. CMC lecitinu se pohybuje v rozmezí 0,18-0,28 mmol.l<sup>-1</sup> v závislosti na pH (nejvyšší CMC při zásaditém pH). CMC může být také ovlivněno přidáním elektrolytu.<sup>65</sup>

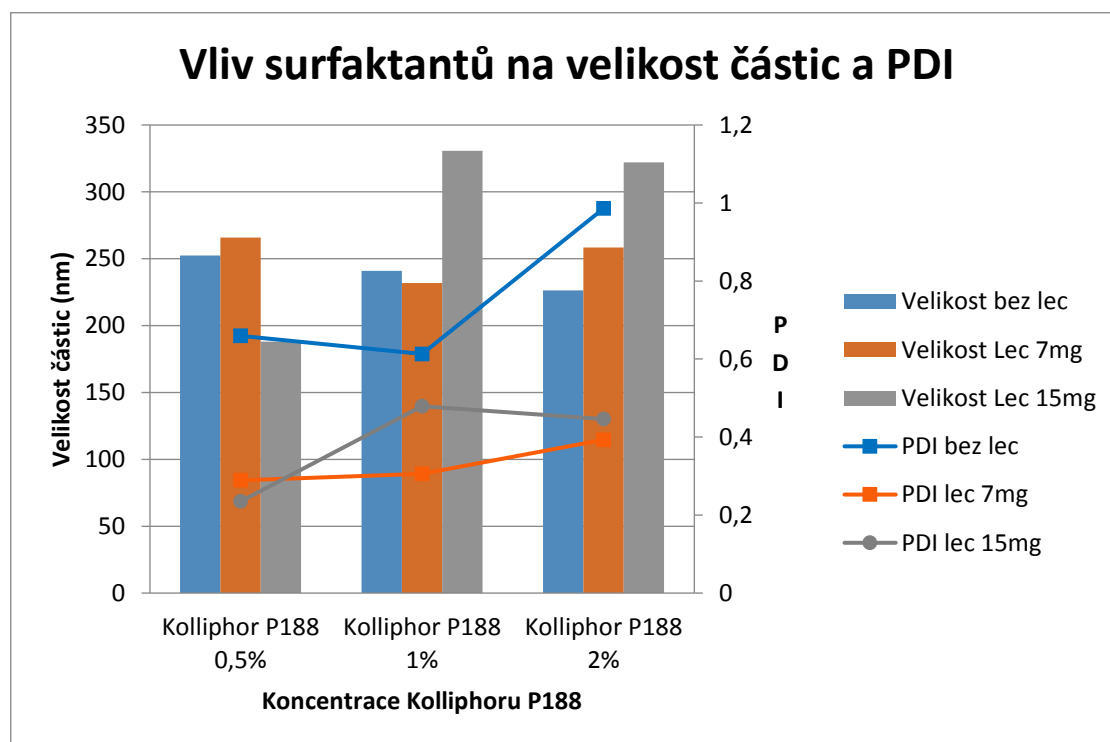
Lec byl v navázce 7 mg nebo 15 mg přidán do vnitřní fáze. Po přidání lec se výrazně změnila vlastnosti částic. Byly testovány formulace obsahující ve vnitřní fázi CHLO a dále CHLO + MET v poměru 3:1.

Nejvýraznější vliv měl lec na snížení hodnoty PDI a na zlepšení vlastností formulace. U formulace s CHLO (obrázek č. 15, 16) měly nejnižší PDI o hodnotě 0,235 vzorky s nejnižší koncentrací Kolliphoru P188 a nejvyšším obsahem lec. Absolutní hodnoty zeta potenciálu výrazně vzrostly u všech koncentrací lec, nejvýrazněji u koncentrace

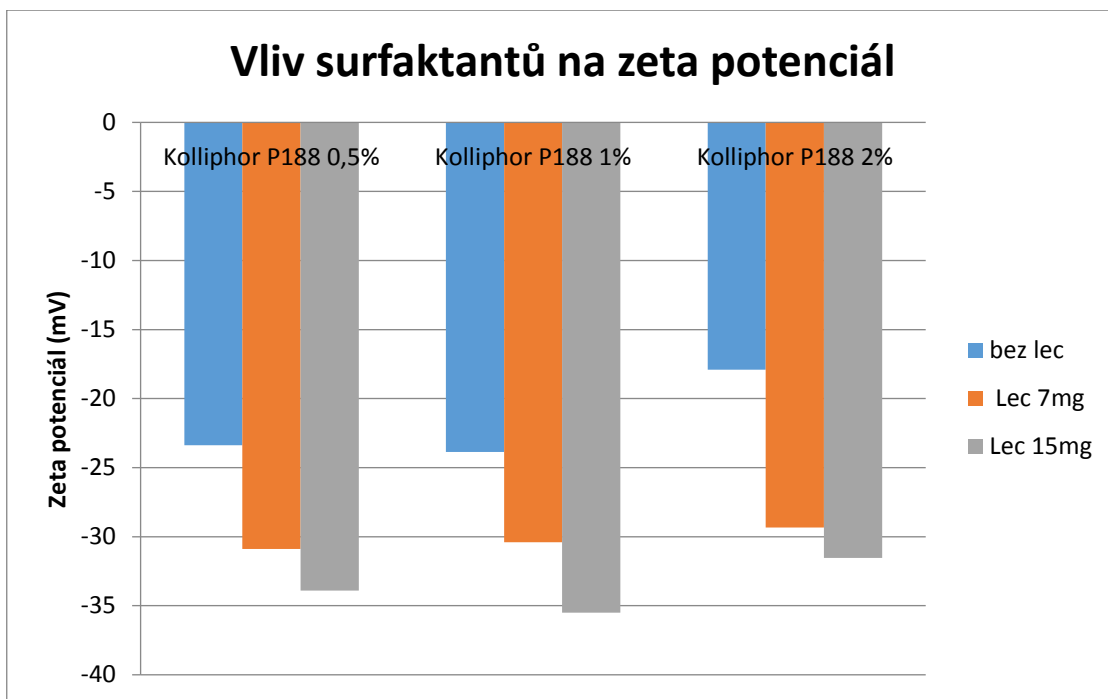


Kolliphoru P188 1% + 15 mg lec na hodnotu -43,8 mV. Velikost částic se snížila při koncentraci Kolliphoru P188 0,5% + 15 mg lec a naopak se zvýšila při koncentraci Kolliphoru P188 2% při všech koncentracích lec. Toto zvětšení velikosti částic mohlo být způsobeno agregací LN při příliš vysoké koncentraci surfaktantu ve vodné fázi. Jak je vidět na obrázku č. 19 a 20, výrazně se snížila tvorba shluků na hladině, po přidání lec do formulace.

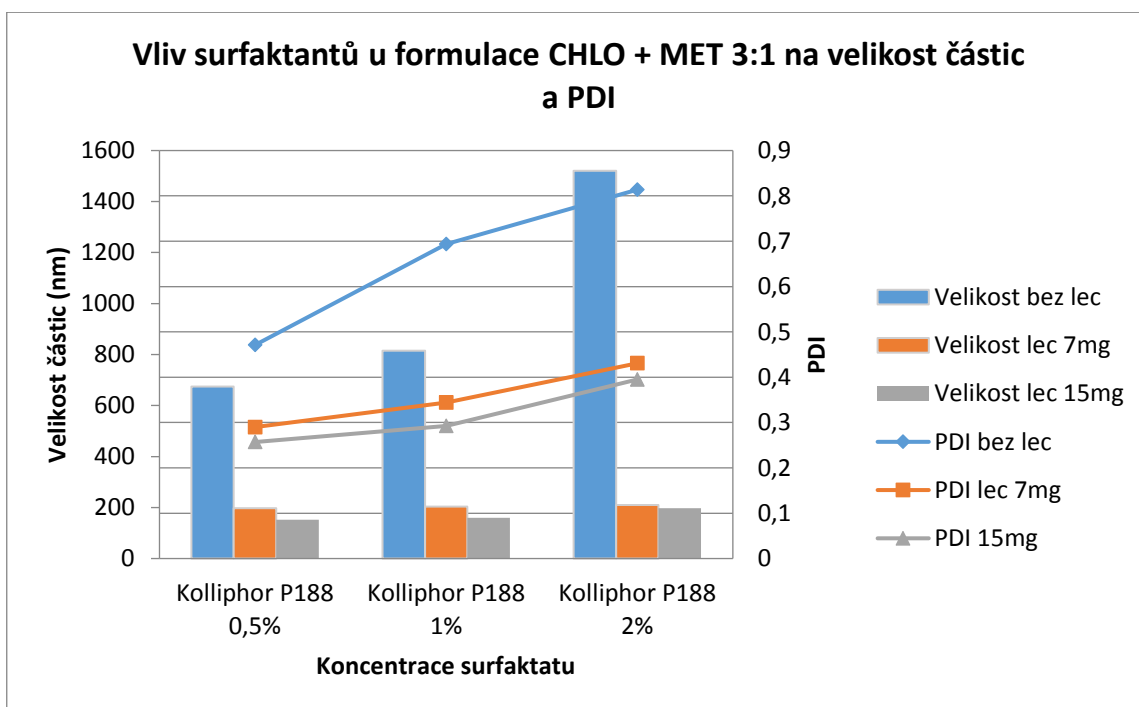
U další zkoušené formulace obsahující CHLO + MET 3:1, přidaný lec výrazně snížil velikost částic a PDI, také zvýšil zeta potenciál (obrázek č. 17, 18). Nejmenší částice o velikosti 152,4 nm s nejnižší hodnotou PDI 0,257 vznikaly při kombinaci Kolliphoru P188 0,5% a lecitinu 15 mg. Hodnota zeta potenciálu byla nejvyšší při kombinaci Kolliphoru P188 1% a lec 15 mg.



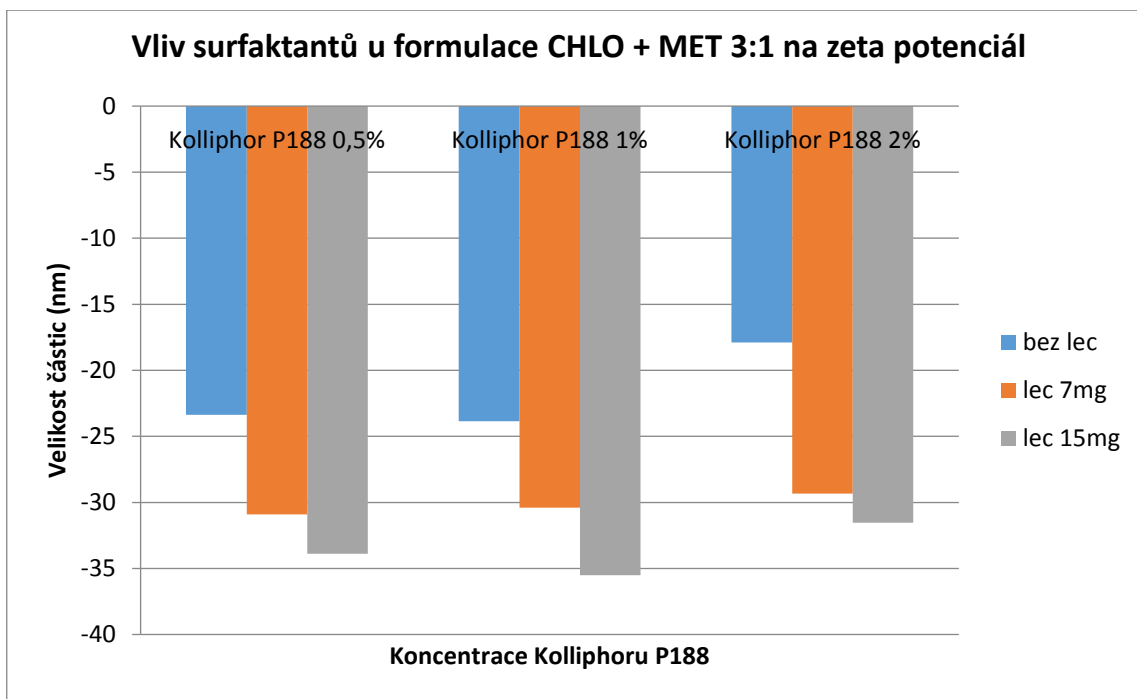
Obrázek 15 - Vliv surfaktantů u formulace s CHLO na velikost částic a PDI



Obrázek 16 - Vliv surfaktantů na zeta potenciál, použité organické rozpouštědlo - CHLO



Obrázek 17 - Vliv surfaktantů u formulace CHLO + MET 3:1 na velikost částic a PDI.

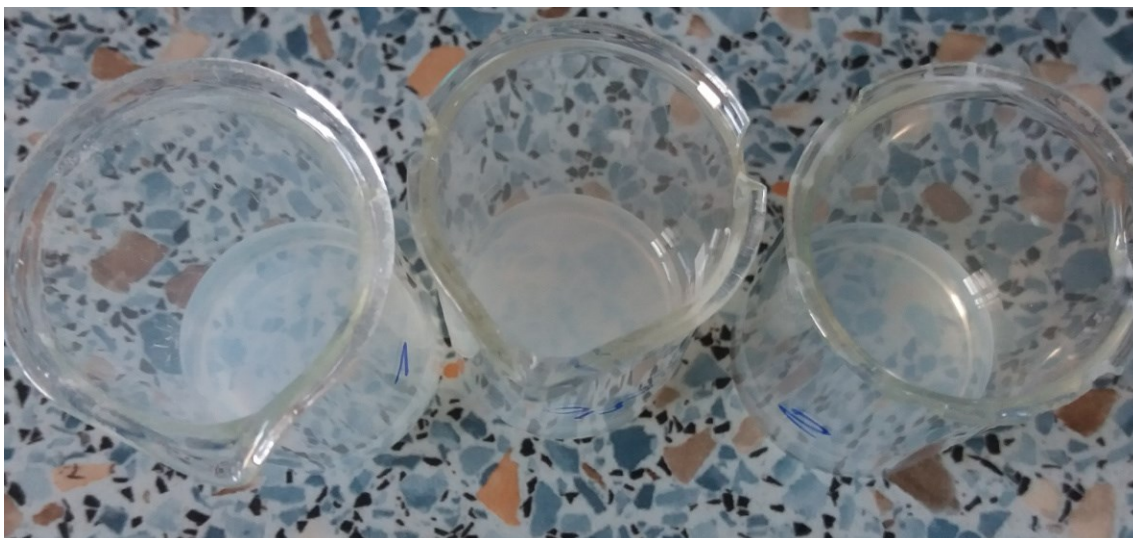


Obrázek 18 - Vliv surfaktantů na zeta potenciál u formulace CHLO+MET 3:1

Přidaný lecitin má amfifilní vlastnosti a zároveň je lipofilní, Kolliphor P188 je hydrofilní, spolu v kombinaci tvoří komplexní emulgátor. Jejich kombinací dochází ke snížení mezipovrchového napětí a lepší stabilizaci emulze. Vzniklé LN tak mají nižší velikost i hodnotu PDI.<sup>9, 73</sup>



Obrázek 19 - Použitý surfaktant Kolliphor P188 – na hladině jsou shluky lipidů



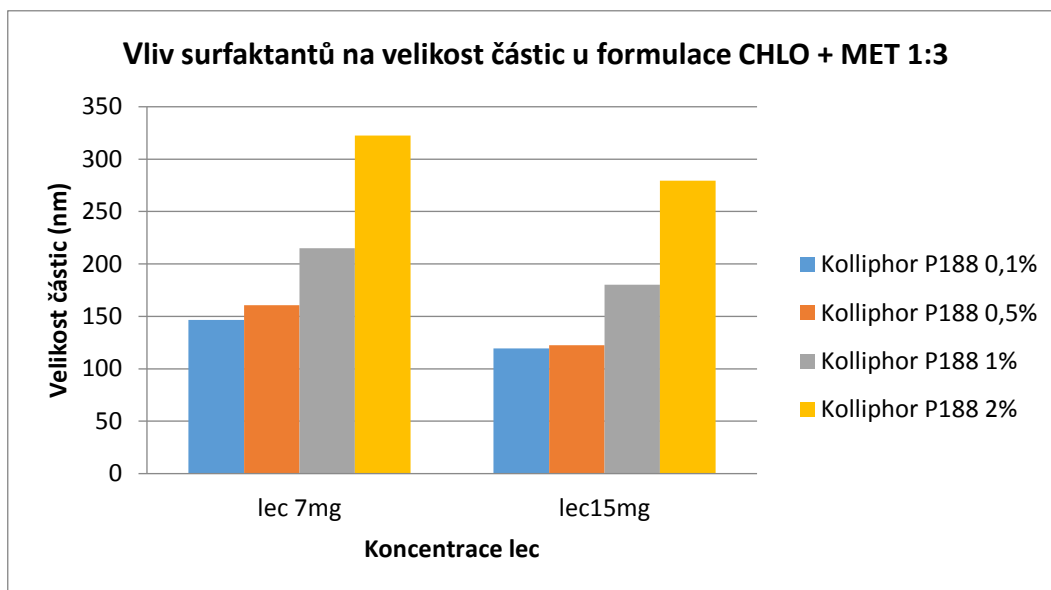
Obrázek 20 - Použitý surfaktant Kolliphor P188 a lec – bez shluků

Pro obě formulace je výhodnější vyšší množství lec až na vzorky č. 33 a 36, kde jsou částice menší při koncentraci Kolliphoru P188 2% s nižším množstvím lec. Hodnoty PDI jsou vždy nižší při nejnižší koncentraci Kolliphoru P188 0,5%, vliv lec na hodnotu PDI není až tak jednoznačný a mění se s koncentrací Kolliphoru P188. Na vlastnosti LN mají také významný vliv použitá rozpouštědla, menší velikost částic měly částice při použití MET+ACE 1:3, hodnota PDI byla většinou mírně vyšší (lišila se dle koncentrace Kolliphoru P188).

Nejlepší parametry měl vzorek č. 34 s velikostí LN 140 nm, PDI = 0,262 a s hodnotou zeta potenciálu -42,7 mV. Hlavním problémem u formulace CHLO+ACE 1:3 byla špatná rozpustnost MS v ACE. U formulace CHLO+MET 1:3 se MS rozpouštěl lépe, nicméně stále byl lipid obtížně rozpustný. Vnitřní fáze musela být před sonikací zahřívána, aby došlo k rozpuštění lipidu. Při následném ochlazení vnitřní fáze docházelo k rychlé krystalizaci lipidu. To je možná i důvod vyšších hodnot PDI zejména u formulace CHLO+ACE 1:3. S těmito vzorky se tedy velmi špatně pracovalo, protože po rozpuštění lipidu muselo dojít velmi rychle k sonikaci, aby lipid nekrystalizoval. Vzhledem k těmto okolnostem nebyla tato formulace dále využita pro přípravu finální formulace.

U formulace obsahující ve vnitřní fázi CHLO+MET v poměru 1:3 byly testovány čtyři koncentrace Kolliphoru P188 a dvě koncentrace lec. Z osmi testovaných možností byly nejlepší výsledky u formulace s nejnižším množstvím Kolliphoru P188 0,5% a největším množstvím lec 15 mg. Částice měly velikost 119,5 nm, PDI 0,225 a hodnotu zeta potenciálu -38 mV. Zhoršení vlastností částic při zvýšení koncentrace Kolliphoru P188

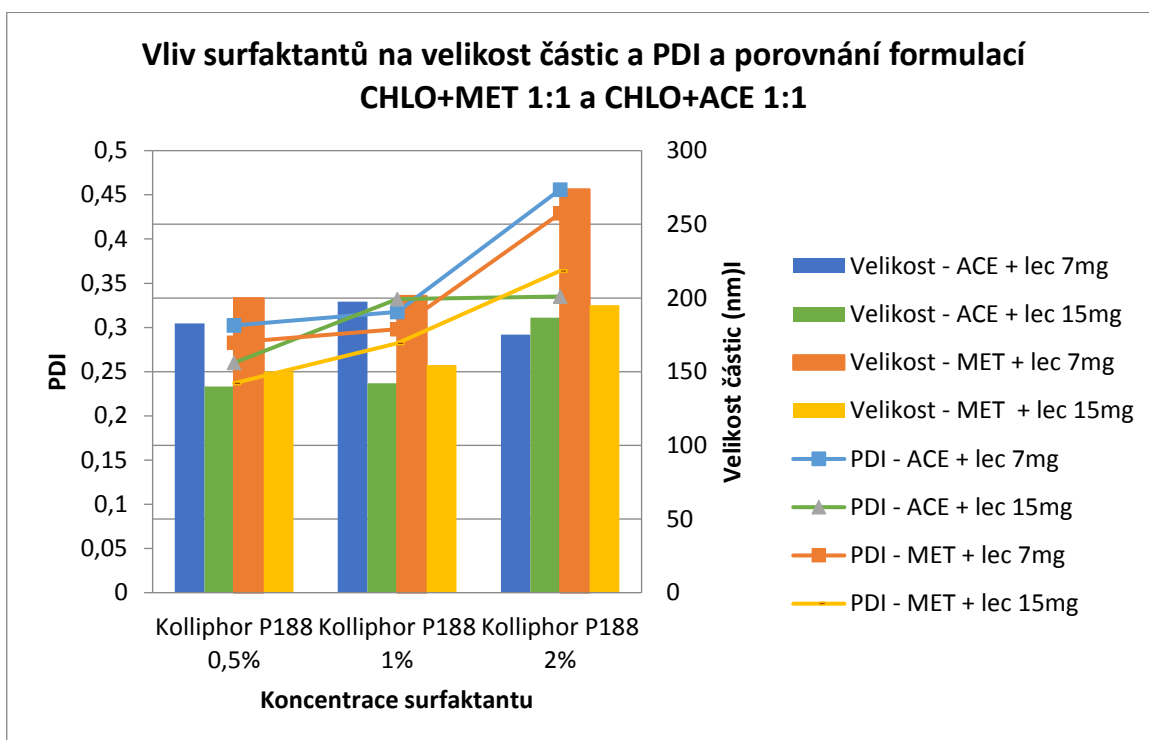
může být způsobeno interakcí mezi použitými surfaktanty, je tedy třeba najít vždy optimální koncentraci surfaktantů.



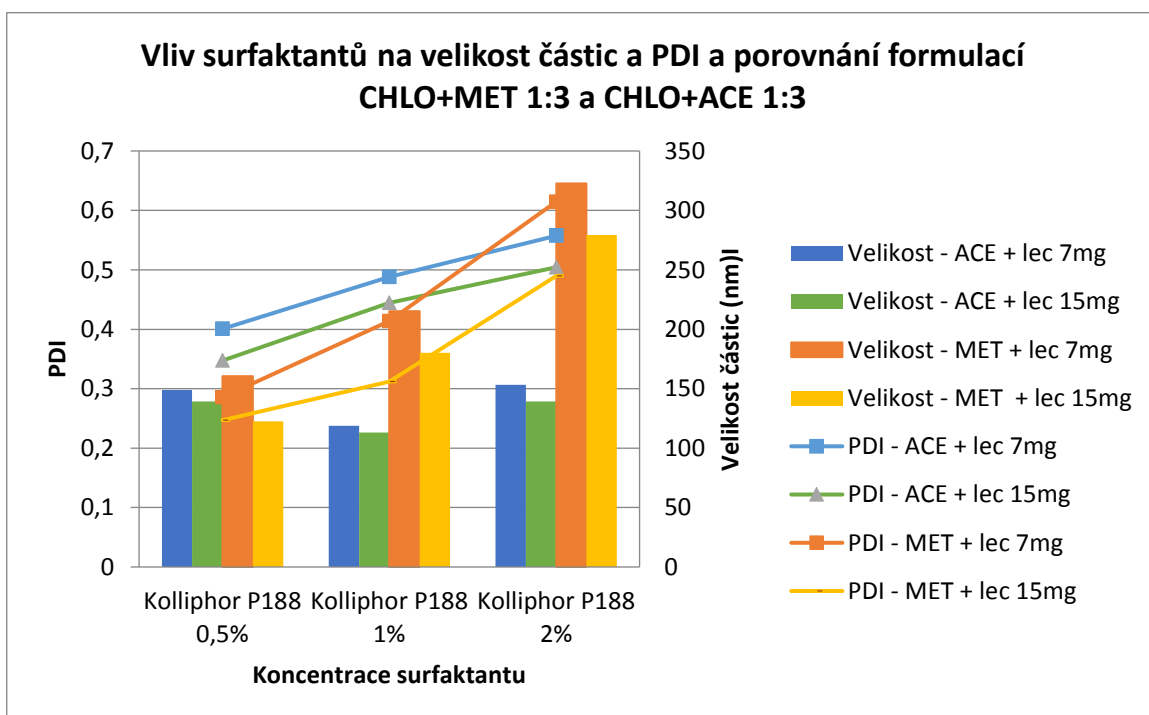
Obrázek 21 - Vliv surfaktantů na velikost částic u formulace CHLO + MET 1:3

Na obrázku č. 22 a 23 je porovnání velikosti částic a PDI u dalších připravovaných formulací, které obsahovaly ve vnitřní fázi různé poměry organických rozpouštědel (CHLO, MET, ACE). Ve většině případů se velikost částic snižovala se snižující se koncentrací Kolliphoru P188 a rostoucím obsahem lec. Nejnižší velikosti měly částice při koncentraci Kolliphoru P188 0,5% a obsahu lec 15 mg. U formulací s vnitřní fází CHLO + ACE 1:3 (s obsahem 7 mg i 15 mg lecitinu) a se samostatným CHLO (s obsahem 7 mg lec) byla nejvýhodnější koncentrace Kolliphoru P188 1%. Hodnota PDI byla nižší při množství lecitinu 15 mg, až na vzorek č. 19. a 20., kde ve formulaci s CHLO bylo výhodnější množství lec 7 mg při koncentraci Kolliphoru P188 1% a 2%. Hodnota PDI byla ve všech případech nejnižší při koncentraci Kolliphoru P188 0,5%.

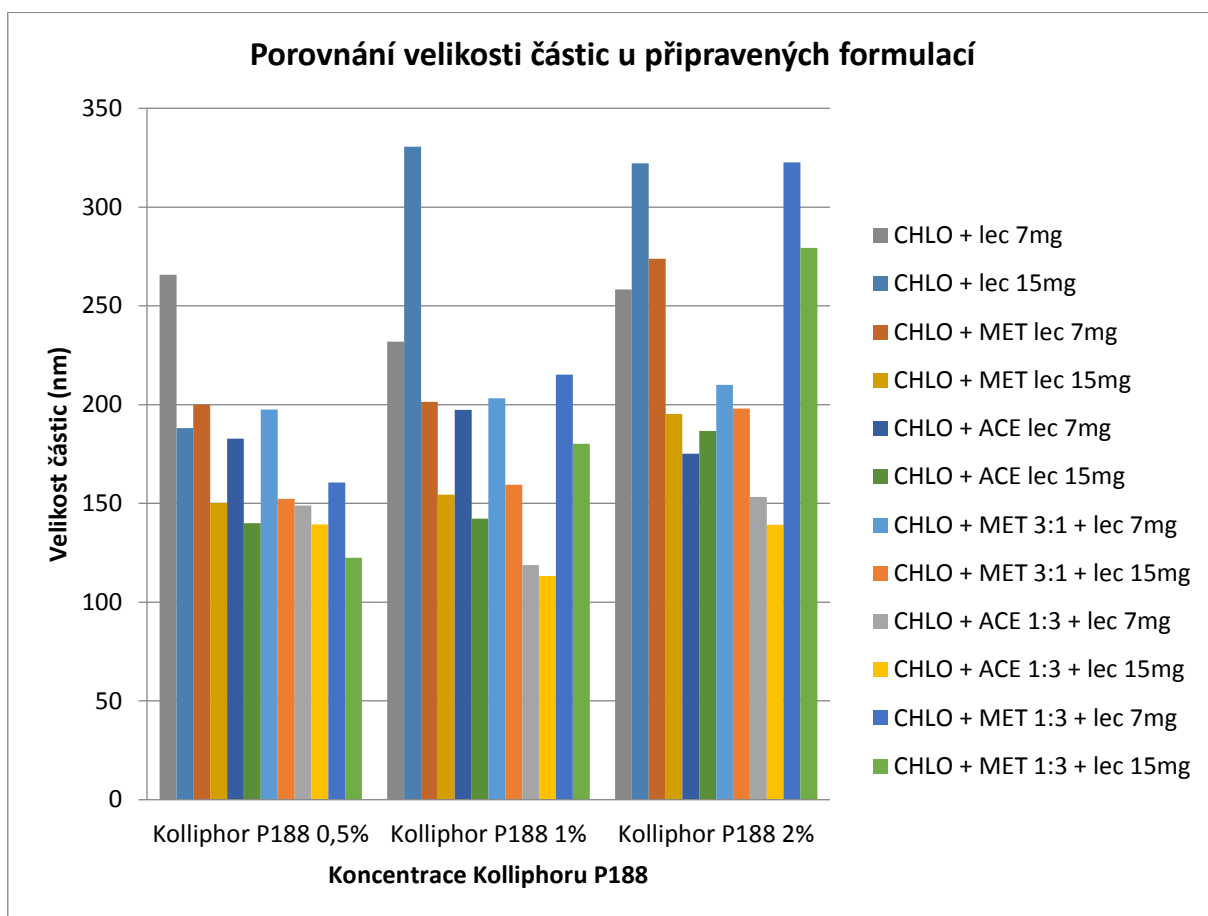
Na obrázku č. 24 a 25 jsou shrnuté výsledky připravených formulací s lec. Z výsledků tedy vyplývá, že se zvyšující koncentrací lecitinu se snižuje velikost částic i PDI a při zvyšující se koncentraci Kolliphoru P188 se zvětšuje velikost částic i PDI. Formulace se také lišily různými vlastnostmi v průběhu přípravy. Vzorky č. 19 až 24 s vnitřní fází obsahující pouze CHLO se odlišovaly i během přípravy. Po sonikaci formulace velmi zhoustla do konzistence hustého jogurtu a měla bílou barvu. Po odpaření rozpouštědla byla formulace čirá s výraznou opalescencí. Ostatní vzorky byly čiré s mírnou opalescencí.



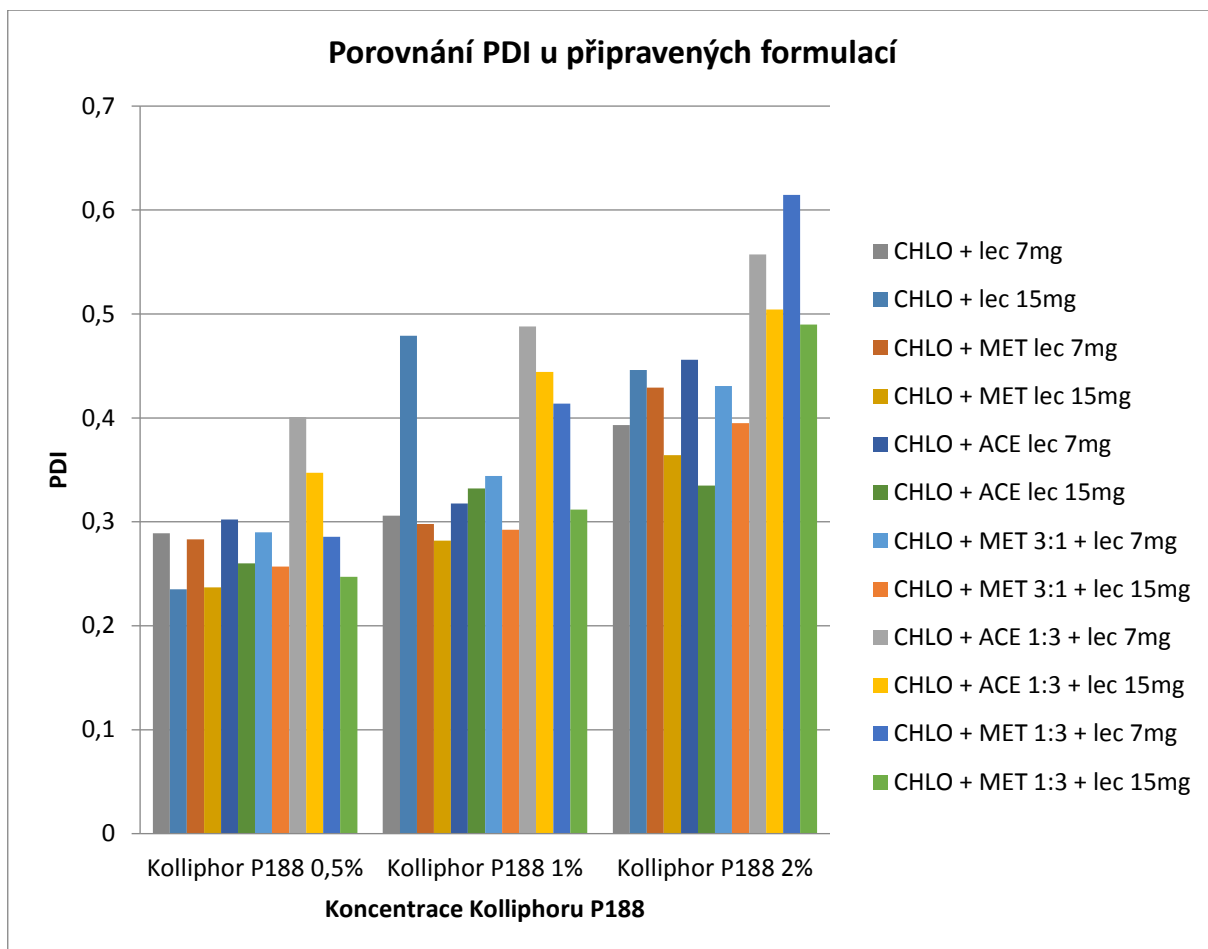
Obrázek 22 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI a porovnání formulací CHLO+MET 1:1 a CHLO+ACE 1:1, - velikost částic, body = PDI



Obrázek 23 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI a porovnání formulací CHLO+MET 1:3 a CHLO+ACE 1:3, - velikost částic, body = PDI



Obrázek 24 - Porovnání velikosti částic u připravených formulací



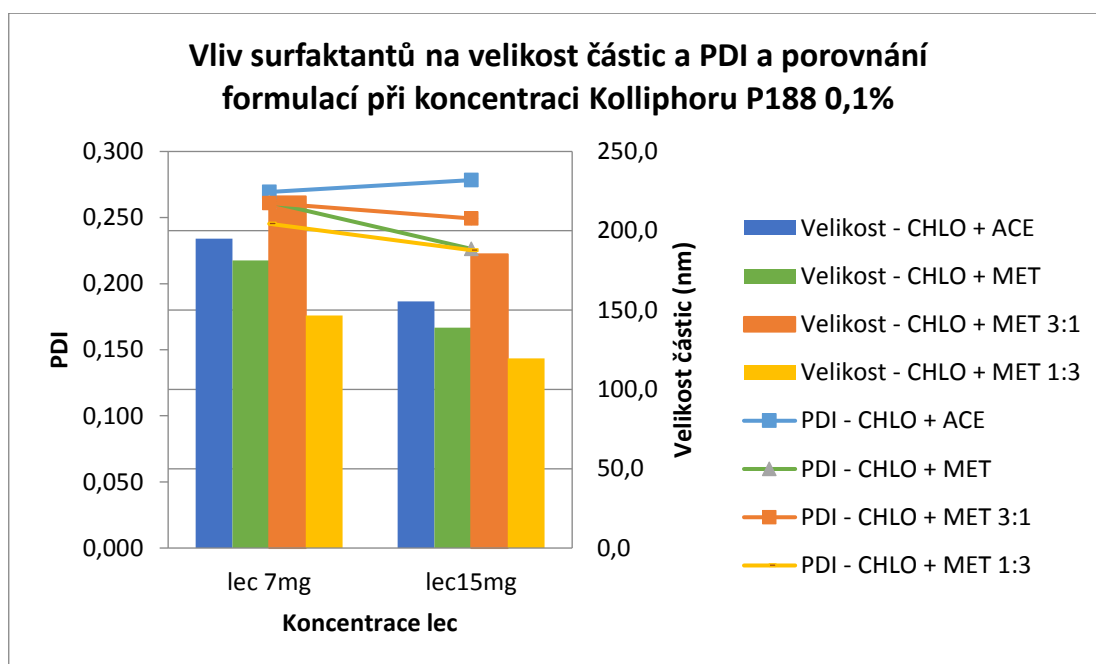
**Obrázek 25 - Porovnání PDI u připravených formulací**

U některých formulací byla zkoušena také koncentrace Kolliphoru P188 0,1% (obrázek č. 26). Velikost částic se opět snižovala s rostoucí koncentrací lec. Hodnota PDI se také snižovala s rostoucí koncentrací lec, až na formulaci CHLO + ACE, kde došlo k mírnému růstu PDI. Změna však byla zanedbatelná. U formulace CHLO + ACE nedošlo snížením koncentrace Kolliphoru P188 ke snížení velikosti částic (hodnoty byly zhruba podobné vzorkům s koncentrací 1%), došlo však ke snížení hodnoty PDI u vzorku s množstvím lec 7 mg. Zde došlo ke snížení hodnoty PDI z hodnoty 0,302 (Kolliphor P188 0,5%) na hodnotu 0,269. Při množství lec 15 mg byla sice hodnota PDI nižší v porovnání s koncentrací Kolliphoru P188 1% a 2%, ale v porovnání s koncentrací 0,5% hodnota PDI mírně stoupla z 0,262 (0,5%) na 0,278 (0,1%). Pro formulaci CHLO + ACE je tak nejvýhodnější koncentrace Kolliphoru P188 0,5% s množstvím lec 15 mg a vznikají částice o velikosti 140,0 nm o hodnotě PDI 0,262. Hodnoty zeta potenciálu se u této formulace při změnách koncentrací Kolliphoru P188 výrazně neměnily.

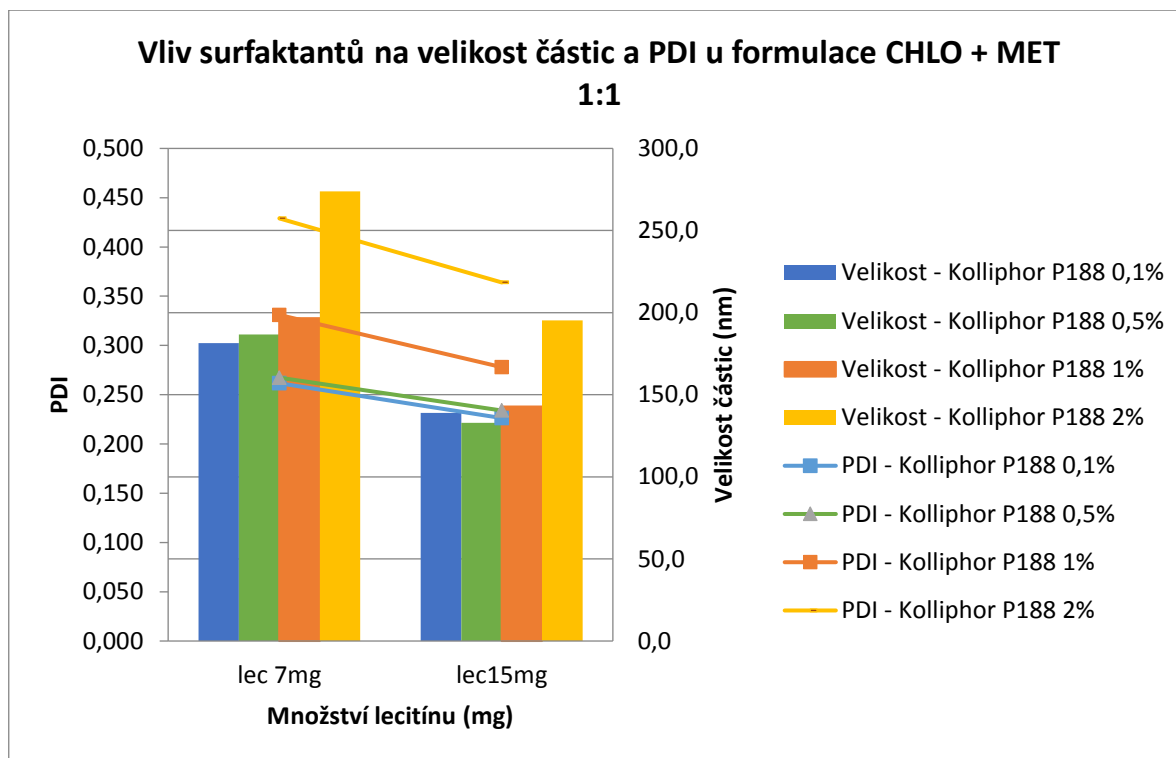
U formulace CHLO + MET 3:1 s množstvím lec 7 mg došlo ke zvětšení velikosti částic a ke snížení hodnoty PDI. Při koncentraci Kolliphoru P188 0,5% vznikaly částice o



velikosti 197,5 nm o hodnotě PDI 0,290 a při snížení koncentrace na 0,1% byla velikost částic 221,6 nm a hodnota PDI 0,261. Při množství lec 15 mg vznikly nejmenší částice při koncentraci Kolliphoru P188 0,5% o velikosti 152,4 nm a nejnižší hodnota PDI byla při koncentraci 0,1% 0,249. Pro tuto formulaci byla nejvýhodnější kombinace 15 mg lec a 0,5% koncentrace Kolliphoru P188, kde vznikaly částice o velikosti 152,4 nm a hodnotě PDI 0,257. Hodnota zeta potenciálu snížením koncentrace Kolliphoru P188 mírně vzrostla. Při jeho koncentraci 0,1% s množstvím lec 15 mg byla hodnota zeta potenciálu -48,3 mV a u vyšších koncentrací Kolliphoru P188 se hodnota pohybovala okolo -30 mV, nejvyšší hodnotu -35,5 mV měl vzorek s koncentrací 1% a množstvím lec 15 mg. Na obrázku č. 27 je porovnání čtyř koncentrací Kolliphoru P188 a lec u formulace CHLO + MET 1:1. Hodnota PDI se zde vždy snižuje s rostoucím množstvím lec. Velikost částic je menší, při nižší koncentraci Kolliphoru.



**Obrázek 26 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI a porovnání formulací při koncentraci Kolliphoru P188 0,1%**

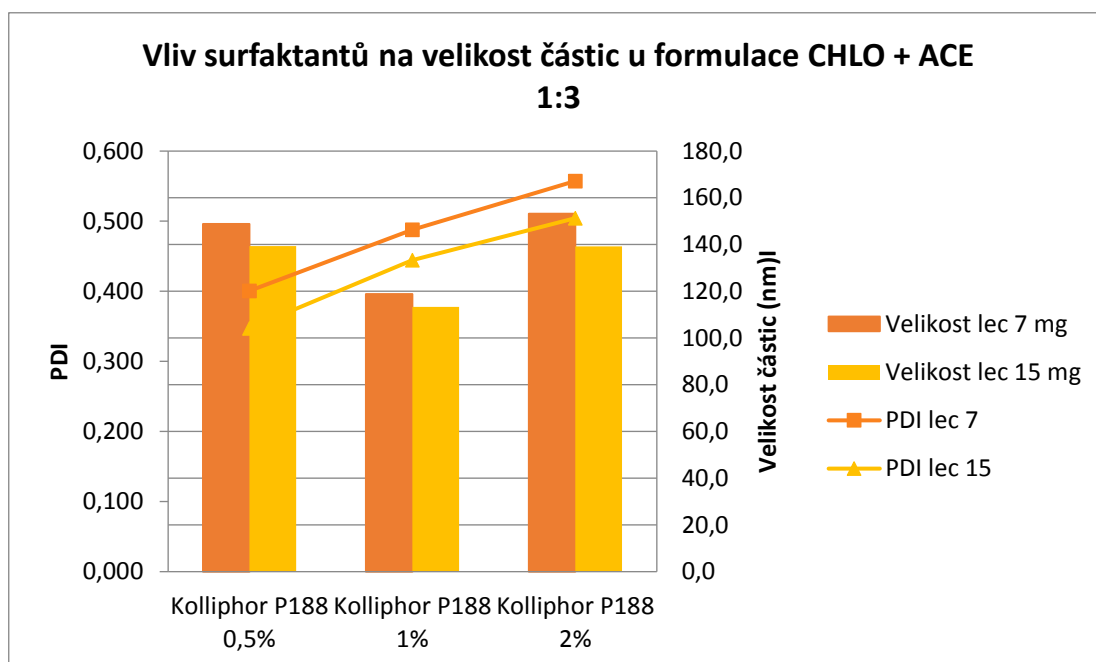


**Obrázek 27 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI u formulace CHLO + MET 1:1**

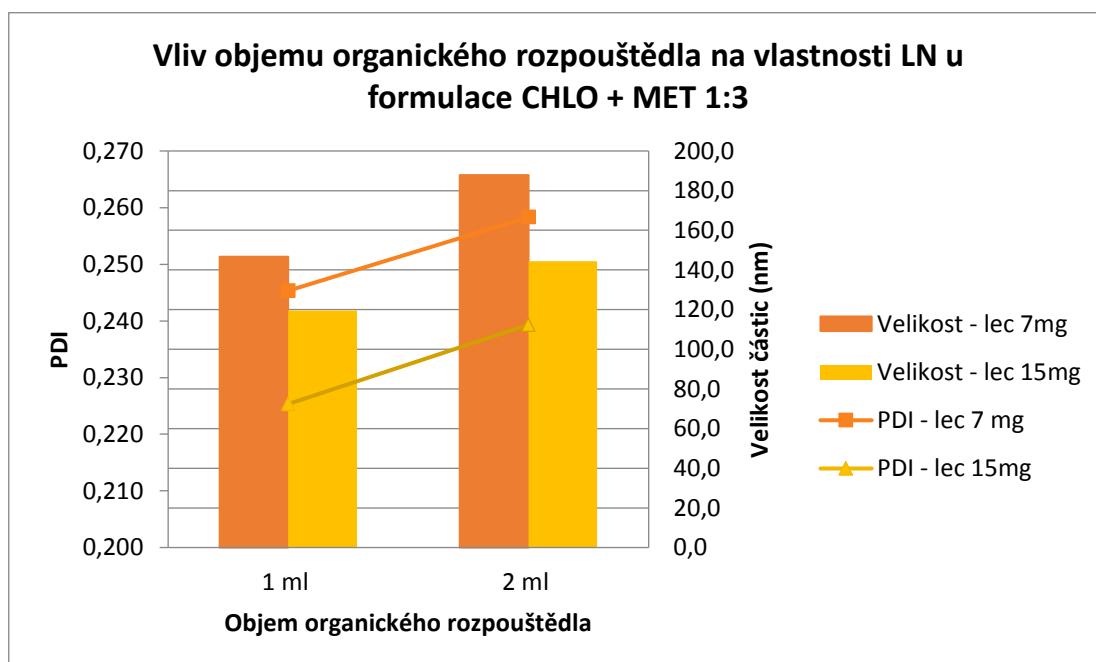
Na obrázku č. 29 je porovnání vlastností LN při různých objemech organického rozpouštědla použitých ve vnitřní fázi u formulace CHLO + MET 1:3. Nejmenší velikost měly vzorky o koncentraci Kolliphoru P188 1% a množství lec 15 mg. Pro nízkou rozpustnost MS v ACE a MET bylo zkoušeno přidání většího celkového objemu rozpouštědla. Pro nízkou rozpustnost MS musela být vnitřní fáze při přípravě zahřívána. Lipid však při ochlazení rychle krystalizoval a manipulace s těmito vzorky byla náročná. Dosažení stejných podmínek pro všechny vzorky z těchto formulací bylo velmi obtížné v laboratorních podmínkách. Docházelo k ulpívání lipidů na vialce, případně docházelo ke vzniku shluků ve formulaci. Tyto shluky byly sice odstraněny před měřením filtrací, ale snižoval se tak výtěžek LN. Přidání většího objemu organických rozpouštědel mírně zlepšilo manipulaci se vzorky, ale velikost částic i hodnota PDI se zvýšila a došlo k mírnému zvýšení hodnoty zeta potenciálu.

U formulace CHLO:ACE 1:3 byl měřen vzorek o koncentraci Kolliphoru P188 0,1% pouze s celkovým objemem rozpouštědel 2 ml. V porovnání s koncentrací Kolliphoru P188 0,5% měly LN sice nižší hodnotu PDI (0,251 pro lec 7 mg, a 0,246 pro lec 15 mg), ale velikost se výrazně zvýšila (211,4 nm pro lec 7 mg a 157,1 nm pro lec 15 mg). Zvýšení objemu organických rozpouštědel se tak ukázalo jako nevhodné, protože nedošlo

k výraznému zlepšení vlastností LN a vzhledem k náročné manipulaci s těmito vzorky, nebyly dále tyto formulace používány.



Obrázek 28 - Vliv surfaktantů na velikost částic u formulace CHLO + ACE 1:3.



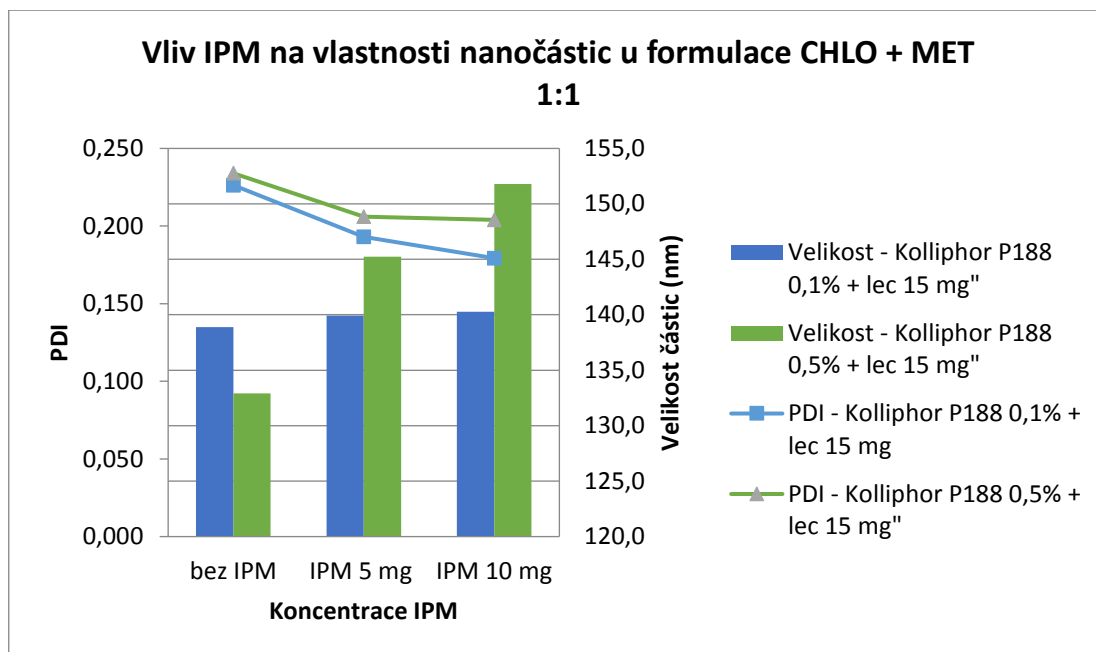
Obrázek 29 - Vliv objemu organického rozpouštědla ve vnitřní fázi na vlastnosti LN u formulace CHLO + MET 1:3, Kolliphor P188 0,1%

### 4.6.2.3 Vliv IPM na LN

Tabulka 10 – Vliv přidání IPM u formulace CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1% a 0,5% lec 15 mg a IPM 5 mg a 10 mg

Kolliphor P188	IPM (mg)	Velikost částic (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
0,1%	10	140,3	0,179	-40,1
0,5%	10	151,8	0,204	-39,6
0,1%	5	139,9	0,193	-41,0
0,5%	5	145,2	0,206	-36,9

Jako finální byla vybrána formulace obsahující ve vnitřní fázi CHLO + MET v poměru 1:1. Díky vyššímu podílu CHLO byl MS ve vnitřní fázi lépe rozpustný a manipulace se vzorkem byla snadná. Nejvhodnější vlastnosti měly LN při množství lec 15 mg a koncentraci Kolliphoru P188 0,1% (velikost = 138,9 nm a PDI = 0,226) a 0,5% (velikost = 132,9 a PDI 0,234). Následně byl přidán k vnitřní fázi těchto formulací IPM (obrázek č. 30). Přidání tohoto tekutého lipidu snížilo hodnoty PDI u všech měřených vzorků. Velikost částic se zvýšila při koncentraci Kolliphoru P188 0,5%. Při jeho nižší koncentraci také došlo ke zvýšení velikosti částic, ale změny byly zanedbatelné – velikost se zvýšila z hodnoty 138,9 nm (bez IPM) na hodnotu 140,3 nm (10 mg IPM). Vzorky s nižší koncentrací Kolliphoru P188 měly také mírně vyšší hodnoty zeta potenciálu. Vybraná finální formulace nakonec obsahovala koncentraci Kolliphoru P188 0,1%, lec 15 mg a množství IPM 10 mg. Bylo zvoleno větší množství IPM, i přestože došlo k mírnému zvýšení velikosti částic, tato změna byla zanedbatelná a velikost 140,3 nm je pro farmaceutické účely dostačující. Pro vlastnosti našich LN bylo důležitější dosáhnout snížení hodnoty PDI. Dále je také předpokládáno, že při vyšším množství IPM bude možné enkapsulovat do LN větší množství léčiva.



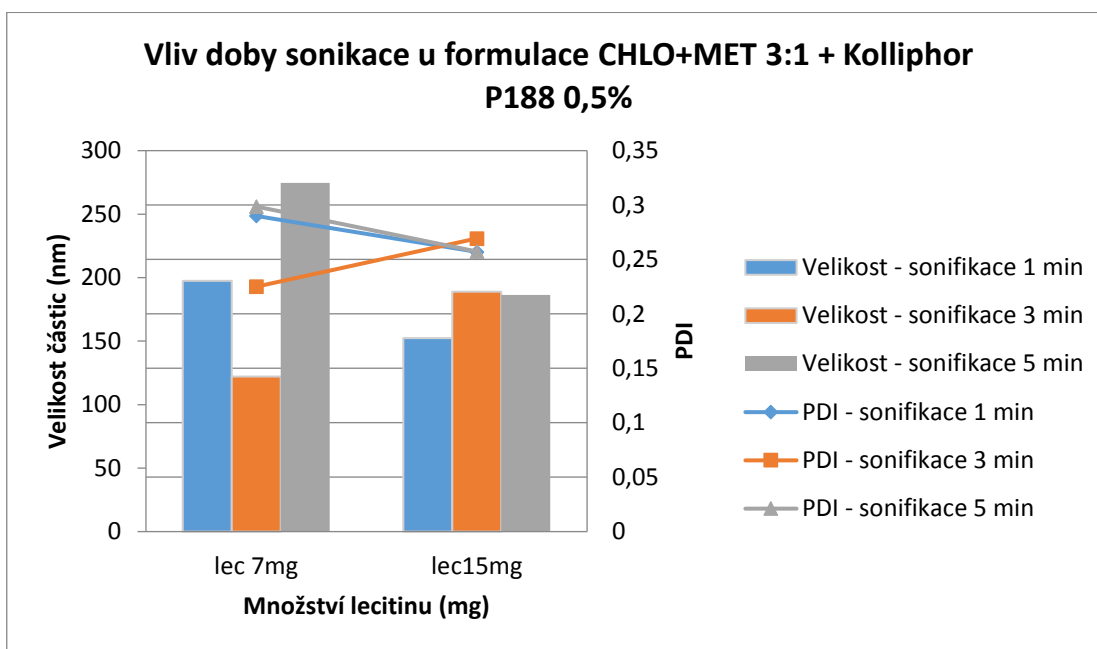
Obrázek 30 - Vliv IPM na vlastnosti nanočástic u formulace CHLO + MET 1:1

#### 4.6.2.4 Vliv doby sonikace na vlastnosti LN

Tabulka 11 - Vliv doby sonikace na vlastnosti LN u formulace CHLO + MET 3:1

Vzorek	Velikost (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)	Doba sonikace
P188 0,5% + lec 7 mg	197,5	0,290	-30,9	1 min
P188 0,5% + lec 15 mg	152,4	0,257	-33,9	1 min
P188 0,5% + lec 7 mg	122,2	0,225	-42,9	3 min
P188 0,5% + lec 15 mg	188,8	0,269	-39,4	3 min
P188 0,5% + lec 7 mg	274,7	0,299	-31,8	5 min
P188 0,5% + lec 15 mg	186,5	0,257	-35,8	5 min

Při sonikaci byla kádinka s vnitřní a vnější fází chlazená ledovou lázní, přesto však docházelo k výraznému zahřátí směsi uvnitř kádinky i ledové lázně. Ve formulacích vznikaly na hladině shluky lipidů. Pro množství lec 7 mg byla nejvýhodnější doba sonikace tři minuty, vznikaly LN o velikosti 122,2 nm s hodnotou PDI 0,225. Pro množství lec 15 mg byla vhodnější doba jedna minuta, vznikaly částice o velikosti 152,4 nm s hodnotou PDI 0,257 (obrázek č. 31). Přestože se u jednoho vzorku ukázalo výhodné prodloužit dobu sonikace, byla nadále používána doba sonikace jedna minuta. V našich laboratorních podmínkách by bylo velmi obtížné dosáhnout spolehlivého chlazení pro všechny připravované vzorky, proto byla v ostatních pokusech doba sonikace jedna minuta.



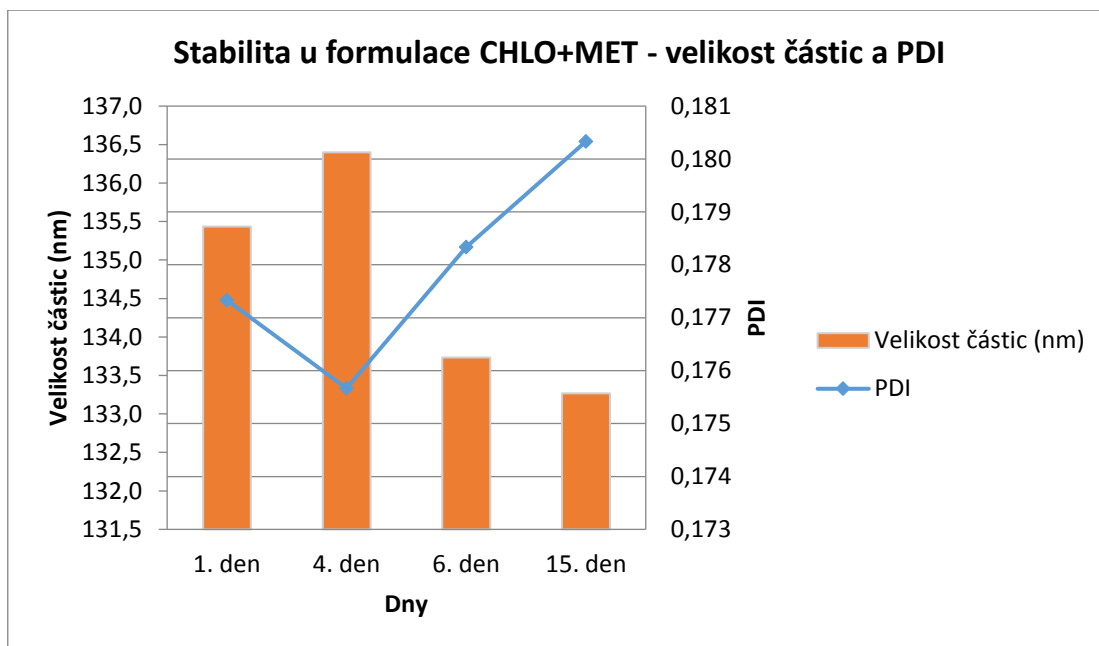
Obrázek 31 - Vliv doby sonikace u formulace CHLO+MET 3:1 + Kolliphor P188 0,5%

#### 4.6.2.5 Stabilita závěrečné formulace

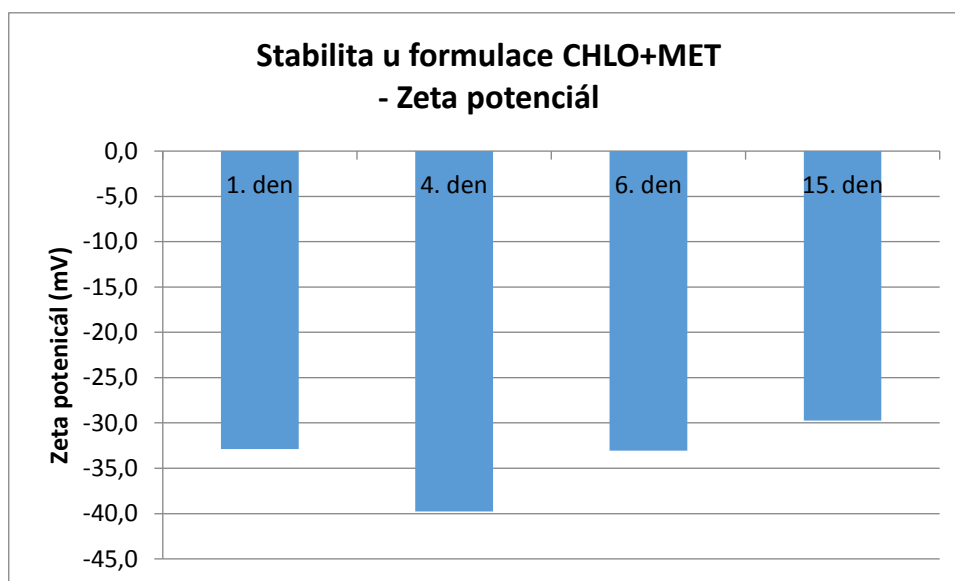
Tabulka 12 - Stabilita závěrečné formulace CHLO + MET 1:1 + P188 0,1% + lec 15 mg + IPM 10 mg - den 1. až 15.

Den	Velikost částic (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
1.	135,4	0,177	-32,9
4.	136,4	0,176	-39,8
6.	133,7	0,178	-33,1
15.	133,3	0,180	-29,7

Velikost částic ve formulaci se při skladování nejprve mírně zvýšila a následně klesala. Pokles byl velmi mírný z hodnoty 135,4 nm až na 133,3 nm. Hodnota PDI se v průběhu skladování nejprve velmi mírně snížila, ale následně začala stoupat. Hodnota zeta potenciálu také nejprve rostla a pak se postupně snižovala až na -29,7 mV. Tyto změny jsou však zanedbatelné a stabilita vzorku je dobrá (obrázek č. 32 a 33).



Obrázek 32 - Stabilita 1. - 15. den u konečné formulace CHLO + MET + Kolliphor P188 0,5% + lec 15 mg + IPM 10 mg



Obrázek 33 - Stabilita u formulace CHLO+MET - Zeta potenciál

#### 4.6.2.6 Vliv enkapsulace Ind u závěrečné formulace

V tabulce č. 13 jsou vlastnosti formulace CHLO + MET, lec 15 mg, Kolliphor P188 0,1% a 10 mg IPM (IPM neobsahují poslední dva vzorky v tabulce). Tato formulace byla připravena pětkrát bez Ind a osmkrát s různým množstvím Ind. Pro porovnání je zde ještě uveden vzorek SLN bez obsahu IPM. Porovnával se vliv enkapsulovaného Ind na vlastnosti LN. Na obrázku č. 34 můžeme pozorovat menší velikost u částic bez Ind v porovnání s částicemi s enkapsulovaným Ind. U hodnoty PDI je obtížné rozdíly

vyhodnotit z obrázku č. 34, nicméně průměrná hodnota PDI u částic s Ind je 0,189 a u částic s Ind je tato hodnota 0,193. Rozdíly mezi těmito částicemi jsou tedy zanedbatelné.

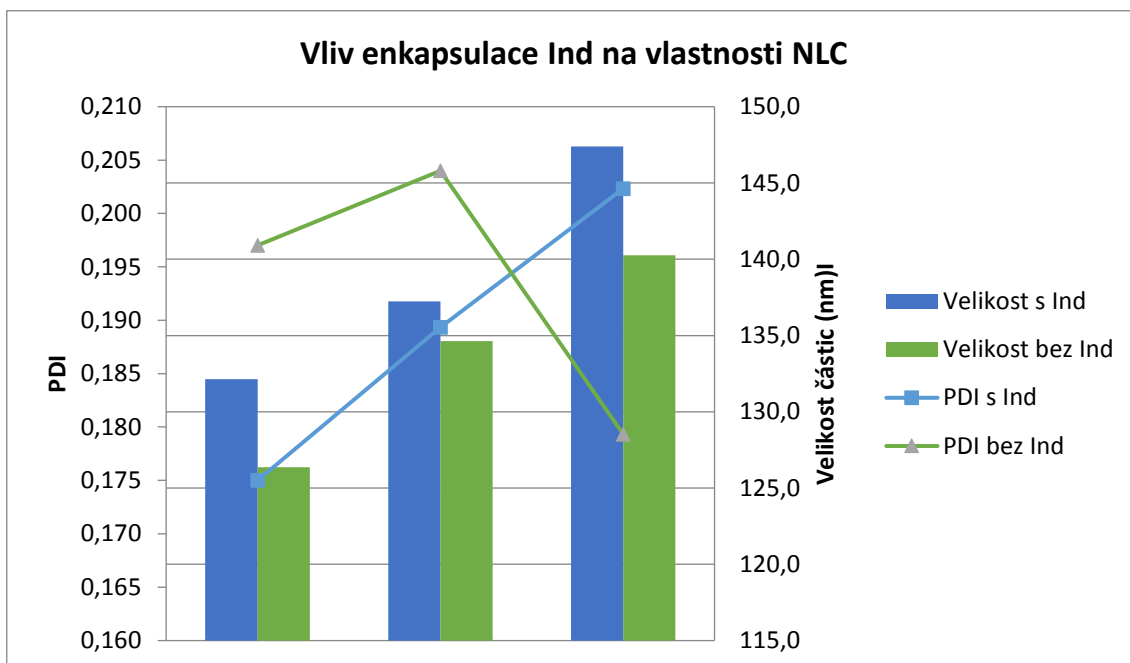
**Tabulka 13 - Závěrečná formulace CHLO + MET, lec 15 mg, Kolliphor P188 0,1% - porovnání NLC s enkapsulovaným Ind a bez něj. Porovnání připravených formulací.**

<b>Obsah Ind</b>	<b>Velikost (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zeta potenciál (mV)</b>
130 µg	132,1	0,175	-43,0
130 µg	137,2	0,189	-47,9
130 µg	147,4	0,202	-46,4
414 µg	143,9	0,197	-47,9
414 µg	144,0	0,190	-41,3
1035 µg	146,8	0,203	-46,1
1035 µg	139,5	0,195	-43,0
-	126,4	0,197	-48,0
-	134,6	0,204	-49,5
-	140,3	0,179	-40,1
-	136,6	0,202	-61,1
-	138,0	0,188	-50,7
- (bez IPM)	136,6	0,224	-42,2
130µg (bez IPM)	139,7	0,240	-37,5

**Tabulka 14 - Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky u závěrečné formulace**

	<b>Velikost (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zeta potenciál (mV)</b>
LN S Ind	141,56 ± 5,15	0,193 ± 0,009	-46,10 ± 5,95
LN bez Ind	136,60 ± 4,77	0,194 ± 0,009	-49,88 ± 6,72

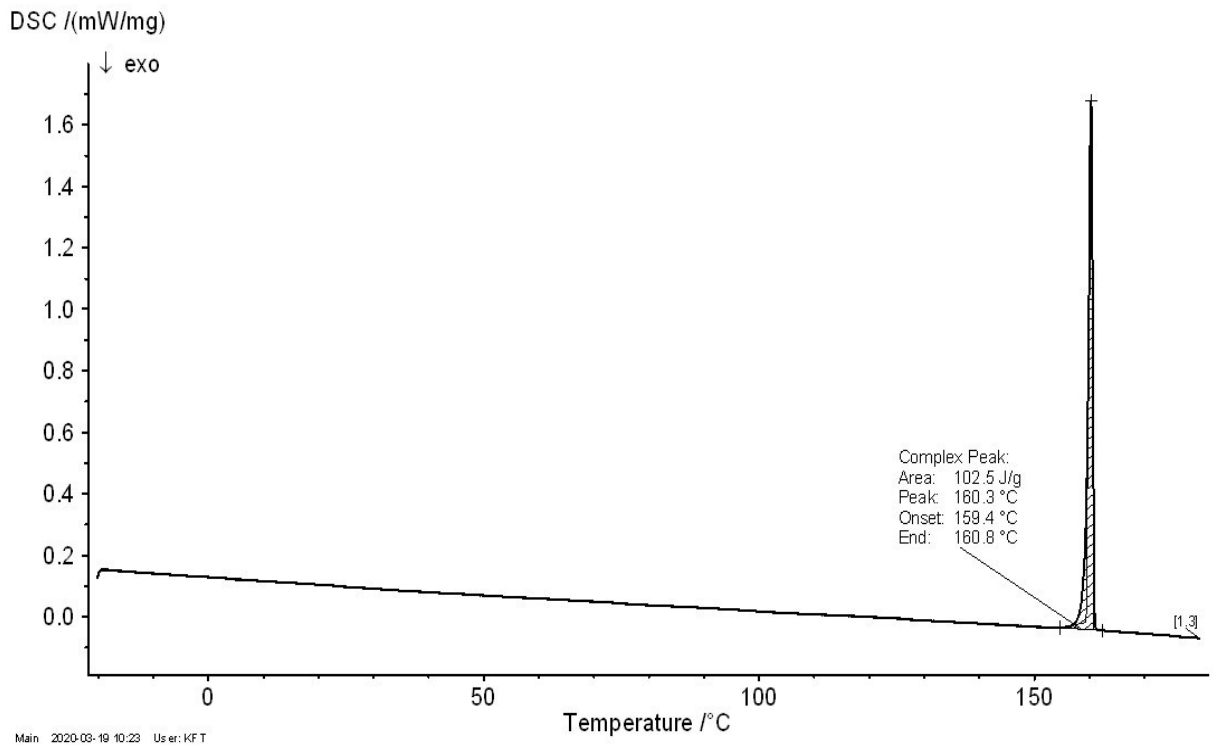




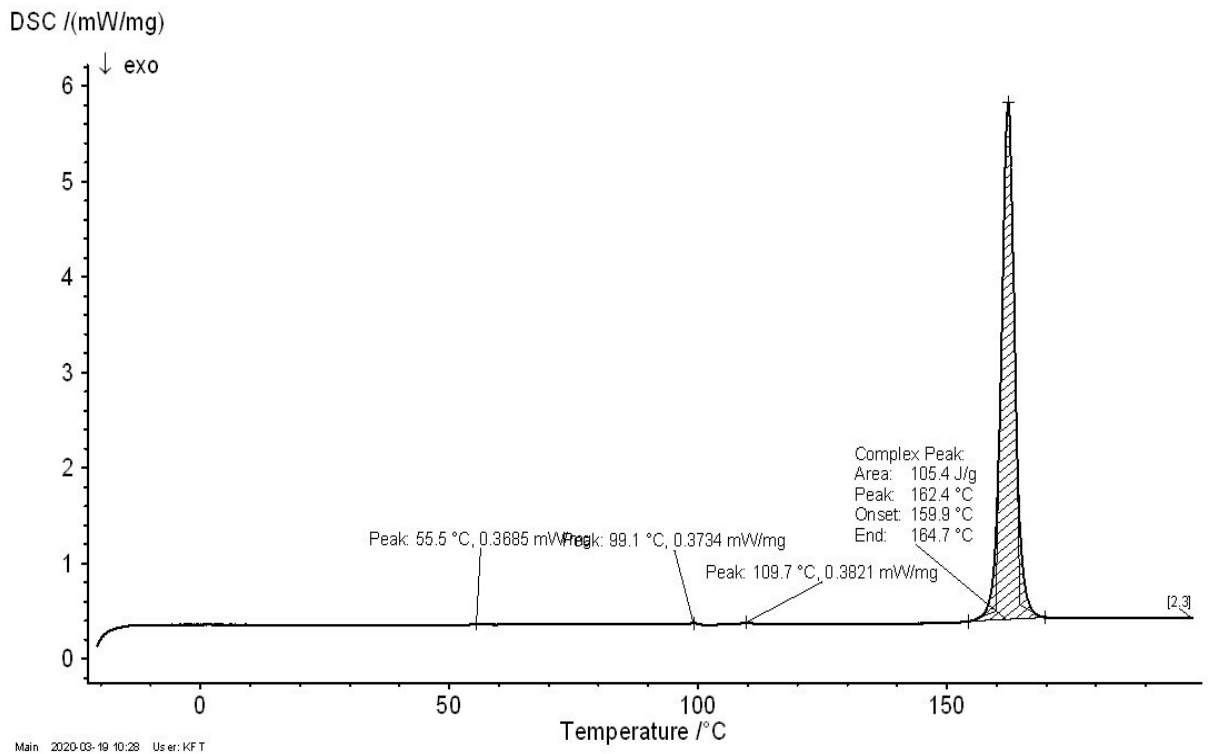
Obrázek 34 - Porovnání vlastností částic s enkapsulovaným Ind a bez něj u formulace CHLO + MET, IPM 10 mg, lec 15 mg, Kolliphor P188. Každý sloupec představuje jeden vzorek.

#### 4.6.3 DSC

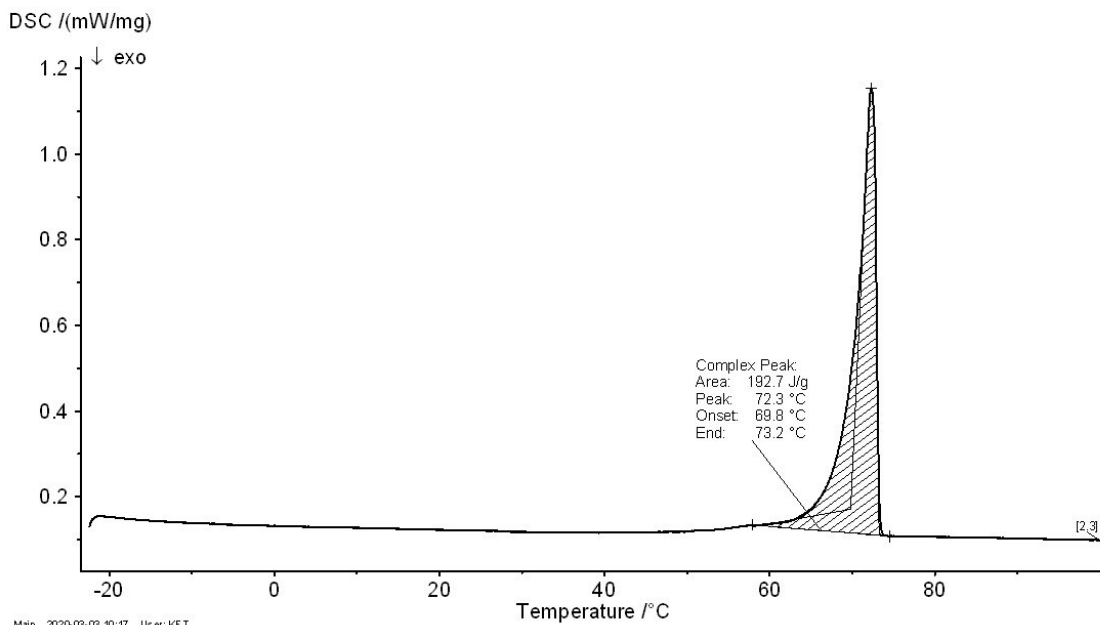
Na obrázku č. 35 a 36 jsou termogramy Ind při různých rychlostech ohřívání. Je zde vidět velmi výrazný pík při teplotě 162,4 °C při rychlosti ohřívání 10 K min<sup>-1</sup> a 160,3 °C při rychlosti ohřívání 1 K min<sup>-1</sup>, tyto píky označují teplotu tání Ind. Dle literatury je teplota tání Ind závislá na polymorfní formě. Jedna forma má teplotu tání při 155 °C a druhá při 164 °C.<sup>68</sup> Teplota tání byla změřena mírně vyšší při vyšší rychlosti ohřívání, jelikož vyšší rychlosti je odezva na teplotní změnu zachycena až později.<sup>68</sup>



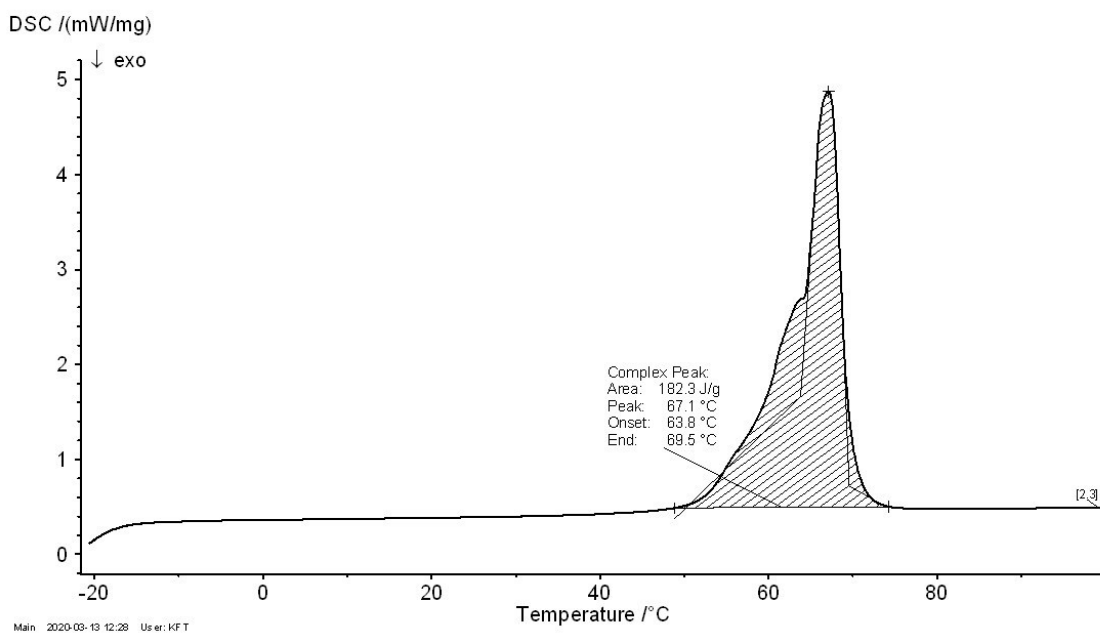
Obrázek 35 - Ind, rychlost ohřívání 1 K.min<sup>-1</sup>



Obrázek 36 - Ind, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>

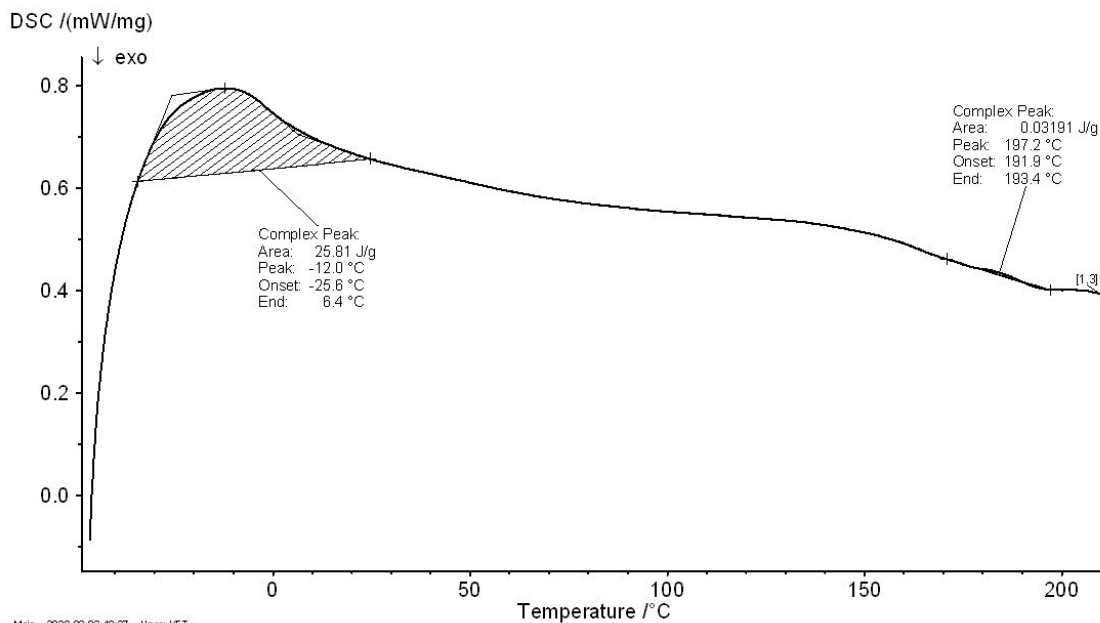


**Obrázek 37 - MS, rychlost ohřívání 1 K.min<sup>-1</sup>**

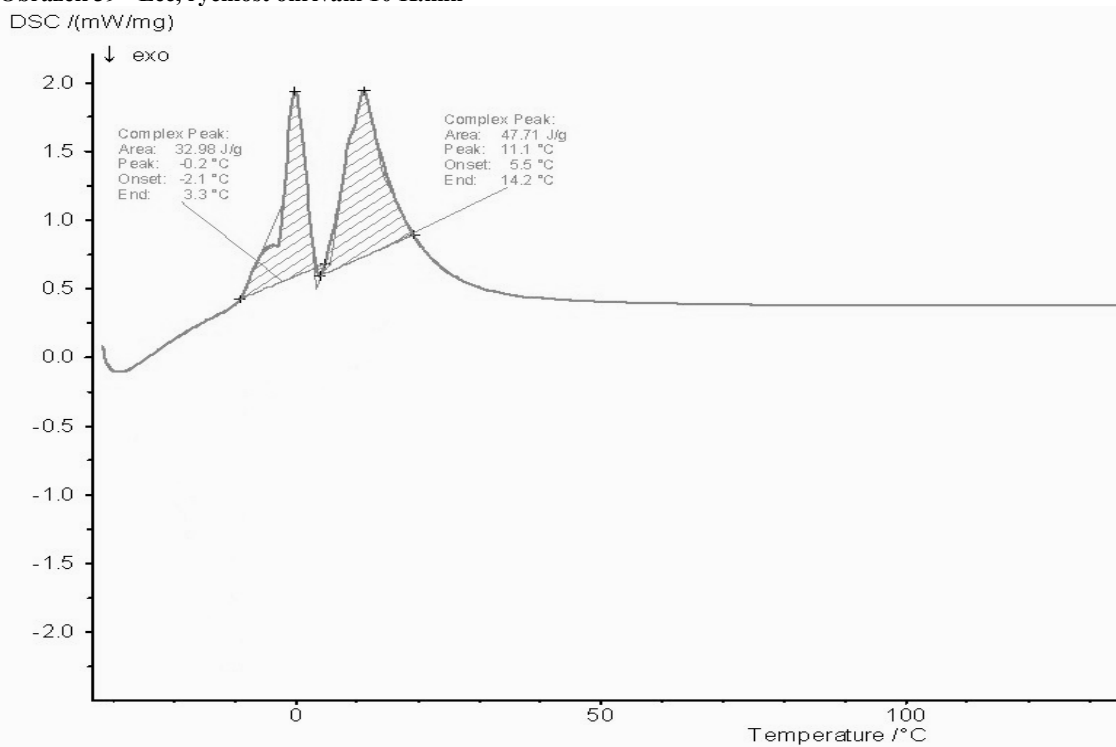


**Obrázek 38 - MS, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>**

U většiny vzorků (směsi lipidů a SLN) můžeme pozorovat menší pík při teplotách pod bodem mrazu v rozmezí zhruba od -6 °C do -15 °C. Tento pík by mohl být způsoben obsaženým lec, jehož termogram je na obrázku č. 39. Pozorujeme velmi široký pík s maximem při -12 °C. Tento pík však není pozorován u vzorků bez IPM, proto by mohl být způsoben i jeho přítomností. Termogram IPM je na obrázku č. 40 a je tvořen dvěma píky, které se vyskytují v teplotním rozmezí -2,1 °C až 11,1 °C. Při nižší rychlosti měření u NLC jsou tyto píky téměř nepatrné, což je nejspíš způsobeno pomalým růstem teploty.



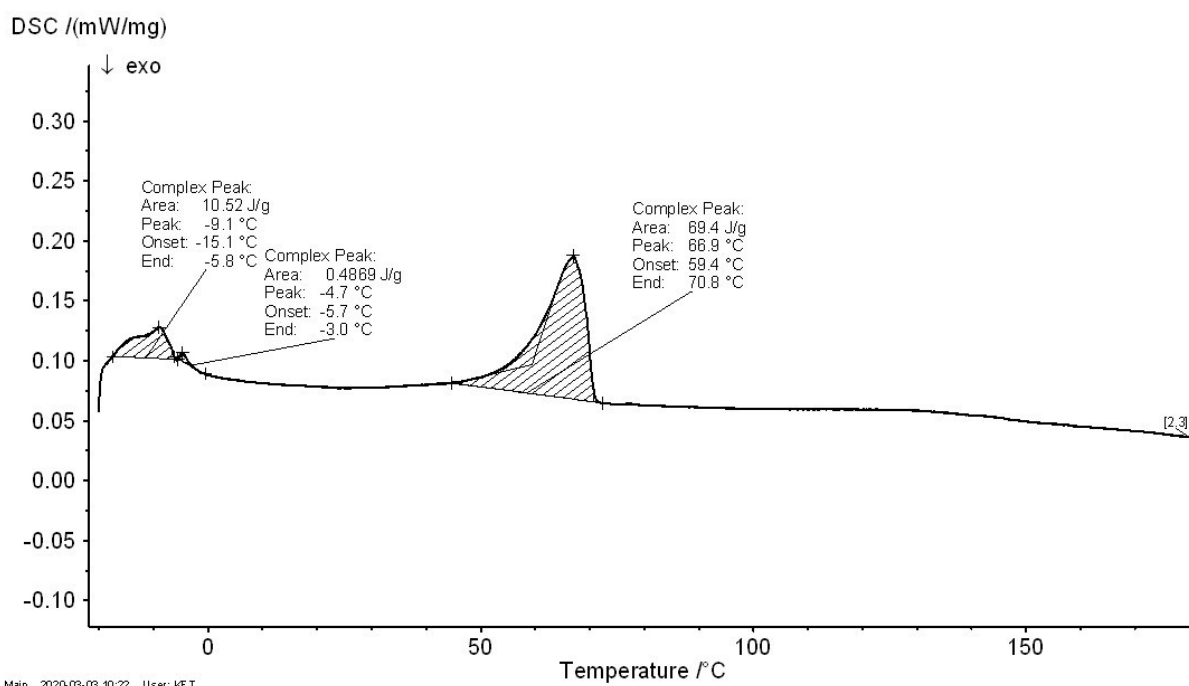
**Obrázek 39 - Lec, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>**



**Obrázek 40 - IPM, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>**

U směsí lipidů s Ind a bez Ind o stejném složení jako NLC (obrázek č. 41 a 43) vidíme na termogramu dva výrazné píky – první v oblasti pod bodem mrazu a druhý při teplotách okolo 60-70 °C. Tento pík má proti píkům u LN začátek a konec při vyšších teplotách, většinou má i vyšší teplotu maxima a není rozdělen na dvě části. Vzniklé LN tedy způsobí změnu tvaru píku i jeho posun do oblasti nižších teplot.<sup>68, 69</sup> Při porovnání těchto termogramů (obrázky č. 41, 43, 45, 47, 49 a 50) s ohledem na obsah Ind, můžeme vidět

mírné zvýšení maximálních teplot a plochy píků u vzorků obsahujících Ind, proti vzorkům bez Ind u SLN a směsi lipidů. Nejvýrazněji se zvýšila teplota maxima u vzorku se směsí lipidů. U NLC vzorky obsahující Ind (velikost LN = 147,4 nm) a neobsahující Ind (velikost LN = 134,6 nm) nemůžeme takto jednoznačně porovnat, jelikož se výrazně liší velikost LN, což také ovlivňuje výslednou křivku termogramu. Teplotní maximum je naopak nižší u vzorku NLC s Ind, na druhou stranu se ale zvýšilo teplotní rozmezí, ve kterém se pík nachází a velikost jeho plochy se také zvětšila.

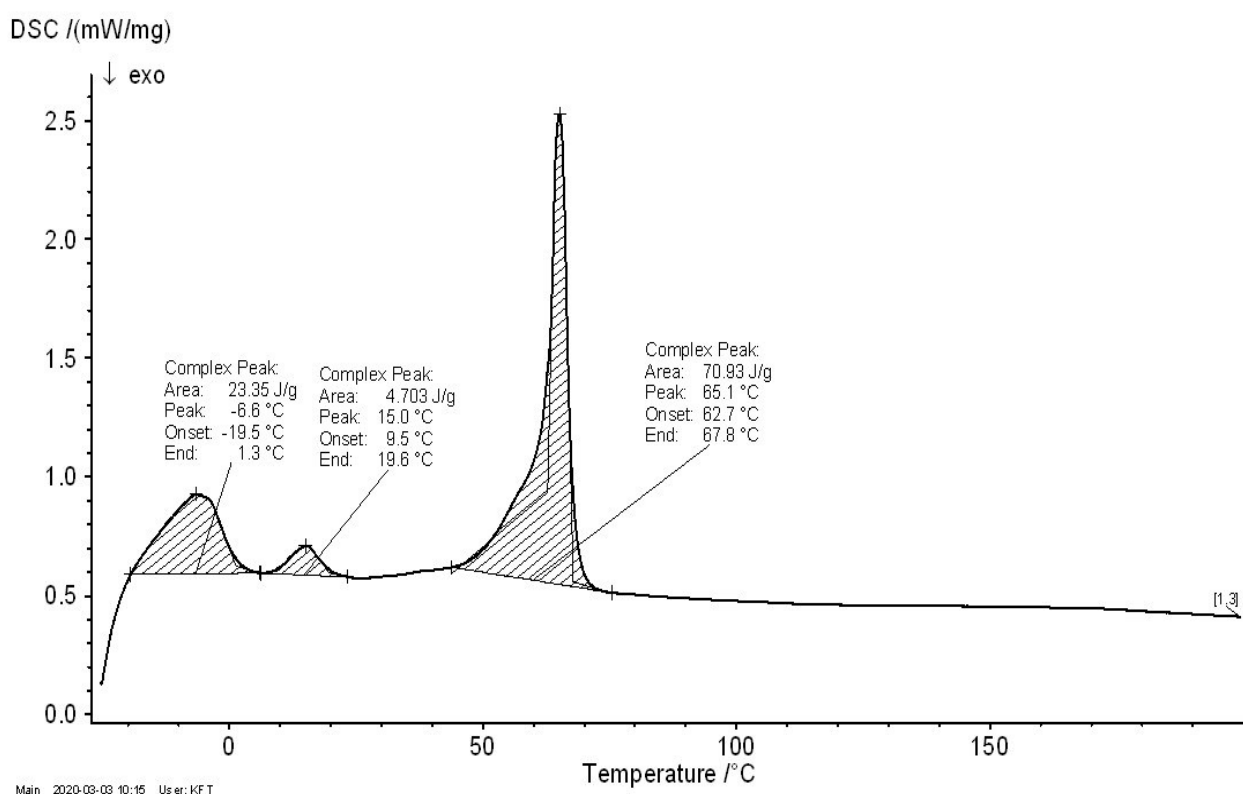


**Obrázek 41 - Směs blank, rychlost ohřívání 1 K.min<sup>-1</sup>**

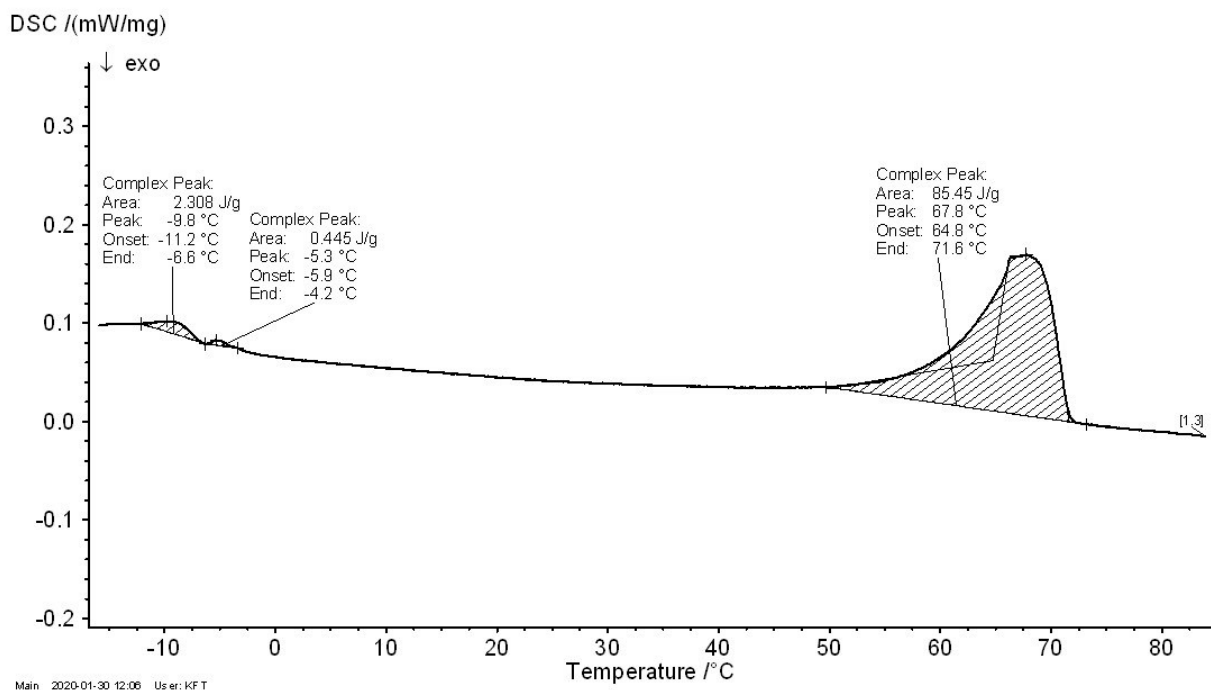
Při porovnání termogramů NLC a směsí o stejném složení (obrázek č. 41 až 48) můžeme pozorovat u NLC širší píky, dokonce rozdělené na dvě části, protože na výslednou křivku termogramu má vliv i rychlost ohřívání vzorku, byly měřeny některé vzorky zahřívány dvěma různými rychlostmi, a to 1 K.min<sup>-1</sup> a 10 K.min<sup>-1</sup>. Nižší rychlost měření zlepšuje rozlišení a umožňuje detekovat různé krystalové modifikace. Metastabilní formy se totiž mohou během pomalého zahřívání přeměňovat na stabilnější formy. Při vyšších rychlostech nemusí být tato změna pozorovatelná. Vyšší rychlost měření posouvá maximum píku k vyšším teplotám a píky bývají větší a vyšší.<sup>68</sup>

U vzorků NLC měřených při rychlosti zahřívání 10 K.min<sup>-1</sup> je pík členěn na dvě části a je zde druhý menší pík pod bodem mrazu, při rychlosti zahřívání 1 K.min<sup>-1</sup> jsou vidět dva samostatné píky a pík pod bodem mrazu se téměř ztratil. K oddělení píků tedy nejspíš

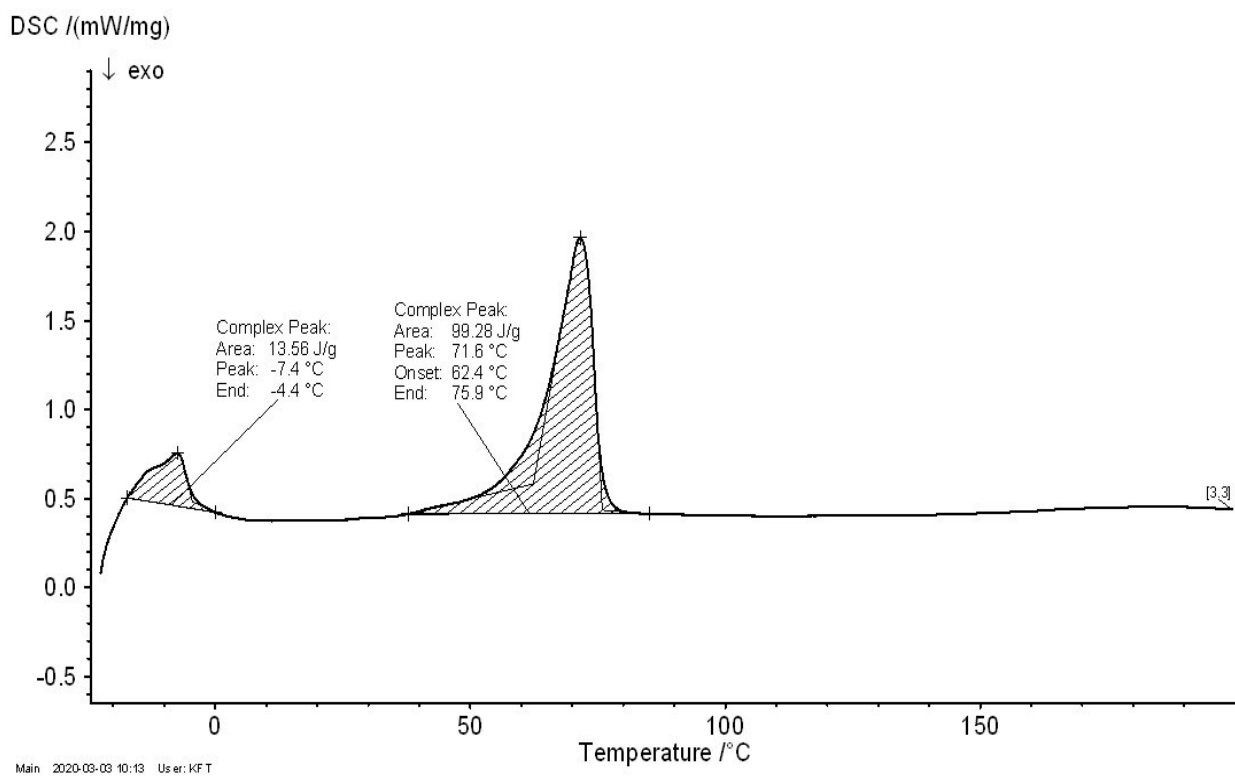
došlo, protože metastabilní krystalická forma se vlivem pomalého zahřívání stihla přeměnit na stabilnější formu. Při porovnání vzorků směsí bez a s Ind můžeme vidět velmi mírný nárůst maxima píku u směsí obsahujících Ind. U NLC nemůžeme s jistotou určit, jak enkapsulovaný Ind ovlivnil termogram, jelikož každý měřený vzorek měl trochu jiné hodnoty PDI a velikost částic a tyto hodnoty výsledné měření také ovlivňují. Rozdělení píku na dvě části u NLC tedy může naznačovat přítomnost různých polymorfních modifikací, jejichž identifikace by vyžadovala podrobnější DSC měření.



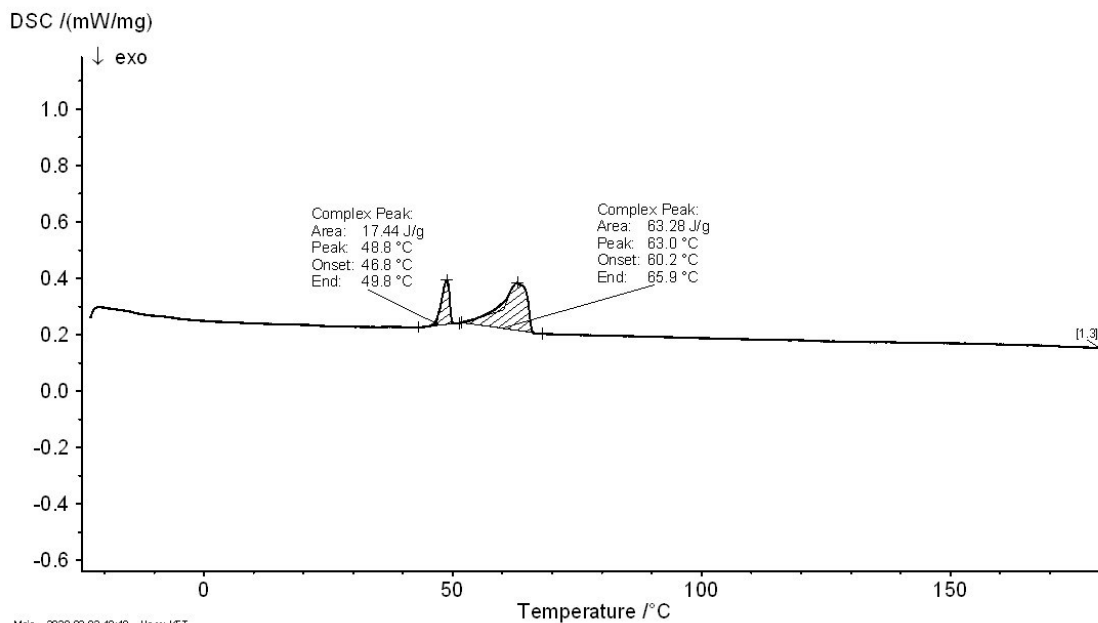
**Obrázek 42 - Směs blank, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>**



Obrázek 43 - Směs s Ind, rychlost ohřívání 1 K.min<sup>-1</sup>



Obrázek 44 - Směs s Ind, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>

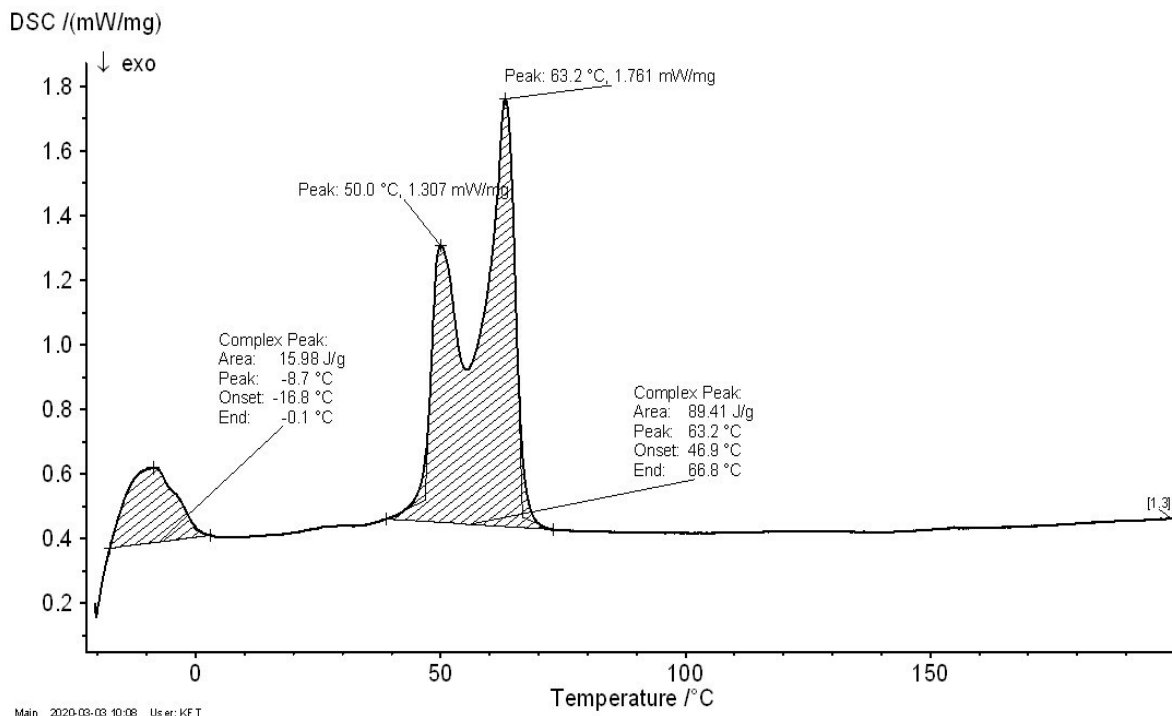


**Obrázek 45 - NLC blank, rychlost ohřívání 1 K.min<sup>-1</sup>, Velikost = 169,57 nm, PDI = 0,189**

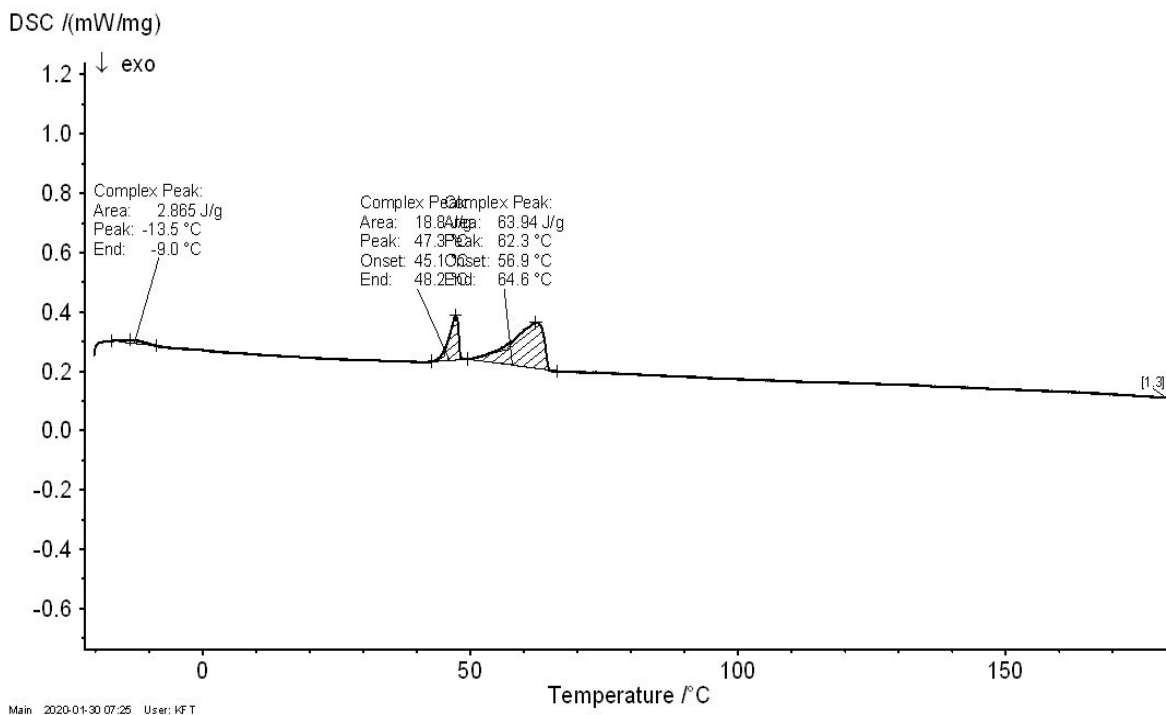
Dále je důležité porovnat rozdíly mezi termogramy SLN a NLC (které navíc obsahují i IPM) na obrázku č. 46, 48, 52 a 53. Pokud se podíváme na křivku termogramu u NLC, pozorujeme dva výrazné píky. První, menší se nachází pod bodem mrazu. Druhý výraznější pík při teplotách okolo 50-60 °C je u NLC rozdělen na dvě části. V porovnání se SLN (44,8-69,8 °C s Ind, 44,6-69,8 °C bez Ind) jsou píky NLC (45,4-69,1 °C s Ind, 46,9-66,8 °C bez Ind) mírně užší, mají větší plochu a maxima při nižších teplotách, výrazně snížené maximum je hlavně u druhého píku (NLC s Ind má oba píky při teplotě 48,8 °C, bez Ind 50,0 °C a 63,2 °C, SLN s Ind má píky při teplotě 48,8 °C a 68,1 °C, bez Ind 51,3 °C a 67,9 °C). Na křivce termogramu u SLN chybí pík pod bodem mrazu, nejspíš kvůli nepřítomnosti IPM, a jsou zde dva výrazné píky oddělené od sebe. Nachází se však v podobném teplotním rozmezí jako jeden zdvojený pík u NLC.

Vliv na výsledné křivky mohly mít také parametry jako jsou velikost částic a hodnota PDI. Vlivem přidání IPM došlo ke snížení hodnoty PDI – NLC mají hodnoty IPM 0,20 na rozdíl od SLN o hodnotě PDI 0,22 a 0,24. U SLN tedy můžeme rozdělení píku na dva vysvětlit tak, že se ve vzorcích vyskytují LN o rozdílných velikostech, což způsobí teplotní přeměny při různých teplotách, rozdělení také mohou způsobit různé polymorfni formy lipidů. Snížení teploty tání a nekompletní oddělení píku u NLC je znakem nižší uspořádanosti v lipidové matrix nanočástic, což bylo vlastně cílem přidání IPM.

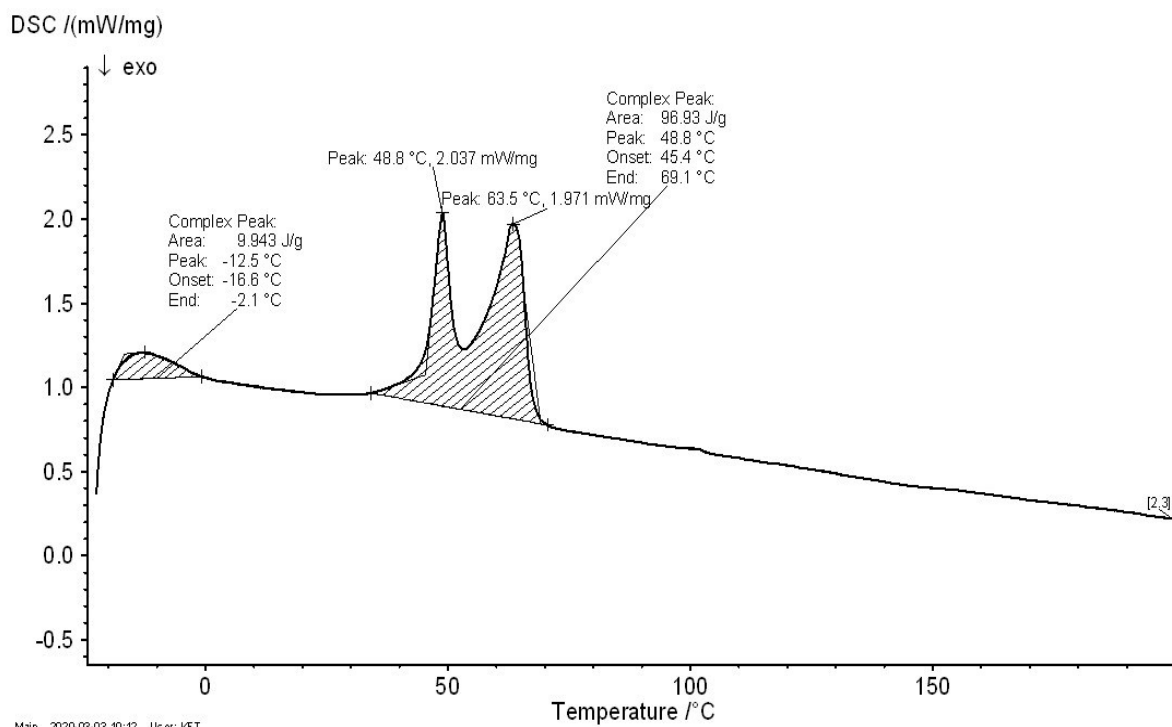




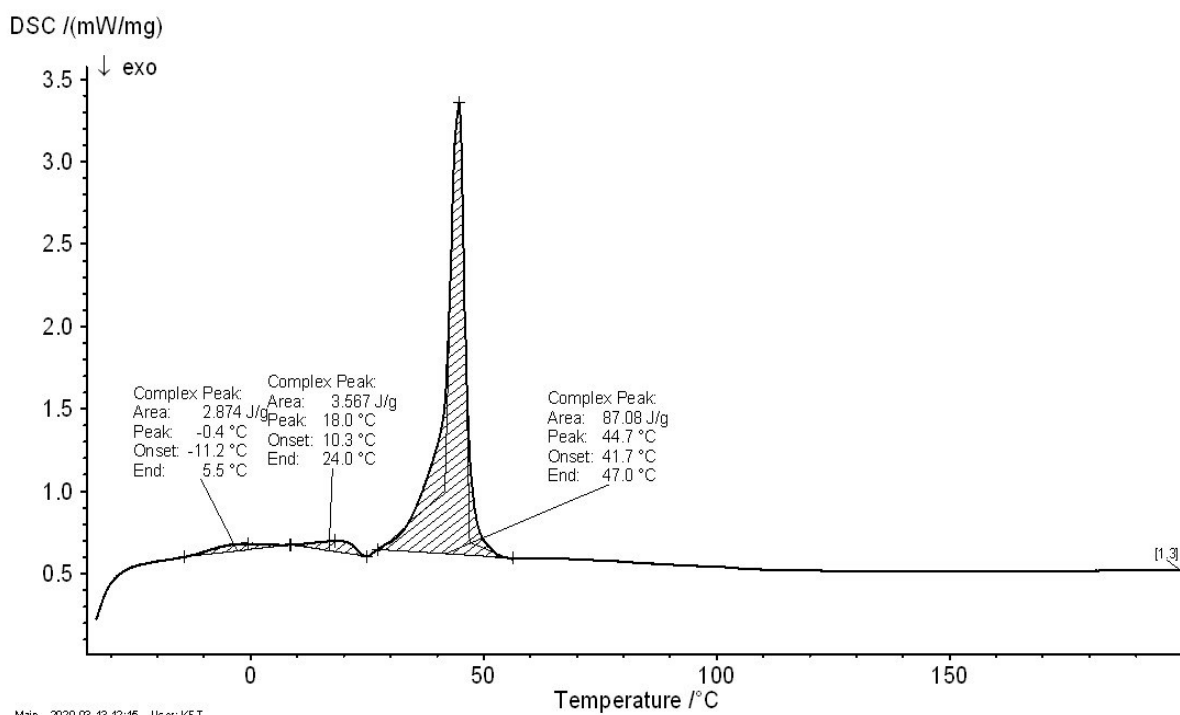
**Obrázek 46 - NLC blank, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>, velikost částic = 136,57 nm, PDI = 0,224**



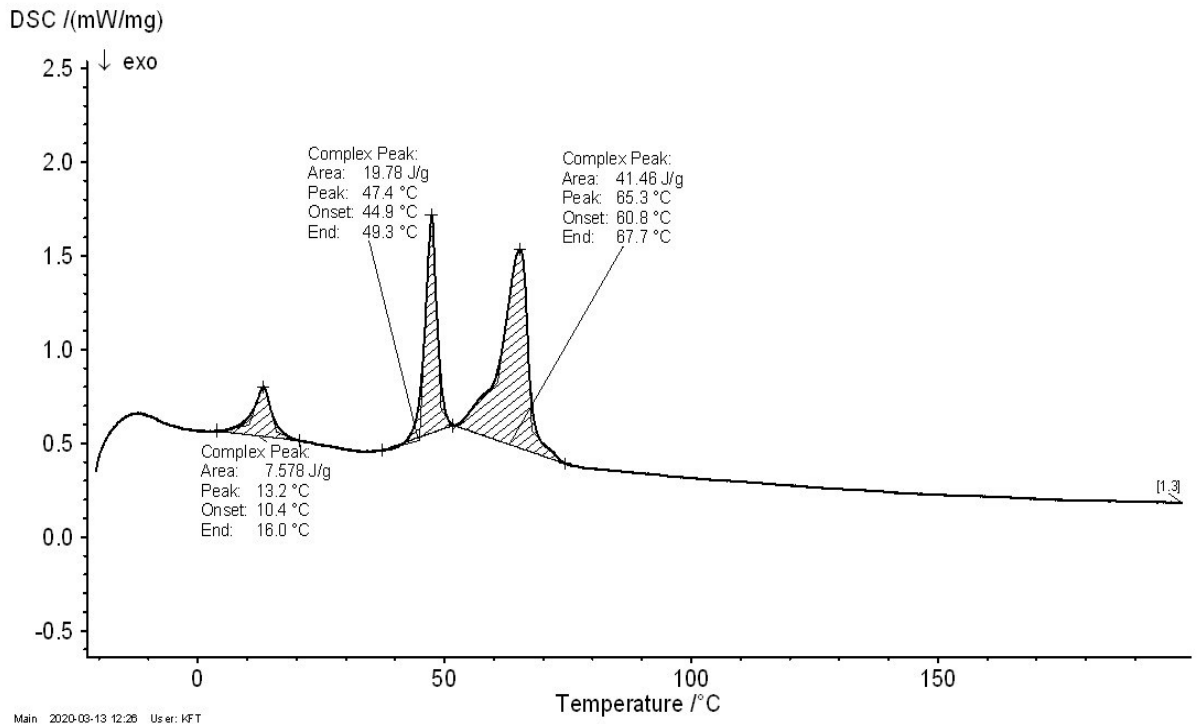
**Obrázek 47 - NLC s Ind, rychlost ohřívání 1 K.min<sup>-1</sup>. Velikost částic 156,73 nm, PDI = 0,183**



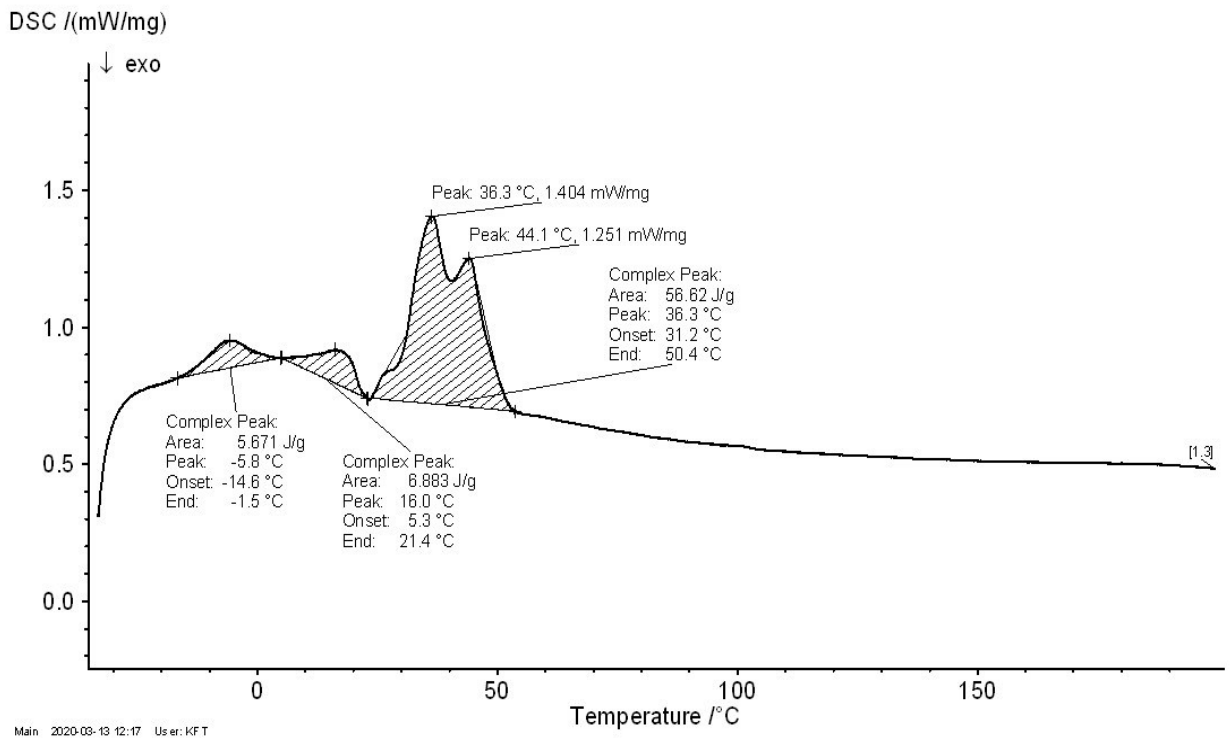
Obrázek 48 - NLC s Ind, rychlost ohřívání 10 K.min<sup>-1</sup>, velikost částic = 147,4 nm, PDI = 0,202



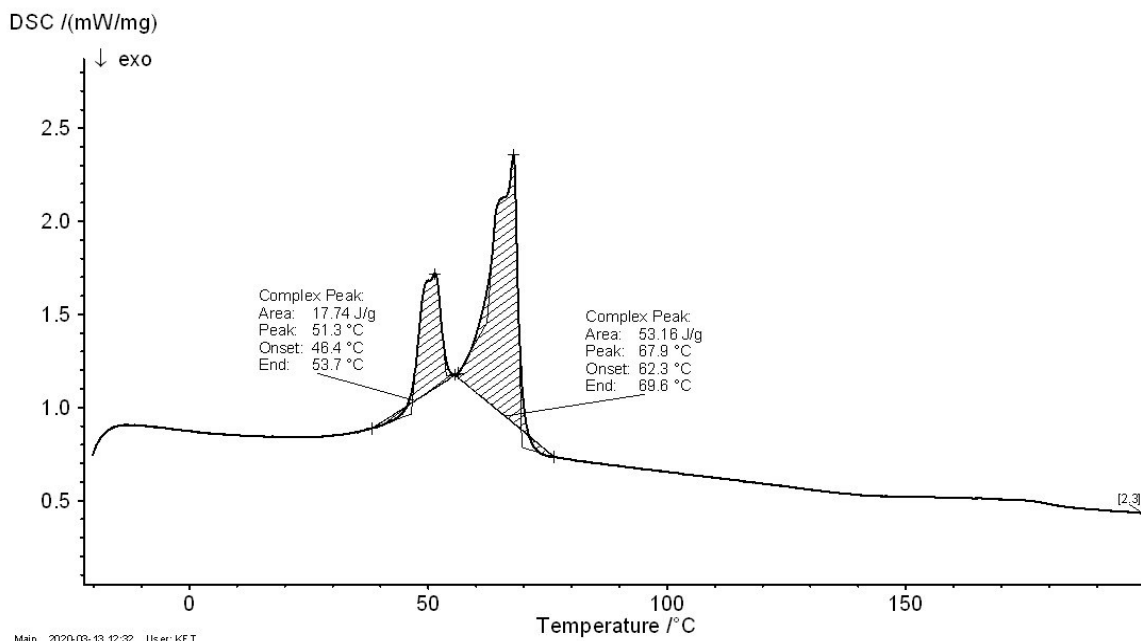
Obrázek 49 - NLC blank, rychlost zahřívání 10 K.min<sup>-1</sup>



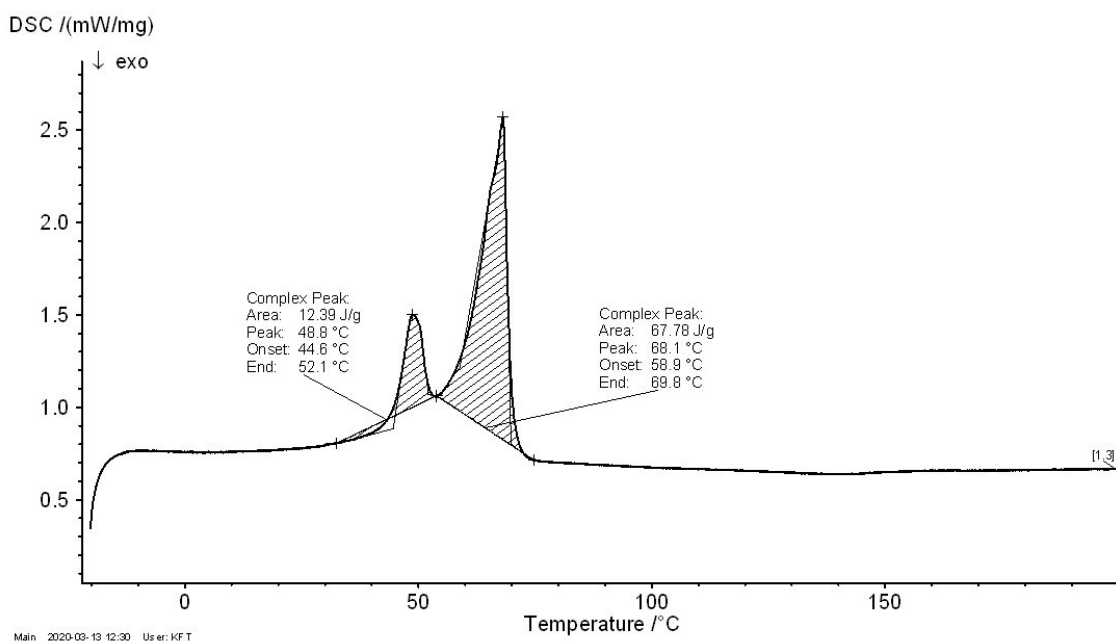
Obrázek 50 - NLC + Ind, rychlost zahřívání 10 K.min<sup>-1</sup>



Obrázek 51 - NLC + Ind, rychlost zahřívání 10 K.min<sup>-1</sup>



**Obrázek 52 - SLN bez IP, blank, rychlost zahřívání 10 K.min<sup>-1</sup>**



**Obrázek 53 - SLN bez IP, s Ind, rychlost zahřívání 10 K.min<sup>-1</sup>**

V žádném z měřených termogramů směsi SLN ani NLC není viditelný pík kolem 160 °C, který by označoval Ind. Nepřítomnost píku Ind by mohla znamenat buď, že je Ind přítomen v LN v amorfnní formě nebo molekulárně dispergováný. Nicméně pík Ind není zaznamenán ani na termogramu směsi lipidů.<sup>70, 71</sup> Ind bude nejspíš v této směsi rozpuštěn. Tato technika však není schopna potvrdit formu Ind v LN ani přesnou povahu tepelných přechodů. Zde by bylo potřeba upřesnit výsledky jinými metodami (např. rentgenová difrakce).<sup>68</sup>

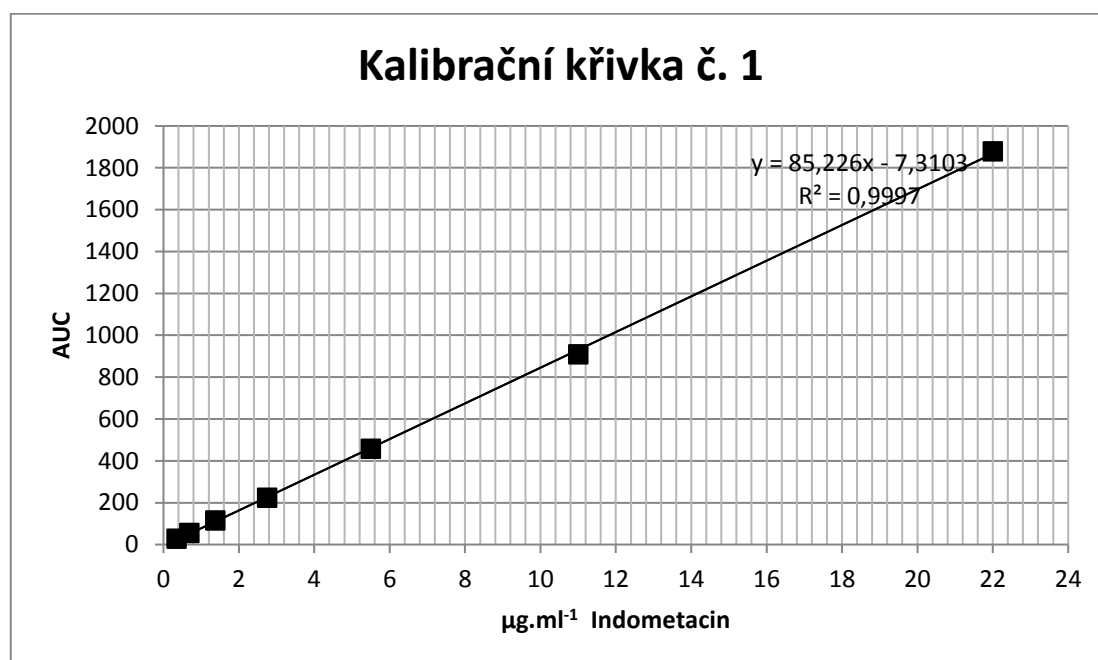
#### 4.6.4 HPLC

V první části HPLC analýzy byly proměřeny vzorky z tabulky č. 6. Parametry připravených vzorků NLC jsou uvedeny v tabulce č. 15. Nebyly měřeny samotné NLC, ale supernatant.

Tabulka 15 – Formulace LN měřená pomocí HPLC: CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1%, lec 15 mg, IPM 10 mg

Velikost (nm)	PDI	Zeta potenciá (mN)	Množství naváženého Ind (mg)
136,6	0,202	-61,1	bez Ind
138,0	0,188	-50,7	bez Ind
143,9	0,197	-47,9	0,414 mg
144,0	0,190	-41,3	0,414 mg
146,8	0,203	-46,1	1,035 mg
139,5	0,195	-43,0	1,035 mg

Před měřením vzorků proběhla kontrola opakovatelnosti nástřiku. Retenční čas kontrolního vzorku s Ind  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byl  $6,508 \pm 0,002$  a hodnoty ploch píků  $225,152 \pm 0,189$ . Následně byly měřeny vzorky pro kalibrační křivku, která je na obrázku č. 54.



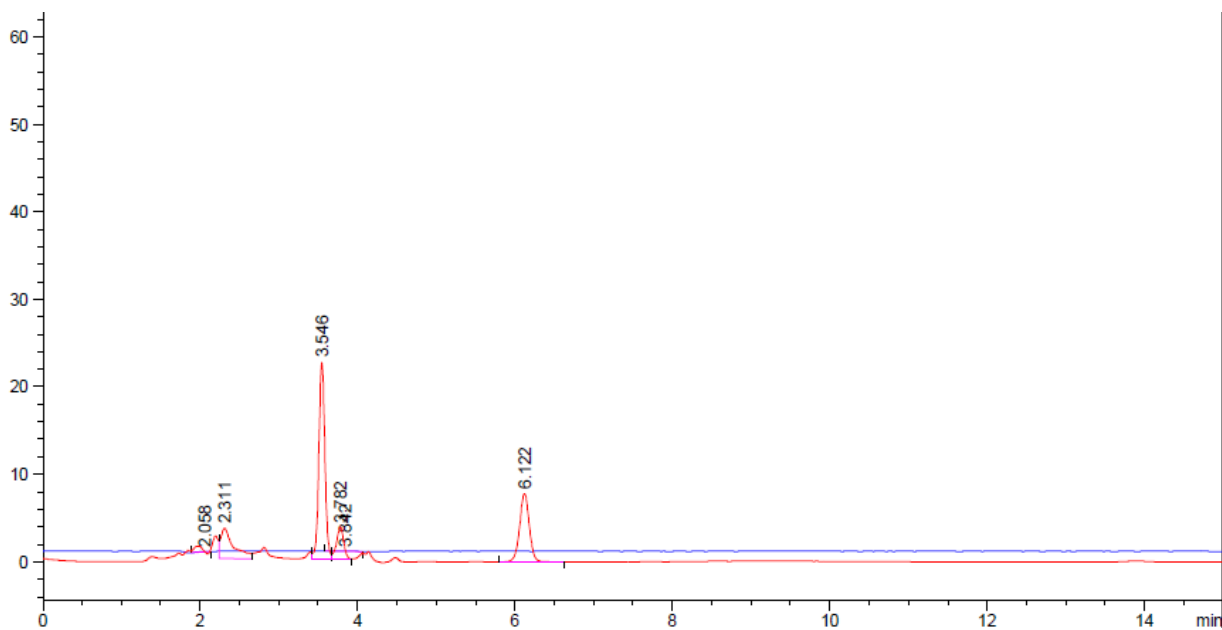
Obrázek 54 - Kalibrační křivka pro první analýzu

Dle měření vzorků s Ind o různých koncentracích (tabulka č. 16) byl retenční čas Ind průměrně 6,52. S klesající koncentrací Ind se retenční čas posouval mírně k vyšším hodnotám.

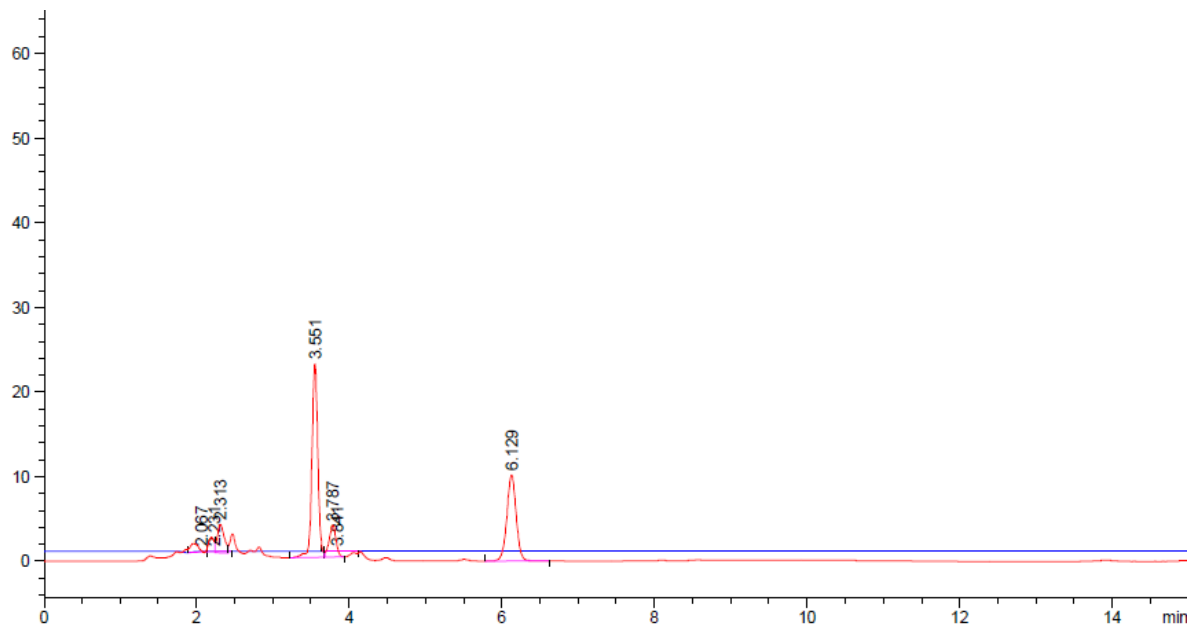
Tabulka 16 - Hodnoty retenčních časů Ind z kalibrační křivky

	Koncentrace Ind	RČ Ind v kalibrační křivce	Plocha píku
1	20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	6,513	1879,23633
2	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	6,519	908,32172
3	5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	6,521	457,85110
4	2,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	6,521	224,47447
5	1,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	6,520	114,80609
6	0,624 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	6,522	55,85186
7	0,314 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	6,522	28,56988
		Průměr = 6,5197 $\pm$ 0,0029	

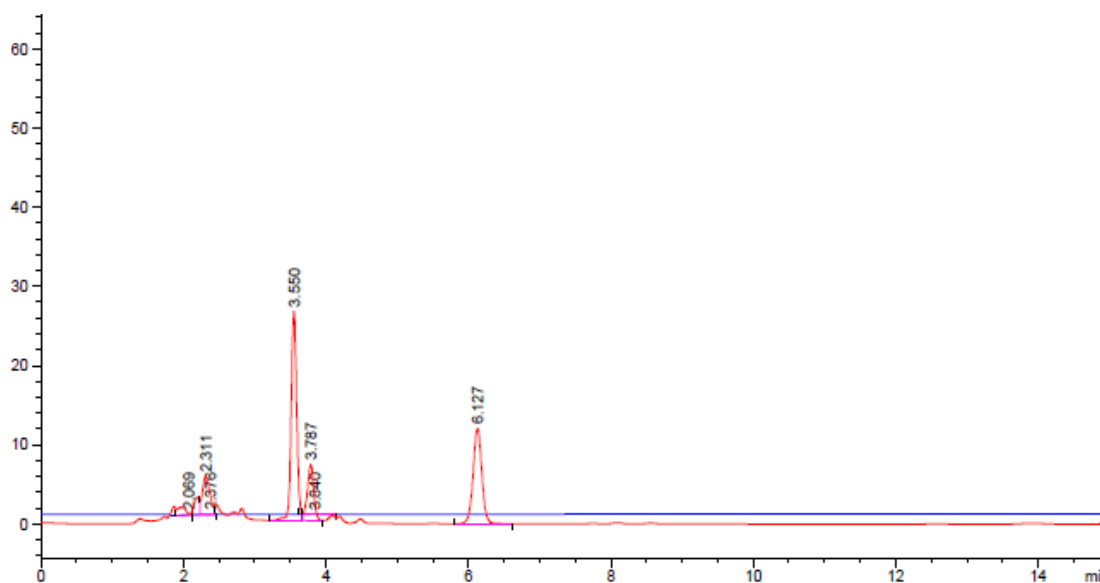
U měřených vzorků NLC bez Ind a s různou koncentrací Ind (obrázek č. 55, 56, 57) není nikde vidět pík v retenčním čase 6,52, který by určil přítomnost Ind v měřených vzorcích. Nepřítomnost Ind ve filtrátu by naznačovalo, že téměř 100 % Ind, který byl přidán do formulace je enkapsulován uvnitř NLC.



Obrázek 55 - NLC blank

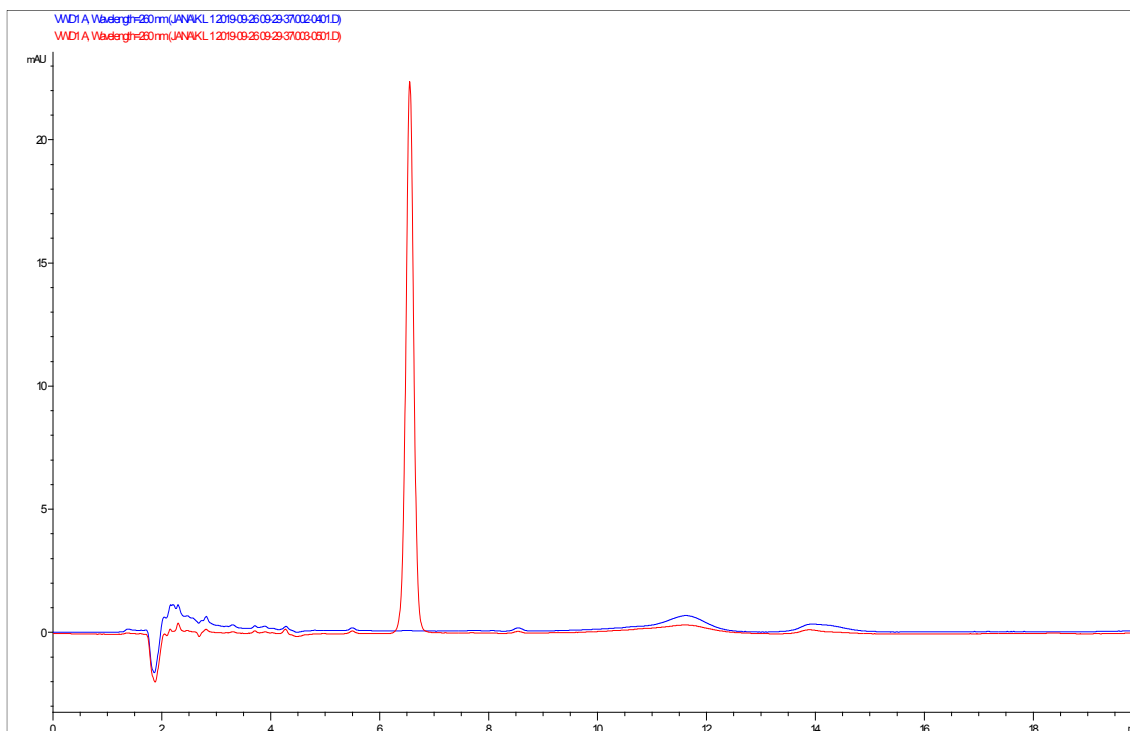


Obrázek 56 - NLC, navážka Ind 0,414 mg



Obrázek 57 - NLC navážka Ind 1,035 mg

Pro zjištění původu píků v měření byl proměřován ještě samostatný Kolliphor P188 (obrázek č. 58). Dále byl ještě proměřen spike, což je roztok Kolliphoru P188, ke kterému byl přidán Ind. Retenční čas Ind je zde 6,553.



**Obrázek 58 - Porovnání dvou vzorků.**

**Modrá: Kolliphor P188 1,25 mg.ml<sup>-1</sup>**

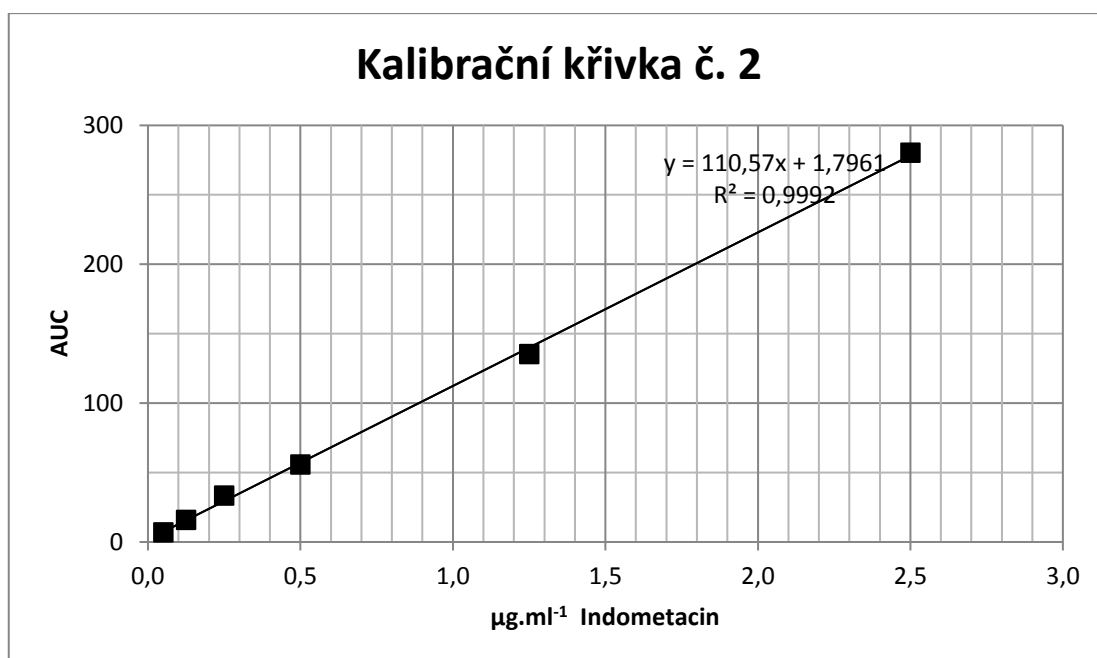
**Červená: spike = Ind 2,75 µg.ml<sup>-1</sup> + 1,25 mg.ml<sup>-1</sup> Kolliphor P188, Retenční čas Ind = 6,553, Plocha = 225,56377**

Pro další upřesnění výsledků a objasnění původu píků, byl proveden ještě další pokus. Byla připravena nová kalibrační křivka (obrázek č. 59) a byly změřeny vzorky z tabulky č. 7. Parametry připravených NLC jsou v tabulce č. 17. Retenční čas Ind naměřený u vzorků při různých koncentracích jsou tabulce č. 18. Retenční čas Ind je zde oproti předchozímu měření posunutý a postupně během měření klesal. Během HPLC analýzy docházelo postupně k poklesu tlaku při měření, a proto se nejspíš snižoval retenční čas vzorků. Není známo, z jakého důvodu při analýze docházelo k poklesu tlaku, nicméně mohlo to být způsobeno několika faktory, například špatně odvzdušněnou mobilní fází, netěsností v systému, kudy se mohl dostávat plyn do kolony nebo třeba porucha čerpadla.<sup>72</sup> V důsledku klesajícího tlaku docházelo ke zpomalení průtoku mobilní fáze kolonou a snížil se tak retenční čas vzorků.

**Tabulka 17 - Druhé měření: Formulace LN měřená pomocí HPLC: CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1%, lec 15 mg, IPM 10 mg**

<b>Velikost (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Množství naváženého Ind</b>
146,53	0,177	bez Ind
169,57	0,188	bez Ind
159,60	0,192	0,414 mg
156,73	0,183	0,414 mg





Obrázek 59 - Kalibrační křivka 2 pro druhou analýzu

Tabulka 18 - Druhé měření: Formulace LN měřená pomocí HPLC: CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1%, lec 15 mg, IPM 10 mg

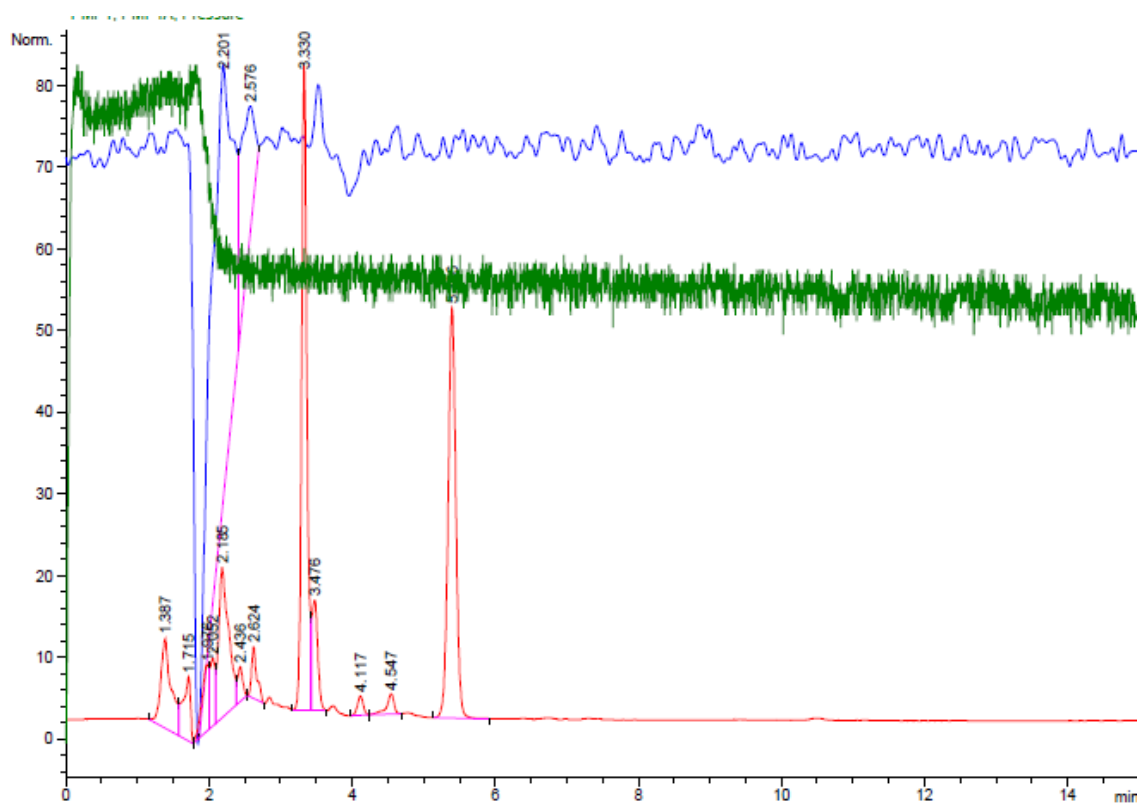
	Koncentrace Ind	RČ Ind v kalibrační křivce	Plocha píku
1	5 µg.ml <sup>-1</sup>	6.801	280,39920
2	2,5 µg.ml <sup>-1</sup>	6.564	135,31331
3	1 µg.ml <sup>-1</sup>	6.367	55,85073
4	0,5 µg.ml <sup>-1</sup>	6.202	33,49475
5	0,25 µg.ml <sup>-1</sup>	6.068	15,83146
6	0,1 µg.ml <sup>-1</sup>	5.948	6,78750
		Průměr = 6,325 ± 0,2912	

Na obrázku č. 60 je analýza vzorku, který obsahoval 0,414 mg Ind. Ani zde není vidět žádný pík, který by značil přítomnost Ind. Při porovnání vzorku NLC s Ind a blanku (obrázek č. 55, 56, 57, 60, 61) není vidět u první ani u druhé analýzy vzorku obsahujícího Ind žádný pík navíc nebo zvětšení píku, což naznačuje, že Ind zde není přítomen nebo je ho zde velmi malé množství pod hranicí detekčního limitu. Množství enkapsulovaného Ind v NLC je tedy 8,28 µg v 1 mg LN.

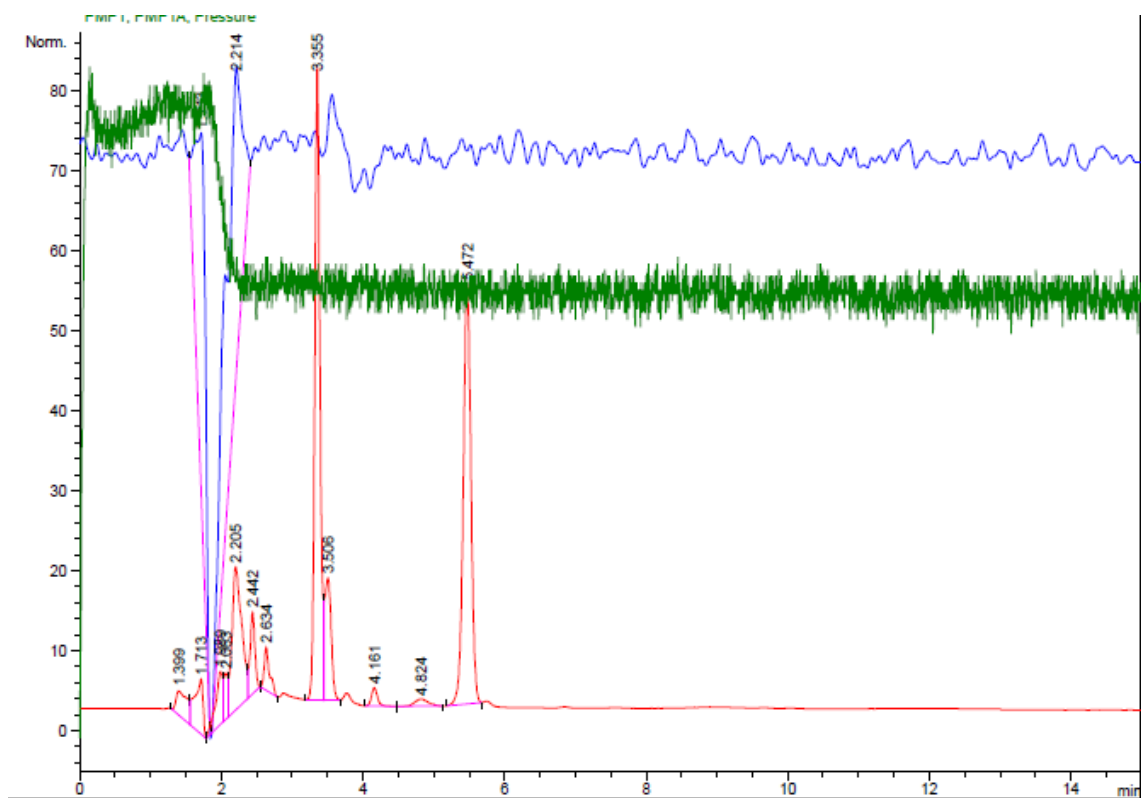
U vzorků NLC je vidět výrazný pík v retenčním čase 5,6 - 5,4, v první analýze je tento pík pozorovatelný v retenčním čase 6,1, kolísání je opět nejspíš způsobeno poklesem tlaku. Tento pík by mohl být způsoben přítomností IPM a MS, u kterých se vyskytují píky v této oblasti. Další výrazný pík se u NLC vyskytuje v retenčním čase 3,3. U žádného

z měřených lipidů se výrazný pík v této oblasti nevyskytuje. Lipidy měly většinou výrazný pík při nižších retenčních časech (IPM - 2,5, MS - 2,7, 2,5, a 2,2, lec - 2,7). Zde mohlo dojít ke tvorbě komplexů mezi analyty, které tento pík mohly způsobit.

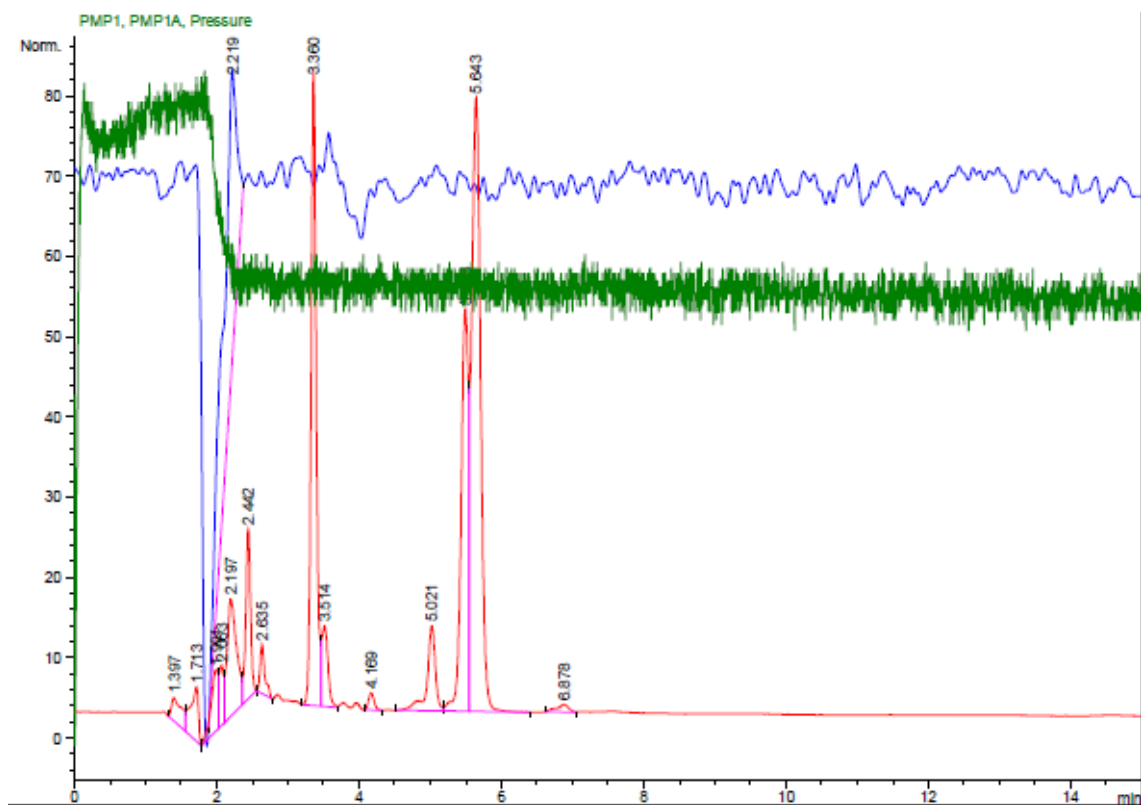
Na obrázku č. 64 je vzorek spike, který obsahuje 0,25 ml NLC blank a 0,25 ml MF s 2,5  $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ind (koncentrace Ind = 1,25  $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V retenčním čase 5,49 a 5,64 jsou dva spojené píky, pík v retenčním čase 5,64 by mohl označovat přidaný Ind, nicméně zde by bylo potřeba optimalizovat metodu tak, aby byly tyto píky oddělené.



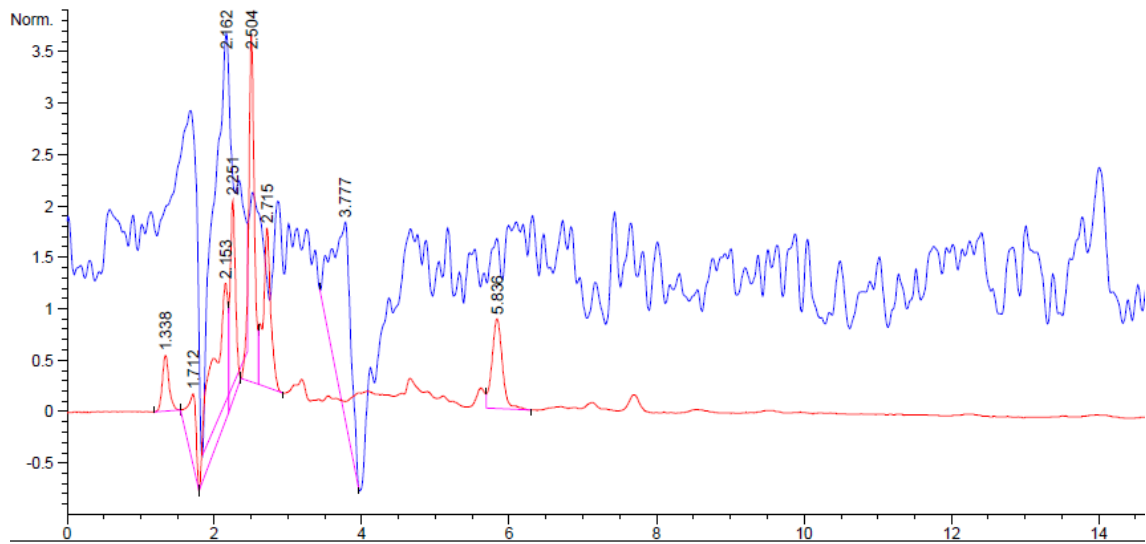
Obrázek 60 - NLC navážka Ind = 0,414 mg



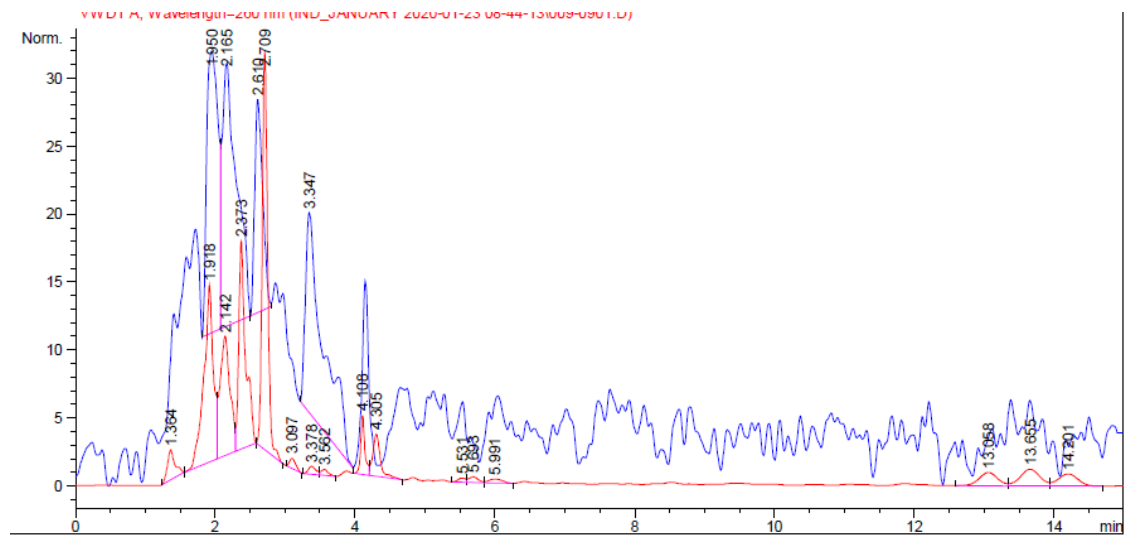
Obrázek 61 - NLC blank



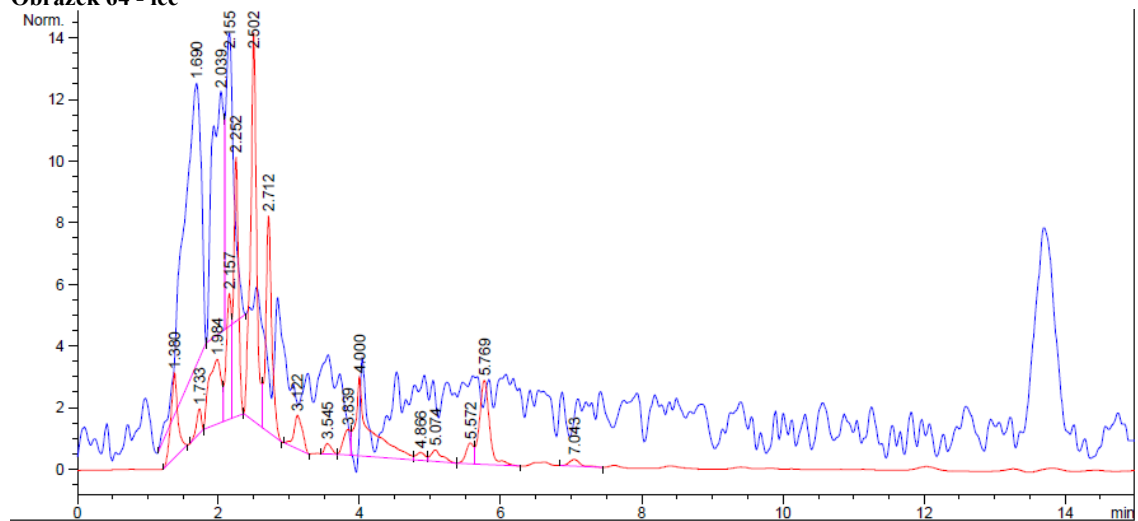
Obrázek 62 – spike (0,25 ml NLC blank + 0,25 ml MF s 2,5 µg.ml<sup>-1</sup> Ind)



Obrázek 63 - IPM



Obrázek 64 - lec



Obrázek 65 - MS

## 5 Závěr

Experimentální práce se zabývala přípravou LN, výběrem optimální metody přípravy a výběrem vhodných lipidů, surfaktantů a určení jejich správných poměrů, které jsou vhodné k přípravě LN. Tyto LN by měly být dále použitelné pro enkapsulaci léčivé látky. Ind byl zvolen jako modelová látka, prakticky nerozpustná ve vodě, jehož biodostupnost může být zvýšena pomocí těchto LN.

Finální formulace byla připravena emulzní odpařovací metodou, kde byla vnitřní organická fáze složená z CHLO a MET v poměru 1:1 při přípravě přidávána ve dvou krocích. LN jsou připraveny z 25 mg MS, 10 mg IPM, 15 mg lec a Kolliphoru P188 0,1% roztok. Výhodné je použití dvou emulgátorů lec a Kolliphor P188, které zde tvoří komplexní emulgátor, který lépe stabilizuje LN a vznikají tak menší a méně polydisperzní částice.<sup>9, 73</sup> Pro tuto formulaci je vhodná vyšší koncentrace lec a nižší koncentrace Kolliphoru P188. Organická rozpouštědla pro vnitřní fázi byla vybrána, dle parametrů (velikost částic a PDI) vzniklých LN, důležitá byla také dobrá rozpustnost lipidů v organických rozpouštědlech.

Ind byl enkapsulován v množství od 130  $\mu\text{g}$  do 1035  $\mu\text{g}$ . Vznikly LN o průměrné velikosti 138,9 nm  $\pm$  5,9, hodnotě PDI 0,19  $\pm$  0,01 a zeta potenciálu -47,8 mV  $\pm$  5,28. Velikost těchto částic je optimální z hlediska potenciálního použití při terapii, jelikož částice menší než 150 nm jsou hůře rozpoznávány imunitním systémem organismu a mají prodlouženou dobu účinku.<sup>38</sup> Cílem bylo získat LN o hodnotě PDI menší než 0,2, protože nižší hodnoty značí, že je vzorek monodisperzní. Pro stabilní vzorek jsou potřebné hodnoty zeta potenciálu alespoň  $\pm$  30 mV. Získané hodnoty zeta potenciálu jsou u připravených LN vyšší a naznačují dobrou stabilitu vzorku, což bylo také potvrzeno měřením. Finální formulace byla proměřena po patnácti dnech a vlastnosti formulace se po této době nijak výrazně nezměnily.

U finální formulace byla prováděna purifikace NLC. Jako nejvhodnější metoda se ukázala purifikace pomocí centrifugačních koncentrátorů Vivaspin 500 MWCO 100000 při nastavení centrifugy 12000 g, 4 °C a 40 min. Purifikované LN byly použity pro DSC měření a filtrát byl odebrán pro HPLC analýzu. Při DSC analýze nebyl viditelný pík Ind při teplotě kolem 160 °C ani u vzorků LN ani u směsi lipidů, což nejspíš znamená, že je Ind ve směsi rozpuštěn. Při porovnání termogramů SLN a NLC můžeme v termogramu NLC pozorovat snížení teplot tání a nekompletní rozdělení píků. To naznačuje nižší uspořádanost s lipidové matrix NLC, což je výhodné pro enkapsulaci většího množství

léčiva do NLC. Rozdělení píků v termogramu na dvě části může naznačovat přítomnost různých polymorfních forem lipidu nebo může být způsobeno různou velikostí částic ve vzorku. DSC analýza však není schopná potvrdit formu Ind v LN ani přesnou povahu tepelných přechodů. Pro upřesnění výsledků by zde bylo potřeba použít jiné metody.

HPLC analýza naznačuje enkapsulační efektivitu Ind do částic blízkou 100 %. Což velmi dobře koreluje s jeho rozpustností ve vodě a vysokým logP.

Připravené nanočástice jsou biokompatibilní a biodegradovatelnou platformou pro zvýšení biologické dostupnosti nízkomolekulárních léčiv s problematickou rozpustností ve vodě. Velikost pod 150 nm je předurčuje k cílené distribuci do zánětlivé tkáně a regulaci genové exprese v polarizovaných makrofázích. Požitím pegylovaných lipidů by bylo možné prodloužit jejich biologický poločas a zajistit distribuci do nádorové tkáně cestou pasivního targetingu.

## 6 Seznam zkratk:

LN – Lipidické nanočástic (Lipid nanoparticle)

SLN – Pevné lipidické nanočástic (Solid lipid nanoparticle)

NLC – Nanostrukturované lipidové nosiče (Nanostructured lipid carrier)

ACE – Aceton

DCM – Dichlormethan

MET – Methanol

CHLO – Chloroform

MS - Glycerolmonostearát

CMC – Kritická micelární koncentrace

PDI – Index polydisperzity

lec – Lecitin

DSC – Diferenciální skenovací kalorimetrie

HPLC – Vysoce účinná kapalinová chromatografie

HPH – Vysokotlaká homogenizace

Ind – Indometacin

č. – číslo

IPM – isopropylmyristát

Min - minuta

## 7 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Navážky Ind, které se rozpustí v daném množství lipidů. 100 % množství lipidů je zde 50 mg.....	34
Tabulka 2 - Přehled měřených vzorků na DSC .....	35
Tabulka 3 - Vzorky měřené pomocí HPLC - formulace obsahuje organická rozpouštědla CHLO + MET v poměru 1:1, 10 mg IPM, surfaktanty lec 15 mg a Kolliphor P188 0,1% a dále množství Ind dle tabulky. Slepý vzorek je pouze NLC bez enkapsulovaného Ind. ....	37
Tabulka 4 - Roztoky pro kalibrační křivku.....	38
Tabulka 5 - Parametry měření <sup>61</sup> .....	39
Tabulka 6 - Seznam měřených vzorků pomocí HPLC při první analýze .....	39
Tabulka 7 - Seznam měřených vzorků pomocí HPLC při druhé analýze .....	40
Tabulka 8 – LN připravené metodou nanoprecipitace.....	41
Tabulka 9 – Emulzní odpařovací (metoda 1 – k vnitřní fázi přidána celá vnější fáze najednou, metoda 2 – k vnitřní fázi přidána vnější fáze ve dvou krocích).....	42
Tabulka 10 – Vliv přidání IPM u formulace CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1% a 0,5% lec 15 mg a IPM 5 mg a 10 mg .....	59
Tabulka 11 - Vliv doby sonikace na vlastnosti LN u formulace CHLO + MET 3:1.....	60
Tabulka 12 - Stabilita závěrečné formulace CHLO + MET 1:1 + P188 0,1% + lec 15 mg + IPM 10 mg - den 1. až 15. ....	61
Tabulka 13 - Závěrečná formulace CHLO + MET, lec 15 mg, Kolliphor P188 0,1% - porovnání NLC s enkapsulovaným Ind a bez něj. Porovnání připravených formulací.....	63
Tabulka 14 - Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky u závěrečné formulace .....	63
Tabulka 15 – Formulace LN měřená pomocí HPLC: CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1%, lec 15 mg, IPM 10 mg .....	76
Tabulka 16 - Hodnoty retenčních časů Ind z kalibrační křivky.....	77
Tabulka 17 - Druhé měření: Formulace LN měřená pomocí HPLC: CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1%, lec 15 mg, IPM 10 mg .....	79
Tabulka 18 - Druhé měření: Formulace LN měřená pomocí HPLC: CHLO + MET 1:1, Kolliphor P188 0,1%, lec 15 mg, IPM 10 mg .....	80



## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Možnosti inkorporace léčiva do SLN: 1 – Matricový model, léčivo rozptýlené v celém objemu, 2 - Léčivo v jádře, 3 - Léčivo v obalu .....	11
Obrázek 2 - Typy NLC. Nedokonalý typ – neuspořádaná struktura. Amorfní typ. Mnohonásobný typ – vznikají nanokompartmenty. <sup>5</sup> .....	13
Obrázek 3 - Extravazace v nádorové tkáni. 1 - Nanočástice nemohou prostupovat přes normální endotel. 4 - Velmi malé molekuly mohou prostoupit přes normální endotel. 2 - Nanočástice mohou prostoupit mezi endotelovými buňkami díky mezerám mezi nimi. 3 - Dochází ke kumulaci nanočástic v tkáni (nádor, zánět) <sup>15</sup> .....	14
Obrázek 4 - Porovnání SLN a NLC- NLC mají více nedokonalostí. Díky tomu pojmu větší množství léčiva než SLN a jsou více stabilní. <sup>13</sup> .....	17
Obrázek 5 - Topické podání – léčivo působí pouze v epidermis. Dermální podání – léčivo působí v dermis a epidermis. Transdermální podání – léčivo prostupuje přes kůži až do krevní cirkulace .....	19
Obrázek 6 - Elektrická dvojvrstva koloidní částice a zeta potenciál <sup>52</sup> .....	27
Obrázek 7 - Měření vzorků pomocí DSC. <sup>57</sup> .....	28
Obrázek 8 - Schéma HPLC: Zásobník mobilní fáze (HPLC solvent), pumpa (HPLC pump), vstřikovač (injector), kolona (HPLC column), detektor, počítač (Data acquisition). <sup>59</sup> .....	29
Obrázek 9 - Vysrážení LN v dialyzační membráně.....	36
Obrázek 10 – Závislost velikosti částic na koncentraci surfaktantu Kolliphor P188 a rozpouštědla .....	41
Obrázek 11 - Závislost hodnoty PDI na koncentraci surfaktantu Kolliphor P188 a rozpouštědla .....	41
Obrázek 12 – Závislost velikosti částic LN na metodě sonikace a koncentraci surfaktantu. Formulace s CHLO .....	46
Obrázek 13 - Závislost velikosti částic na metodě sonikace a koncentraci surfaktantu. Formulace s DCM.....	46
Obrázek 14 - Porovnání velikosti částic při použití rozpouštědel CHLO a DCHLM ve vnitřní fázi.....	47
Obrázek 15 - Vliv surfaktantů u formulace s CHLO na velikost částic a PDI .....	48
Obrázek 16 - Vliv surfaktantů na zeta potenciál, použité organické rozpouštědlo - CHLO.....	49
Obrázek 17 - Vliv surfaktantů u formulace CHLO + MET 3:1 na velikost částic a PDI. ....	49
Obrázek 18 - Vliv surfaktantů na zeta potenciál u formulace CHLO+MET 3:1.....	50
Obrázek 19 - Použitý surfaktant Kolliphor P188 – na hladině jsou shluky lipidu .....	50
Obrázek 20 - Použitý surfaktant Kolliphor P188 a lec – bez shluků.....	51
Obrázek 21 - Vliv surfaktantů na velikost částic u formulace CHLO + MET 1:3 .....	52
Obrázek 22 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI a porovnání formulací CHLO+MET 1:1 a CHLO+ACE 1:1, - velikost částic, body = PDI.....	53

Obrázek 23 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI a porovnání formulací CHLO+MET 1:3 a CHLO+ACE 1:3, - velikost částic, body = PDI.....	53
Obrázek 24 - Porovnání velikosti částic u připravených formulací.....	54
Obrázek 25 - Porovnání PDI u připravených formulací.....	55
Obrázek 26 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI a porovnání formulací při koncentraci Kolliphoru P188 0,1%.....	56
Obrázek 27 - Vliv surfaktantů na velikost částic a PDI u formulace CHLO + MET 1:157	
Obrázek 28 - Vliv surfaktantů na velikost částic u formulace CHLO + ACE 1:3. ....	58
Obrázek 29 - Vliv objemu organického rozpouštědla ve vnitřní fázi na vlastnosti LN u formulace CHLO + MET 1:3, Kolliphor P188 0,1% .....	58
Obrázek 30 - Vliv IPM na vlastnosti nanočástic u formulace CHLO + MET 1:1 .....	60
Obrázek 31 - Vliv doby sonikace u formulace CHLO+MET 3:1 + Kolliphor P188 0,5% .....	61
Obrázek 32 - Stabilita 1. - 15. den u konečné formulace CHLO + MET + Kolliphor P188 0,5% + lec 15 mg + IPM 10 mg .....	62
Obrázek 33 - Stabilita u formulace CHLO+MET - Zeta potenciál .....	62
Obrázek 34 - Porovnání vlastností částic s enkapsulovaným Ind a bez něj u formulace CHLO + MET, IPM 10 mg, lec 15 mg, Kolliphor P188. Každý sloupec představuje jeden vzorek. ....	64
Obrázek 35 - Ind, rychlost ohřívání 1 K.min <sup>-1</sup> .....	65
Obrázek 36 - Ind, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	65
Obrázek 37 - MS, rychlost ohřívání 1 K.min <sup>-1</sup> .....	66
Obrázek 38 - MS, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	66
Obrázek 39 - Lec, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	67
Obrázek 40 - IPM, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	67
Obrázek 41 - Směs blank, rychlost ohřívání 1 K.min <sup>-1</sup> .....	68
Obrázek 42 - Směs blank, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	69
Obrázek 43 - Směs s Ind, rychlost ohřívání 1 K.min <sup>-1</sup> .....	70
Obrázek 44 - Směs s Ind, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	70
Obrázek 45 - NLC blank, rychlost ohřívání 1 K.min <sup>-1</sup> , Velikost = 169,57 nm, PDI = 0,189 .....	71
Obrázek 46 - NLC blank, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> , velikost částic = 136,57 nm, PDI = 0,224.....	72
Obrázek 47 - NLC s Ind, rychlost ohřívání 1 K.min <sup>-1</sup> . Velikost částic 156,73 nm, PDI = 0,183 .....	72
Obrázek 48 - NLC s Ind, rychlost ohřívání 10 K.min <sup>-1</sup> , velikost částic = 147,4 nm, PDI = 0,202 .....	73
Obrázek 49 - NLC blank, rychlost zahřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	73
Obrázek 50 - NLC + Ind, rychlost zahřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	74
Obrázek 51 - NLC + Ind, rychlost zahřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	74
Obrázek 52 - SLN bez IP, blank, rychlost zahřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	75
Obrázek 53 - SLN bez IP, s Ind, rychlost zahřívání 10 K.min <sup>-1</sup> .....	75
Obrázek 54 - Kalibrační křivka pro první analýzu .....	76
Obrázek 55 - NLC blank.....	77

Obrázek 56 - NLC, navážka Ind 0,414 mg .....	78
Obrázek 57 - NLC navážka Ind 1,035 mg .....	78
Obrázek 58 - Porovnání dvou vzorků. Modrá: Kolliphor P188 1,25 mg.ml <sup>-1</sup> Červená: spike = Ind 2,75 μg.ml <sup>-1</sup> + 1,25 mg.ml <sup>-1</sup> Kolliphor P188, Retenční čas Ind = 6,553, Plocha = 225,56377 .....	79
Obrázek 59 - Kalibrační křivka 2 pro druhou analýzu .....	80
Obrázek 60 - NLC navážka Ind = 0,414 mg .....	81
Obrázek 61 - NLC blank .....	82
Obrázek 62 – spike (0,25 ml NLC blank + 0,25 ml MF s 2,5 μg.ml <sup>-1</sup> Ind) .....	82
Obrázek 63 - IPM .....	83
Obrázek 64 - lec .....	83
Obrázek 65 - MS .....	83

## 9 Použitá literatura:

1 DAS, Surajit, Wai Kiong NG a Reginald B.H. TAN. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012, **47**(1), 139-151. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.05.010. ISSN 09280987.

2 KUMAR, Sacheen a Jaspreet Kaur RANDHAWA. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 2013, **33**(4), 1842-1852. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.037. ISSN 09284931.

3 CHOI, Kyeong-Ok, Jaehyeog CHOE, Seokjin SUH a Sanghoon KO. Positively Charged Nanostructured Lipid Carriers and Their Effect on the Dissolution of Poorly Soluble Drugs. *Molecules*. 2016, **21**(5). DOI: 10.3390/molecules21050672. ISSN 1420-3049.

4 HADINOTO, Kunn, Ajitha SUNDARESAN a Wean Sin CHEOW. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, **85**(3), 427-443. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.07.002. ISSN 09396411.

5 KHOSA, Archana, Satish REDDI a SAHA. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. 2018, **103**, 598-613. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.055. ISSN 07533322.

6 ESCOBAR-CHAVEZ, Jose, Roberto DIAZ-TORRES, Isabel Marlen RODRIGUEZ-CRUZ, DOMÍNGUEZ-DELGADO, SAMPERE-MORALES, ANGELES-ANGUIANO a MELGOZA-CONTRERAS. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*. DOI: 10.2147/RRTD.S32621. ISSN 2253-1580.

7 ÜNER, Melike a Gülgün YENER. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. 2007, **2007**(2). ISSN 1178-2013.

8 NASERI, Neda, Hadi VALIZADEH a Parvin ZAKERI-MILANI. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2015, **5**(3), 305-313. DOI: 10.15171/apb.2015.043. ISSN 2228-5881.

9 MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001, **47**(2-3), 165-196. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00105-3. ISSN 0169409X.

- 10 MÜLLER, R. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **50**(1), 161-177. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00087-4. ISSN 09396411.
- 11 KOVACEVIC, A., S. SAVIC, G. VULETA, R.H. MÜLLER a C.M. KECK. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **406**(1-2), 163-172. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.036. ISSN 03785173.
- 12 YANG, Yihui, Alessandro CORONA, Beth SCHUBERT, Robert REEDER a Michael A. HENSON. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014, **418**, 261-272. DOI: 10.1016/j.jcis.2013.12.024. ISSN 00219797.
- 13 BELOQUI, Ana, María Ángeles SOLINÍS, Alicia RODRÍGUEZ-GASCÓN, António J. ALMEIDA a Véronique PRÉAT. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016, **12**(1), 143-161. DOI: 10.1016/j.nano.2015.09.004. ISSN 15499634.
- 14 JAISWAL, Piyush, Bina GIDWANI a Amber VYAS. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2014, **44**(1), 27-40. DOI: 10.3109/21691401.2014.909822. ISSN 2169-1401.
- 15 Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example. *Drug Delivery*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 3-53. *Handbook of Experimental Pharmacology*. DOI: 10.1007/978-3-642-00477-3\_1. ISBN 978-3-642-00476-6.
- 16 ELIANA, B., H. SOUTO, H. RAINER a MULLER. Lipid nanoparticles (Solid Lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers) for cosmetic, dermal and transdermal applications, Deepak Thassu, Michel Deleers, Yashwant Vishnupant Pathak. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. CRC Press, 2007, s. 213-234. ISBN 1420008447.
- 17 PARDEIKE, Jana, Aiman HOMMOSS, Rainer H. MÜLLER, et al. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, **366**(1-2), 170-184. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.10.003. ISSN 03785173.

- 18 DESAI, Pinaki, Ram R. PATLOLLA, Mandip SINGH, Caterina Di GIOVANNI, Stefano GIOVAGNOLI a Carlo ROSSI. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery: In Vitro and In Vivo Studies. *Molecular Membrane Biology*. 2010, **27**(7), 247-259. DOI: 10.3109/09687688.2010.522203. ISSN 0968-7688.
- 19 THASSU, Deepak, Michel DELEERS a Yashwant PATHAK. Nanoparticulate drug delivery systems. New York: Informa Healthcare, c2007, 213-231. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, v. 166. ISBN 978-084-9390-739
- 20 MARCATO, P. D., J. CAVERZAN, B. ROSSI-BERGMANN, et al. Nanostructured Polymer and Lipid Carriers for Sunscreen. Biological Effects and Skin Permeation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2011, **11**(3), 1880-1886. DOI: 10.1166/jnn.2011.3135. ISSN 15334880.
- 21 WANG, Wenxi, Lina CHEN, Xinyan HUANG a Anna SHAO. Preparation and Characterization of Minoxidil Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *AAPS PharmSciTech*. 2017, **18**(2), 509-516. DOI: 10.1208/s12249-016-0519-x. ISSN 1530-9932.
- 22 ALJUFFALI, Ibrahim A., Calvin T. SUNG, Feng-Ming SHEN, Chi-Ting HUANG a Jia-You FANG. Squarticles as a Lipid Nanocarrier for Delivering Diphencyprone and Minoxidil to Hair Follicles and Human Dermal Papilla Cells. *The AAPS Journal*. 2014, **16**(1), 140-150. DOI: 10.1208/s12248-013-9550-y. ISSN 1550-7416.
- 23 DOKTOROVOVÁ, Slavomira, Andjelka B. KOVAČEVIĆ, Maria L. GARCIA a Eliana B. SOUTO. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2016, **108**, 235-252. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.08.001. ISSN 09396411.
- 24 SHAMMA, Rehab a Mona ABURAHMA. Follicular delivery of spironolactone via nanostructured lipid carriers for management of alopecia. *International Journal of Nanomedicine*. DOI: 10.2147/IJN.S73010. ISSN 1178-2013.
- 25 JOSHI, Medha a Vandana PATRAVALE. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, **346**(1-2), 124-132 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.05.060. ISSN 03785173.
- 26 RICCI, Maurizio, Carmelo PUGLIA, Francesco BONINA, Caterina Di GIOVANNI, Stefano GIOVAGNOLI a ROSSI. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, **94**(5). DOI: 10.1002/jps.20335. ISSN 00223549.

- 27 PUGLIA, Carmelo, Paolo BLASI, Luisa RIZZA, Aurélie SCHOUBBEN, Francesco BONINA, Carlo ROSSI a Maurizio RICCI. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, **357**(1-2), 295-304. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.01.045. ISSN 03785173.
- 28 ASHOKKUMAR, Muthupandian a Sivakumar MANICKAM. *Cavitation: A Novel Energy-Efficient Technique for the Generation of Nanomaterials*. 1. CRC Press, 2014. ISBN 978-981-4411-55-4.
- 29 BHASKAR, Kesavan, Chinnala KRISHNA MOHAN, Meka LINGAM, Veerareddy PRABHAKAR REDDY, Vobalaboina VENKATESWARLU a Yamsani MADHUSUDAN RAO. Development of Nitrendipine Controlled Release Formulations Based on SLN and NLC for Topical Delivery: In Vitro and Ex Vivo Characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, **34**(7), 719-725. DOI: 10.1080/03639040701842485. ISSN 0363-9045.
- 30 VITORINO, Carla, António ALMEIDA, João SOUSA, et al. Passive and active strategies for transdermal delivery using co-encapsulating nanostructured lipid carriers: In vitro vs. in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014, **86**(2), 133-144. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.12.004. ISSN 09396411.
- 31 Meyyanathan SN, Reddy G, Sood S *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research: Solid lipid Nanoparticles for Oral delivery of Poorly Soluble Drugs*. 2012, **4**(7), 1848-1855. ISSN 0975-1459
- 32 MUCHOW, M., P. MAINCENT, R.H. MÜLLER a C.M. KECK. Production and characterization of testosterone undecanoate-loaded NLC for oral bioavailability enhancement. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2010, **37**(1), 8-14. DOI: 10.3109/03639045.2010.489559. ISSN 0363-9045.
- 33 MUNTONI, Elisabetta, Elisabetta MARINI, Nahid AHMADI, et al. Lipid nanoparticles as vehicles for oral delivery of insulin and insulin analogs: preliminary ex vivo and in vivo studies. *Acta Diabetologica*. 2019, **56**(12), 1283-1292. DOI: 10.1007/s00592-019-01403-9. ISSN 0940-5429.
- 34 BOCCA, Claudia, Otto CAPUTO, Roberta CAVALLI, Ludovica GABRIEL, Antonella MIGLIETTA a Maria Rosa GASCO. Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998, **175**(2), 185-193. DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00282-8. ISSN 03785173
- 35 GREF, R, M LÜCK, P QUELLEC, M MARCHAND, E DELLACHERIE, S HARNISCH, T BLUNK a R.H MÜLLER. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface

modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2000, **18**(3-4), 301-313. DOI: 10.1016/S0927-7765(99)00156-3. ISSN 09277765.

36 WISSING, S.A, O KAYSER a R.H MÜLLER. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004, **56**(9), 1257-1272. DOI: 10.1016/j.addr.2003.12.002. ISSN 0169409X.

37 GAO, Yan, Yanbin SHI, Li WANG, Shengli KONG, Jian DU a Guimei LIN. Advances in mathematical models of the active targeting of tumor cells by functional nanoparticles. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2020, 184. DOI: 10.1016/j.cmpb.2019.105106. ISSN 01692607.

38 Tammam, Salma N Azzazy, Hassan M E Lamprecht, Alf. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **2014**, (10), 1-23. DOI: 10.1166/jbn.2014.2017. ISSN 1550-7033/2014/10/001/023.

39 JOSHI, Medha D. a Rainer H. MÜLLER. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, **71**(2), 161-172. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.09.003. ISSN 09396411.

40 KAUR, Indu Pal, Rohit BHANDARI, Swati BHANDARI a Vandita KAKKAR. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled Release*. 2008, **127**(2), 97-109. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.12.018. ISSN 01683659.

41 YOO, Jihye, Changhee PARK, Gawon YI, Donghyun LEE a Heebeom KOO. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers*. 2019, **11**(5). DOI: 10.3390/cancers11050640. ISSN 2072-6694.

42 QUINTANAR-GUERRERO, David, Eric ALLÉMANN, Hatem FESSI a Eric DOELKER. Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2008, **24**(12), 1113-1128. DOI: 10.3109/03639049809108571. ISSN 0363-9045

43 BILATI, Ugo, Eric ALLÉMANN a Eric DOELKER. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005, **24**(1), 67-75. DOI: 10.1016/j.ejps.2004.09.011. ISSN 09280987.

44 RIESZ, P. *Free Radical Biology and Medicine*. 1992, 13. DOI: 10.1016/0891-5849(92)90021-8. ISSN 08915849.



- 45 BILATI, Ugo, Eric ALLÉMANN a Eric DOELKER. Sonication Parameters for the Preparation of Biodegradable Nanocapsules of Controlled Size by the Double Emulsion Method. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2003, **8**(1), 1-9. DOI: 10.1081/PDT-120017517. ISSN 1083-7450.
- 46 MURAKAMI, Hideki, Masao KOBAYASHI, Hirofumi TAKEUCHI a Yoshiaki KAWASHIMA. Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, **187**(2), 143-152. DOI: 10.1016/S0378-5173(99)00187-8. ISSN 03785173.
- 47 SUN, Ming, Shufang NIE, Xuan PAN, Ruiwen ZHANG, Zhaoyang FAN a Shu WANG. Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, **113**, 15-24. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.08.032. ISSN 09277765.
- 48 ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*. 2014, vol. 108, iss. 5, s. 479-482. ISSN 1213-7103.
- 49 PECORA, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. **2**(2), 123-131. DOI: 10.1023/A:1010067107182. ISSN 13880764.
- 50 ŠIMEK, Michal, Veronika GRÜN WALDOVÁ a Bohumil Kratochvíl. SOUČASNÉ METODY MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC FARMACEUTICKÝCH LÁTEK A JEJICH OMEZENÍ. *Chem. Liszy*. **2014**, (108), 50-55. ISSN 1213-7103.
- 51 MÜHLEN, A. zur, E. zur MÜHLEN, H. NIEHUS a W. MEHNERT. Atomic Force Microscopy Studies of Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. **13**(9), 1411-1416. DOI: 10.1023/A:1016042504830. ISSN 07248741.
- 52 NANOCOMPOSIX'S GUIDE TO DYNAMIC LIGHT SCATTERING MEASUREMENT AND ANALYSIS: Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis. SAN DIEGO: NANOCOMPOSIX, 2015.
- 53 Malvern Instruments Ltd. STABILITA SUZPENZÍ A DISPERZÍ – PROČ JSOU PARAMETRY JAKO VELIKOST ČÁSTIC, ZETA POTENCIÁL A REOLOGICKÉ VLASTNOSTI TAK DŮLEŽITÉ? *CHEMAGAZÍN* [online]. 2011, **XXI**(4), 14-16
- 54 HONARY, S a F ZAHIR. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013, **12**(2), 255-264. DOI: 10.4314/tjpr.v12i2.19. ISSN 1596-9827.

- 55 <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/pojmy.htm> [online] [cit. 2020-01-18].
- 56 CRAIG, Duncan Q. M. a Mike READING. Thermal analysis of pharmaceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press, c2007. ISBN 978-082-4758-141.
- 57 SCHICK, C. Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **395**(6), 1589-1611. DOI: 10.1007/s00216-009-3169-y. ISSN 1618-2642.
- 58 <https://www.ultrac.com/en/solutions/test-methods/thermal-analysis/differential-scanning-calorimetry-dsc.html> [online] [cit. 2020-01-18].
- 59 KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 04-716-8162-8.
- 60 ResearchGate [online]. [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/236146377\\_Chromatography\\_in\\_Bioactivity\\_Analysis\\_of\\_Compounds/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/236146377_Chromatography_in_Bioactivity_Analysis_of_Compounds/figures?lo=1)
- 61 ŠKOLOVÁ, Barbora, Barbora JANUŠOVÁ a Kateřina VÁVROVÁ. Ceramides with a pentadecasphingosine chain and short acyls have strong permeabilization effects on skin and model lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016, **1858**(2), 220-232. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.11.019. ISSN 00052736
- 62 REINTJES, Thomas. Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers Solubilizer Compendium. BASF SE, 2011.
- 63 Critical micelle concentration. NIČ, Miloslav, Jiří JIRÁT, Bedřich KOŠATA, Aubrey JENKINS a Alan MCNAUGHT, ed. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009. DOI: 10.1351/goldbook.C01395. ISBN 0-9678550-9-8.
- 64 DOMINGUEZ, Ana, Aurora FERNANDEZ, Noemi GONZALEZ, Emilia IGLESIAS a Luis MONTENEGRO. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*. Spain, 1997, **74**(10). DOI: 10.1021/ed074p1227. ISSN 0021-9584.
- 65 MARTÍNEZ-LANDEIRA, Pablo, Juan M. RUSO, Gerardo PRIETO a Félix SARMIENTO. Surface Tensions, Critical Micelle Concentrations, and Standard Free Energies of Micellization of C<sub>8</sub>-Lecithin at Different pHs and Electrolyte Concentrations. 2002, **47**(4), 1017-1021. DOI: 10.1021/je020033p. ISSN 0021-9568.
- 66 GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB. Vivaspin: Sample concentration [online]. Sweden, 2008 [cit. 2019-12-09]. Dostupné z: <https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/28935653.pdf>

- 67 PUBCHEM Indomethacin [online]. 2019 [cit. 2019-12-09]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indomethacin>
- 68 BUNJES, H a T UNRUH. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, **59**(6), 379-402. DOI: 10.1016/j.addr.2007.04.013. ISSN 0169409X.
- 69 CASTELLI, Francesco, Carmelo PUGLIA, Maria Grazia SARPIETRO, Luisa RIZZA a Francesco BONINA. Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, **304**(1-2), 231-238. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.08.011. ISSN 03785173.
- 70 Pandita D, Ahuja A, Velpandian T, et al. Characterization and in vitro assessment of paclitaxel loaded lipid nanoparticles formulated using modified solvent injection technique. *Die Pharmazie*. 2009 May; **64**(5):301-310.
- 71 KELIDARI, H. R., M. SAEEDI, J. AKBARI, K. MORTEZA-SEMNANI, H. VALIZADEH, Mohammed MANIRUZZAMAN, Ali FARMOUDEH a Ali NOKHODCHI. Development and Optimisation of Spironolactone Nanoparticles for Enhanced Dissolution Rates and Stability. *AAPS PharmSciTech*. 2017, **18**(5), 1469-1474. DOI: 10.1208/s12249-016-0621-0. ISSN 1530-9932.
- 72 Diagnosing & Troubleshooting HPLC Pressure Fluctuation Problems (Unstable Baseline) [online]. [cit. 2020-05-10].
- 73 SALMINEN, Hanna, Thrandur HELGASON, Susanne AULBACH, Bjarki KRISTINSSON, Kristberg KRISTBERGSSON a Jochen WEISS. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2014, **426**, 256-263. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.04.009. ISSN 00219797.