

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta

Katedra farmaceutické technologie

Polyesteramidové nanočástice

(diplomová práce)

Autor: Marie Seidlová

Datum: 11.05.2009

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Odevzdáno: 15.05.2009

Obhajoba: 03.06.2009

Počet stran: 80

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za rady, připomínky a náměty k práci a paní Romaně Nobilisové za vytvoření nadstandartních pracovních podmínek při realizaci této diplomové práce.

Souhrn

Téma práce je zaměřeno na přípravu nanočástic emulzní rozdělovací a odpařovací metodou. Cílem bylo získat co nejmenší nanočástice s co největším povrchovým nábojem měřitelným jako zeta potenciál. V teoretické části je pojednáno o biodegradabilních nosičích, vlastnostech nanočástic a jejich charakteristikách, metodách jejich přípravy, metodách hodnocení postupů přípravy a perspektivách využití nanočástic v terapii. Těžiště práce je v experimentu. Nanočástice byly připraveny z polyesterů a polyesteramidů rozpuštěných v různých biokompatibilních rozpouštědlech. Byly vyzkoušeny různé koncentrace těchto nosičů, které byly dispergovány ve vodné vnější fázi obsahující různé emulgátory a elektrolyt při různém režimu míchání. Bylo prokázáno, že velikost nanočástic je možno regulovat jednak způsobem míchání, jednak složením vnitřní a vnější fáze emulzní soustavy. Při uchovávání nanočástic ve vodném disperzním prostředí byly nanočástice dostatečně agregátně stabilní po dobu několika dní.

Abstract

The aim of the work is focused on preparation method of nanoparticles by emulsion distribution and evaporation method. The objective was to obtain the smallest nanoparticles with the sufficiently high surface charge represented by zeta potential. Theoretical part of the presented thesis concerns biodegradable carriers, properties of nanoparticulate systems and their characteristics, preparation methods, methods of evaluation of preparation procedures, and prospective views of usage of nanoparticles in therapy. The substantial part of the thesis concerns experimental methods, results of experiments and its discussion. Nanoparticles were prepared from polyesters and polyesteramides dissolved in various biocompatible solvents. Appropriate concentrations of these carriers were founded. Solutions of carriers were

Polyesteramidové nanočástice

dispersed in external aqueous phase containing various emulsifiers and model electrolyte by the use of various regimens of stirring. It was approved that the size of nanoparticles is possible to control by the agitating method and by the formulation of the inner and outer phase of emulsion system. During nanoparticles storage for few days in the aqueous dispersion medium nanoparticles were sufficiently stable.

Obsah

	Obsah.....	5
	Seznam tabulek.....	8
	Seznam obrázků.....	10
1	Úvod.....	15
2	Polymerní nosiče využitě k přípravě nanočástic.....	16
2.1	Biodegradabilní polymery.....	16
	2.1.1 Přírodní biodegradabilní polymery.....	17
	2.1.2 Syntetické biodegradabilní polymery.....	17
2.2	Neodbouratelné polymery.....	17
3	Charakteristika nanočástic.....	18
3.1	Fyzikální vlastnosti.....	18
	3.1.1 Molekulová hmotnost.....	18
	3.1.2 Stupeň krystalinity.....	18
	3.1.3 Hydrofobicita.....	18
	3.1.4 Poměr ko-polymerů.....	19
	3.1.5 Biodegradabilita a biokompatibilita.....	19
	3.1.6 Rozpustnost.....	20
	3.1.7 Interakce léčivo –	
	polymer.....	20
3.2	Vlastnosti nanočástic, které ovlivňují biologický účinek.....	20
	3.2.1 Cesta podání.....	20
	3.2.2 Velikost částic a distribuce velikosti.....	21
	3.2.3 Zeta potenciál.....	21
	3.2.4 Obměny povrchu.....	21
	3.2.5 Biokompatibilita.....	21
4	Příprava nanočástic.....	22
4.1	Příprava „bottom-up“.....	22
	4.1.1 Chemická syntéza.....	22
	4.1.2 Samokompletování.....	22
	4.1.3 Poziční kompletování.....	23
4.2	Příprava „top-down“.....	23
5	Měření a popis nanočástic.....	24

5.1	Transmisní elektronová mikroskopie.....	24
5.2	Skenovací elektronová mikroskopie.....	24
5.3	Skenovací sondáž.....	25
5.4	Optické kleštičky.....	25
6	Využití nanočástic v terapii.....	26
6.1	Nanočástice jako nosiče léčiv.....	26
6.2	NPDDS tvořené z polymerů.....	27
6.2.1	NPDDS tvořené z hydrogelu.....	27
6.2.2	NPDDS založené na dendrimerech.....	27
6.2.3	CaCO ₃ nanočástice.....	28
6.2.4	Protaminem tvořené nanočásticové přenašeče.....	29
6.2.5	Chitosanové NPDDS.....	29
6.2.6	Albuminové a želatinové nanosféry.....	30
6.2.7	Polyesterové nanočástice.....	30
7	Cíl práce.....	31
8	Principy měření zkoumaných charakteristik nanočástic.....	32
8.1	Měření velikosti nanočástic.....	32
8.2	Měření zeta potenciálu nanočástic.....	32
9	Experimentální část.....	33
9.1	Použité přístroje.....	33
9.2	Chemikálie.....	33
9.3	Nosiče a jejich charakterizace.....	34
9.4	Použitá metoda přípravy nanočástic.....	35
9.4.1	Příprava vnější fáze.....	35
9.4.2	Příprava vnitřní fáze.....	36
9.4.3	Příprava nanočástic.....	36
9.4.4	Měření velikosti a zeta potenciálu částic.....	36
9.4.5	Výsledky.....	37
10	Diskuse.....	67
10.1	K tématu.....	67
10.2	Velikost nanočástic.....	68

10.2.1 Nanočástice připravené z nosiče 3P.....	68
10.2.2 Nanočástice připravené z nosiče PEA 1.....	69
10.2.3 Nanočástice připravené z nosiče PEA 4.....	69
10.2.4 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 1, 2, 3, 4....	70
10.2.5 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 1 a PEA 4 v poměru 3:1.....	71
10.2.6 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 1 a PEA 4 v poměru 1:1.....	71
10.2.7 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 2 a PEA 3 v poměru 1:1.....	72
10.2.8 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 2, 3 a D5...	75
10.3 Zeta potenciál.....	75
11 Závěry.....	7
8	
12 Literatura.....	79

Seznam tabulek

Tabulka 9-1	Lineární polyesteramidy – použité reaktanty.....	34
Tabulka 9-2	Větvené oligoestery – složení reakční směsi.....	34
Tabulka 9-3	Molekulární a termické charakteristiky nosičů.....	34
Tabulka 9-4	Vnější fáze (1% vodný roztok lecitinu a polysorbátu 20).....	35
Tabulka 9-5	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu.....	37
Tabulka 9-6	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylacetátu.....	39
Tabulka 9-7	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylformiátu.....	39
Tabulka 9-8	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% polyesteramid PEA 1 v chloroformu.....	41
Tabulka 9-9	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% polyesteramid PEA 4 v dichlormethanu.....	41
Tabulka 9-10	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) v chloroformu.....	42
Tabulka 9-11	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50)...	43
Tabulka 9-12	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.....	44
Tabulka 9-13	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.....	47
Tabulka 9-14	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu a dichlormethanu.....	47
Tabulka 9-15	Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic,	

vnitřní fáze: 1% (vzorek č.12) a 3% (vzorek č.13) směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) v chloroformu.....	47
Tabulka 9-16 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% (vzorek č.14) a 3% (vzorek č.15) směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	48
Tabulka 9-17 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% (vzorek č.28) a 3% (vzorek č.30) směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) v chloroformu.....	51
Tabulka 9-18 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	51
Tabulka 9-19 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	52
Tabulka 9-20 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	58
Tabulka 9-21 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	60
Tabulka 9-22 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2, PEA 3 a D5 (25:25:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	66
Tabulka 9-23 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2, PEA 3 a D5 (1:1:4) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	66
Tabulka 9-24 Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 4,5% směs polyesteramidů PEA 2, PEA 3 a D5 (1:1:4) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	66

Seznam obrázků

Obrázek 1-1	Výskyt nanočástic v životním prostředí.....	15
Obrázek 5-1	SEM povrchu poly-(laktid-ko-glykolid) nanočástice.....	25
Obrázek 6-1	Struktura dendrimera.....	28
Obrázek 6-2	Kontaktní čočky pokrytá nanočásticemi.....	29
Obrázek 6-3	Rozdíl mezi nanokapsulkou a nanosférou.....	30
Obrázek 9-1A	Vzorek 1 - intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu.....	37
Obrázek 9-1B	Vzorek 1 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu.....	38
Obrázek 9-2A	Vzorek 3 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu.....	38
Obrázek 9-2B	Vzorek 3 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu.....	39
Obrázek 9-3A	Vzorek 7 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylformiátu.....	40
Obrázek 9-3B	Vzorek 7 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylformiátu.....	40
Obrázek 9-3C	Vzorek 7 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylformiátu.....	41
Obrázek 9-4A	Vzorek 19 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) v chloroformu.....	42
Obrázek 9-4B	Vzorek 19 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) v chloroformu.....	43
Obrázek 9-5	Vzorek 20 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) v chloroformu.....	44
Obrázek 9-6A	Vzorek 23 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční	

	křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.....	45
Obrázek 9-6B	Vzorek 23 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.....	45
Obrázek 9-7A	Vzorek 25 - intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.....	46
Obrázek 9-7B	Vzorek 25 - objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.....	46
Obrázek 9-8A	Vzorek 14 - intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	48
Obrázek 9-8B	Vzorek 14 - objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	49
Obrázek 9-9A	Vzorek 15 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	49
Obrázek 9-9B	Vzorek 15 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	50
Obrázek 9-9C	Vzorek 15 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	50
Obrázek 9-10	Vzorek 32 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze:	

	3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	52
Obrázek 9-11A	Vzorek 34 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	53
Obrázek 9-11B	Vzorek 34 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	53
Obrázek 9-11C	Vzorek 34 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	54
Obrázek 9-12A	Vzorek 37 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	54
Obrázek 9-12B	Vzorek 37 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	55
Obrázek 9-13A	Vzorek 38 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	55
Obrázek 9-13B	Vzorek 38 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	56
Obrázek 9-13C	Vzorek 38 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	56

Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-14A	Vzorek 39 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	57
Obrázek 9-14B	Vzorek 39 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	57
Obrázek 9-14C	Vzorek 39 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	58
Obrázek 9-15A	Vzorek 41 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	59
Obrázek 9-15B	Vzorek 41 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	59
Obrázek 9-15C	Vzorek 41 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	60
Obrázek 9-16	Vzorek 42 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	61
Obrázek 9-17A	Vzorek 43 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	61
Obrázek 9-17B	Vzorek 43 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu	

Polyesteramidové nanočástice

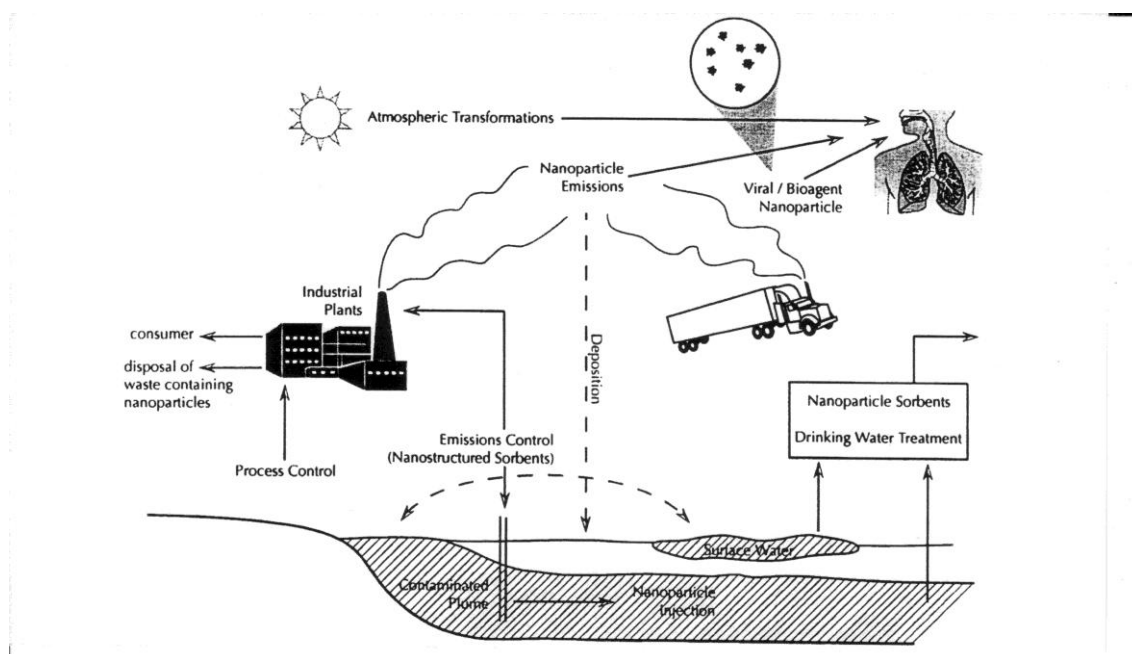
	a dichlormethanu (50:50).....	62
Obrázek 9-17C	Vzorek 43 – zeta potenciál nanočástic, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	62
Obrázek 9-18A	Vzorek 44 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	63
Obrázek 9-18B	Vzorek 44 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	63
Obrázek 9-19A	Vzorek 45 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	64
Obrázek 9-19B	Vzorek 45 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	64
Obrázek 9-20A	Vzorek 46 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	65
Obrázek 9-20B	Vzorek 46 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka, vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50).....	65

1 Úvod

Nanotechnologie a nanověda jsou veřejností viděny jako směry mající velký potenciál v přínosu mnoha oblastem výzkumu a upotřebení. V celém světě přitahují narůstající počet investic ze strany vlády i z privátních sektorů obchodu. Společně s tím však aplikace nanovědy vyvolává vlnu otázek v bezpečnosti, regulacích a etických oblastech, které vyžadují rozsáhlé debaty na všech úrovních.

Předpona „nano“ je odvozena z řeckého slova trpaslík. Jeden nanometr je roven jedné miliardtině metru, to je 10^{-9} m. Rozsah velikosti, která tolik uchvacuje pozornost, je obvykle od 100 nm k atomové úrovni kolem 0,2 nm, protože v tomto rozmezí mají látky rozdílné vlastnosti v porovnání se stejnými látkami ve větší velikosti. Nanotechnologie jsou používány k vytvoření malých rysů na počítačových čípech již 25 let. Běžný svět také obsahuje spoustu příkladů struktur nanovelikosti, od mléka (koloid nanočástic) k sofistikovaným proteinům nanovelikostí, které kontrolují řadu biologických činností jako stažlivost svalů, uvolňování energie a oprava buněk. Nanočástice se vyskytují přirozeně, existují po tisíce let jako produkty spalování a úpravy jídla.

Obrázek 1-1: Výskyt nanočástic v životním prostředí (1)



Nanomateriály se významně liší od ostatních materiálů vzhledem ke dvěma největším hlavním faktorům: zvětšující se záběr oblasti a kvantum účinků. Tyto faktory mohou povznést vlastnosti jako reaktivita, síla, elektrické charakteristiky a in vivo chování. Jak klesá velikost částic, nacházíme větší poměr atomů na povrchu částice v porovnání s nitrem. Například částice, která má 30 nm má 5% svých atomů na povrchu, v 10 nm 20% a při velikosti 3nm je to už 50% částic (2). Tudíž nanočástice má mnohem větší plochu povrchu na jednotku hmoty než větší částice, což vede k větší reaktivitě. Za těmito efekty způsobenými velikostí plochy povrchu následuje množství efektů, které mohou dominovat ve vlastnostech hmoty, když je velikost redukována do nanoškály. To může změnit optické, elektrické a magnetické chování látek. Jejich chování in vivo může vést od zvýšené absorpce až k vysoké toxicitě nanomateriálů.

2 Polymerní nosiče využité k přípravě nanočástic

Ideálně mohou být biologicky aktivní látky enkapsulovány do polymerních nanočástic s velmi dobře popsányými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Tyto polymery chrání aktivní složku a při lokálním nebo systémovém podání,

podmiňují targeting a kontrolují přesné množství uvolněného léčiva. Využití polymerních nanočástic pro doručování léčiv je strategií k optimalizaci terapeutických efektů při současné minimalizaci vedlejších účinků (3-5).

Polymery používané v kontrolovaném doručování (targeting) léčiva, zahrnující nanočástice, můžeme rozlišit na biodegradabilní, které jsou pro využití ve farmakoterapii daleko výhodnější, a na biologicky neodbouratelné.

2.1 Biodegradabilní polymery

Biologicky odbouratelné polymery jsou klasifikovány jako přírodní nebo syntetické.

2.1.1 Přírodní biodegradabilní polymery

Příklady v přírodě se vyskytujícími biodegradabilními a biokompatibilními polymerů využitých k přípravě nanočástic zahrnují celulózu, želatinu, chitosan, algináty a další. Vlastnosti a chování, zvláště in vivo, nanočástic připravených použitím přírodních polymerů mohou být méně předvídatelné stejně tak jako se mohou tyto polymery široce lišit v chemické stavbě a také ve fyzikálních vlastnostech. Navíc jsou přírodní polymery často lehce imunogenní.

2.1.2 Syntetické biodegradabilní polymery

Naproti výskytu přírodních polymerů je možné syntetizovat polymery s přesnou chemickou strukturou ústící ve vysokou možnost předvídat fyzikální vlastnosti jako je rozpustnost, propustnost a míra biodegradace. Tím jsou syntetické polymery daleko přesněji určeny pro specifickou cestu podání vlastnostmi, jako je kontrolovatelná míra disoluce, propustnosti, degradace a eroze, stejně tak jako zacílení na místo účinku. Příklady syntetických biodegradabilních polymerů používaných k přípravě nanočástic jsou polylaktidy (PLA), poly(laktid-ko-

glykolidy) (PLGA), polyanhydridy a poly- ϵ -kaprolakony. Biologická degradabilita a kompatibilita jsou důležitými prvky polymerních materiálů, které jsou určeny k aplikaci injekcí nebo k implantování do těla.

2.2 Biologicky neodbouratelné polymery

Nebiodegradabilní polymerní nanočástice mohou být také určena ke kontrolované distribuci a v příbuzné oblasti též k diagnostice. Příklady nebiodegradabilních syntetických polymerů používaných jako nosiče jsou polymethylmetakryláty, zatímco polystyrénové nanočástice se používají jako diagnostické látky.

3 Charakteristika nanočástic

3.1 Fyzikální vlastnosti polymerů

3.1.1 Molekulová hmotnost

Molekulová hmotnost ovlivňuje takové vlastnosti polymerů jako je teplota skelného přechodu, viskozita v roztocích, rozpustnost, krystalinita, míra degradace a mechanická pevnost. Obecně polymery s nízkou molekulovou hmotností vykazují nižší viskozitu a pevnost v tahu a rozpadají se rychleji. Je proto důležité vybrat vždy takový polymer, aby jeho vlastnosti, opírající se o jeho molekulovou hmotnost, umožňovaly podání zamýšlenou cestou.

3.1.2 Stupeň krystalinity

Mechanické vlastnosti polymerů mohou být měněny v závislosti na stupni krystalinity. Polymery s uniformním uspořádáním řetězců bez síťování struktury se budou rozpadat rychleji než amorfni formy. Nicméně čistě krystalické polymery jsou křehké a proto méně vhodné pro doručování léčiv na místo určení. Amorfni polymery mají velmi malou mechanickou pevnost. Proto se pro přípravu nanočástic, které jsou určeny pro doručování léčiv, používají směsi krystalických a amorfni forem.

3.1.3 Hydrofobicita

Faktory, které ovlivňují hydrofobicitu polymerů zahrnují molekulovou hmotnost, rozpustnost monomerů ve vodě a stupeň větvení. Ačkoli vzrůstající molekulová hmotnost zvyšuje hydrofobicitu, zvýšení míry větvení ústí ve vodě více

rozpuštěné polymery. Nanočástice připravené použitím hydrofobních polymerů vykazují snižující se penetraci vody a zvlhčování, což vede k relativně pomalejšímu uvolňování neseného léčiva. Je také zpomalena degradace polymeru než u jednoduchých hydrofilních polymerů. Nicméně inkorporací hydrofilních polymerů nebo aditiv do nanočástic připravených z hydrofobních polymerů budou ve vodném prostředí tvořeny na nanočásticích póry a zvýší se tak degradace, eroze a stejně tak uvolňování nesené látky. Je důležité si toto uvědomit, že metoda přípravy nanočástice bude ovlivněna relativní hydrofobicitou i hydrofilitou jak polymeru, tak léčiva.

3.1.4 Poměr ko-monomerů

Výběr polymeru a metoda polymerizace přímo dopadá na typ ko-polymeru stejně tak jako molekulová hmotnost, krystalinita a hydrofobita. Obecně lze říci, že ko-polymery použité k přípravě nanočástic typicky obsahují jak hydrofobní, tak hydrofilní úseky, které umožňují větší flexibilitu při přípravě a větší předvídatelnost fyzikálních vlastností.

3.1.5 Biodegradabilita a biokompatibilita

Biologicky odbouratelný polymer se musí degradovat na fyziologicky inertní produkty, které jsou následně eliminovány tělem. PLGA polymery hydrolyzují na mléčnou a glykolovou kyselinu, které jsou dále štěpeny na běžné složky těla. Biokompatibilní polymery jsou definovány jako ty, které nevyvolávají imunitní nebo zánětlivou reakci, jsou stabilní v průběhu trvání účinku a kompletně metabolizovány tělem. Většina biodegradabilních polymerů používaných v doručování léčiv jsou vysoce specificky využity pro parenterální podání.

3.1.6 Rozpustnost

Rozpouštěcí spektrum polymerů ovlivňuje metodu přípravy a in vivo chování nanočástic. Obecně je jak polymer, tak látka potřebná k doručení, rozpustné v organických rozpouštědlech, může tak být pro přípravu použita jednoduchá o/v emulzní metoda nebo fázová separace.

3.1.7 Interakce léčivo – polymer

Jedná se o chemické a fyzikální interakce, které se vyskytují v závislosti na chemických vlastnostech obou činitelů. Většinou jde o interakce nábojů, rozpustnosti a hydrofobicity a mohou pozměňovat vlastnosti polymeru, jako je teplota skelného přechodu a stupeň krystalinity, stejně tak jako vlastnosti nanočástic, zde nejčastěji míru uvolňování.

3.2 Vlastnosti nanočástic, které ovlivňují biologický účinek

3.2.1 Cesta podání

Nanočástice jsou podávány následujícími cestami: perorálně, intravenózně, subkutánně, intrathekálně, intraokulárně a inhalačně. Při výběru cesty podání nanočástic, je důležité zajistit stabilitu léčiva v biologických tekutinách, stejně tak jako anatomické a fyziologické charakteristiky cesty podání a místa účinku. Perorální podání nanočástic může signifikantně zvýšit biodostupnost slabě rozpustných léčiv. Nicméně po intravenózním podání biodostupnost může klesnout v důsledku rozpoznání neupravených nanočástic makrofágy. Tento problém může být vyřešen pokrytím povrchu nanočástic hydrofilním polyethylenglykolem, který propůjčuje „falešné“ vlastnosti těmto částicím. Důležité je poznamenat, že po inhalačním podání mohou nanočástice pronikat

do lymfatického systému společně s aerosoly.

3.2.2 Velikost částic a distribuce velikosti

Velikost částic a distribuce jejich velikosti jsou kritické faktory v chování nanočástic. Oba faktory mohou být popsány použitím techniky rozptylu světla a skenovací nebo transmisní elektronovou mikroskopií.

3.2.3 Zeta potenciál

Náboj povrchu nanosféry ovlivní její distribuci vtěle a přijetí nebo odmítnutí buňkou. Protože jsou buněčné membrány negativně nabitý, jsou daleko ochotnější přijmout pozitivně nabitou nanočástici v důsledku vysoké elektrostatické afinity. Na druhou stranu negativně nebo neutrálně nabité částice mohou být upraveny tak, že si propůjčí kladný náboj, aby byl účinek přece jen zajištěn.

3.2.4 Obměny povrchu

Povrch nanočástic může být měněn, aby snáze vázal cílové ligandy nebo pozměňoval biodistribuci. Potahování nanočástic hydrofilními polymery, jako je polyethyleneglykol, heparin nebo dextran, chrání částici před pohlcením makrofágy nebo Kupfferovými buňkami. Tím se zvyšuje jejich cirkulační čas a stupňuje se biodostupnost léčiva.

3.2.5 Biokompatibilita

Tkáně odpovídají na polymerní částice ve třech fázích. Ve fázi 1, lehký zánět,

se v okolí částice vyskytují monocyty, lymfocyty a leukocyty. Ve fázi 2 se monocyty diferencují v makrofágy a pohlcují částice. V některých případech se může tvořit fibrotická tkáň. Třetí fáze značí degradaci částic. Typ imunitní odpovědi vyvolané nanočásticemi bude záležet na cestě podání, typu enkapsulované terapeutické látky a výběru polymeru. Díky dynamickému toku se po intravenózním podání vyskytují minimální imunitní odezvy.

4 Příprava nanočástic

Při přípravě nanočástic existuje široká řada technik s různými stupněmi kvality, rychlosti a ceny. Tyto přístupy spadají do dvou kategorií: „bottom-up” a „top-down”.

4.1 Příprava „bottom-up“

Tento typ výroby zahrnuje budování nanostruktury atom za atomem a molekulu po molekule. To může být učiněno třemi způsoby: chemickou syntézou, samokompletováním a pozičním kompletováním.

4.1.1 Chemická syntéza

Chemická syntéza je metoda produkce molekul nebo částic, které mohou být použity buď přímo do produktů v jejich rozměrově nestejnorodé formě a nebo jako stavební kameny do strukturálně složitých materiálů.

4.1.2 Samokompletování

Samokompletování je produkční technika, ve které se atomy nebo molekuly

samy sdružují do uspořádaných částic v měřítku nanometrů pomocí fyzikálních nebo chemických interakcí. Příklady samokompletovacího procesu jsou formování krystalů solí nebo sněhových vloček s jejich složitou strukturou. Vyskytuje se tedy i v přírodě a v průmyslu je relativně novou a netradiční metodou (2).

4.1.3 Poziční kompletování

V pozičním kompletování je s atomy a molekulami, případně shluky, vědomě manipulováno a jsou stavěny jeden za druhým. Jsou zde používány techniky jako SPM pro práci na povrchu nebo optické pinzety ve volném prostoru. Poziční kompletování je extrémně pracnou a zřídka užívanou průmyslovou metodou.

4.2 Příprava „top-down“

Tato příprava začíná s větším kvantem materiálu a jeho leptáním, mletím nebo obráběním do nanostruktury odstraňováním látky. Top-down metody poskytují spolehlivost a komplexnost zařízení. Jsou náročnější na energii a vytvářejí více odpadu než bottom-up metody.

Ačkoli jsou nanotechnologie používány v průmyslu po mnoho dekád (polovodiče a chemický průmysl), zůstávají vlastně ještě v dětských letech. V posledních letech dospěly přístroje pro popis materiálů k lepšímu porozumění při studiu chování a vlastností hmoty ve velmi malém měřítku. Rostoucí znalosti zákonitostí mezi strukturou a vlastnostmi nanomateriálů umožnily výrobu materiálů a zařízení v lepším provedení a s vyšší funkcí. Ve stejný čas se objevily nejistoty, které jsou potřeba vyřešit pro řízení, které nanotechnologie vyžaduje, a pro zjištění rizik pro člověka a prostředí, která jsou předurčena z jistých aspektů této technologie (6).

5 Měření a popis nanočástic

Nanometrologie je věda o měření v nanoškále a její aplikaci podléhají všechny nanovědy a nanotechnologie. Schopnost měřit a popsat částice, určit jejich tvar, velikost a fyzikální vlastnosti v nanoměřítku je pro nanomateriály zásadní. Stejně tak se kladou velké požadavky na zařízení. Je potřeba, aby tyto přístroje vykazovaly vysokou přesnost a spolehlivost v používání nanotechnologií. Nanometrologie zahrnuje délku a/nebo velikost (kde rozměrem jsou nanometry) stejně tak jako měření síly, hmoty, elektrických a jiných vlastností. Čtyři obecně používané techniky jsou: transmisní elektronová mikroskopie (TEM), skenovací elektronová mikroskopie (SEM), skenovací sondáž (SPM) a optické kleštičky.

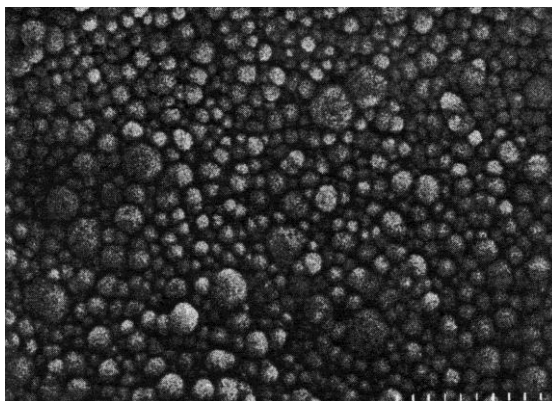
5.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

TEM je používána pro zjištění vnitřních struktur mikro a nanočástice. Podkladem je procházení elektronů vzorkem a poté použití magnetických čoček k zaostření vzhledu struktury. TEM může odhalit poslední detaily vnitřní struktury, v některých případech až samotné atomy. TEM s vysokorozkladnou transmisní elektronou mikroskopií jsou tím nejdůležitějším náčiním pro studii nanočástic.

5.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

SEM používá základní technologii vyvinutou pro TEM, ale paprsek elektronů je zaměřen na kruhový bod o velikosti přibližně 1 nm na povrchu vzorku a je opakovaně skenován na celé ploše povrchu.

Obrázek 5-1: SEM povrchu poly-(laktid-ko-glykolid) nanočástice (7)



5.3 Skenovací sondáž (SPM)

SPM k získání vzhledu využívá interakce mezi sondou a povrchem. Sonda je držena velmi blízko testovaného povrchu a ten je skenován tam a zpět. Jak sonda skenuje přes vzorek, posunutí konce ramene je měřeno využívajíc laserový paprsek. Ten může jednoduše zobrazit izolovanou látku, protože signál odpovídá odporu mezi hrotem a vzorkem, který odráží skenovaný reliéf. Skenovací tunelovací mikroskop přinesl Nobelovu cenu za fyziku Gerdu Binnigovi a Heinrichovi v roce 1986. Tuto SPM techniku používá mikroskop atomárních sil, který zobrazuje reliéf vzorků.

5.4 Optické kleštičky

Optické pinzety používají jednoduchý laserový paprsek (zaměřený vysoce kvalitním objektivem mikroskopu) na bod povrchu vzorku. Radiační tlak a gradient sil z bodu vytváří optickou kapsu, která drží částice v jejím centru. Touto technikou mohou být změřeny malé meziatomární síly a posunutí. Vzorky, které mohou být analyzovány, jsou v rozpětí samotných atomů k mikrometrovým sférám a až k vláknu DNA a živým buňkám. Kapsy mohou být simultánně zkoumány dalšími optickými technikami, jako například skalpely, které rozříznou částici, která je právě pozorována.

6 Využití nanočástic v terapii

Použití molekulárních a makromolekulárních těles a superstruktur odvozených pro doručování léčiv má dlouhou historii. Například protilátky byly navrhované v minulém století jako způsob namíření protinádorových léčiv do rakovinných buněk v těle, které nesly příslušný antigen. Jejich použití ve formě monoklonálních je nyní v popředí cílené léčby. Následující kroky v objevu buněčných receptorů vedly k zařazení na receptor se vážících makromolekul do instrumentária systémů pro cílené působení léčiv. Paralelně k tomuto vývoji začalo ze začátku sedmdesátých let i využívání lipozómů jako doručovacích systémů léků a vakcín. Tyto superstruktury, vzniklé spontánně z amfifilních lipidových molekul, společně s rozličnou kolekcí dalších slibných superstruktur odvozených z obrovského množství přírodních a syntetických monomerních i polymerních jednotek, se vyvinuly do důmyslných verzí díky začlenění do roviny jejich makromolekul, které tak přispěly k optimální farmakokinetice a tím doručení na místo, kde je jich třeba. Jako vždy je velké množství léčivo či vakcínu doručujících systémů testováno klinicky a se spoustou je již možno se setkat na trhu.

6.1 Nanočástice jako nosiče léčiv

Dokonalý NPDDS má dvě základní vlastnosti: schopnost zacílit a kontrolovat uvolňování léčiva. Zacílení zajistí vysokou účinnost léčiva a zredukuje vedlejší účinky, zvláště když jde o léčiva, která jsou určena ke zničení rakovinných buněk, a která zrovna tak mohou zabít i zdravé buňky, pokud jsou k nim doručena. Snížení nebo předcházení vedlejšími účinkům je rovněž dosaženo kontrolovaným uvolňováním. Nanočásticový systém pro doručování léčiv umožňuje lepší penetraci částic do těla, jejich velikost určuje, zda budou podány intravenózní injekcí nebo jinou cestou. Velikost těchto částicových

systemů na nanoškále rovněž minimalizuje dráždivou reakci v místě injekce. Dřívější pokusy přímé léčby specifické skupiny buněk jsou spojeny s připojením radioaktivních látek na protilátky specifické k markerům, které se vyskytují na povrchu rakovinných buněk. Protilátky jsou způsobem, jak dokázat přítomnost cizorodých látek. Protilátky specifické na konkrétní proteiny mohou být masově vyráběny v laboratořích, paradoxně za použití rakovinných buněk. Nanočásticové systémy vykazují v této oblasti velký potenciál.

6.2 NPDDS tvořené z polymerů

Spousta polymerů a nelipidových materiálů mají význam jako přenašeče látek v nanočásticové podobě. Tyto materiály vykazují rozdílné vlastnosti a výhody, pokud jsou formulovány jako NPDDS.

6.2.1 NPDDS tvořené z hydrogelu

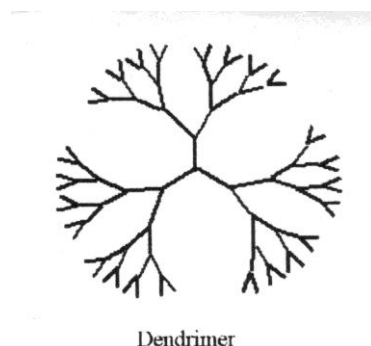
Vzrůstající zájem je vyvíjen o samokompletující se hydrogelové nanočástice z hydrofilních ve vodě rozpustných polymerů pro jejich potenciální biomedicínské a farmaceutické použití (8). Nanočástice vykazují různé strukturální a reologické rysy ve vodných roztocích závislé na původním ve vodě rozpustném polymeru, konjugovaných hydrofóbních skupinách a stupni substituce.

6.2.2 NPDDS založené na dendrimerech

Trojrozměrné jako strom větvené makromolekuly mají některé fascinující vlastnosti: velmi dobře definovanou strukturu, vysoce vymezenou distribuci molekulové hmotnosti, třírozměrnou strukturu doladěnou tvorbou dendrimerů, flexibilitu upravených funkčních skupin s vysokou hustotou na periferii (9).

Studie biomedicínského využití dendrimerů se stávají více a více atraktivní, zvláště v oblasti nevirových genových vektorů a NPDDS (10,11).

Obrázek 6-1: Struktura dendrimeru (12).



Fotodynamická terapie rakoviny zahrnuje systémovou distribuci fotosenzitizérů do masy nádoru a lokální osvětlení světlem specifické vlnové délky, vedoucí k fotochemickému zničení nádorových buněk. Je to způsobeno díky dvorbě singletů kyslíku a superoxidu z molekulárního kyslíku. Vhodné přenašeče a doručovače fotosenzitizérů by měly mít jednoduchou ale efektivní strategii pro realizaci vysoké selektivity, vysoké fotodynamické účinnosti vedle nízkého výskytu vedlejších účinků.

6.2.3 CaCO₃ nanočástice

Do nanočástic z uhličitanu vápenatého se dají inkorporovat hydrofilní látky a bioaktivní proteiny (13). Velikost takových nanočástic byla popsána okolo 105 až 128 nm. Tyto uličitano-vápenaté nanočástice jsou velmi stabilní a byly zkoušeny jako nosiče betamethason fosfátu.

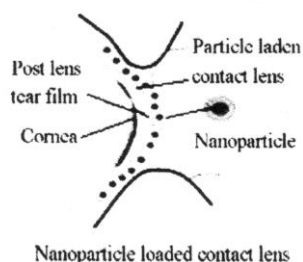
6.2.4 Protaminem tvořené nanočásticové přenašeče

Protamin je neantigenní a nízkě toxický peptid spermatu získávaného z lososa. Jeho molekulová hmotnost je okolo 5000 g/mol. Může být použit jako doručovací systém pro DNA nebo oligonukleotidy. Spousta literatury popisuje protamin jako velmi výhodný NPDDS (14-17). V několika studiích je peptid spojen a využit dohromady s relativně velkou dvouřetězcovou DNA. Výhody protaminu jsou stabilita, samokompletování, které je jednoduché a rychlé, je neantigenní, relativně netoxický a velmi dobře snášen. Nevýhodami jsou obrovská schopnost agregace a precipitace v solných roztocích a to už ve fyziologických koncentracích, jeden druh (fosfothiolát místo diesteru) neumožňuje přenášenou látku uvolnit po přijetí buňkou (14).

6.2.5 Chitosanové NPDDS

Chitosan, polykationický polymer, skládající se z D-glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu řetězených β -(1,4)-glykosidickou vazbou je intenzivně zkoumán jako NPDDS pro doručování protirakovinných látek, genů a vakcín (18-21). Jeho nespornou výhodou je jeho biokompatibilita, biodegradabilita, netoxičita a vysoká schopnost mukoadheze. Chitosanové NPDDS jsou nejvíce využívány v očním lékařství.

Obrázek 6-2: Kontaktní čočka pokrytá nanočásticemi (12).

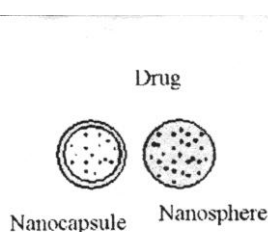


6.2.6 Albuminové a želatinové nanosféry

Albumin je jednou z široce využívaných doručovacích systémů (22). Více než 100 terapeutických a diagnostických látek bylo inkorporováno do albuminových nanočástic a zkoumány po intravenózním, intramuskulárním, intraarteriálním a intraartikulárním podání. Albuminové částice jsou dobře využívány pro zacílení léčivé látky a doručení na místo určení díky nízké toxicitě a antigenitě. Ve srovnání s ostatními koloidními přenašečovými systémy, albuminové nanosféry mají lepší stabilitu, kontrolované vlastnosti uvolňování a lepší uvolňování hydrofilních molekul.

Želatinové nanočástice byly vytvořeny pro doručování a zacílení T-lymfocytů (23) dvoustupňovým disolvačním procesem.

Obrázek 6-3: Rozdíl mezi nanokapsulou a nanosférou (12).



6.2.7 Polyesterové nanočástice

Tyto nanočástice mohou být připraveny z předem definovaných ko-polymerů metodou jako je emulgace s odpařováním rozpouštědla, nanoprecipitace nebo vysolování. Všechny jsou založeny na předchozím rozpuštění polymeru v organickém rozpouštědle.

7 Cíl práce

Cílem předložené diplomové práce bylo vytipovat jako nosiče polyestery a polyesteramidy syntetizované na katedře farmaceutické technologie z hlediska jejich potenciální výhodnosti pro formulaci a použití nanočástic. Pro přípravu nanočástic bylo zadáno využít různá rozpouštědla s důrazem na jejich co nejnižší toxicitu. Koncentraci nosičů bylo nutno volit tak, aby byly získány co nejmenší nanočástice při jejich dostatečné výtěžnosti. Pro přípravu byla doporučena jako nejvhodnější metoda přípravy nanočástic emulgací roztoků nosičů za rozdělování rozpouštědla do vnější vodné fáze. Tato metoda byla vyzkoušena z hlediska různého režimu míchání a různého složení vnější fáze z hlediska volby emulgátorů a dalších aditiv. Hodnocenými parametry nanočástic byla jejich velikost a jejich povrchový náboj. Byl zájem sledovat, jestli nedochází ke změnám těchto parametrů po dobu několika hodin po přípravě.

8 Principy měření zkoumaných charakteristik nanočástic

8.1 Měření velikosti nanočástic

Velikost nanočástic je měřena na základě Brownova pohybu, jehož rychlost je úměrná velikosti částic. Částice při svém pohybu odráží laserový paprsek, který se rozptýlí mnoha směry. Tomuto procesu se říká dynamický rozptyl světla (DLS - dynamic light scattering). Detektor vyhodnotí dopadající záření, zaznamená rychlost pohybu skvrn (tedy částic) a přes korelační funkci a Stokes-Einsteinovu rovnici přepočítá rychlost pohybu částic na jejich velikost.

8.2 Měření zeta potenciálu nanočástic

Technikou používanou v Zetasizeru ZS 90 k měření zeta potenciálu je laserový Dopplerův rychloměr. Během měření je používán paprsek měrný a paprsek srovnávací. Zeta potenciál je měřen pomocí vytvoření elektrického pole v disperzi. Částice v disperzi s určitým zeta potenciálem putují k opačně nabitě elektrodě rychlostí, která je úměrná velikosti zeta potenciálu. Po aplikaci elektrického pole dochází ke kolísání detekovaného světla, které je odráženo z dráhy zdroje pohybujícími se částicemi. Frekvence kolísání je měřena jako pohyblivost částic a tato pohyblivost je konvertována na zeta potenciál.

9 Experimentální část

9.1 Použité přístroje

Analytické váhy Kern ABS, max 220g, d=0,1mg

Váhy Kern 440-47, max 1 200g, d=0,1g

Homogenizátor DiAx 900 Heildolph, 8000-26 000 otáček/min., 6 pásem

Magnetická míchačka Heildolph MR 3001, 100-1 250 otáček/min.

Malvern Instruments, UK Zetasizer ZS 90

9.2 Chemikálie

3P, KFT FaF UK Hradec Králové

PEA 1, KFT FaF UK Hradec Králové

PEA 2, KFT FaF UK Hradec Králové

PEA 3, KFT FaF UK Hradec Králové

PEA 4, KFT FaF UK Hradec Králové

5D, KFT FaF UK Hradec Králové

dichlormethan – LachNer s. r. o. Neratovice

methylacetát - Penta Chrudim

methylformiát - Aldrich

chloroform - Penta Chrudim

lecitin, Míča & Harašta Blansko

polysorbát 20, Biesterfeld Silcom Praha

destilovaná voda

chlorid sodný, LachNer s. r. o. Neratovice

hydroxid sodný, LachNer s. r. o. Neratovice

led

9.3 Nosiče a jejich charakterizace

Tabulka 9-1: lineární polyesteramidy – použité reaktanty

označení	SA (mol%)	AA (mol%)	EA (mol%)	AB (mol%)	AMP (mol%)	SnOct (mol%)
PEA1	50	-	50	-	-	0,02
PEA2	50	-	35	15	-	0,02
PEA3	50	-	35	-	15	0,02
PEA4	25	25	30	10	10	0,02

Vysv.: SA – sebacic acid
 AA – adipic acid
 EA – ethanolamin
 AB – 2-amino-1-butanol
 AMP – 2-amino-2-methyl-1-propanol
 SnOct – stannous octoate

Tabulka 9-2: větvené oligoestery – složení reakční směsi

označení	větvící monomer		GA (% mol)	DLLA (% mol)
	název	konc. (% hmotn.)		
D5	Dipentaerytritol	5,0	(100-D)/2	(100-D)/2

Tabulka 9-3: molekulární a termické charakteristiky nosičů

NOSIČ	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mw/Mn	Tg	ΔC_p	Větvení
3P	2440	5231	4659	8342	11778	2,14	22,2	N	
PEA 1	N	N	N	N	N	N	-3,1	4,06	
PEA 2	N	N	N	N	N	N	-10,7	0,46	
PEA 3	N	N	N	N	N	N	-8,5	4,53	
PEA 4	N	N	N	N	N	N	-9,2	6,3	
D5	1900	2300	N	N	N	1,2	16,3	N	1,04

Vysv.: hodnoty naměřeny v Synpo Pardubice, a. s.
 Mn – číselně střední molekulová hmotnost
 Mw – hmotnostně střední molekulová hmotnost
 MP – charakteristika v místě píku
 Mz – molekulová hmotnost velkých molekul
 Mz+1 – molekulová hmotnost extrémně velkých molekul
 Mw/Mn – stupeň polydisperzity
 Tg – teplota skelného přechodu
 ΔC_p – specifická tepelná kapacita
 N – nebylo měřeno

9.4 Použitá metoda přípravy nanočástic

Pro přípravu nanočástic v rámci této práce byla použita metoda typu „top-down“. Byl připraven roztok polymeru v organickém rozpouštědle (olejová vnitřní fáze), který byl následně emulgován do roztoku emulgátorů ve vodné fázi. Proces emulgace se odehrával za účasti homogenizátoru při nejvyšším stupni otáček a to v různých schématech přidávání vnitřní fáze do vnější. Při míchání dochází v soustavě k tomu, že organické rozpouštědlo přechází do vnější fáze a odpařuje se a polymer přechází z roztoku do pevné fáze. Vnější fáze byla připravena jako 1% roztok lecitinu a polysorbátu 20 (3:1) ve vodě. Ve vnitřní fázi byly obsaženy ať už samotné, tak směsi polymerů 3P, PEA 1, PEA 2, PEA 3, PEA 4 a 5D rozpuštěné jako 1%, 3%, 4,5% a 6% roztok v methylacetátu, methylformiátu, dichlormethanu, chloroformu a směsích dichlormethanu a chloroformu v poměru 1:1. U některých vzorků byl zkoumán vliv chlazení vnější fáze, sycení vnější fáze rozpouštědlem, vliv různého obsahu chloridu sodného ve vnější fázi a úprava pH této fáze.

9.4.1 Příprava vnější fáze

Na analytických vahách jsme navážili potřebné množství směsi emulgátorů a rozpustili ve vodě. Protože se lecitin ve vodě při laboratorní teplotě rozpouští pomalu, umístili jsme směs do mikrovlnné trouby a zahřívali po dobu asi 10 vteřin.

Tabulka 9-4: Vnější fáze (1% vodný roztok lecitinu a polysorbátu 20)

Látka	Množství
Lecitin	0,375g
Polysorbát 20	0,125g
Destilovaná voda	49,50g

9.4.2 Příprava vnitřní fáze

Na analytických vahách jsme navážili potřebné množství polymerů, případně směsi polymerů o různých poměrech a rozpustili v organickém rozpouštědle, případně směsi rozpouštědel. Jelikož jsou vybraná použitá rozpouštědla těkavé kapaliny, překryli jsme kádinku víčkem z alobalu pro snížení odpařování.

9.4.3 Příprava nanočástic

Kádinku s vodnou fází jsme umístili na homogenizátor a postupně zvyšovali otáčky až na maximum. Při maximálních otáčkách jsme začali přidávat organickou fázi ve dvou schématech. Buď byla organická fáze vlita najednou a další 1 minutu míchána (postup A), anebo byla organická fáze přidávána po dobu 30 vteřin, míchána 30 vteřin, poté následovala přestávka v míchání asi 20 vteřin a příprava emulze byla ukončena 30 vteřinami míchání (postup B). Postupným snižováním otáček na homogenizátoru bylo ukončeno míchání a emulze byla vlita do velké kádinky umístěné na magnetické míchačce, ve které bylo obsaženo 200 ml destilované vody. Směs byla většinou stabilizována po dobu 2 hodin. Odebírali jsme vzorky a měřili velikost částic a jejich zeta potenciál na Zetasizeru ZS. U některých vzorků byly zkoumané vlastnosti měřeny opakovaně s odstupem času několika hodin až několika dní. Zkoumali jsme vliv použitého rozpouštědla, polymeru, jejich směsí a vliv chlazení, alkalizování vnější fáze a obsah chloridu sodného ve vnější fázi.

9.4.4 Měření velikosti a zeta potenciálu částic

Pro měření byl použit Zetasizer ZS 90. Přístroj vyžaduje pro měření speciální polystyrénové kyvety dvojího typu, jeden pro měření velikosti částic a druhý pro měření vlastního potenciálu. Kapátkem jsme naplnili kyvety do požadované výšky, kyvety na měření zeta potenciálu jsme uzavřeli k tomu určenými zátkami

a umístili do přístroje.

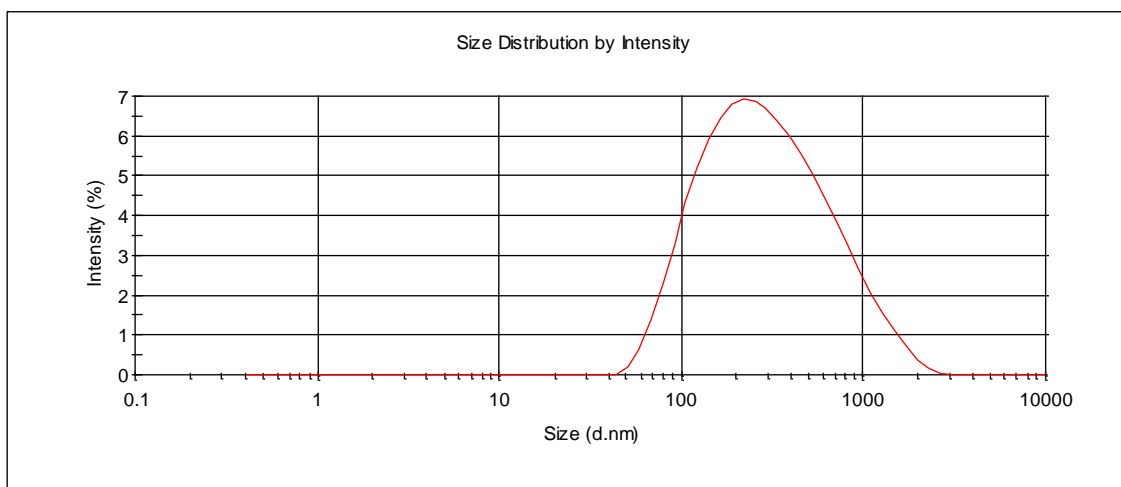
9.4.5 Výsledky

Výsledky jsou předloženy v tabulkách 9-5 až 9-24 a obrázcích 9-1 až 9-20.

Tabulka 9-5: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A (vysvětlení v kapitole 9.3.3). Měření následovala 1 hodinu a 20 minut, 2 hodiny a 30 minut a pět dnů po přípravě emulze.

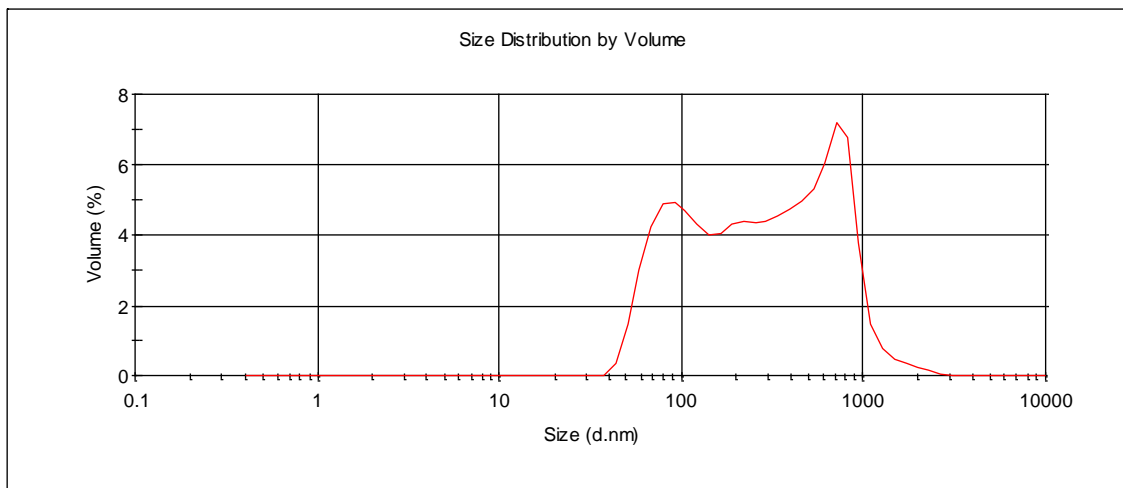
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
1	390,2	100	0	0	0	0	93,52	29	195,6	19	608,4	51	-56,9
2	370,5	100	0	0	0	0	102,6	22	196,6	21	576,8	55	
3	615,2	59	156,9	40	0	0	648,3	63	137,3	36	0	0	-50,6

Obrázek 9-1A: Vzorek 1 - intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

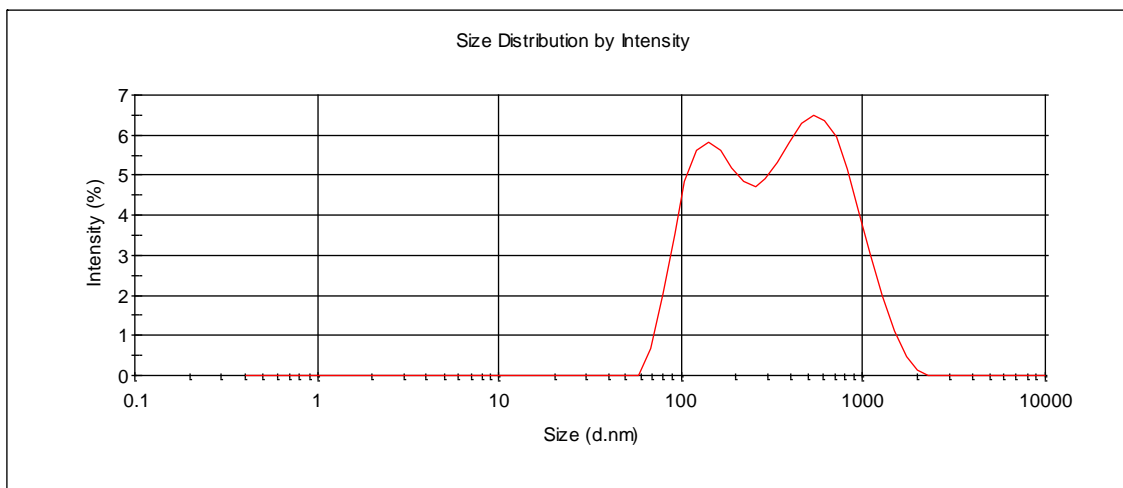


Polyesteramidové nanočástice

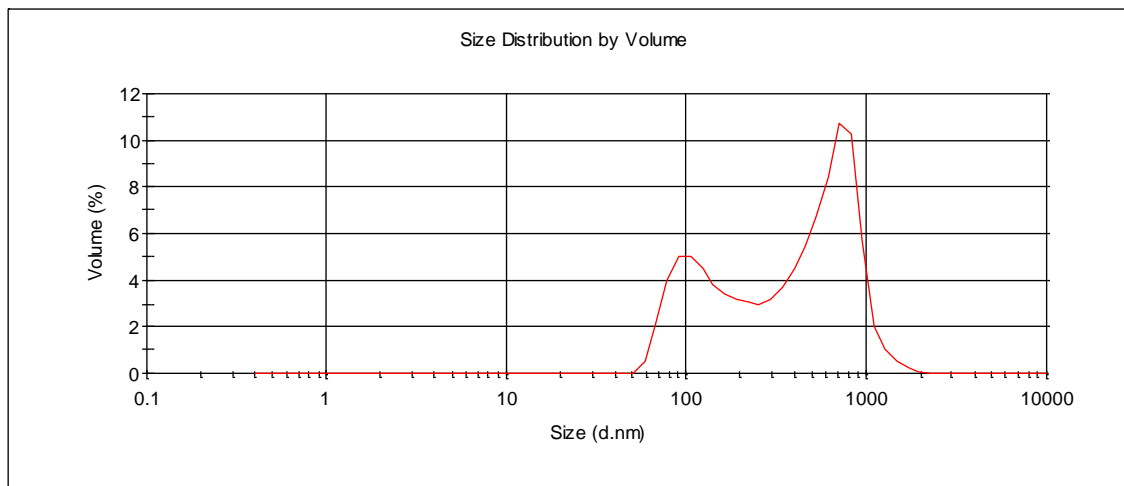
Obrázek 9-1B: Vzorek 1 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Obrázek 9-2A: Vzorek 3 - intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Obrázek 9-2B: Vzorek 3 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v dichlormethanu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Tabulka 9-6: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylacetátu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A (vysv. v kap. 9.3.3). Měření následovala 1 hodinu, 1 hodinu a 30 minut a po pěti dnech od přípravy emulze.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
4	526	69	137,2	30	0	0	585,6	72	110	27	0	0	-62,6
5	519,6	66	146,9	33	0	0	594,3	69	126	30	0	0	
6	428,6	100	0	0	0	0	89,1	25	547,2	74	0	0	-44,1

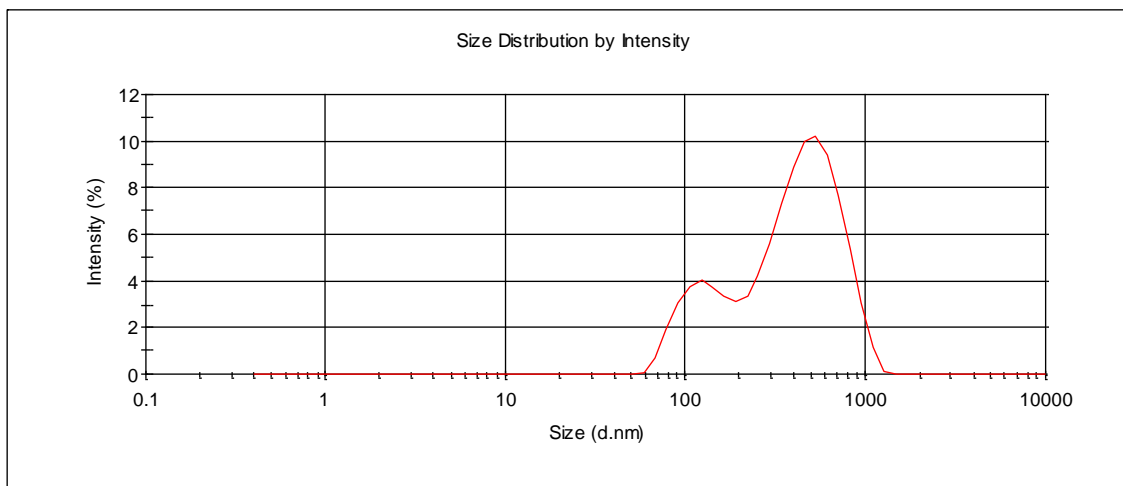
Tabulka 9-7: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylformiátu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A (vysv. v kap. 9.3.3). Měření provedena po dvou hodinách a dvou dnech od počátku stabilizace na magnetické míchačce.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
7	505,6	76	128,3	23	0	0	580,8	77	111,8	22	0	0	-27,9
8	474	100	0	0	0	0	104,1	18	602,9	81	0	0	-27,3

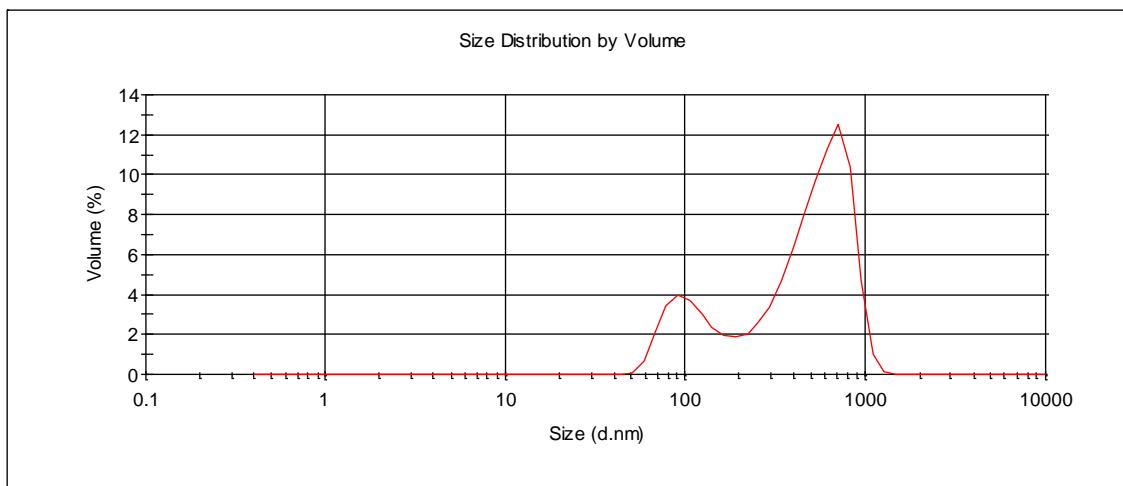
Obrázek 9-3A: Vzorek 7 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka.

Polyesteramidové nanočástice

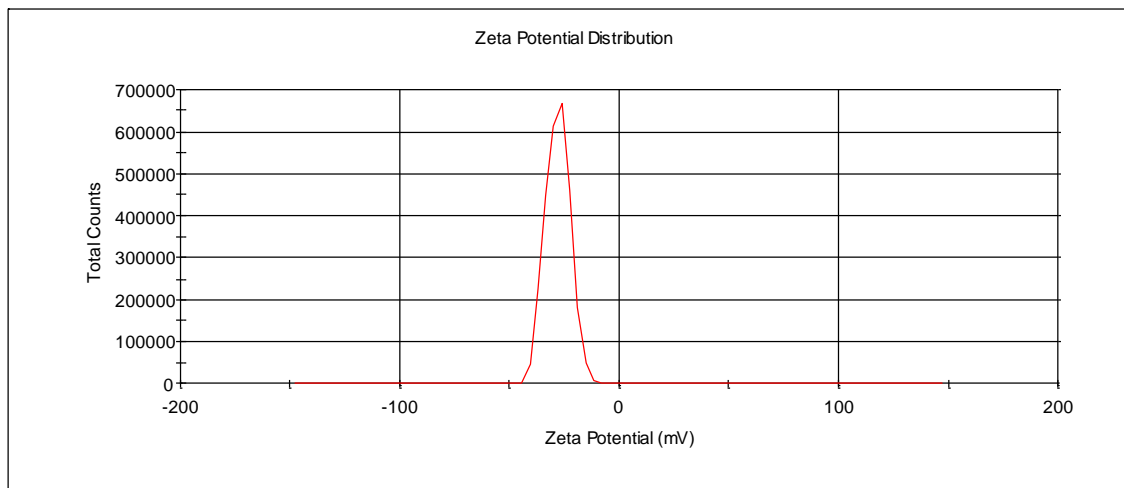
Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylformiátu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Obrázek 9-3B: Vzorek 7 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methylformiátu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Obrázek 9-3C: Vzorek 7 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% polyester 3P v methyloformiátu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Tabulka 9-8: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% polyesteramid PEA 1 v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A (vysv. v kap. 9.3.3). Měření provedena po dvou a čtyřech hodinách a dvou dnech od přidání emulze do kádinky na magnetické míchačce.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
9	955,9	59	199,1	40	0	0	109,4	14	208,9	18	827,2	67	-45,3
10	557,4	99	0	0	0	0	35,59	16	504,6	80	2364	2	
11	568,9	80	119,8	19	0	0	617,3	79	104,4	20	0	0	-42,1

Tabulka 9-9: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% polyesteramid PEA 4 v dichlormethanu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A (vysv. v kap. 9.3.3). Měření provedena po dvou hodinách a dvou dnech od přípravy emulze na homogenizátoru.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
50	397,7	99	0	0	0	0	94,81	26	507,6	72	0	0	-49
51	367,1	100	0	0	0	0	91,58	28	493,7	71	0	0	-45,1

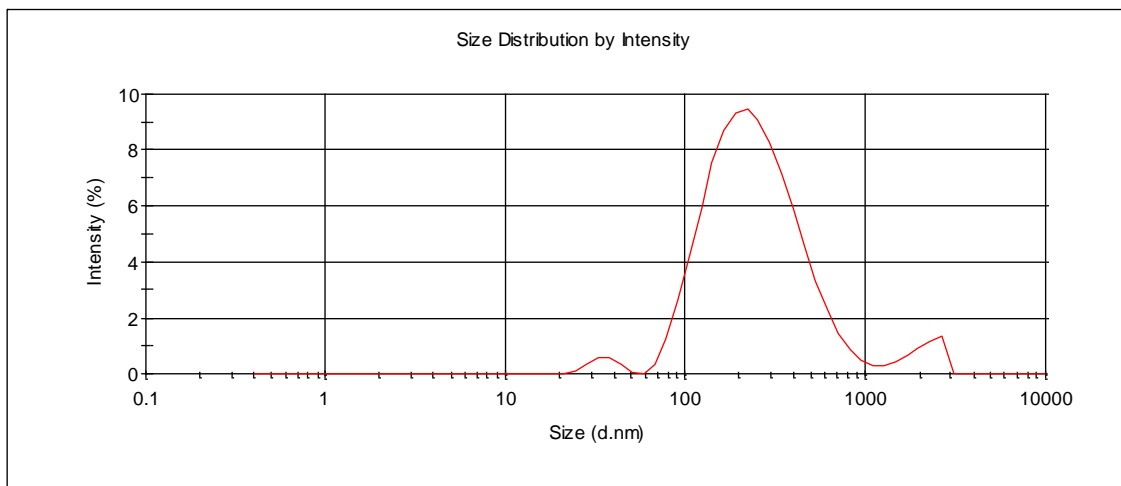
Tabulka 9-10: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní

Polyesteramidové nanočástice

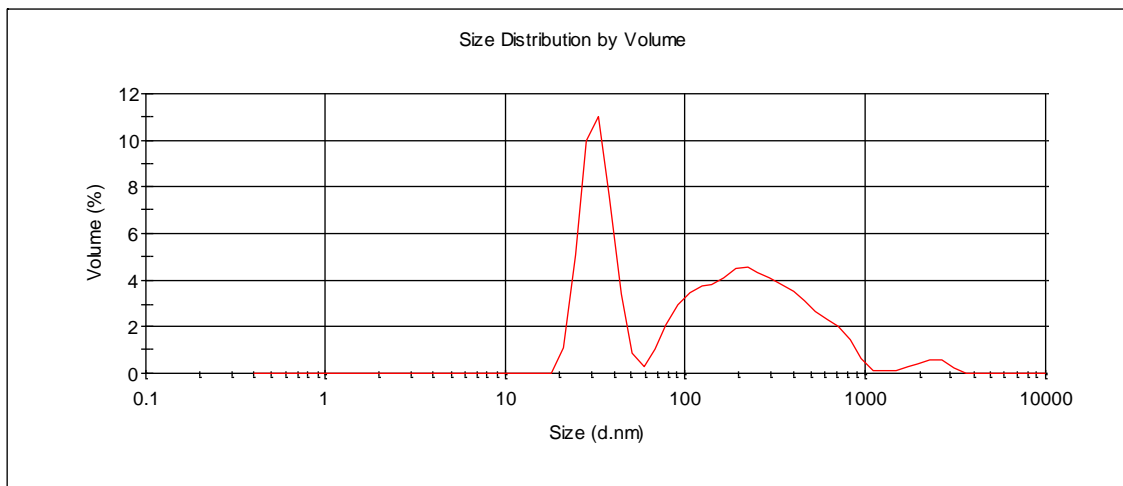
fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A u vzorků 16, 17 a 18, vzorek 19 připraven postupem B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorky 16 a 19 měřeny po dvou hodinách od přípravy emulze, vzorek 17 po dvou dnech a vzorek 18 po sedmi dnech.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
16	424,5	100	0	0	0	0	472,1	100	0	0	0	0	-47
17	350,6	100	0	0	0	0	77,47	23	448,4	76	0	0	-43,9
18	580,8	100	0	0	0	0	94,65	19	606,8	77	2388	2	
19	270,1	92	2068	5	35,28	2	293,7	58	2235	2	32,73	39	-48,7

Obrázek 9-4A: Vzorek 19 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Obrázek 9-4B: Vzorek 19 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

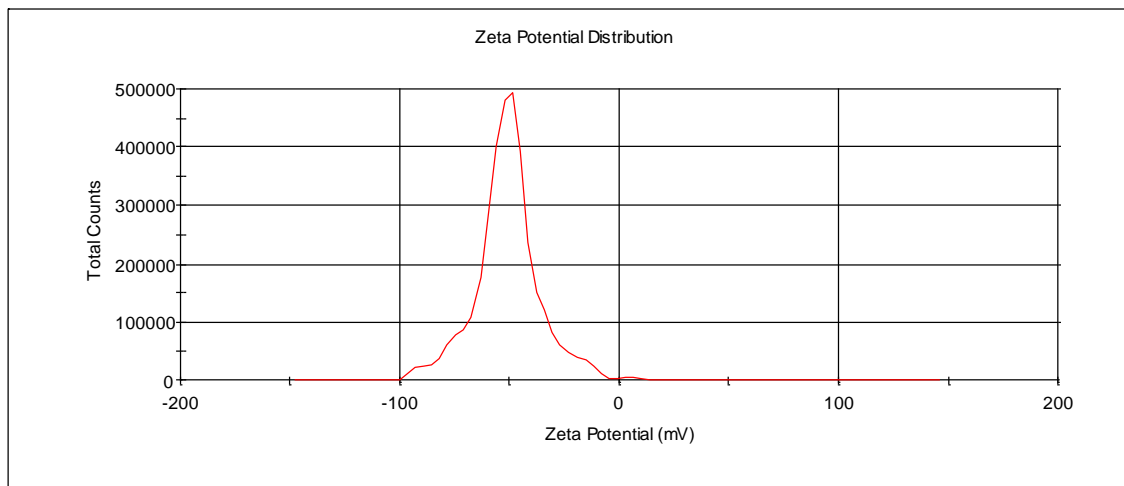


Tabulka 9-11: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A u vzorků 20 a 21, vzorek 22 postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorek 20 a 22 měřeny po dvou hodinách, vzorek 21 po dvou dnech od počátku stabilizace.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
20	495,9	100	0	0	0	0	502,1	100	0	0	0	0	-51,5
21	533,7	100	0	0	0	0	175,4	34	730,1	65	0	0	-44,3
22	328,4	99	0	0	0	0	191,2	44	435,5	36	760,8	19	-49,4

Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-5: Vzorek 20 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (75:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

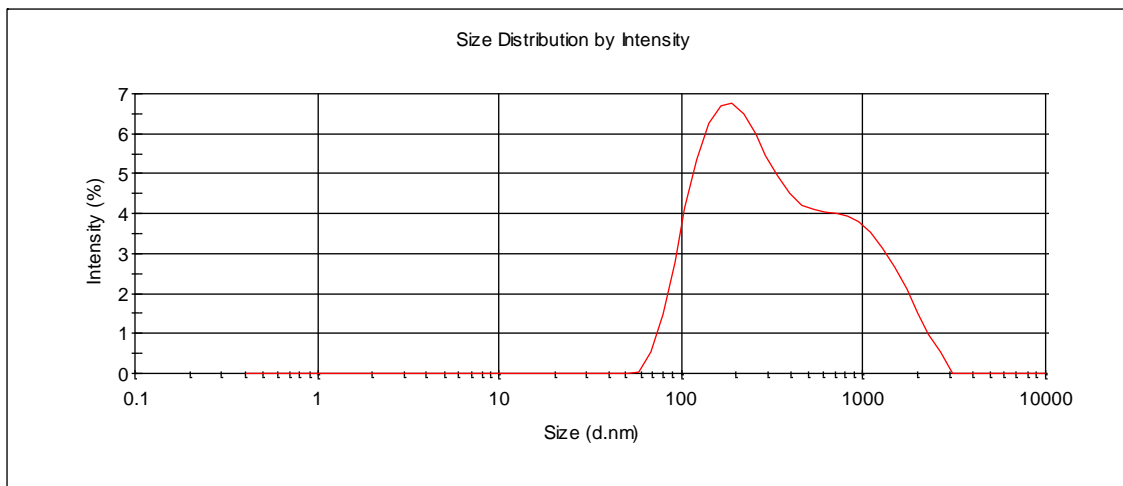


Tabulka 9-12: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze A (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorky měřeny po dvou hodinách, dvou a sedmi dnech.

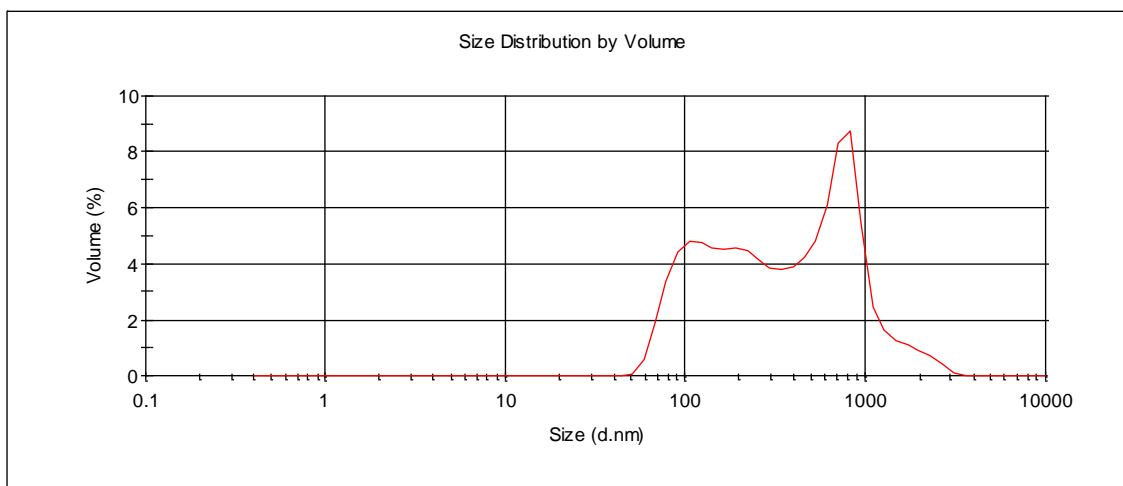
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
23	513,4	100	0	0	0	0	114,3	26	240,2	23	796,5	49	-51,8
24	274,2	100	0	0	0	0	85,87	25	310,8	74	0	0	-44,6
25	235,3	64	1245	35	0	0	214,8	54	1004	45	0	0	

Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-6A: Vzorek 23 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka.
Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.
Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

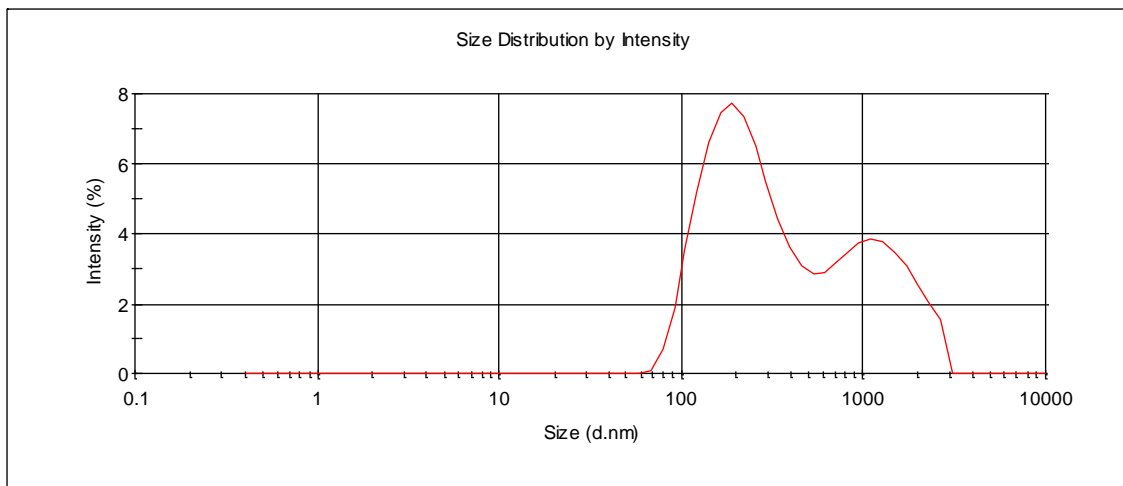


Obrázek 9-6B: Vzorek 23 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka.
Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.
Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

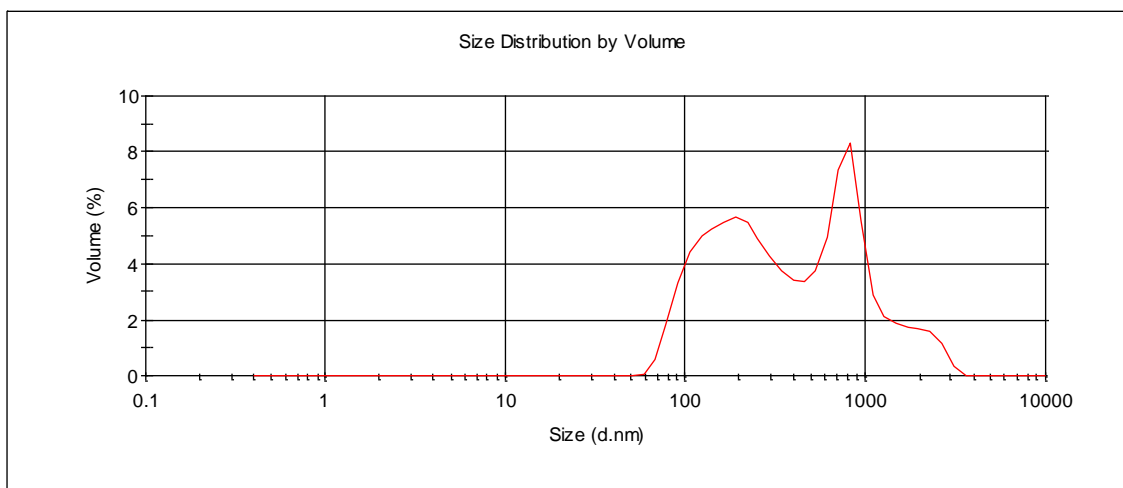


Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-7A: Vzorek 25 - intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka.
Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.
Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Obrázek 9-7B: Vzorek 25 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka.
Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu.
Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Polyesteramidové nanočástice

Tabulka 9-13: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorek měřen po dvou hodinách od počátku stabilizace na magentické míchačce.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
26	513	100	0	0	0	0	542,5	100	0	0	0	0	-49,3

Tabulka 9-14: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1 a PEA 4 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorek měřen po dvou hodinách od počátku stabilizace na magentické míchačce.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
27	229,2	68	1169	31	0	0	115,6	29	253,7	28	901	41	-40,3

Tabulka 9-15: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% (vzorek č.12) a 3% (vzorek č.13) směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorky měřeny po dvou hodinách od přípravy emulze a umístění na magentickou míchačku.

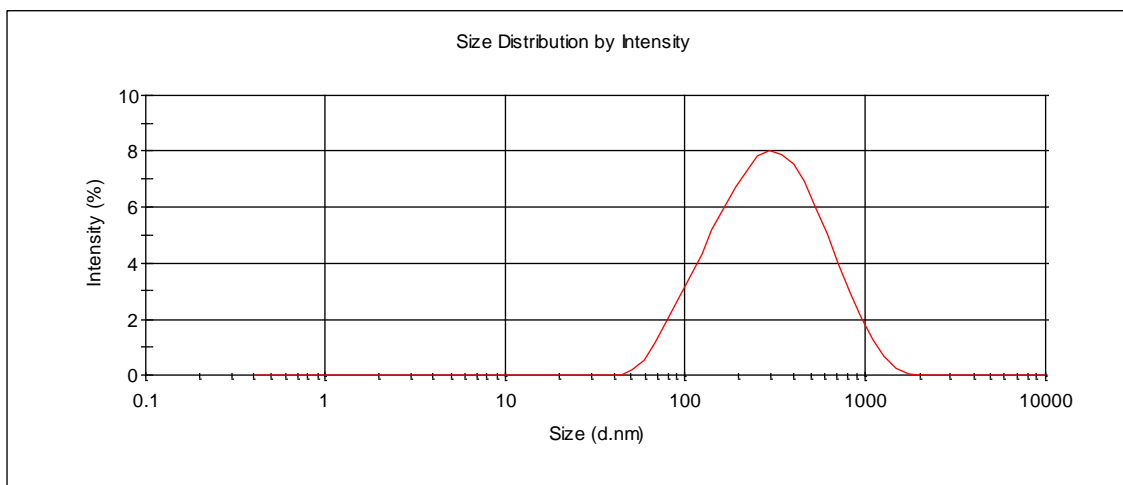
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
12	357,5	97	2330	2	0	0	250,5	72	739,8	24	2149	2	-52,8
13	769	58	173,5	41	0	0	716	66	137,4	33	0	0	-44,7

Polyesteramidové nanočástice

Tabulka 9-16: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% (vzorek č.14) a 3% (vzorek č.15) směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorky měřeny po dvou hodinách od přípravy emulze a umístění na magnetickou míchačku.

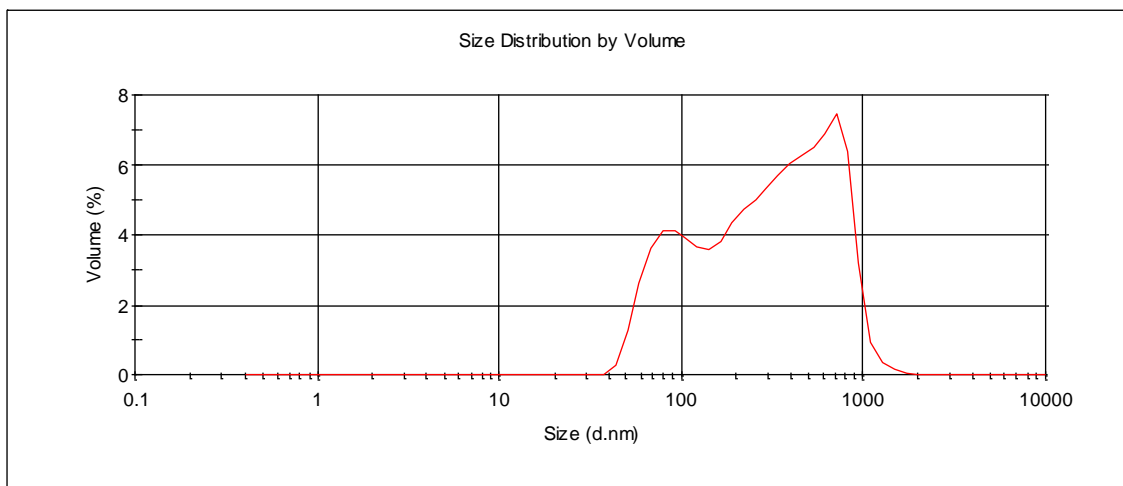
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
14	354,6	100	0	0	0	0	93,78	16	471,8	73	0	0	-51,7
15	539,8	100	0	0	0	0	103,7	18	212,9	22	753,3	58	-53

Obrázek 9-8A: Vzorek 14 - intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

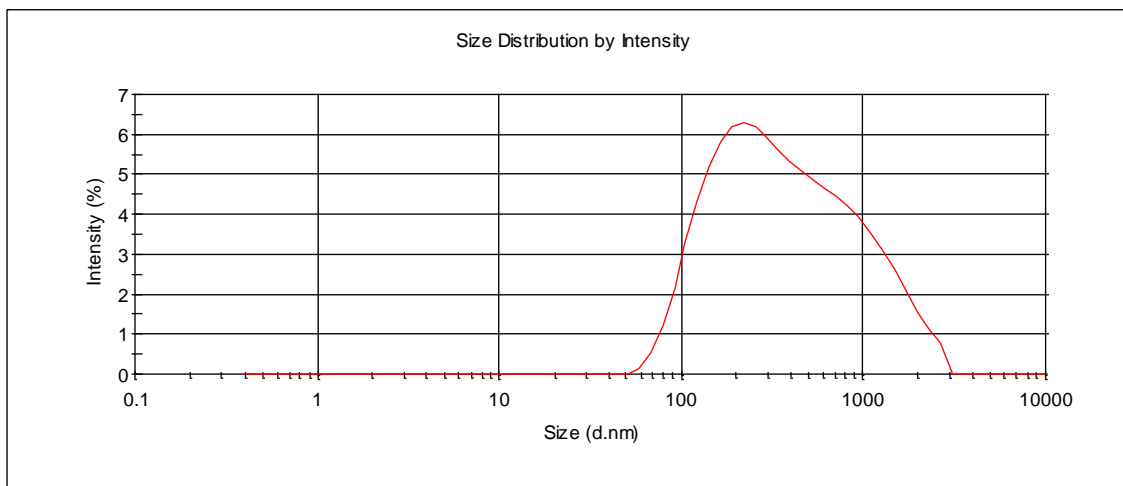


Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-8B: Vzorek 14 - objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

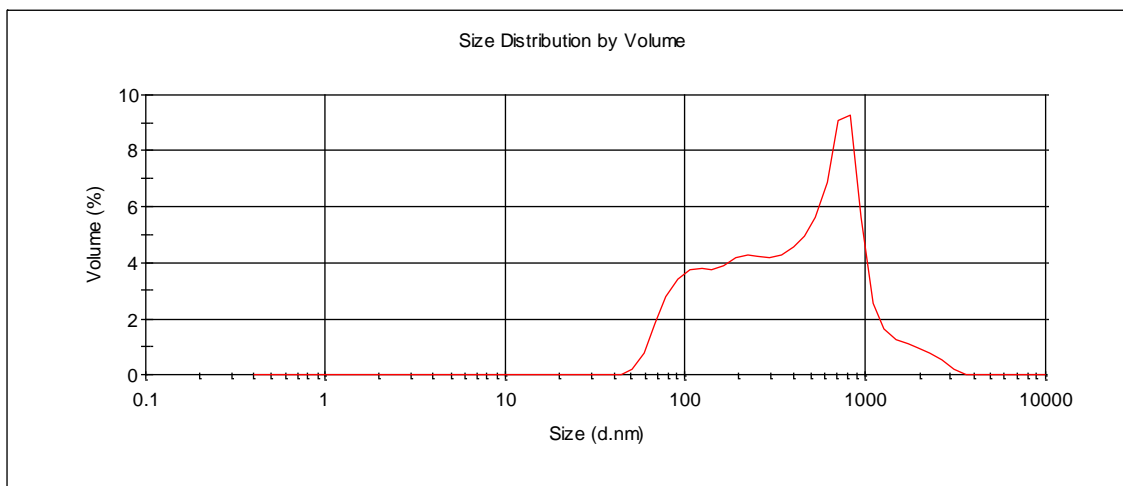


Obrázek 9-9A: Vzorek 15 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

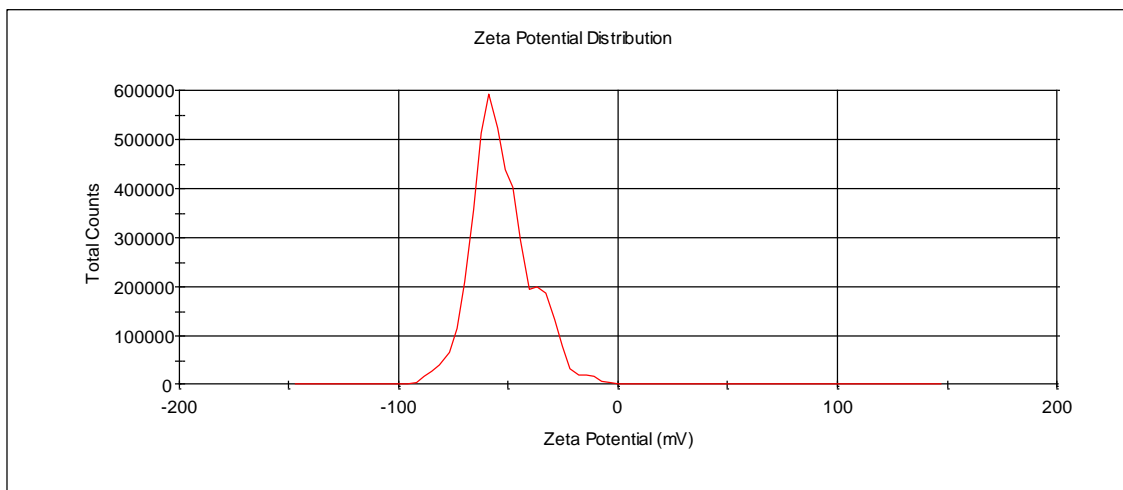


Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-9B: Vzorek 15 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Obrázek 9-9C: Vzorek 15 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 1, PEA 2, PEA 3 a PEA 4 (25:25:25:25) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).



Polyesteramidové nanočástice

Tabulka 9-17: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% (vzorek č.28) a 3% (vzorek č.30) směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) v chloroformu. Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorky měřeny po dvou hodinách od počátku stabilizace.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
28	374,5	98	2346	1	0	0	401,8	98	2279	1	0	0	-48
30	716,7	67	172,5	32	0	0	111,8	12	194,9	15	705,6	72	-50,2

Tabulka 9-18: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 1% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Měření provedena dvě hodiny po přípravě emulze.

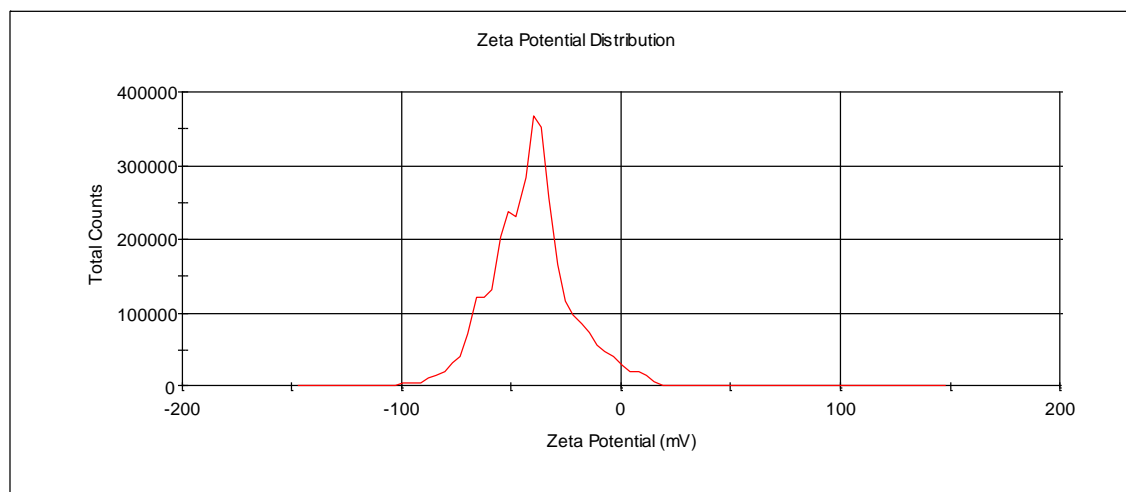
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
29	316,1	100	0	0	0	0	39,23	12	355,9	87	0	0	-48,4

Polyesteramidové nanočástice

Tabulka 9-19: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Vzorek 34 a 38 má upraveno pH vnější fáze roztokem NaOH na 8,0. Vzorek 35 až 40 mají přidán NaCl do vodné fáze v koncentraci 1% (vzorek 35), 4% (vzorek 36 až 38) a 6% (vzorek 39 a 40). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Měření provedena dvě hodiny po přípravě emulze kromě vzorků 32 a 40 (měřeno po 1 dni), 33 (měřeno po třech dnech), 37 (měřeno po čtyřech dnech).

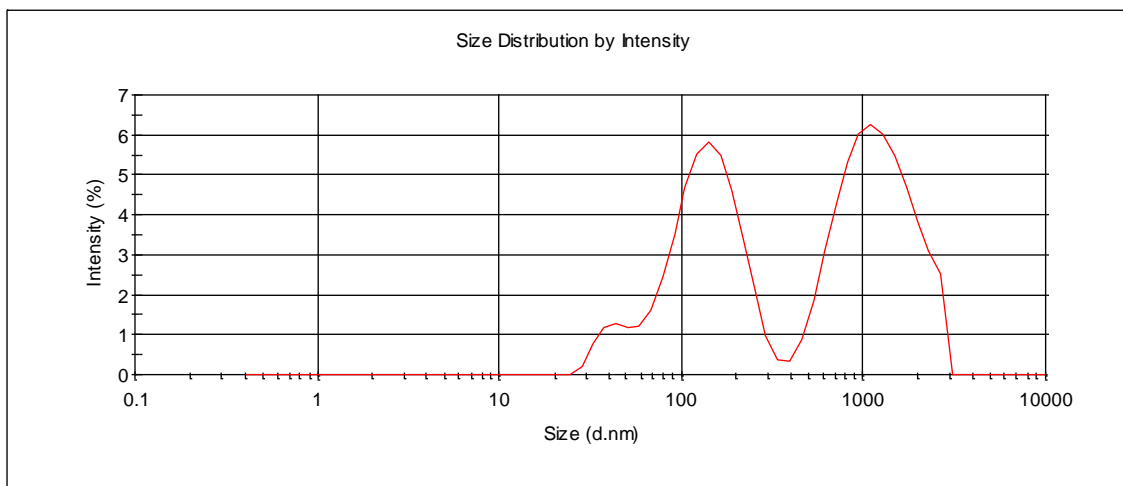
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
31	490,4	100	0	0	0	0	539,2	100	0	0	0	0	-46,4
32	232,7	55	1091	44	0	0	170,5	36	836	63	0	0	-41,1
33	684,8	57	175,3	42	0	0	673,7	68	146,4	31	0	0	-38,5
34	1285	52	146,7	42	41,44	4	1079	30	137,1	19	43,6	49	-74,9
35	468,7	77	2016	22	0	0	93,84	20	606,9	67	2230	12	-26,3
36	383,5	100	0	0	0	0	399,9	100	0	0	0	0	-7,76
37	429,5	100	0	0	0	0	449,1	100	0	0	0	0	
38	543,9	93	61,8	6	0	0	568,9	77	59,43	22	0	0	-16,3
39	317,4	100	0	0	0	0	322	100	0	0	0	0	-5,03
40	424,9	100	0	0	0	0	448,8	100	0	0	0	0	

Obrázek 9-10: Vzorek 32 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25).

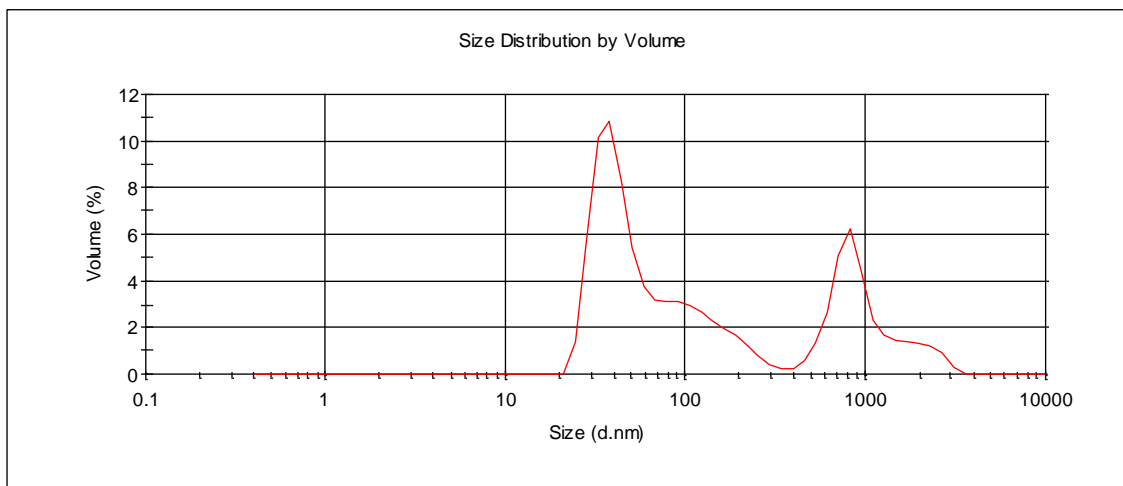


Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-11A: Vzorek 34 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), úprava pH hydroxidem sodným na 8,0.



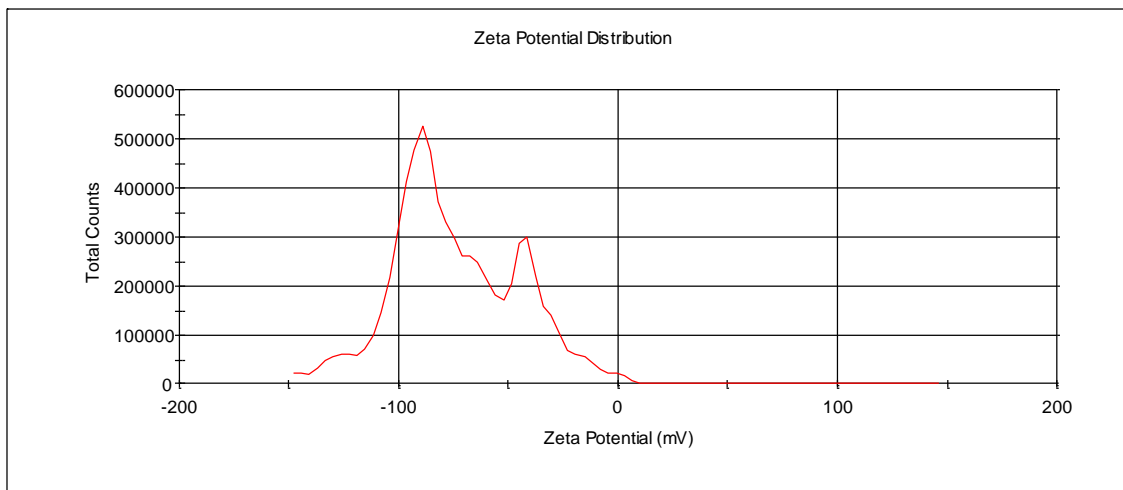
Obrázek 9-11B: Vzorek 34 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), úprava pH hydroxidem sodným na 8,0.



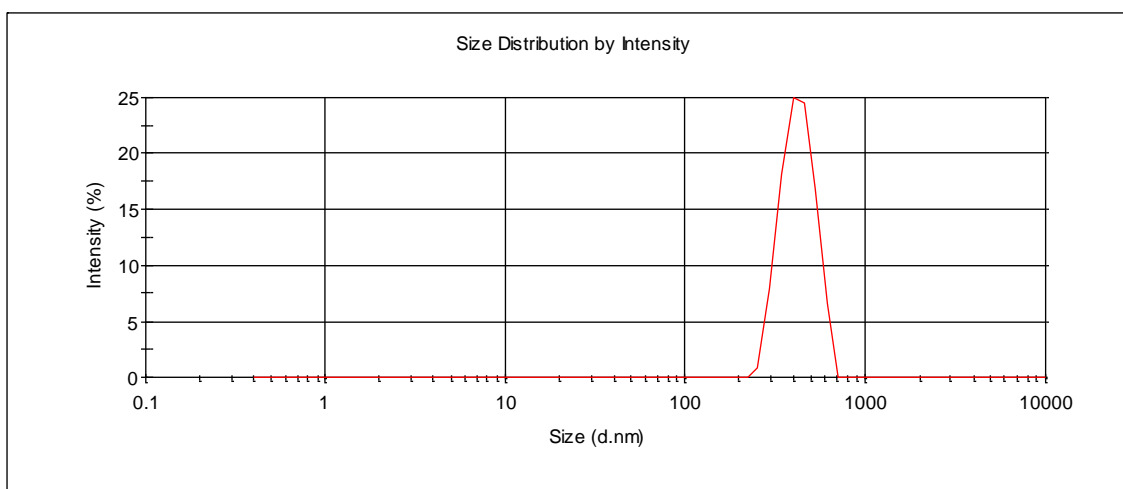
Obrázek 9-11C: Vzorek 34 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs

Polyesteramidové nanočástice

polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), úprava pH hydroxidem sodným na 8,0.



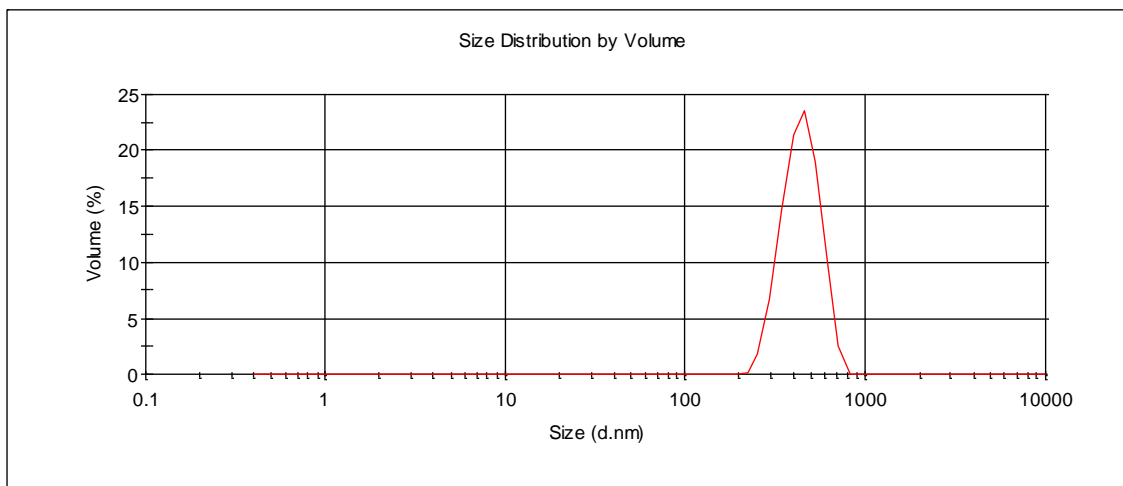
Obrázek 9-12A: Vzorek 37 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 4%.



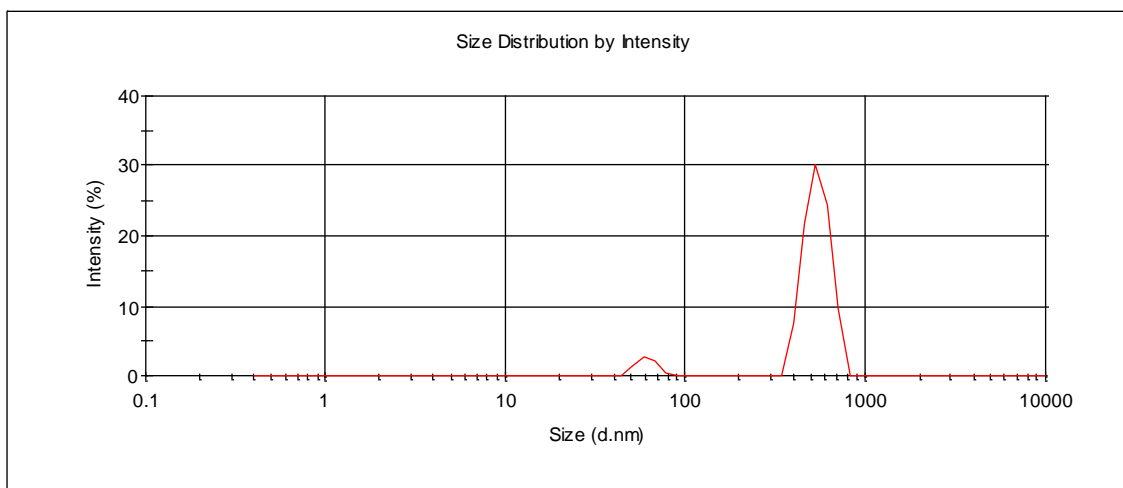
Obrázek 9-12B: Vzorek 37 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi

Polyesteramidové nanočástice

chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 4%.



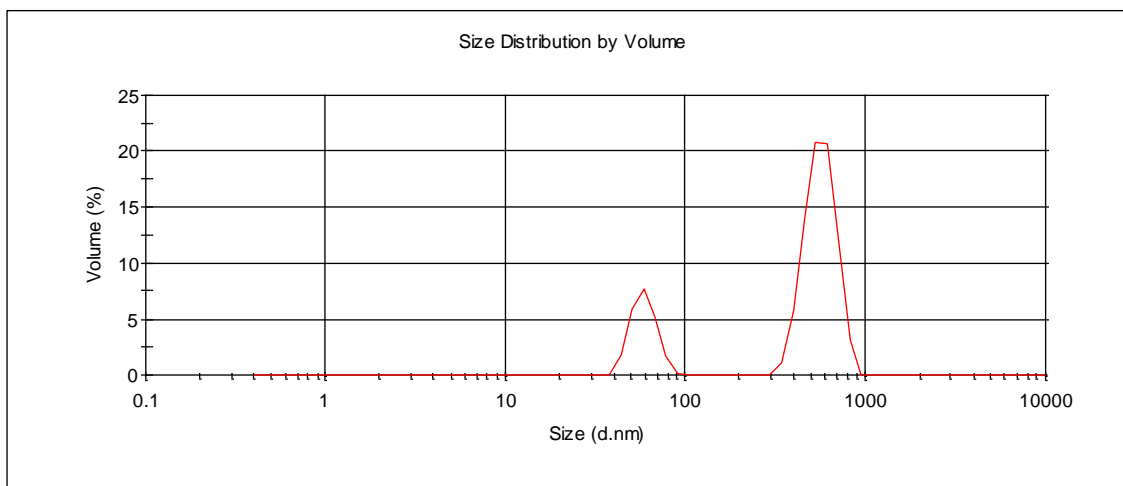
Obrázek 9-13A: Vzorek 38 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 4%, úprava pH NaOH na 8,0.



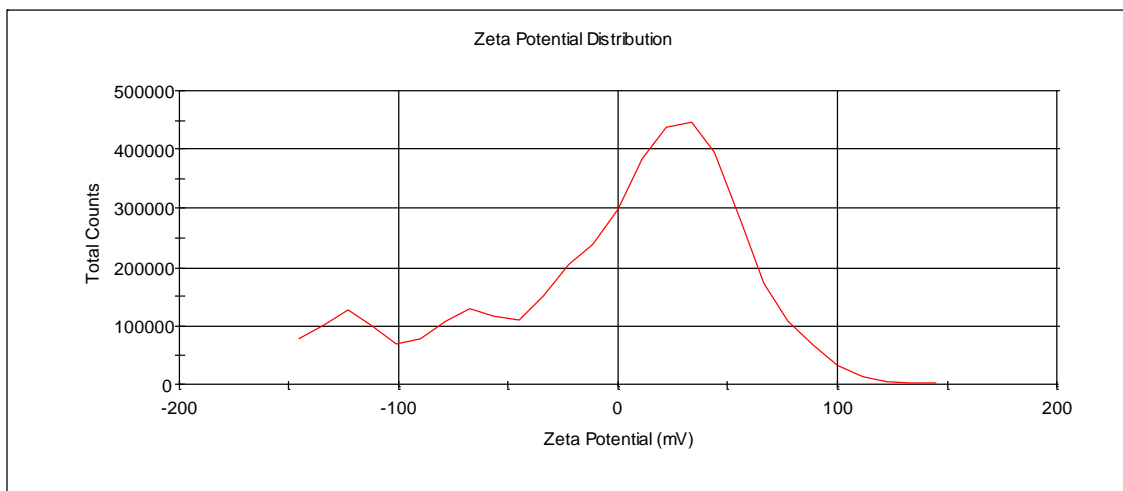
Obrázek 9-13B: Vzorek 38 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi

Polyesteramidové nanočástice

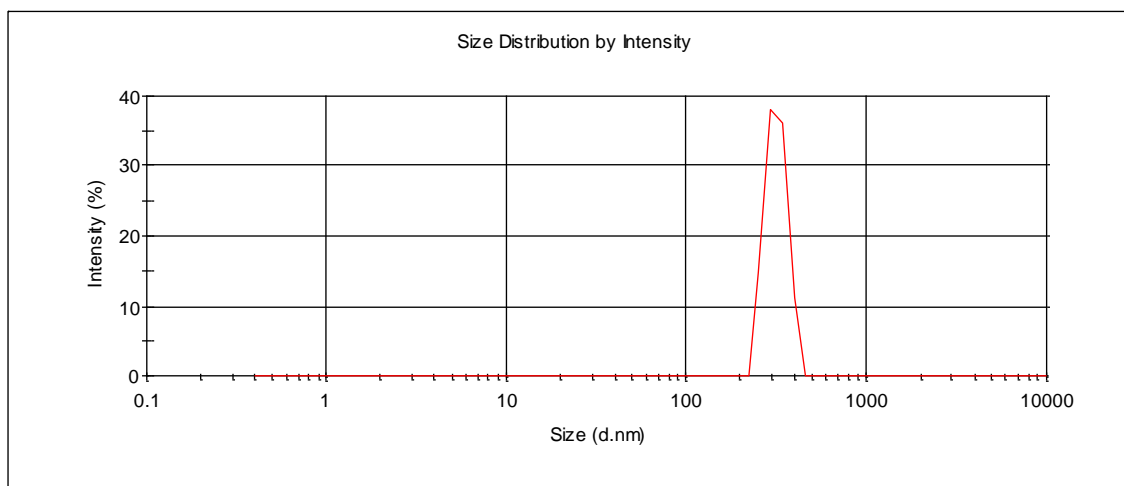
lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 4%, úprava pH NaOH na 8,0.



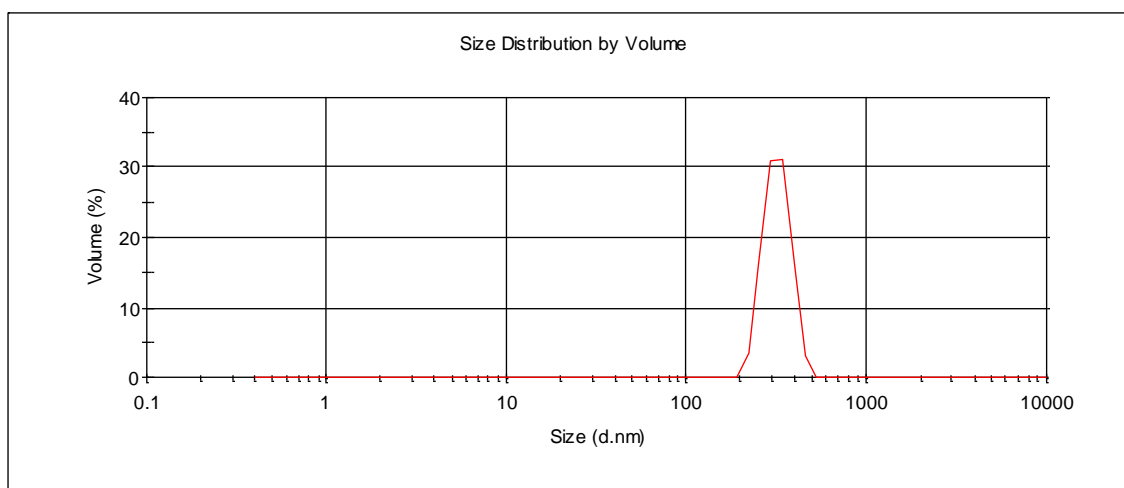
Obrázek 9-13C: Vzorek 38 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 4%, úprava pH NaOH na 8,0.



Obrázek 9-14A: Vzorek 39 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 6%.

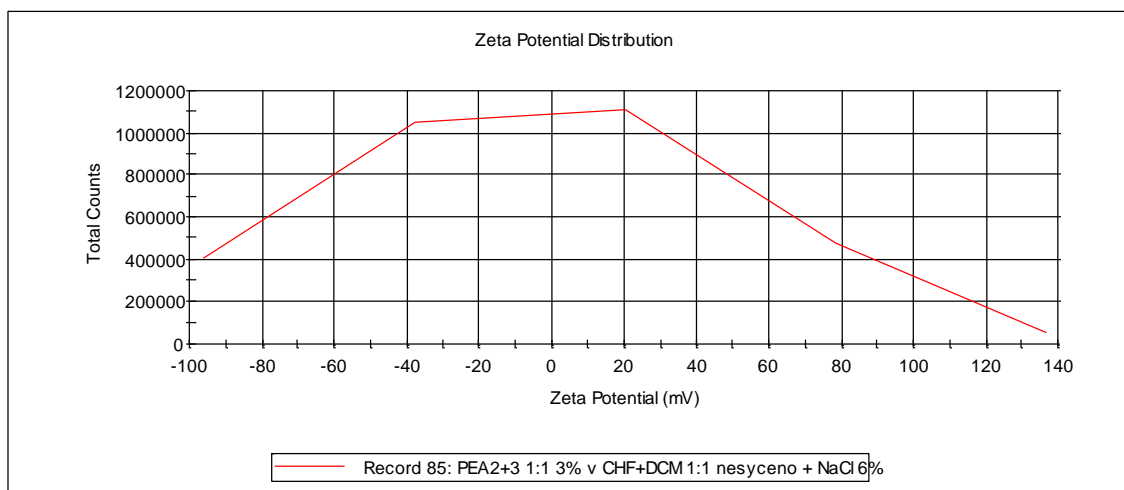


Obrázek 9-14B: Vzorek 39 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 6%.



Obrázek 9-14C: Vzorek 39 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), obsah NaCl 6%.

Polyesteramidové nanočástice

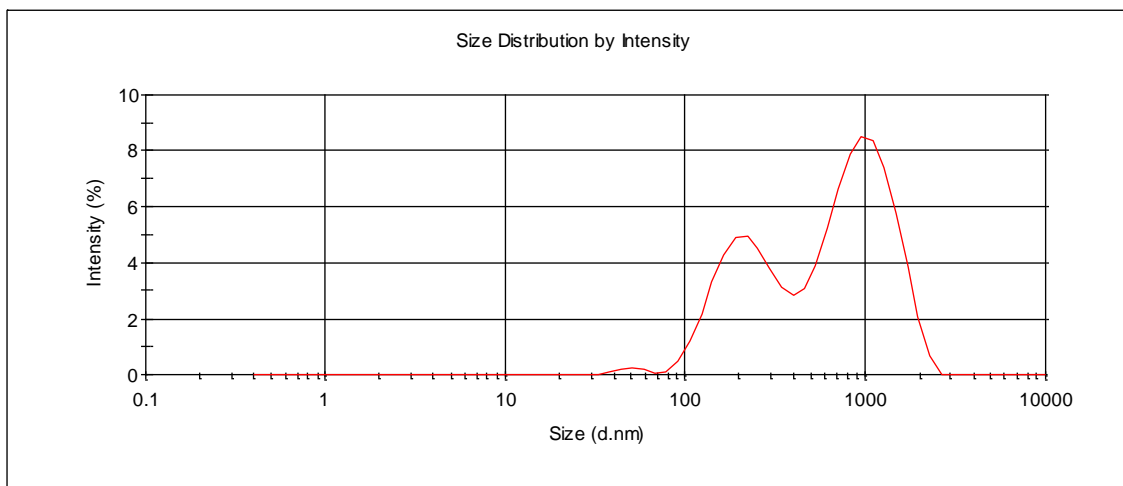


Tabulka 9-20: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), ochlazený ledovou lázní na přibližně 10°C. Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Měření provedena dvě hodiny po přípravě emulze.

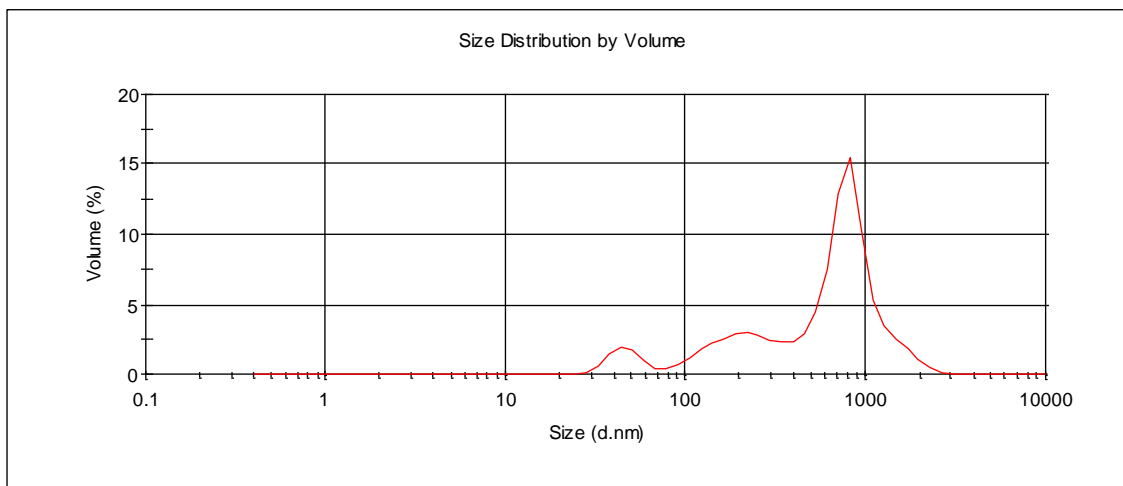
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
41	1008	64	226,9	34	0	0	48,16	7	206	21	859,2	70	6,68

Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-15A: Vzorek 41 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), ochlazený ledovou lázní na přibližně 10°C.

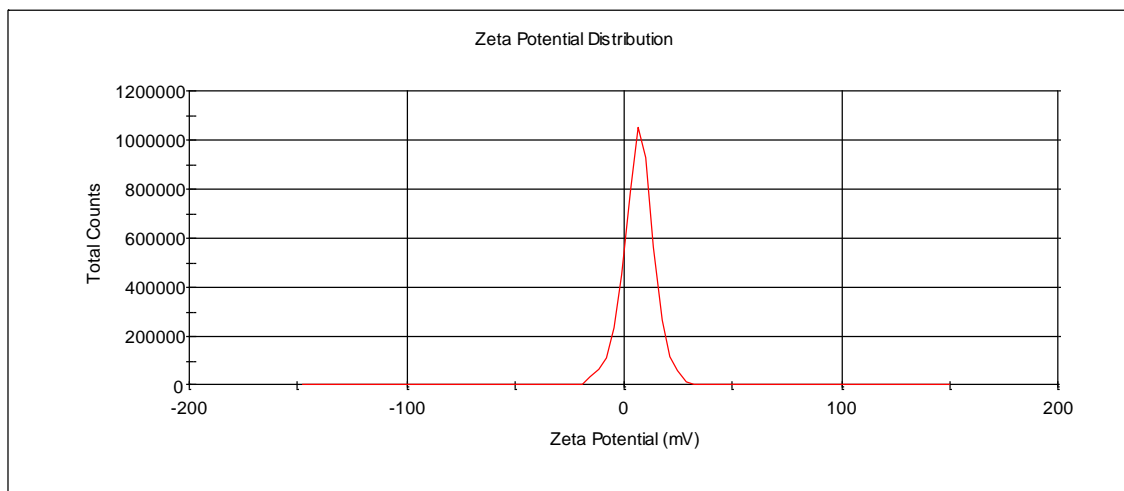


Obrázek 9-15B: Vzorek 41 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), ochlazený ledovou lázní na přibližně 10°C.



Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-15C: Vzorek 41 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 6% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), ochlazený ledovou lázní na přibližně 10°C.

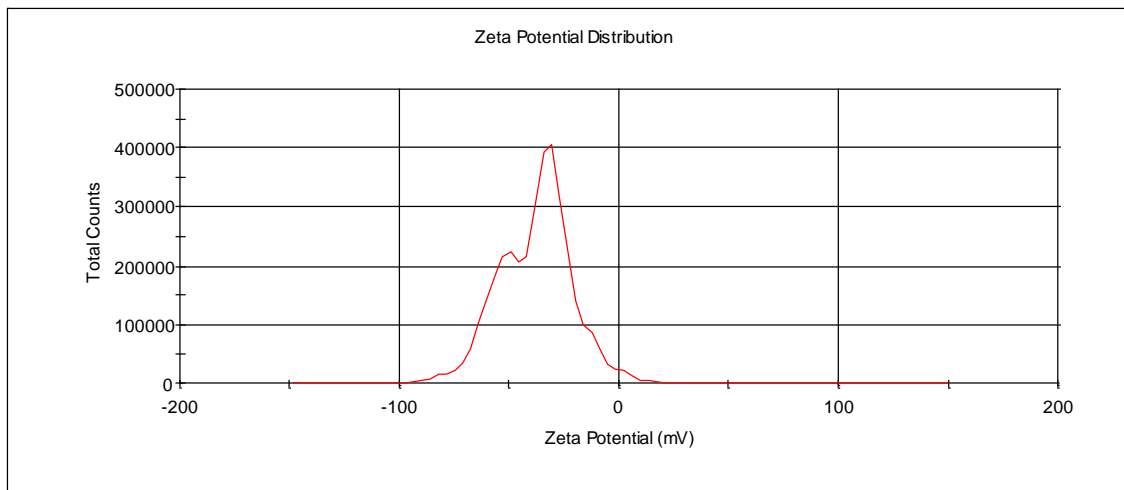


Tabulka 9-21: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), syćený 1% (vzorky 42, 43, 44) nebo 2% (vzorky 45 a 46) směsi rozpouštědel. Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Charakteristiky přeměřeny po dvou hodinách (vzorky 42 a 45) a po třech dnech (vzorky 43, 44 a 46) od počátku stabilizace. Vzorek 44 jsme odebírali ze dna uchovávací kádinky pro ověření přítomnosti či nepřítomnosti sedimentu.

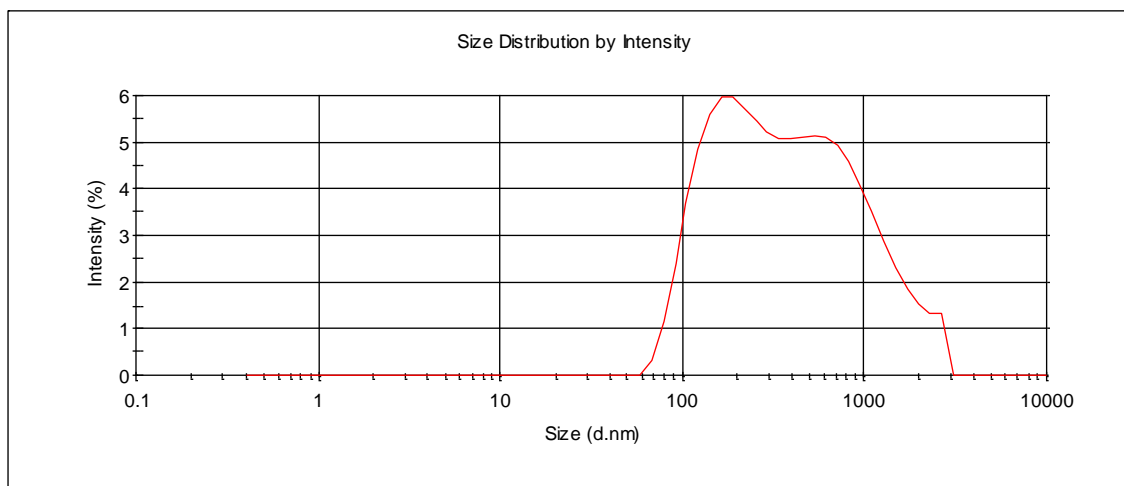
Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
42	478,8	97	2489	2	0	0	46,63	13	468,1	83	2243	3	-37,8
43	215,3	53	928,5	46	0	0	116,8	21	223,5	17	713,6	57	-35,9
44	201,6	52	803,2	49	0	0	171,2	38	748	61	0	0	
45	455,6	96	2331	3	0	0	26,56	20	82,15	14	521,3	62	-43,6
46	306,6	65	1779	31	53	2	49,02	20	296,8	48	854,5	15	-39,2

Polyesteramidové nanočástice

Obrázek 9-16: Vzorek 42 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 1% směsí rozpouštědel.



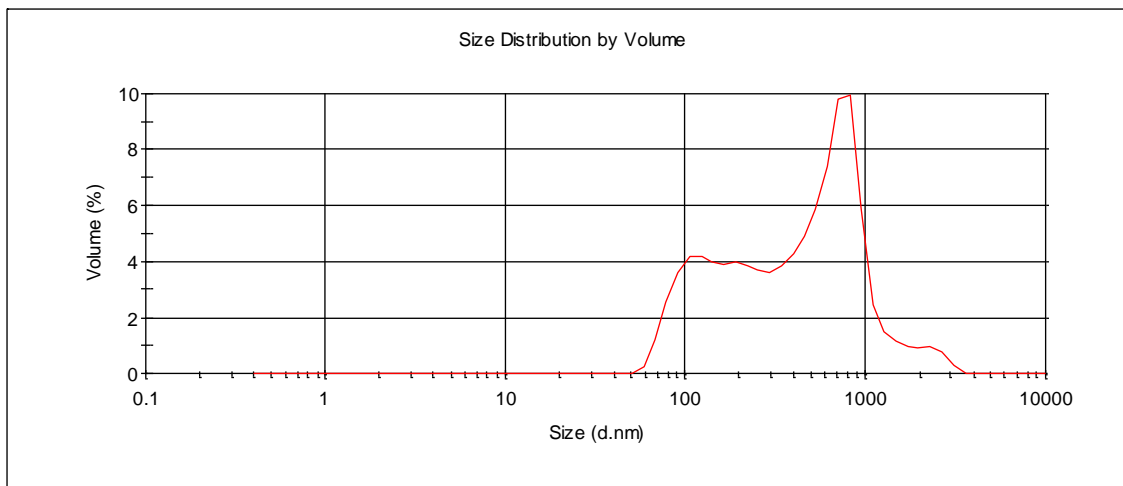
Obrázek 9-17A: Vzorek 43 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 1% směsí rozpouštědel.



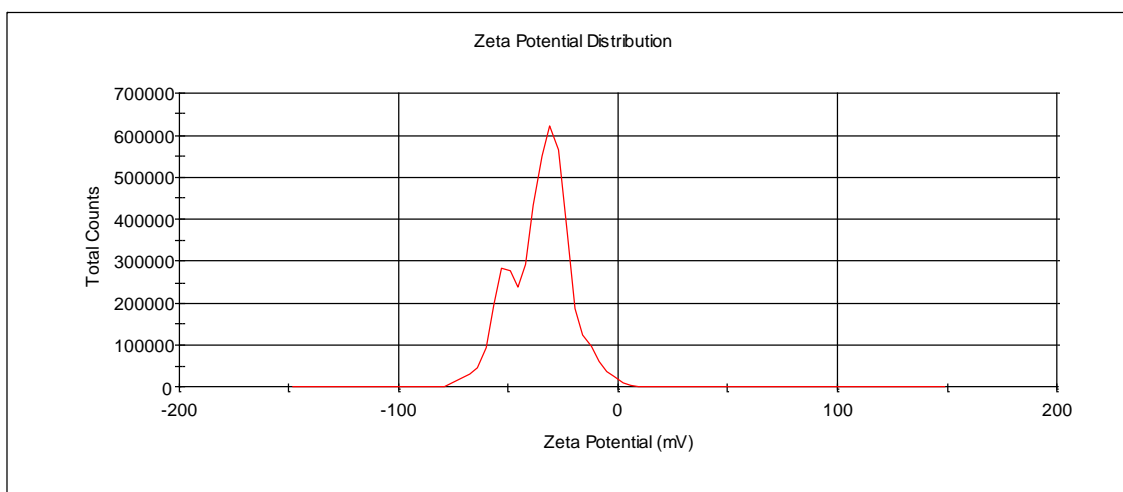
Obrázek 9-17B: Vzorek 43 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka.

Polyesteramidové nanočástice

Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 1% směsí rozpouštědel.



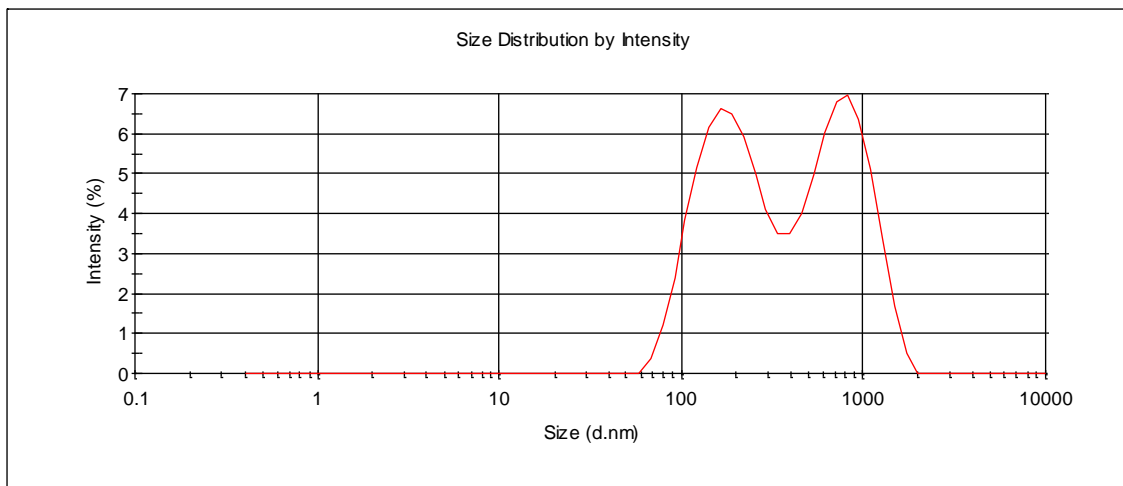
Obrázek 9-17C: Vzorek 43 – zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 1% směsí rozpouštědel.



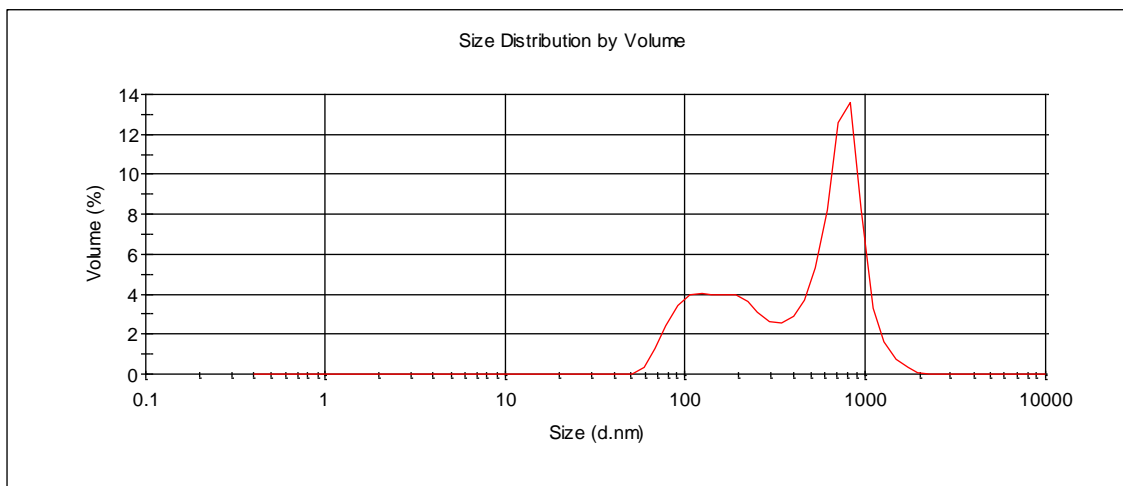
Obrázek 9-18A: Vzorek 44 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi

Polyesteramidové nanočástice

chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 1% směsí rozpouštědel, vzorek odebrán ze dna kádinky.



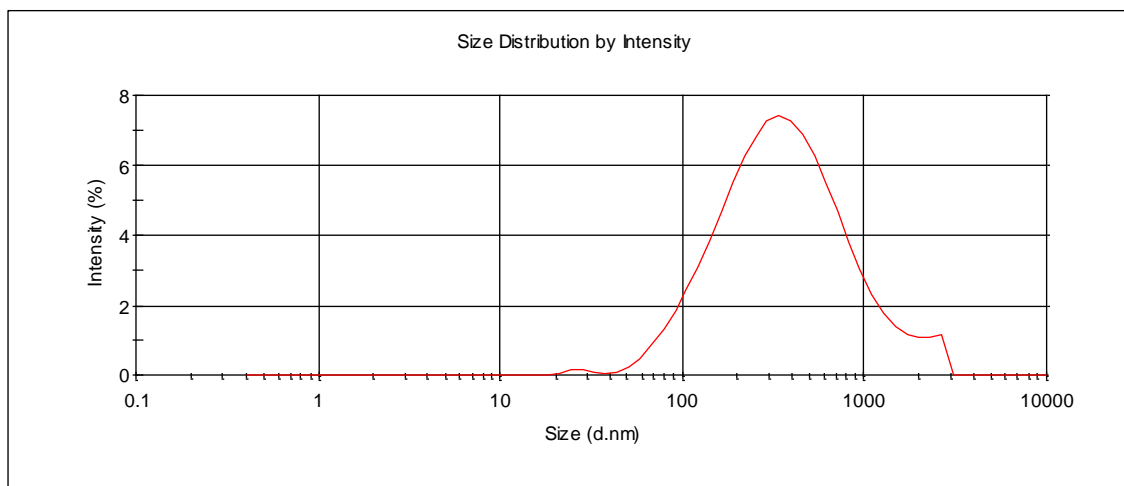
Obrázek 9-18B: Vzorek 44 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 1% směsí rozpouštědel, vzorek odebrán ze dna kádinky.



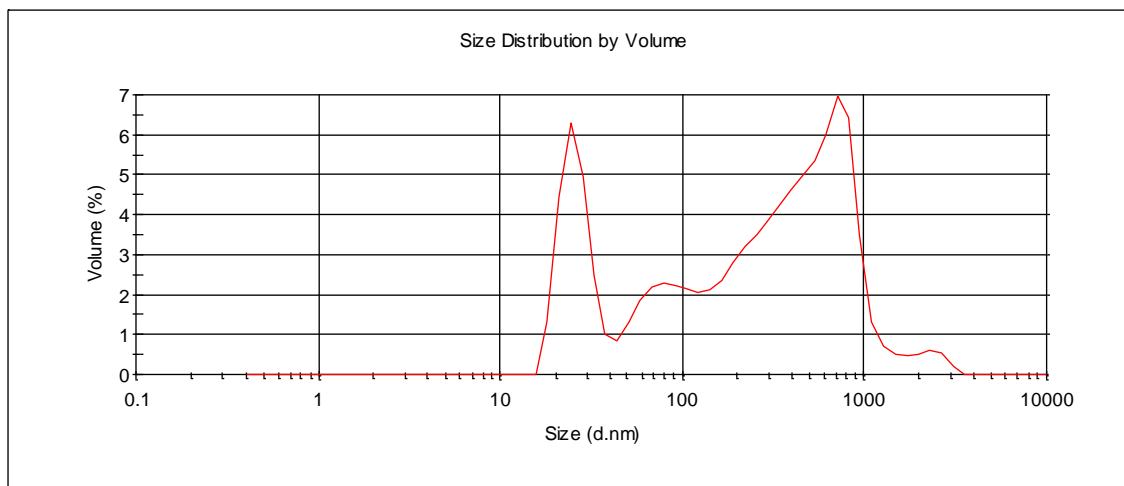
Obrázek 9-19A: Vzorek 45 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi

Polyesteramidové nanočástice

lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 2% směsí rozpouštědel.

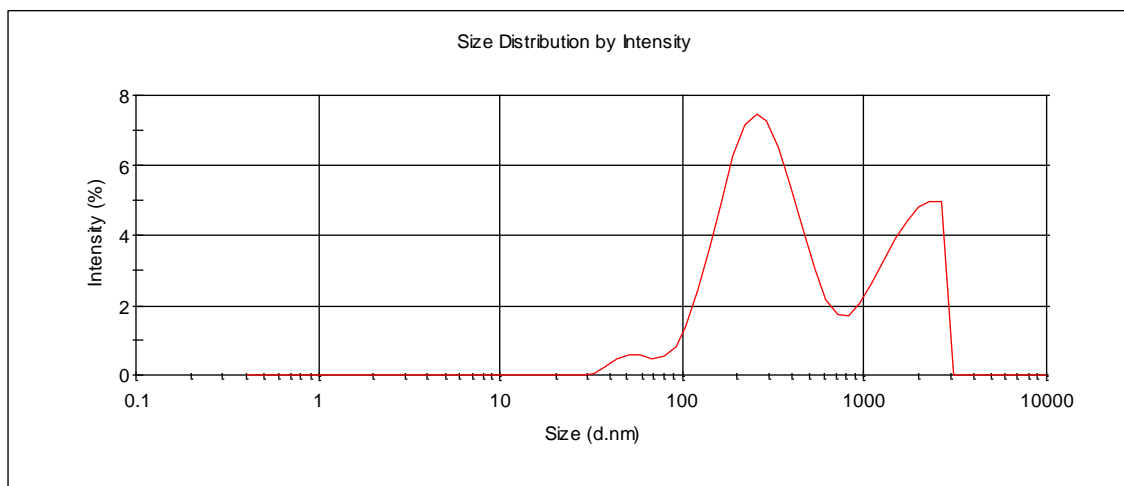


Obrázek 9-19B: Vzorek 45 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 2% směsí rozpouštědel.

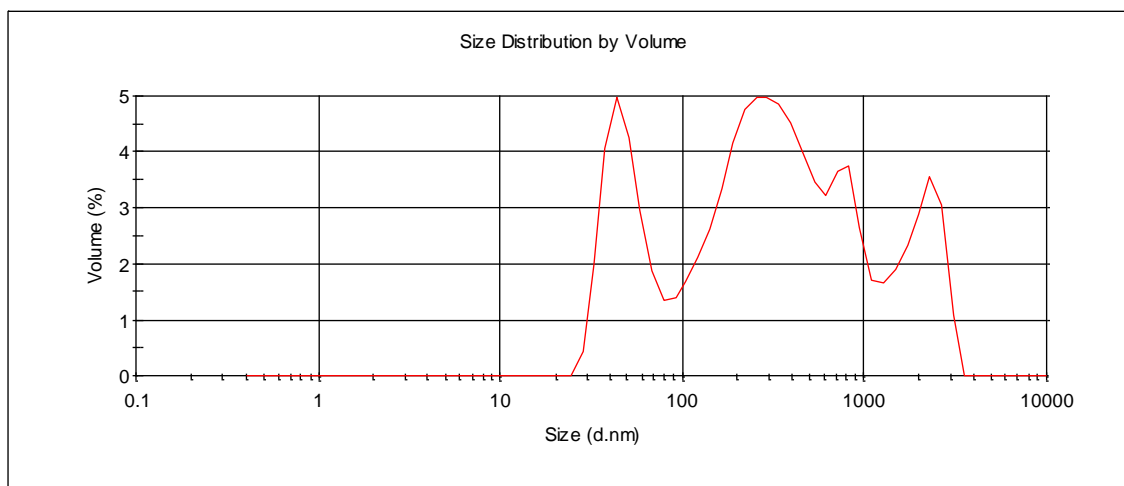


Obrázek 9-20A: Vzorek 46 – intenzitní průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 2% směsí rozpouštědel, odběr po

třech dnech.



Obrázek 9-20B: Vzorek 46 – objemový průměr nanočástic – frekvenční křivka. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2 a PEA 3 (50:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25), sycený 2% směsí rozpouštědel, odběr po třech dnech.



Tabulka 9-22: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2, PEA 3 a D5 (25:25:50) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Velikost a povrchový potenciál přeměřeny po dvou hodinách.

Polyesteramidové nanočástice

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
47	419	92	2162	6	0	0	28,35	26	278,5	461	764,7	22	-41,8

Tabulka 9-23: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 3% směs polyesteramidů PEA 2, PEA 3 a D5 (1:1:4) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Vzorek změřen za dvě hodiny po ukončení homogenizace.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
48	313,8	98	2451	1	0	0	52,25	22	368,9	76	2494	1	-48,4

Tabulka 9-24: Intenzitní a objemový průměr a zeta potenciál nanočástic. Vnitřní fáze: 4,5% směs polyesteramidů PEA 2, PEA 3 a D5 (1:1:4) ve směsi chloroformu a dichlormethanu (50:50). Vnější fáze: 1% vodný roztok směsi lecitinu a polysorbátu 20 (75:25). Postup přidávání vnitřní fáze B (vysv. v kap. 9.3.3). Měření jsme provedli po dvou hodinách od počátku stabilizace.

Číslo vzorku	Int Peak 1	%	Int Peak 2	%	Int Peak 3	%	Vol Peak 1	%	Vol Peak 2	%	Vol Peak 3	%	Zeta
49	662,9	100	0	0	0	0	490,4	91	2087	8	0	0	-44,5

10 Diskuse

10.1 K tématu

Úkolem bylo jednak rozšířit dosavadní znalosti o vlivu metody přípravy nanočástic na jejich velikost a zeta potenciál, jednak vyzkoušet možnosti přípravy nanočástic z polyesteramidů a jejich směsí.

Pro vyzkoušení vlivu dichlormethanu, ethylacetátu a methylformiátu jako rozpouštědel byl použit větvený terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a pentaerytritolu. Nanočástice byly testovány krátce po přípravě, nebo byly uchovávány několik dní.

Většina vzorků byla připravena z polyesteramidů. Byly k dispozici tři strukturálně odlišné typy s lineární konstitucí molekuly. Jeden z nich (PEA 1) byl v literatuře popsán, zbylé tři (PEA 2, 3 a 4) měly originální složení. Bylo zjištěno, že se tyto sloučeniny rozpouštějí v chlorovaných uhlovodících, proto byl jako rozpouštědlo použit chloroform, dichlormethan a jejich směs ve stejných hmotnostních dílech. Roztoky polyesteramidů byly připraveny v koncentracích od 1% do 6%.

Jako emulgátor byla použita dříve osvědčená směs 0,75% lecitinu s 0,25% polysorbátu 20. Obě složky působily synergicky. Lecitin je patrně výhradně používaným emulgátorem při výrobě nanoemulzí pro parenterální tukovou výživu. Polysorbát zvyšuje hodnotu HLB emulgátoru a také zvyšuje mísitelnost lecitinu ve vodě.

Nanočástice byly připraveny pomocí turbíny s frekvencí 26 000 otáček za minutu. Vzorky 1 až 11, 16 až 18, 20, 21, 23, 24, 25 a 50 a 51 byly přidávány pomalu do vnější fáze za míchání a po jejich přidání míchány další 1 minutu, vzorky ostatní byly připraveny rychlým přidáním olejové fáze a mícháním emulze po dobu 30 sekund, následovala přestávka 20 sekund a po ní byla emulze míchána 30 sekund. Při snaze dosáhnout co nejmenších nanočástic byla vyzkoušena možnost sytit vnější fázi omezeně mísitelným rozpouštědlem. Byla také vyzkoušena možnost zvýšit polaritu vnější vodné fáze rozpuštěním

elektrolytu. Byl vybrán chlorid sodný v koncentraci od 1% do 6%. V jednom vzorku byla vodná fáze alkalizována na pH 8,0. Některé ze vzorků byly uchovávány při laboratorní teplotě po dobu dvou, tří, čtyř i sedmi dní a potom byly opět měřeny jejich velikostní a povrchové parametry.

10.2 Velikost nanočástic

Byly hodnoceny dvě vlastnosti – velikost a zeta potenciál. Pro dostatečný přehled o distribuci velikosti nanočástic byly vyhodnoceny dva parametry v podobě intenzitního a objemového průměru. Intenzitní průměr je přístrojová charakteristika bezprostředně související s principem měření velikosti částic na základě kinetiky difrakce skvrn v měřené ploše. Objemový průměr je výhodný z hlediska interpretace, je však zatížen chybou převodu z intenzitního průměru. Charakteristikou byla plocha pod příslušným píkem závislosti frekvence na velikostním parametru.

10.2.1 Nanočástice připravené z nosiče 3P

Nosič, který měl označení 3P, byl terpolymerem kyselin mléčné a glykolové větvený 3% pentaerytritolem. Bylo hodnoceno celkem 8 vzorků, které se lišily rozpouštědlem nosiče a dobou uchovávání.

Vzorek č. 1 byl připraven za použití dichlormethanu jako rozpouštědla. Výsledky analýz jsou v tabulce 9-5 a obrázku 9-1A,B.

Z hlediska intenzitního průměru je rozdělení velikosti nanočástic unimodální se středním rozměrem 390 nm (obr. 9-1A).

V interpretaci podle objemového průměru byly prokázány tři velmi odlišné velikostní frakce vzorku (obr. 9-1B). Nejsilněji (50%) byla zastoupena frakce největších nanočástic se středním rozměrem kolem 600 nm. Poměrně velká byla frakce nejmenších nanočástic s rozměrem 94 nm. Po hodinovém intervalu (vzorek č. 2) došlo k mírnému snížení hodnoty intenzitního průměru, z hlediska

objemového průměru jsme prokázali naopak mírné zvýšení hodnot. Po pěti dnech (vzorek č. 3) se nanočástice zvětšily markantně (obr. 9-2A,B). Je možno očekávat nejen botnání, ale i aglomeraci především malých a středně velkých nanočástic.

Analogické vzorky č. 4 až 6 byly připravené za použití methylacetátu jako rozpouštědla. Zmenšení nanočástic s dobou uchovávání 5 dní je možno vysvětlit erozí, případně i desintegrací. Jedná se o situaci opačnou, než tomu bylo u nanočástic připravených z dichlormethanového roztoku. Vlivu rozpouštědla na změnu velikosti bude nutno věnovat další pozornost.

Obdobně velké nanočástice dvou velikostních typů s velmi odlišnými objemovými průměry 112 nm a 581 nm byly připraveny z methylformiátového roztoku (vzorky č. 7 a 8 na obrázku 9-3A,B).

10.2.2 Nanočástice připravené z nosiče PEA 1

Nosič PEA 1 byl syntetizován podle dříve popsaného postupu. Je popsán jako semikrystalický. O vysokém stupni krystalinity svědčí jeho značná křehkost a vzhled. Protože tento polyesteramid není rozpustný v esterech a je vysoce krystalický, byl jako rozpouštědlo použit pouze chloroform. K přípravě nanočástic byly použity pouze 1% roztoky. Možnost využít více koncentrovaný roztok dává možnost větší výtěžnosti postupu z daného objemu emulze.

Výsledky měření velikosti nanočástic jsou v tabulce 9-8. Bylo prokázáno, že při přípravě nanočástic dochází k tvorbě velikostně značně odlišných frakcí. Příčinou může být krystalizace při přípravě. Při uchovávání je možno předpokládat sedimentaci větších nanočástic a mikročástic. Vliv botnání a eroze je možno na základě dříve realizovaných experimentů zanedbat.

10.2.3 Nanočástice připravené z nosiče PEA 4

Polyesteramid PEA 4 se lišil od ostatních vysokým počtem reagujících

monomerů. Nepravidelnost řetězce měla vliv na jeho nižší schopnost krystalizovat. O vysokém podílu amorfní fáze svědčila jeho polotuhá konzistence. Výhodou tohoto nosiče je, že je rozpustný v dichlormethanu. V tabulce 9-9 jsou vzorky č. 50 a 51. Velikost nanočástic z hlediska jejich intenzitního průměru byla 400 nm. Objemová charakteristika prokázala dva druhy nanočástic. Větší měly průměr 500 nm, menší, kterých byla přibližně čtvrtina, měly objemový průměr 95 nm. Pozitivně je možno hodnotit velikostní stabilitu nanočástic uchovávaných ve stavu disperze. Parametry se po dvou dnech nezměnily.

10.2.4 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 1, 2, 3 a 4

Existuje několik možností, jak zabránit nebo zpomalit krystalizaci polymerů. Jednou z nich je jejich mísení (blending). Byla připravena směs stejných dílů všech čtyř polyesteramidů, které byly k dispozici. Z těchto směsí byly připraveny 1% a 3% roztoky v chloroformu a ve směsi stejných dílů chloroformu s dichlormethanem. Výsledky jsou v tabulkách 9-15 a 9-16. Z 1% chloroformového roztoku byla získána malá frakce mikročástic větších než 2 μm . Z hlediska objemové charakteristiky byly prokázány tři druhy nanočástic se středními hodnotami 250, 740 a 2250 nm (vzorek 12).

Zajímavé je, že po zvýšení koncentrace nosiče na 3% se frakce mikročástic nevytvořila (vzorek 13). Je možné, že při vyšší koncentraci nosiče proběhla krystalizace v menším rozsahu vlivem vyšší viskozity roztoku a kratší doby jeho solidifikace.

Směs chloroformu s dichlormethanem se jako rozpouštědlo polyesteramidů osvědčila evidentně lépe než samotný chloroform, jak je patrné z porovnání dat v tabulkách 9-15 a 9-16 a na obrázku 4 (vzorek 14). Podle intenzitní charakteristiky měly produkty unimodální distribuci velikosti (obr. 9-8A), z 3% roztoku byly větší, což je možno vysvětlit vyšší viskozitou. Objemová charakteristika odhalila malou (16%) frakci částic menších než 100 nm (obr. 9-8B). Z 3% roztoku byly získány tři druhy nanočástic (obr. 9-9), více než

polovina měla střední rozměr 750 nm, byl získán významný podíl nanočástic větších než 100 nm. Z výše uvedeného plyne, že za daných podmínek je vhodnějším rozpouštědlem směs chloroformu se stejným dílem dichlormethanu než samotný chloroform.

10.2.5 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 1 a PEA 4 v poměru 3:1

Tyto produkty polykondenzační reakce představovaly dva extrémní případy z hlediska jejich předpokládané krystalinity. PEA 1 byl evidentně značně krystalický, zatímco PEA 4 se projevoval jako značně amorfní. Byly testovány 1% roztoky této směsi v chloroformu a v chloroformu s dichlormethanem.

Dispergací chloroformového roztoku byly získány nanočástice s unimodální distribucí a střední velikostí kolem 250 nm (tabulka 9-10, vzorek č. 16). Po uchování vzorku po dobu 2 a 7 dní se z hlediska objemového průměru začala objevovat frakce menších a větších nanočástic a mikročástic. Je možno předpokládat proces dokončování rozdělování rozpouštědla a v pozdějším stádiu proces aglomerace. Změna postupu zkrácením doby míchání s přestávkou (vzorek 19, obr. 9-4A,B) vedla ke zvýšení polydisperzity vznikem velmi malých nanočástic (39% objemově kolem 35 nm) a malé frakce (2% intenzitně i objemově) mikročástic větších než 2 μm . Záměna chloroformu za jeho směs s dichlormethanem nevedla k jednoznačně lepším produktům (vzorky 20 a 21). Modifikace postupu přípravy krátkodobým mícháním s přestávkou (vzorek 22) měla vliv na větší polydisperzitu, tak jako u vzorku 19.

10.2.6 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 1 a PEA 4 v poměru 1:1

Zvýšením podílu složky PEA 4 ve směsi byl očekáván vyšší podíl amorfní fáze s lepšími možnostmi dispergace. V tabulce 9-12 je vzorek č. 23, který byl

připraven z 1% chloroformového roztoku. Na obrázku 9-6A je vidět, že byly získány nehomogenní nanočástice s intenzitním průměrem vyšším než 500 nm. Z hlediska objemového průměru měla polovina nanočástic rozměr kolem 800 nm, významný podíl měl průměr 240 nm a další 114 nm. Zajímavé je zmenšení nanočástic po jejich dvoudenním uchování (vzorek 24). Tento zdánlivý paradox je pravděpodobně způsoben pomalou solidifikací nanočástic při rozdělování rozpouštědla do vnější vodné fáze. Ke stejnému jevu došlo u vzorků č. 17 a 24. Po sedmi dnech uchování se projevila aglomerace nanočástic za vzniku mikročástic větších než 1 μm .

Po zvýšení koncentrace roztoku směsi PEA 1 a 4 v chloroformu na 3% (vzorek 26) byly získány nanočástice s rozměrem kolem 500 nm, stejně jako z 1% roztoku (vzorek 23). Změna rozpouštědla za směs chlorovaných uhlovodíků při 3% koncentraci měla důsledek ve značné polydisperzitě nanočástic s největším podílem, který měl objemový průměr 900 nm (vzorek 27).

10.2.7 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 2 a PEA 3 v poměru 1:1

Uvedená směs dvou polyesteramidů byla rozpuštěna v chloroformu nebo v jeho směsi s dichlormethanem na 1%, 3% nebo 6% roztok. Kromě modifikace vnitřní fáze byla modifikována fáze vnější sycením 1% nebo 2% rozpouštědla polyesteramidů. Opatření měla za cíl zpomalit proces rozdělování rozpouštědla. Dalším opatřením bylo přidání chloridu sodného v 1%, 4% nebo 6% koncentraci do vnější fáze. Účelem bylo zvýšit kontrast mezi fázemi zvýšením polarizace vnější fáze. Tato fáze byla také modifikována zvýšením ionizace lecitinu zvýšením hodnoty pH na 8,0 nebo ochlazením vnější fáze. Výsledky měření velikosti částic jsou v tabulkách 9-17 až 9-21.

Vzorky č. 28 a 29 byly připraveny z 1% roztoků v různých rozpouštědlech. Výsledky měření velikosti částic ilustrují, že je výhodnější směs chloroformu s dichlormethanem než samotný chloroform. Obdobný závěr platí u 3% roztoků

(vzorky č. 30 a 31). Po třech dnech se u vzorku připraveného ze směsi rozpouštědel projevila vyšší polydisperzita.

Zvýšením pH vnější fáze na 8,0 byla zvýšena ionizace lecitinu. Opatření mělo výrazný efekt ve zvýšení polydisperzity, jak je patrné z obrázku 9-11A,B (vzorek 34). Pozitivní účinek v získání poloviční frakce nanočástic s objemovým průměrem 44 nm byl znevýhodněn 30% objemovou frakcí mikročástic se středním rozměrem těsně nad 1000 nm.

Ovlivnění polarizace vnější frakce 1% chloridem sodným mělo spíše negativní účinek ve zvýšené polydisperzitě (vzorek 35). Po zvýšení koncentrace soli na 4% bylo prokázáno významné zmenšení rozměru nanočástic i polydisperzity jejich velikosti (vzorek 36). Po čtyřech dnech byla prokázána mírná aglomerace, případně i botnání, zvětšení intenzitního i objemového průměru asi o 10% (vzorek 37). Vzorek měl relativně malou polydisperzitu, jak je patrné z obrázku 9-12A,B.

Alkalizace vnější fáze na pH 8,0 s 4% chloridu sodného (vzorek 38) měla stejně jako u vzorku alkalizovaného bez soli (vzorek 34) vliv na získání frakce velmi malých (60 nm) nanočástic. Na obrázku 9-13 je zřejmé, že se jedná o dva druhy nanočástic. Malé s rozměrem kolem 60 nm představovaly 22% z celkového objemu (obr. 9-13A), velké zbylých 78% (obr. 9-13B).

Vzorky č. 39 a 40 byly připraveny ve vnější fázi obsahující 6% roztok soli. Toto opatření je možno hodnotit pozitivně, protože produkt má menší rozměr částic (320 nm) s malou polydisperzitou, jak je vidět z obrázku 9-14A,B. Do druhého dne se obě střední hodnoty rozměru nanočástic asi o třetinu zvýšily, což svědčí o nestabilitě systému (vzorek 40).

Zvýšení koncentrace polyesteramidů na 6% a ochlazení vnější fáze při emulgaci na 10°C mělo negativní účinek. Většina nanočástic vzorku č. 41 měla střední intenzitní průměr 1000 nm, objemový 860 nm. Z obou variant na obrázku 9-15 je patrné, že největší podíl (asi dvě třetiny) byl o velikosti kolem 1000 nm (intenzitně), menší (třetina) měl střední intenzitní průměr 227 nm. Frakce velmi malých nanočástic nebyla z hlediska intenzitní charakteristiky prokázána, z hlediska objemového průměru měla střední rozměr 48 nm a představovala nezanedbatelných 7% nanočástic (obr. 9-15B).

Sycením vnější fáze bylo zamýšleno dosáhnout delší dobu pro účinnější dispergaci pomalejší solidifikací kapalně vnitřní fáze s cílem získat jejich co nejmenší rozměr. K sycení vodné fáze byla využita 1% nebo 2% směs stejných dílů dichlormethanu a chloroformu. Bylo možno předpokládat, že dojde ke zvýšené rozpustnosti, případně účinné dispergaci rozpouštědel vlivem emulgátorů. Z parametrů velikosti nanočástic vzorků č. 42 a 46 je možno tvrdit, že toto opatření nebylo úspěšné. Nanočástice byly polydisperzní, obsahovaly frakci velmi malých nanočástic, jejichž velikost se při uchovávání zvyšovala aglomerací. Na obrázku 9-17B je dokumentováno, že ve vzorku č. 43, který byl měřen tři dny po přípravě, byly z hlediska objemového průměru prokázány tři velikostní druhy částic. Proto byl v tomto intervalu odebrán vzorek ze dna nádoby. Jak je patrné z obrázku 9-18A,B, za tři dny po přípravě nebyla prokázána sedimentace.

Docházelo také k velmi pomalému rozdělování rozpouštědla, což se týká především nanočástic připravených ve vnější fázi sycené 2% rozpouštědla z hlediska intenzitního průměru (vzorky č. 45 a 46). Na obrázku 9-19A je distribuce velikosti nanočástic prakticky unimodální. Z hlediska objemového průměru (obr. 9-19B) je zřejmé, že vzorek č. 45 obsahuje minimálně 4 velikostně odlišné druhy částic. Nanočástic s objemovým průměrem 27 nm bylo 20%. Tyto vznikly na základě fúze částic dispergovaného rozpouštědla a následné dispergace nízkoviskózních nanočástic z velmi zředěného roztoku nosičů. Největší nanočástice vznikly aglomerací pomalu tuhoucích mikročástic a nanočástic v procesu dlouhodobé dispergace.

Důkazem aglomeračních dějů, ke kterým docházelo při nedokonalé solidifikaci částic, je vzorek č. 46, který je tři dny uchovávaným vzorkem č. 45. Na obrázku 9-20A je značná polydisperzita zřetelná již z hlediska intenzitní charakteristiky velikosti. Objemová charakteristika odhalila čtyři velikostně zřetelně odlišné částice (obr. 9-20B). Pozoruhodný je především velký podíl mikročástic, který není přístrojem vyhodnocen. Jejich rozměr patrně přesahuje přístrojový limit, který je výrobcem deklarován na hodnotě 3 μm . O aglomeraci svědčí posun ve středním rozměru frakce nejmenších nanočástic. Původní hodnota ve vzorku č. 45 byla 27 nm, za tři dny byla naměřena hodnota 49 nm, podíl této frakce se

neměnil, činil 20% (obrázky 9-19B a 9-20B).

10.2.8 Nanočástice připravené ze směsi nosičů PEA 2, PEA 3 a D5

V tabulkách 9-22 až 9-24 jsou vzorky č. 47 až 49. Vzorek č. 47 byl připraven z 3% roztoku směsi nosičů v poměru 1:1:2 v chloroformu a dichlormethanu. Byla tak získána velmi polydisperzní směs nanočástic. Pozoruhodné je, že obsahovala objemově 26% nanočástic menších než 30 nm. Totéž se týká směsi nosičů v poměru 1:1:4. Ani zvýšení koncentrace nosičů z 3% na 4,5% nevedlo ke zlepšení parametrů produktu, částice byly větší, což souvisí s vyšší viskozitou roztoků.

10.3 Zeta potenciál

Zeta potenciál je důležitou charakteristikou nanočástic, která je jednou z podmínek jejich stability v disperzi. Jeho hodnota přesahující 60 mV je pokládána za dostatečnou pro velmi dobrou stabilitu disperze, hodnota nad 30 mV dává předpoklad dostatečné stability.

V tabulkách č. 9-5 až 9-24 jsou hodnoty zeta potenciálu nanočástic. Jejich obvyklé hodnoty pro polyestery jsou v rozmezí od 40 do 53 mV. Nižší hodnoty (28 mV) byly naměřeny u nanočástic připravených z polyesteru 3P z methylformiátového roztoku (vzorky 7 a 8). Příčinou může být velká rychlost solidifikace, která neposkytuje dostatek času pro strukturalizaci povrchu. Může se jednat o zvýšenou koncentraci koncových karboxylových skupin směřujících jako povrchově aktivní část řetězce do vodné fáze. Druhou možností je nepravidelná distribuce lecitinu na mezifázi při velmi rychlé dispergaci.

Typický průběh distribuce hodnot zeta potenciálu v relativně úzkém rozmezí hodnot je ilustrován na obr. 9-3C, který popisuje vzorek č. 8. Na obr. 9-5, 9-9C a 9-10 je frekvenční křivka nepravidelná, složená buď z více píků (obr. 9-9C, 9-10) nebo značně rozšířená (obr. 9-5). Tyto záznamy jsou typické pro

polydisperzní produkty, jakými jsou v tomto případě vzorky č. 15, 20 a 33.

Extrémně polydisperzní z hlediska velikosti částic byl vzorek č. 34. Tomu také odpovídají hodnoty zeta potenciálu, který má hodnoty píků -126 mV, -83 mV a 34 mV. V tomto případě se nabízí přímá souvislost s elektromigračním chováním tří velikostně odlišných frakcí 41 nm, 147 nm a 1285 nm na obr. 9-11A, nebo 44 nm, 137 nm a 1079 nm na obr. 9-11B. Médium bylo alkalizováno hydroxidem sodným na hodnotu pH 8,0.

Velmi nízké hodnoty zeta potenciálu byly naměřeny také u nanočástic, které byly připraveny z polyesteramidů ve vnější fázi obsahující 4% nebo 6% chloridu sodného. Projevila se silná závislost na koncentraci soli. Při její nulové koncentraci byl zeta potenciál 44 mV (vzorek 32), při 1% chloridu sodného byl 26 mV (vzorek 35), při 4% byl pouhých 8 mV (vzorek 36) a při 6% dokonce 5 mV (vzorek 39).

Opačný efekt ve smyslu významného zvýšení zeta potenciálu byl naměřen v případě alkalizace vodné fáze na hodnotu pH 8,0. Je tomu u vzorku č. 34, který měl hodnotu zeta potenciálu 75 mV. Vzorek č. 32 byl připraven za stejných podmínek bez úpravy pH hydroxidem sodným. Měl hodnotu zeta potenciálu 41 mV, tedy značně nižší.

Zajímavá z hlediska hodnoty zeta potenciálu je kombinace 4% soli a zvýšení pH na 8,0 (vzorek 38). Oba faktory se projevily na výsledné hodnotě 16 mV. Na obr. 9-13C jsou tři hodnoty zeta potenciálu, hlavní pík je v oblasti kladných hodnot. Pro tento překvapivý a ojedinělý výsledek nemámě v této fázi vysvětlení. Jedná se patrně o artefakt, protože podle záznamu by ve stejném vzorku měly být částice, které mají zeta potenciál -120 mV a také takové, které mají tuto hodnotu +100 mV (obr. 9-13C).

Po zvýšení koncentrace elektrolytu na 6% byl vzorek č. 39 z hlediska zeta potenciálu také naměřitelný, na záznamu obr. 9-14C jsou hodnoty v celém rozsahu přístroje.

Zajímavá je velmi nízká hodnota zeta potenciálu vzorku č. 41 (+7 mV) na obrázku 9-15C, který byl připraven při nižší teplotě (přibližně 10°C). Podle pracovní hypotézy by se mohlo jednat o asociaci molekul lecitinu a vyrušení náboje jeho amfolytickým charakterem.

Polyesteramidové nanočástice

Efekt syčení je patrný nejen v polydisperzitě velikosti částic, ale také v jejich zeta potenciálu. U vzorků č. 42 a 43 byl prokázán výrazný účinek aglomerace částic na jejich velikost. Vliv tohoto jevu na zeta potenciál byl slabší, jak je patrné z obr. 11-16 a 11-17C. Superpozicí těchto obrázků je patrný posun z oblasti vyšších absolutních hodnot do nižších. Tento posun souvisí se zánikem nejmenších nanočástic.

11 Závěry

- A. Bylo zjištěno, že při přípravě nanočástic z polyesterů, polyesteramidů a jejich směsí emulzní metodou se z hlediska jejich velikosti a povrchového náboje významně uplatní faktory, které souvisí s parametry vnitřní i vnější fáze.
- B. Kvalita použitého rozpouštědla reprezentovaná chloroformem a jeho směsí s dichlormethanem ovlivnila velikost nanočástic. Rozdíl ve velikosti mohl být způsoben rozdílnou viskozitou roztoků, případně rozdílnou rychlostí rozdělování rozpouštědla mezi vnitřní a vnější fázi.
- C. Koncentrace nosiče v rozmezí od 1% do 6% je významným faktorem z hlediska ovlivnění velikosti nanočástic.
- D. Vliv rozpouštědla na zeta potenciál byl prokázán u methylformiátu. Příčinou mohla být odlišná rychlost jeho rozdělování do vnější fáze.
- E. Pro konstatování vlivu časového režimu míchání a případných přestávek nebylo získáno dostatečné množství podkladů.
- F. Přidání elektrolytu a látky upravující hodnotu pH vnější fáze jsou faktory, které významně ovlivňují velikost nanočástic i jejich zeta potenciál tak, že modifikují vlastnosti emulgátorů a mísitelnost rozpouštědel ve vnější fázi.
- G. Nanodisperze je po přípravě při obyčejné teplotě relativně stabilní po dobu několika dní, změny velikosti částic v počáteční fázi jsou způsobeny rozdělováním rozpouštědla, v pozdějších jejich aglomerací.

12 Literatura

- [1] Biswas P., Wu Ch.-Y., Nanoparticles and the Environment, J. Air & Waste Manage. Assoc., 2005, č. 55, s. 709
- [2] The Royal Society, Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties, London, Royal Society, 2004, č. 4
- [3] Wissing S. A., Kayser O., Muller R. H., Solid-lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, Adv Drug Deliv Rev, 2004, č. 56, s. 1257-1272
- [4] Bala I., Hariharan S., Kumar M. N., PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2004; č. 21, s. 387-422
- [5] Kumar N., Langer R. S., Domb A. J., Polyanhydrides, Adv Drug Deliv Rev, 2002, č. 54, s. 889-910
- [6] Hoet P., Hohlfeld I. B., Salata O. V., Nanoparticles – known and unknown health risks, J Nanobiotechnol, 2004, č. 2, s. 12
- [7] Thassu D., Deleers M., Pathak Y., Nanoparticulate drug delivery systems, New York, Informa Healthcare USA, Inc., 2007, s. 57
- [8] Na K., Lee K. H., Bae Y. H., pH sensitivity and pH dependent interior structural change of self assembled hydrogel nanoparticles of pullulan acetate/oligo-sulfonamide conjugate, J Control Release, 2004, s. 513
- [9] Fisher M., Vogtle F., Dendrimers: from design to application – a progress report, Angew Chem Int Ed Engl, 1999, s. 885
- [10] Ihre H. R., Gagne L., Frechet J. M. J., Szoka F. C., Polyester dendritic systems for drug delivery applications: in vitro and in vivo evaluations, Bioconjug Chem, 2002, č. 13, s. 453
- [11] Liu M. J., Kono K., Frechet R., Water soluble dendritic unimolecular micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer, J Control Release, 2000, č. 65, s. 121
- [12] Sahoo K. S., Dilnawaz F., Krishnakumar S., Nanotechnology in ocular drug delivery, Drug Disc Today, 2008, č. 13, s.146
- [13] Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A. Mizushima Y., Drug

- incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery systém, *J Control Release*, 2005, č. 103, s. 93
- [14] Vogel V., Lochmann D., Weyermann J., et al., Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: preparation, physical properties and intracellular distribution, *J Control Release*, 2005, č. 103, s. 99
- [15] Dinaure N., Lochmann D., Demirhan I., et al., Intracellular tracking of protamin / antisense oligonucleotides nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation, *J Control Release*, 2004, č. 96, s. 497
- [16] Lochmann D., Vogel V., Weyermann J., et al., Physicochemical characterization of protamine phosphorothionate nanoparticles, *J Microencapsul*, 2004, č. 21, s. 643
- [17] Ando T., Yamasaki M., Suzuki K., *Protamines: Isolation, Charakterization, Structure and Function*, Berlin, Springer, 1973
- [18] Huang M., Khor E., Lim L. Y., Uptake and cytotoxicity of Chitosan molecules and nanoparticles effects of molecular weight and degree on deacetylation, *Pharm Res*, 2004
- [19] Janes K. A., Fresneau M. P., Marazuela A. Fabra A., Alonso M. J., Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin, *J Control Release*, 2001, č. 73, s. 255
- [20] Ma Z. S., Lim L. Y., Uptake of Chitosan and associated insulin in the caco-2 cell monolayers: a comparison between Chitosan molecules and Chitosan nanoparticles, *Pharm Res*, 2002, č. 19, s. 1488
- [21] Illum L., Gill I. J., Hinchcliffe M., Fischer A. N., Davis S. S., Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines, *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, č. 51, s. 81
- [22] Muller B. G., Leuenberger H., Kissel T., Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting: an optimized manufacturing technique, *Pharm Res*, 1996, č. 13, s. 32
- [23] Balthasar S., Michaelis K., Dinauer N., Briesen V. H., Kreuter J., Langer K., Preparation and characterization of antibody modified gelatin nanoparticles as carrier system for uptake in lymphocytes, *Biomaterials*, 2005, č. 26, s. 2723