

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

Biodegradabilní submikronové částice
s terbinafinem.

rigorózní práce

Mgr. Barbora Sulíková

Hradec Králové 2012

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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Barbora Sulíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc., za odborné vedení a poskytnuté rady při vypracování diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Kandidát: Mgr. Barbora Sulíková

Konzultant: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Název diplomové práce: Biodegradabilní submikronové částice s terbinafinem.

Teoretická část práce je věnovaná fyzikálně emulzním a emulzně polymeračním metodám přípravy nanočásticových systémů, klasifikaci nanočástic s hlavním důrazem na informace o nanokapsulách a nanosférách z biodegradabilních polymerů a jejich fyzikální stabilitě ve formě nanodisperzí. Experiment je zaměřen na studium formulačních faktorů vedoucích k dosažení maximální účinnosti dispergace. Velikost nanočástic byla prezentována formou intenzitního průměru jako výsledku měření metodou PCS. Byl prokázán pozitivní účinek přidání terbinafinu a lecitinu do vnitřní fáze emulze. Byl využit kombinovaný účinek turbulentního toku rozpouštědla a dispergace stříhem. Byla potvrzena dostatečná účinnost cetrimidu jako emulgátoru při velmi nízkých koncentracích a nevhodnost přísady chloridu sodného do vnější fáze emulze. Způsob dispergace v koloidním mlýnu v průtoku poskytuje kvalitnější nanodisperze než dispergace v homogenizátoru vsádkovým způsobem.

ABSTRACT

Charles Univerzity in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Technology

Candidate: Mgr. Barbora Sulíková

Consultant: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Title of Thesis: Biodegradable submicron particles with terbinafine.

The theoretical part is dealing with physical emulsion and emulsion polymer method preparation of nanoparticles systems, classification of nanoparticles with the main emphasis on information of nanocapsules and nanospheres made from biodegradable polymers and their physical stability in the form of nanodispersions. Experimental part of the thesis is focused on study of formulation factors leading to the achievement to maximal effectivity of the dispersion. The size of the nanoparticles was presented by the form of intensity diameter as a result of the measurement by the method of PCS. The positive effectivity was proved with addition of the terbinafine and lecithine to the internal phase of the emulsion. The combined effect of turbulent flow of the solvent and dispersion shear was used. There was confirmed sufficient efficiency of the cetrimide as emulsifier at very low concentrations and as inappropriate ingredient was revealed sodium chloride used as additive in external phase of the emulsion. Continuous flow method provides a better quality nanodispersion than dispersion in the homogeniser by the batchwise method.

OBSAH

1	ZADÁNÍ PRÁCE	11
2	ÚVOD.....	12
3	TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1	Seznam zkratk k teoretické části.....	13
3.2	Metody pro přípravu polymerních nanočástic	14
3.2.1	Emulzní polymerace	15
3.2.1.1	Konvenční emulzní polymerace	15
3.2.1.2	Emulzní polymerace bez povrchově aktivních látek	16
3.2.1.3	Mini-emulzní polymerace	16
3.2.1.4	Mikro-emulzní polymerace	17
3.2.2	Mezifázová polymerace.....	18
3.2.3	Řízená/living radikálová polymerace	18
3.3	Klasifikace nanočástic.....	20
3.3.1	SLN	20
3.3.2	Liposomy.....	21
3.3.3	NLC.....	21
3.3.4	Nanoslupky.....	22
3.3.5	Kvantové tečky	23
3.3.6	Supermagnetické nanočástice.....	23
3.3.7	Dendrimery.....	24
3.3.8	Fullereny	24
3.3.9	Nanokapsuly.....	25
3.3.9.1	Definice nanokapsul.....	25
3.3.9.2	Metody přípravy nanokapsul.....	26
3.4	Stabilita nanočástic	31
3.4.1	Vliv lékové formy na stabilitu	31
3.4.2	Sedimentace/krémovatění	32
3.4.3	Aglomerace	33
3.4.4	Růst krystalů.....	34

3.4.5	Změna krystalického stavu.....	35
3.4.6	Chemická stabilita.....	35
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
4.1	Použité přístroje.....	36
4.2	Použité chemikálie.....	36
4.3	Seznam zkratk k praktické části.....	37
4.4	Pracovní postup.....	38
4.4.1	Příprava báze terbinafinu.....	38
4.4.2	Příprava vnitřní fáze.....	38
4.4.3	Příprava vnější fáze.....	38
4.4.4	Příprava suspenze nanočástic.....	39
4.4.5	Měření velikosti nanočástic.....	40
4.5	Princip měření velikosti nanočástic metodou PCS.....	41
5	VÝSLEDKY.....	42
5.1	Tabulky.....	43
5.2	Obrázky.....	72
6	DISKUSE.....	81
6.1	K zaměření práce a řešenému tématu.....	81
6.2	K vlivu koncentrace terbinafinu na granulometrické parametry nanočástic.....	82
6.3	K vlivu koncentrace lecitinu na granulometrické parametry nanočástic.....	83
6.4	K vlivu koncentrace acetonu na granulometrické parametry nanočástic.....	83
6.5	K vlivu koncentrace methanolu na granulometrické parametry nanočástic.....	84
6.6	K vlivu koncentrace cetrimidu ve vnější fázi na granulometrické parametry nanočástic.....	84
6.7	K vlivu koncentrace ethylmethyketonu ve vnější fázi na granulometrické parametry nanočástic.....	85
6.8	K vlivu chloridu sodného ve vnější fázi na granulometrické parametry nanočástic.....	85
6.9	K vlivu způsobu dispergace emulze na granulometrické parametry nanočástic.....	86
7	ZÁVĚRY.....	87
8	SEZNAM LITERATURY.....	88

Seznam obrázků

Obr. 1: Struktura dendrimery	24
Obr. 2: Typy nanokapsul	25
Obr. 3: Nanoprecipitační metoda.....	27
Obr. 4: Emulzně difúzní metoda.....	28
Obr. 5: Metoda dvojité emulze	29
Obr. 6: Metoda emulzní koacervace	30
Obr. 7: Sedimentace v a) deflokulované suspenzi, b) flokulované suspenzi, c) suspenzi založené na „open flocs“	32
Obr. 8: Schématické znázornění Ostwaldova zrání	34
Obr. 9: Zetasizer	40
Obr. 10: Vliv koncentrace BT. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 1-6.....	72
Obr. 11: Vliv koncentrace BT. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 3 %, postup přípravy A. Vzorky 7-12.....	72
Obr. 12: Vliv koncentrace BT. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 13-17.....	73
Obr. 13: Vliv koncentrace lecitinu. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 19-22.....	73
Obr. 14: Vliv koncentrace lecitinu. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor PSB 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 23-26.....	74
Obr. 15: Vliv koncentrace sycení EMK. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor PSB 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 27-30... 74	
Obr. 16: Vliv koncentrace sycení EMK. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor PSB 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 3 %, postup přípravy A. Vzorky 31-34... 75	
Obr. 17: Vliv koncentrace emulgátoru CET. Velikost nanočástic (nm). Koncentrace směsi BT+T3 1 % (vzorky 79, 86, 88, 90) a 3 % (vzorky 80, 87, 89 a 91), koncentrace T3 100 %, postup přípravy A.....	75
Obr. 18: Vliv koncentrace acetonu. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1%, koncentrace T3 100%. Postup přípravy A. Vzorky 43-52.....	76

Obr. 19: Vliv koncentrace MeOH. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, koncentrace 100 %, postup přípravy A. Vzorky 37-42.....	76
Obr. 20: Vliv koncentrace MeOH. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1%, koncentrace BT 10 % a koncentrace T3 90 % postup přípravy A. Vzorky 61-64.	77
Obr. 21: Vliv koncentrace NaOH. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1%, koncentrace T3 100 %, postup přípravy A. Vzorky 53-59.....	77
Obr. 22: Vzorek 88 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 0,025%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.	78
Obr. 23: Vzorek 86 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 0,05%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.	78
Obr. 24: Obrázek 84 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 0,20%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.	79
Obr. 25: Obrázek 90 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 1%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.	79
Obr. 26: Vzorek 81 (složení: koncentrace směsi BT+T3 3 %, koncentrace BT 30 %, koncentrace T3 70 %, emulgátor CET 0,20%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.....	80
Obr. 27: Vzorek 82 (složení: koncentrace směsi BT+T3 3 %, koncentrace BT 10 %, koncentrace T3 90 %, emulgátor CET 0,20%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.....	80

Seznam tabulek

Tab. 1: Složení vzorků.....	43
Tab. 1 a: Složení vzorků.....	44
Tab. 1 b: Složení vzorků.....	45
Tab. 1 c: Složení vzorků.....	46
Tab. 1 d: Složení vzorků.....	47
Tab. 1 e: Složení vzorků.....	48
Tab. 2: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.....	49
Tab. 3: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.....	50
Tab. 4: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.....	51
Tab. 5: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.....	52
Tab. 6: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.....	53
Tab. 7: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.....	54
Tab. 8: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.....	55
Tab. 9: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.....	56
Tab. 10: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.....	57
Tab. 11: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.....	58
Tab. 12: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.....	59
Tab. 13: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.....	60
Tab. 14: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 c.....	61
Tab. 15: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 c.....	62
Tab. 16: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 c.....	63
Tab. 17: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.....	64
Tab. 18: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.....	65
Tab. 19: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.....	66
Tab. 20: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.....	67
Tab. 21: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.....	68
Tab. 22: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.....	69
Tab. 23: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.....	70
Tab. 24: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.....	71

1 ZADÁNÍ PRÁCE

V zadání tématu rigorózní práce byly formulovány dílčí úkoly týkající se vlivu formulačních faktorů na granulometrické parametry nanočástic z větveného terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu s terbinafinem měřené metodou PCS v následujících bodech:

- využít emulzní metodu za rozdělování rozpouštědla, jako rozpouštědlo použít methylethylketon, jako emulgátor cetrimid nebo polysorbát 20
- jako aditivum do vnitřní fáze vyzkoušet lecitin, dimethylketon, nebo metanol
- vyzkoušet účinek cetrimidu jako emulgátoru v různých koncentracích, methylethylketonu jako látky modifikující rychlost rozdělování rozpouštědla a chloridu sodného jako složky měnící polaritu a stav mezifáze
- využít alternativní postupy při homogenizaci emulze

2 ÚVOD

Nanotechnologie je v dnešní době běžně používaný výraz v mnoha oblastech vědy, každodenního života a také v aplikaci léčiv.

Obecně jsou nanočástice definovány jako pevné koloidní částice zahrnující nanotobolky, nanosféry a další. Mohou být připraveny různými metodami, včetně polymeračních metod a syntézou ze speciálních polymerů. Jednou ze základních charakteristik je jejich velikost, která je od 5-10 nm s horním limitem velikosti ~1000 nm, ale rozsah je obvykle 100-500 nm. Nanočástice jsou slibné jako aktivní nosiče díky jejich vlastnostem, např. schopnosti uvolňování léčiv, jejich subcelulární velikost umožňuje relativně vyšší intracelulární vychytávání částic a transport léčiv do orgánů, tkání a buněk, dále mohou zlepšit stabilitu účinných látek a mohou být biokompatibilní s tkáněmi a buňkami, protože jsou syntetizovány z materiálů, které jsou buď biokompatibilní, nebo biologicky odbouratelné. Tyto vlastnosti částicových systémů jsou ve farmaceutické technologii důvodem přechodu od jednotkových lékových forem (tobolky, tablety, injekční roztoky atd.). Velká očekávání jsou vkládána do léčby nádorových onemocnění. Léčivo může být cíleno do postižené tkáně nebo orgánu, kde bude efektivně působit na zhoubné buňky, a tím budou sníženy nežádoucí účinky na zdravou tkáň.^{1,2}

Výběrem způsobu přípravy a úpravou povrchu částic je možné nanočástice nasměrovat na různé cíle. Tyto lékové formy mohou být podávány perorálně, parenterálně i lokálně. Kromě aplikace cytostatik mají velký význam pro podání antibiotik, antiparazitik, inzulínu, proteinů, vakcín atd. Ve zdravotnictví je nanotechnologie využívána také v diagnostice, bioimplantátech a jsou využívány léčebné schopnosti nanorobotů. Nanotechnologie je hojně využívána i v dalších oborech, jako je např. elektronika, potravinářství, textilní průmysl atd.²

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Seznam zkratk k teoretické části

C/LRP	řízená/radikálová polymerace
DDM	dodecylmercaptan
FDA	Food and Drug Administration
MMA	methylemethakrylát
NLC	nanostructured lipid carriers
PBCA	poly(butylkyanoakrylát)
PCL	polykaprolakton
PCS	fotonová korelační spektroskopie
PECA	poly(ethylkyanoakrylát)
PEG	polyethylenglykol
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny DL-mléčné s kyselinou glykolovou (50:50)
PMMA	poly(methylemethakrylát)
PNPs	polymerní nanočástice
PS	polysorbát
PVA	polyvinylalkohol
SDS	dodecylsíran sodný
SLN	pevné lipidové nanočástice
SLS	laurylsíran sodný
VA	vinylalkohol

3.2 Metody pro přípravu polymerních nanočástic

PNPs je možné připravit z hotových polymerů nebo přímou polymerací monomerů, klasickou polymerizací. Výběr metody přípravy se provádí na základě řady faktorů, jako je typ polymerních systémů, oblast využití, velikost požadovaných nanočástic apod. Např. polymerní systém, který je vyvinut pro použití v biomedicínských a environmentálních oborech, musí být zcela bez přídatných látek nebo reagujících složek, jako jsou povrchově aktivní látky nebo stopy organických rozpouštědel.³

❖ metody přípravy z hotových polymerů

- odpařování rozpouštědla
- vysolování
- superkritické fluidní techniky
- metoda spontánní emulgace
- metoda nanoprecipitace

❖ metody přípravy polymerací monomerů

- emulzní polymerace
- mezifázové polymerace
- řízená/living radikálová polymerace (C/LRP)

3.2.1 Emulzní polymerace

Emulzní polymerace je nejběžnější metoda pro výrobu celé řady speciálních polymerů. Jako disperzní prostředí využívá vodu, čímž je šetrná k životnímu prostředí a zároveň umožňuje vynikající odvod tepla v průběhu polymerace. Podle použití povrchově aktivních látek může být klasifikována jako konvenční polymerace a polymerace bez povrchově aktivních látek.⁴

3.2.1.1 Konvenční emulzní polymerace

Tato metoda pokrývá většinu produkce emulzní polymerací. Konvenční systém se skládá z monomeru s nízkou rozpustností ve vodě, vody, iniciátoru rozpustného ve vodě a povrchově aktivní látky. Zahájení polymerace nastane, když se molekula monomeru rozpuštěná v kontinuální fázi srazí s molekulou iniciátoru, kterým může být ion nebo volný radikál. Alternativou je přeměna molekuly monomeru na zahajující radikál vysokoenergetickým zářením, včetně γ -záření, UV záření nebo silného viditelného světla. Na konci polymerační reakce vzniknou PNPs s typickou velikostí 10^2 nm a každá obsahuje mnoho řetězců polymeru. Oddělení fází a vznik pevných částic může probíhat před nebo po ukončení polymerační reakce. Průměr PNPs závisí na typu povrchově aktivní látky.⁵

Příklady využití metody

- příprava polyakrylkyanoakrylátových nanočástic
 - tyto metody jsou dobře známy, což umožňuje přípravu nanočástic s přesně definovanými vlastnostmi
 - využívána je především aniontová polymerace, kdy je reakce spontánně zahájena hydroxylovými skupinami vody nebo jinými nukleofilními skupinami přítomnými v polymeračním systému⁶⁷
- příprava PS, PNMA, PECA a PBCA nanočástic
 - metoda je prováděna pomocí dispergace povrchově aktivní látky do rozpouštědla, např. cyklohexanu, n-pentanu nebo toluenu⁸

3.2.1.2 Emulzní polymerace bez povrchově aktivních látek

Povrchově aktivní látky, které využívá konvenční metoda, musí být z konečného produktu odstraněny.^{9,10} Odstranění tenzidů je časově náročný proces, který zvyšuje náklady na výrobu a zároveň je ekologicky nešetrný.¹¹ Emulzní polymerace bez povrchově aktivních látek, nazývaná také „surfactant free“, je vhodnou alternativou konvenční polymerace díky jednoduchosti a možnosti výroby bez přidání a následného odstranění stabilizačních látek.¹² Suroviny vyžívané v této metodě jsou deionizovaná voda, ve vodě rozpustný iniciátor a monomery, nejčastěji vinylové a akrylové.¹³ V tomto polymeračním systému dojde ke stabilizaci PNPs pomocí ionizovatelných iniciátorů nebo iontových ko-monomerů.^{14, 15}

Existuje několik mechanismů nukleace a růstu částic pro emulzní polymeraci bez povrchově aktivních látek, např. „micellar-like nucleation“ a homogenní nukleace. Rozdíl mezi těmito dvěma metodami je založen na rozpustnosti monomeru ve vodě.¹⁶

3.2.1.3 Mini-emulzní polymerace

Systém mini-emulzní polymerace se skládá z monomerní směsi, ko-stabilizátoru, povrchově aktivní látky a iniciátoru. Klíčový rozdíl mezi emulzní a miniemulzní polymerací je ve využití nízkomolekulárních sloučenin, ko-stabilizátoru a také ve využití vysokoenergetických zařízení (ultrazvuk atd.). Miniemulze jsou stabilizované, vyžadují vysokou energii až do dosažení ustáleného stavu a mají povrchové napětí mnohem větší než nula. Univerzální PNPs byly připraveny s různými kombinacemi ko-stabilizátoru a iniciátoru. Tyto kombinace mají převažující vliv na tvorbu a charakter částic. Např. za použití ve vodě rozpustného iniciátoru APS (amonium persulfát) byly získány mikročástice, ale za použití lipofilních radikálních iniciátorů, jako je AIBN (azobisisobutyronitrile), byly připraveny nanočástice o průměru 80-150 nm.¹⁷

Příklady látek využitých touto metodou:

- povrchově aktivní látky: Span 80, Tween 80, SLS,
- ko-stabilizátor: DDM, hexadekan, SDS¹⁸

3.2.1.4 Mikro-emulzní polymerace

Tato metoda je nový a účinný postup k přípravě polymerních nanočástic. I když emulzní a mikroemulzní polymerace vypadají podobně, neboť oba postupy mohou vytvářet polymerní koloidní částice o vysoké molární hmotnosti, jsou zcela odlišné v porovnání kinetiky. Mikroemulzní polymerace má dva intervaly reakční rychlosti, zatímco emulzní polymerace má intervaly tři. Velikost částic a průměrný počet řetězců v částici je u mikroemulzní polymerace podstatně větší.¹⁹

Při této metodě je iniciátor, obvykle ve vodě rozpustný, přidán do vodné fáze termodynamicky stabilní emulze obsahující nabobtnalé micely. Polymerace začíná z této termodynamicky stabilní emulze, spontánně proběhne a je závislá na velkém množství povrchově aktivních látek. Zpočátku jsou polymerní řetězce vytvořeny pouze v některých kapkách, protože iniciace nelze dosáhnout současně ve všech mikrokapkách. Později osmotické a elastické vlivy řetězců destabilizují labilní strukturu mikroemulze a to obvykle vede ke zvýšení velikosti částic, tvorbě prázdných micel a sekundární nukleaci. Velmi malé nanočástice (5-50 nm) koexistují ve finálním produktu s většinou prázdnými micelami.

Typ iniciátoru a jeho koncentrace, povrchově aktivní látka, monomer a reakční teplota jsou jedny z kritických faktorů ovlivňující kinetiku mikroemulzní polymerace a vlastnosti PNPs.²⁰

Příklady využitých látek

- iniciátor: H_2O_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- povrchově aktivní látka: SDS, Brij 30
- monomer: MMA, VA

3.2.2 Mezifázová polymerace

Tato metoda zahrnuje krok polymerace dvou reaktivních monomerů nebo látek, které jsou rozpuštěny ve dvou fázích (tj. kontinuální a dispergovaná fáze) a reakce odehrávající se na rozhraní dvou kapalin. Tato metoda je preferována v mnoha oborech díky snadnosti provedení. Používá se od enkapsulace farmaceutických produktů až po přípravu vodivých polymerů.²¹

Polymerní nanočástice jsou syntetizovány díky mezifázovým reakcím, jako je polyadice, polykondenzace nebo radikálová polymerizace. Nanočástice obsahující olej byly připraveny polymerací monomerů na mezifázi olej/voda mikroemulze jemného oleje ve vodě.²² Organická rozpouštědla, která jsou plně mísitelná s vodou, slouží jako nosič monomeru a je známo, že IP monomeru probíhá na povrchu kapek oleje, které se vytvoří během emulgace. Alternativně je možné připravit nanokapsuly s obsahem monomerů v mikroemulze oleje. Polymer se hromadí na rozhraní voda/olej a precipitací dochází ke vzniku obalu nanokapsul. Pro podporu tvorby nanokapsul je doporučeno použití aprotických rozpouštědel, jako je aceton nebo acetonitril. Pro přípravu nanosfér s přídavkem nanokapsul jsou vhodná protická rozpouštědla, jako je etanol, n-butanol a isopropanol.²³

3.2.3 Řízená/living radikálová polymerace

Řízená polymerace je typ polymerace, ve které chybí schopnost růstu polymerního řetězce až do ukončení polymerace a také chybí řetězové převodní reakce. Rychlost řetězového zahájení je mnohem vyšší než rychlost řetězového šíření. Výsledkem je, že polymerní řetězce rostou více konstantní rychlostí, než při klasické řetězové polymeraci a mají velmi nízký index polydisperzity. Řízená polymerace je populární metoda pro syntézu blokových kopolymerů, protože polymer může být syntetizován v několika fázích a každá fáze obsahuje různé monomery.²⁴

Velikost PNPs je ovlivněna řídicím agens, monomerem, iniciátorem a typem emulze. C/LRP vytváří spektrum příležitostí pro syntézu PNPs s potenciálními aplikacemi u funkčních materiálů. I přes mnohé výhody této metody zde stále zůstává řada problémů. Některé jsou společné pro různé druhy C/LRP, některé jsou specifické konkrétnímu systému.

Mezi hlavní problémy patří přítomnost zbytkového kontrolního činidla v produktu, který musí být odstraněn, snižování nákladů ve srovnání s konvenčními metodami, barva, vůně, stabilita a dodržování právních předpisů ohledně životního prostředí.²⁵

Hlavní techniky řízené polymerace jsou:

- řízená anionická polymerace
- řízená kationická polymerace
- řízená radikálová polymerace
- řízená Ziegler-Natta polymerace
- polymerace přenosem skupin
- řízená polymerace za otevření kruhu

Vznik této metody, tzv. řízené nebo „živé“ radikálové polymerace, dává možnost použití klasické polymerační techniky v nových oblastech.²⁶ Hlavním omezením radikálové polymerace je nedostatečná kontrola molární hmotnosti, molárního objemu, makromolekulární struktury atd. Mezi nejdůležitější faktory, které přispívají k rozvíjení C/LRP jsou zvyšující se obavy o životní prostředí a prudký rozvoj farmaceutických a zdravotnických aplikací pro hydrofilní polymery. Tyto faktory daly vznik tzv. zelené chemii a kladou větší důležitost na využívání chemicky neškodných rozpouštědel, např. vody nebo superkritického oxidu uhličitého. Hlavním cílem je kontrola vlastností polymeru, jako je molární hmotnost, distribuční molární hmotnost, struktura a funkce.²⁷

3.3 Klasifikace nanočástic

- SLN
- liposomy
- NLC
- nanoslupky
- kvantové tečky
- supermagnetické nanočástice
- dendrimery
- fullereny
- nanokapsuly

3.3.1 SLN

SLN jsou kulaté nanočástice s průměrnou velikostí 10-1000 nm. Tyto pevné tukové nanočástice mají hydrofobní jádro, ve kterém mohou být rozpuštěny lipofilní molekuly. Lipidové jádro je stabilizováno povrchově aktivními látkami. Z pevných tuků se k formulaci SLN hojně využívají mastné kyseliny (k. palmitová, kaprinová), triglyceridy, steroidy (cholesterol), parciální glyceridy a vosky. Z emulgátorů se nejčastěji používá sójový lecitin, fosfatidylcholin, poloxamer 188 atd.²⁸

Výhody SLN:

- využití fyziologických tuků
- vyloučení organických rozpouštědel během přípravy
- široké možnosti využití (kožní, perorální, nitrožilní)
- lepší biologická dostupnost, cílené uvolňování léčiv
- ochrana léčiva před vnějším prostředím

Využití:

- antimykotika: ketokonazol, mikonazol, klotrimazol
- antibiotika: tobramycin, rifampicin
- tamoxifen
- ibuprofen, nimesulid

3.3.2 Liposomy

Liposomy mají vezikulární tvar s tekutým jádrem obklopeným hydrofobní lipidovou dvojvrstvou vzniklou vytlačováním fosfolipidů. Hydrofilní látky jsou rozpuštěny v jádře a lipofilní látky mohou být zabudovány do lipidové dvojvrstvy, což umožňuje liposomům nést jak hydrofilní, tak lipofilní léčiva. Lipidová dvojvrstva se může spojit s dalšími lipidovými dvojvrstvami, např. buněčnými membránami, a tím je podpořeno uvolňování obsahu, které je užitečné při podávání léčiv nebo v kosmetice.

Liposomy se mohou lišit velikostí, od 15nm až po několik mikrometrů a mohou mít jednu vrstvu (unilamelární) nebo multilamelární strukturu.²⁹ Unilamelární vesikuly (ULVs) mohou být v závislosti na velikosti rozděleny na malé unilamelární (SUVs) a velké unilamelární (LUVs) liposomy. Unilamelární struktura jim umožňuje využívat hydrofilní i lipofilní látky bez změny chemické struktury. Povrch liposomu lze upravit funkčními skupinami pro zvýšení stability in vivo nebo ligandy, které umožňují targeting.³⁰

Příklady využití:

- antivirotika
- antibiotika
- insulin
- antineoplastika
- plastidy

3.3.3 NLC

NLC jsou vyrobeny ze směsi pevných a tekutých tuků, ale při teplotě těla jsou v pevném stavu. Jejich výroba je založena na technologii tuhnutí emulze (disperzní fáze). Uvolňování léčiv z lipidových částic probíhá difúzí a současně degradací lipidových částic v těle. V ideálním případě by mělo být toto uvolňování spuštěno impulzem, když jsou částice podány. NLC pojmu léčiva díky vysoké neuspořádanosti jejich lipidové struktury. Požadovaná dávka uvolnění léčiva může být vyvolána použitím spouštěcího podnětu, který matici přivede do více organizované struktury.³¹

Příklady využití:

- farmacie: topické, perorální, parenterální podání, protizánětlivé látky, lokální kortikoidy, targeting ve vodě rozpustných léčiv
- kosmetika
- potravinářství, zemědělské produkty

3.3.4 Nanoslupky

Tento typ nanočástic je složen z kulatého jádra určité látky obklopeného velmi tenkou stěnou nebo vnější vrstvou z jiného materiálu, která je několik nanometrů silná (1-20 nm).³² Jejich vlastnosti mohou být upraveny buď změnou stavebního materiálu, nebo poměrem stěna:jádro. Nanoslupky mohou být syntetizovány z polovodičů (dielektrické materiály- polystyren, oxid křemičitý), kovů nebo izolátorů. Dielektrické materiály jsou obvykle používány jako jádro, protože jsou vysoce stabilní. Příkladem mohou být kovové nanoslupky, které se skládají z dielektrického jádra potaženého kovovou stěnou, která je nejčastěji ze zlata. V zobrazovacím použití mohou být nanoslupky označeny specifickými protilátkami pro postižené tkáně nebo nádory.³³

Výhody:

- příznivé optické a chemické vlastnosti pro biomedicínské zobrazování a terapeutickou aplikaci
- lepší optické vlastnosti než konvenční barviva
- snížená citlivost k tepelné nebo chemické denaturaci

Využití:

- detekce nádorů, protilátek, mikroorganismů
- zobrazování nemocí
- imunologické testy

3.3.5 Kvantové tečky

Kvantové tečky jsou polovodičové nanokrystaly a nanokrystaly typu jádro-slupka. Jejich velikost se pohybuje mezi 2 a 10 nm.³⁴ Kvantové tečky mají unikátní a fascinující optické vlastnosti, díky nimž se staly nepostradatelným nástrojem v oblasti biomedicínského výzkumu, zejména pro multiplexní, kvantitativní a dlouhodobé fluorescenční zobrazování a detekci. Jádro kvantových teček může sloužit jako stavební lešení a zobrazovací kontrastní látky nebo malé molekuly hydrofobního léčiva mohou být zachyceny mezi anorganické jádro a amfifilní polymerní obalovací vrstvu. Hydrofilní terapeutické látky včetně malých RNA, oligodeoxynukleotidů a cílených biomolekul (protilátky, peptidy) mohou být imobilizovány na hydrofilní straně amfifilního polymeru kovalentní nebo nekovalentní vazbou.³⁵

3.3.6 Supermagnetické nanočástice

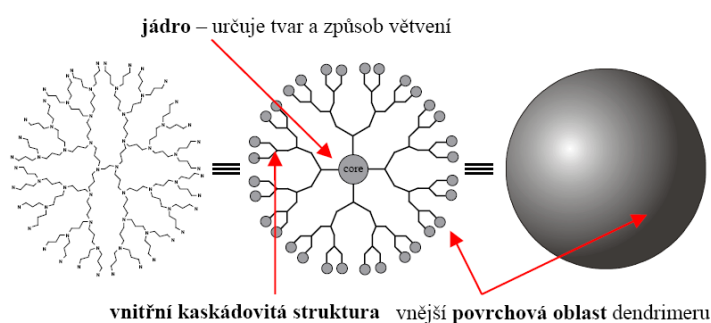
Supermagnetické nanočástice jsou částice, které jsou přitahovány k magnetickému poli, ale neudrží zbytkový magnetismus po odstranění pole. Mezi hlavní výhody supermagnetických nanočástic patří, že mohou být zobrazeny pomocí magnetické rezonance a díky svým paramagnetickým vlastnostem mohou být vedeny k místu účinku použitím magnetického pole. Vyhříváním magnetickým polem pak spustí uvolňování léčiva.³⁶ Supermagnetické nanočástice patří do skupiny anorganických nanočástic mající jádro z oxidu železa obaleného vrstvou buď z anorganického (oxid křemičitý, zlato), nebo organického materiálu (fosfolipidy, mastné kyseliny, polysacharidy, peptidy).³⁷

Využití:

- separační techniky
- zvýraznění kontrastních látek
- magnetická hypertermie (lokální zdroj tepla v případě léčby nádorů)
- magnetické usnadnění transfekce buněk

3.3.7 Dendrimery

Dendrimery jsou unimolekulární, monodisperzní nanostruktury o velikosti kolem 20 nm s dobře definovanou, pravidelně větvenou, symetrickou strukturou a vysokou hustotou koncových funkčních skupin na jejich povrchu. Struktura dendrimery se skládá ze tří rozdílných stavebních částí: ústřední složky nebo jádra, vrstvy z rozvětvených opakujících se jednotek formující se z jádra a z funkčních koncových vrstev na vnější vrstvě opakujících se jednotek. Jsou známé jako robustní, kovalentní pevné trojrozměrné struktury mající obě rozpouštědla naplněná uvnitř jádra.³⁸



Obr. 1: Struktura dendrimery³⁹

Jsou připravovány použitím konvergentní metody nebo divergentní metody. Při divergentní metodě dochází k růstu dendronu od jádra směrem k periférii. Konvergentní metoda spočívá v růstu molekuly od povrchu směrem ke středu.³⁹

3.3.8 Fullereny

Fullereny jsou molekuly, které jsou složeny výhradně z atomů uhlíku. Mohou mít tvar koule, elipsoidu nebo trubice. Kulaté fullereny jsou také nazývány „buckyballs“, válcovité jsou uhlíkové nanotrubičky, nebo také „buckytubes“. Díky své struktuře jsou velmi odolné vůči vnějším fyzikálním vlivům.⁴⁰

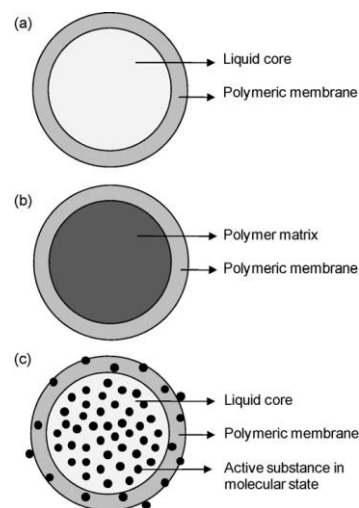
Využití fullerenů:

- mazivo, elektronika, kosmetika
- lékařství: léčba HIV, Parkinsonovy nemoci, leukémie nebo rakoviny kostí

3.3.9 Nanokapsuly

3.3.9.1 Definice nanokapsul

Nanokapsuly mohou být definovány jako nanovezikulární systémy skládající se z jádra obklopeného polymerní membránou. Léčivá látka může být ukotvena uvnitř jádra v kapalné nebo pevné formě nebo jako molekulární disperze. Dle metody přípravy a použitých surovin může být zásobník lipofilní nebo hydrofilní povahy. Nanokapsuly mohou nést léčivé látky také na svém povrchu nebo mohou být zabudovány v polymerní membráně.^{41, 42}



Obr. 2: Typy nanokapsul¹

Výhody nanokapsul

- vysoká účinnost zapouzdření aktivní látky díky optimalizované rozpustnosti léčiva v jádru
- nízký obsah polymeru ve srovnání s jinými částicovými systémy, např. nanosféry
- polymer vytváří ochranný obal proti degradačním faktorům, jako je pH nebo světlo
- polymerní obal chrání tkáň před podrážděním účinnou látkou

3.3.9.2 Metody přípravy nanokapsul

Existují 4 hlavní metody přípravy nanokapsul: nanoprecipitace, emulzně-difúzní metoda, metoda dvojité emulze a metoda koacervace v emulzi. I přes řadu nevýhod je někdy využívána metoda emulzního odpařování nebo metody pro přípravu liposomů.

Nanoprecipitace

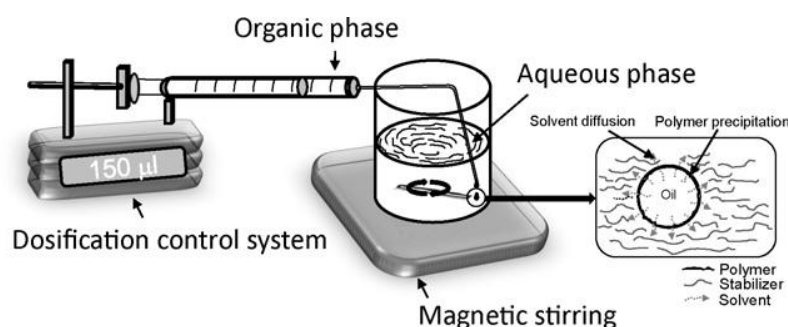
Metoda nanoprecipitace může také být nazývána mezifázová depozice nebo přemístění (displacement) rozpouštědla. K syntéze nanotobolek jsou potřeba 2 fáze, fáze rozpouštědla a fáze nerozpouštědla. Fáze rozpouštědla se skládá z roztoku rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel (ethanol, aceton, hexan, methylenchlorid nebo dioxan), látky tvořící film - nejčastěji polymer (syntetický, semisyntetický nebo zcela přírodní), účinné látky, rozpouštědla účinné látky, lipofilního tenzidu, oleje a rozpouštědla oleje, pokud je potřeba. Fáze nerozpouštědla se skládá z nerozpouštědla nebo směsi nerozpouštědel pro filmotvornou látku doplněné jednou nebo více přírodními nebo syntetickými povrchově aktivními látkami. Obecně je rozpouštědlem organické médium a nerozpouštědlem voda.⁴³

Nanokapsuly vznikají jako koloidní suspenze, když je organická fáze pomalu a za stálého míchání přidávána do vodné fáze. Klíčovými proměnnými tohoto procesu jsou ty, které souvisí s přidáváním organické fáze do vodné, jako např. rychlost vstříku organické fáze, rychlost agitace vodné fáze, způsob přidávání organické fáze a poměr organická/ vodná fáze. Vlastnosti nanokapsul jsou ovlivněny výchozími složkami. Principem vzniku nanokapsul je tendence polymeru shlukovat se na olejovém povrchu během proudění rozpouštědla z oblasti nízkého povrchového napětí (organická fáze) do oblasti s vyšším povrchovým napětím (vodná fáze).^{44, 45}

Příklady používaných látek:

- polymery: PCL, PLA, PLGA
- oleje: různé typy kaprinových/ kaprylových triglyceridů
- povrchově aktivní látky: estery sorbitanu, fosfolipidy
- rozpouštědla: etanol, aceton
- nerozpouštědla: voda, tlumivé roztoky
- stabilizátory: poloxamer 188, polysorbát 80

Některé polymery jsou kopolymerizovány PEG, aby se snížilo vychytávání nanokapsul fagocytárním systémem. Syntetické polymery se používají častěji, protože mají vyšší čistotu a lepší reprodukovatelnost než polymery přírodní. Používané oleje jsou vybrány dle kritérií nejvyšší možné rozpustnosti léčivé látky, absence toxicity, nízké rozpustnosti oleje v polymeru a naopak nebo nemožnosti degradace polymeru.¹



Obr. 3: Nanoprecipitační metoda¹

Emulzně- difúzní metoda

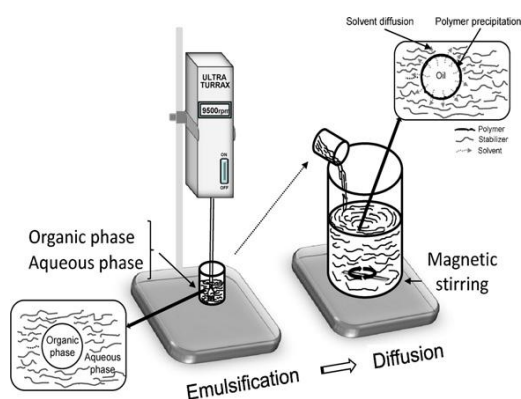
Příprava nanokapsul touto metodou umožňuje enkapsulaci hydrofilních i lipofilních látek. Tato metoda vyžaduje 3 fáze: organickou, vodnou a ředící. Když je cílem enkapsulace lipofilní účinná látka, tak organická fáze obsahuje polymer, účinné látky, oleje a organické rozpouštědlo částečně mísitelné s vodou. Pokud je to nutné, může organická fáze obsahovat i rozpouštědla účinných látek nebo rozpustné oleje. Vodná fáze se skládá z vodné disperze stabilizující látky. Fáze ředící je obvykle voda.⁴¹

Při přípravě nanokapsul touto metodou je organická fáze emulgována za silného míchání do vodné fáze. Následné přidání vody (ředící fáze) do systému způsobí šíření rozpouštědla do vnější fáze, což vede ke tvorbě nanokapsul. Rozpouštědlo je následně odstraněno destilací nebo cross-flow filtrací v závislosti na bodu varu. Bylo prokázáno, že velikost nanokapsul souvisí se smykovou rychlostí používanou při procesu emulgace, chemickým složením organické fáze, koncentrací polymeru, poměru olej:polymer a poklesu velikosti primární emulze.⁴⁶

Mechanismus tvorby nanokapsul je založený na teorii, že každá kapka emulze vytváří několik nanokapsul a tyto nanokapsuly jsou tvořeny precipitací polymeru a mezifázovými jevy při šíření rozpouštědla.⁴¹

Příklady používaných látek:

- polymer: PLA, PLA-PEG-PLA, PCL, poly(hydroxybutyrát-co-hydroxyvalerát)
- rozpouštědlo: ethylacetát, propylen karbonát, benzylalkohol, dichlormethan
- olej: kaprinové/kaprylové triglyceridy
- vnitřní fáze: voda a PVA jako stabilizační činidlo



Obr. 4: Emulzně difúzní metoda⁴³

Metoda dvojité emulze

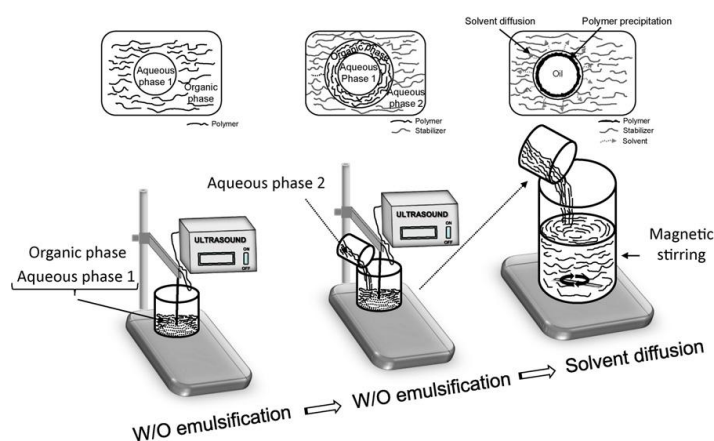
Dvojitě emulze jsou komplexy heterodisperzních systémů nazývané emulze v emulzi. Jsou klasifikovány 2 typy: v/o/v nebo o/v/o.⁴⁷ Dispergovaná fáze je sama emulzí a vnitřní dispergované kapky jsou odděleny od vnější tekuté fáze vrstvou další fáze. Dvojitě emulze jsou obvykle připravovány v dvoukrokovém procesu využívajícím 2 povrchově aktivní látky: hydrofobní, která má stabilizovat mezifázi vnitřní emulze v/o a hydrofilní ke stabilizaci vnější mezifáze olejových kapek o/v/o emulze.⁴⁸

Pro přípravu nanokapsul je princip dvojité emulze (v/o/v) spojen s principy nanoprecipitace a emulzně difúzní metody. Olej v emulzi v/o je nahrazen organickou fází obsahující rozpouštědlo, které je úplně nebo částečně mísitelné s vodou. Dále organická fáze obsahuje polymer tvořící film a emulgátor v/o. Do této emulze je přidávána voda obsahující stabilizační agens pro vytvoření emulze v/o/v.

V posledním kroku dochází ke zpevnění částic difúzí rozpouštědla a precipitací polymeru. Účinnost enkapsulace a průměrná velikost částic jsou ovlivněny tím, jak se mění druh a koncentrace emulze typu v/o/v a stabilizátoru.⁴⁸

Příklady používaných látek:

- vodná fáze: účinná látka, voda
- organická fáze: ethylacetát, dichlormethan (rozpuštědla), PLA, PCL, PLGA
- stabilizátory: estery sorbitanu, PVA, polysorbát



Obr. 5 Metoda dvojité emulze¹

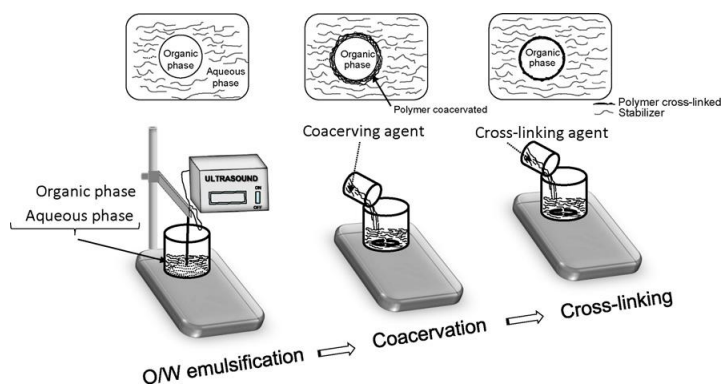
Metoda koacervace v emulzi

Tato metoda je využívána především pro přípravu nanokapsul z přírodních polymerních materiálů. Používanými polymery jsou alginát sodný nebo želatina, ale mohly by být použity také syntetické polymerní materiály. Nejprve je vytvořena emulze typu o/v pomocí mechanického míchání nebo ultrazvuku. Organická fáze obsahuje oleje, účinné látky, v případě potřeby i rozpouštědla a vodná fáze se skládá z vody, polymeru a stabilizátoru. Po vytvoření emulze je jednoduchým procesem provedena koacervace buď pomocí elektrolytů (alginát sodný+CaCl₂), přidáním s vodou mísitelným nerozpustným nebo dehydratovaným činidlem (želatina+isopropanol+Na₂SO₄), nebo změnou teploty (syntéza Au nanotobolek z triblokového terpolymeru).^{49, 50}

Tvorba nanotobolek touto metodou využívá emulzi jako předlohovou fázi pro vytvoření koacervační fáze, která je příčinou srážení polymeru z kontinuální emulzní fáze do nanotobolek. Rozhodující fází přípravy touto metodou je vznik koacervační fáze.⁵¹

Příklady používaných látek

- organická fáze: etanol, aceton, chloroform
- vodná fáze: PVA, voda
- polymer: alginát sodný, želatina
- koacervační látka: CaCl_2 , glutaraldehyd



Obr. 6 Metoda emulzní koacervace¹

3.4 Stabilita nanočástic

3.4.1 Vliv lékové formy na stabilitu

Unikátní vlastnosti nanočástic s léčivy umožnily jejich rozsáhlé využití v různých lékových formách, včetně orální, parenterální, oční, plicní, kožní a v dalších speciálních systémech podávání léčiv. Ačkoli různé lékové formy mohou sdílet některé běžné problémy se stabilitou, jako je sedimentace, aglomerace částic nebo růst krystalů, jejich vliv na léčivé přípravky je zcela odlišný. Například aglomerace částic by mohla být hlavním problémem léků aplikovaných pulmonálně, protože je ovlivněno množství a místo ukládání, a tím účinnost léků. U intravenózních přípravků může aglomerace způsobit ucpání krevních kapilár a brání průtoku krve.⁵²

Výběr stabilizátorů úzce souvisí s disperzním prostředím, lékovou formou a je přísně řízen FDA. V dnešní době je zde široká škála rozhodnutí o schválených stabilizátorech pro perorální lékové formy, zatímco pomocné látky povolené k inhalaci jsou velmi omezené.⁵³ Nanočástice léčiv existují v konečných léčivých přípravcích buď v suchém prášku, nebo ve formě suspenze. Příklady suchých práškových forem jsou inhalátory suchého prášku, lyofilizovaný prášek pro přípravu injekce a perorální tablety nebo kapsuly. Pevné lékové formy mají obvykle dobré stabilitní profily skladování, což je důvod, proč společná strategie pro zvýšení stability suspenzí je transformovat suspenze do pevných forem. Většina obav z nestability se týká nanosuspenzí, ve kterých jsou nanočástice rozptýlené v médiu s nebo bez obsahu stabilizátorů.^{54, 55}

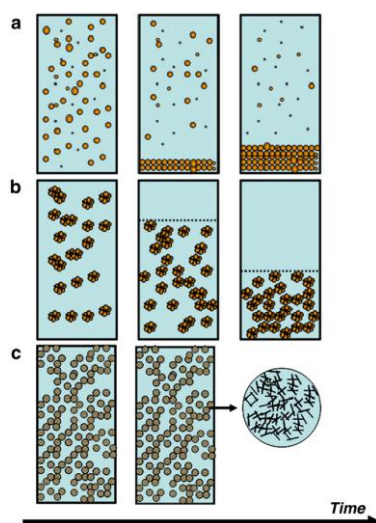
Stabilitní problémy nanosuspenzí

- sedimentace/krémovatění
- aglomerace
- růst krystalů
- změna krystalického stavu

3.4.2 Sedimentace/krémovatění

Částice léčiva mohou buď sedimentovat, nebo krémovatět v médiu v závislosti na jejich hustotě vzhledem k hustotě tohoto média. Sedimentace je popsána Stokesovým zákonem, který popisuje významnou roli velikosti částic, střední viskozity a rozdílu hustot mezi médiem a dispergovanou fází pro stanovení rychlosti sedimentace částic. Zmenšování velikosti částic je nejběžnější strategie používaná ke snížení usazování částic. Vhodná hustota částic léčiv v médiu nebo zvýšená viskozita média jsou další široce používané přístupy ke zmírnění problémů se sedimentací. Na obrázku jsou znázorněny různé typy sedimentace, které se objevují ve složení suspenzí.^{56, 57}

V deflokulované suspenzi částice sedimentují nezávisle, samostatně jako subjekty malé velikosti v důsledku pomalé sedimentace. Hustý sediment, známý jako „koláč = caking“, obvykle vzniká v důsledku tlaku na jednotlivé částice.⁴² Tento sediment lze obtížně znovu rozptýlit mícháním a má nepříznivý dopad na vlastnosti léčivých přípravků. Ve flokulované suspenzi částice sedimentují jako samostatné agregáty, nikoliv jako jednotlivé částice.^{56,57} Volné agregáty mají větší velikosti ve srovnání s jednotlivými částicemi, a tím větší rychlost sedimentace. Volná struktura usazujících se vloček obsahuje významné množství zachyceného média a tato struktura je zachována v sedimentu. Konečný objem sedimentu je poměrně velký, flokuly mohou být snadno porušeny a suspenze znovu homogenizována jednoduchým mícháním. K. P. Johnston a spol. se pokoušeli dosáhnout stabilní nanosuspenze novým návrhem struktury vloček nazývané „open flocs“.⁵⁸



Obr. 7: Sedimentace v a) deflokulované suspenzi, b) flokulované suspenzi, c) suspenzi založené na „open flocs“⁵¹

I přesto, že je sedimentace jedním z klíčových problémů stability koloidních suspenzí, studie na toto téma jsou vzácné. Může to být způsobeno tensidy, které se obvykle používají ve většině nanosuspenzí a brání aglomeraci částic v médiu, zmírňují sedimentační problémy a malá velikost nanočástic významně snižuje rychlost sedimentace.⁵¹

Problém sedimentace obecně zmírňuje optimalizace vlastností částic a morfologie povrchu, např. duté porézní částice. Velké množství vodných nanosuspenzí je přeměněno na suché pevné formy, sprejovým sušením nebo vymrazování, a tím je dlouhodobě obejit sedimentační problém. Toto bohužel nemůže být využito u nevodných suspenzí.⁵⁹

3.4.3 Aglomerace

Velký povrch nanočástic vytváří vysokou celkovou povrchovou energii, což je termodynamicky nevýhodné. Proto mají částice tendenci hromadit se, aby se minimalizovala jejich povrchová energie. Aglomerace může způsobit řadu problémů nanosuspenzí včetně rychlé sedimentace/krémovatění, růstu krystalů a nekonzistentního dávkování. Nejčastější strategie pro řešení tohoto problému je použití stabilizátorů. Výběr stabilizátorů je prováděn, kromě bezpečnosti a předepsaných nařízení, na základě jejich schopnosti smáčet povrch částic a vytvářet bariéru, aby se zabránilo aglomeraci částic.⁵⁹ Existují dva hlavní mechanismy, jejichž prostřednictvím je možné koloidní suspenze stabilizovat, tj. elektrostatické odpuzování a stérická stabilizace, a to u vodných i nevodných suspenzí. Těchto dvou mechanismů lze dosáhnout tak, že do média se přidají iontové i neiontové stabilizátory. Stabilizaci elektrostatickými silami lze popsat DLVO teorií. Tato teorie je platná především pro vodné suspenze a její aplikace pro nevodné prostředí není zatím dobře objasněna. Tato teorie předpokládá, že DLVO síly působící na koloidní částice v médiu jsou odpudivé elektrostatické síly a atraktivní Van der Waalovy síly.⁵³

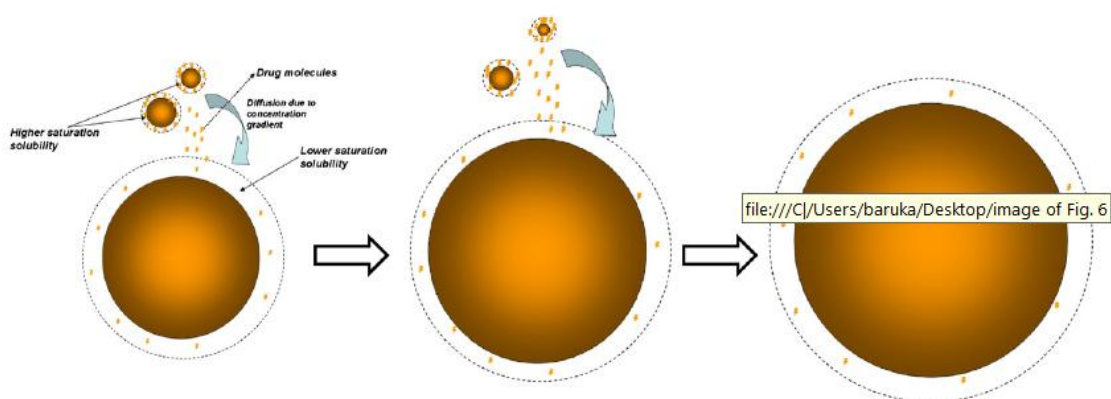
Klíčovým faktorem stérické stabilizace je absorpce stabilizátoru na povrch částic přes kotvící segment. Mezi tímto segmentem a rozpouštědlem dochází k silným interakcím, a tím je zabráněno aglomeraci částic v médiu.⁵⁰

Stabilizující složka musí být dobře rozpustná, dostatečně dlouhá a hustá a musí udržovat stérickou bariéru, která je schopna minimalizovat interakci částic na úrovni, kdy jsou Van der Waalsovy přitažlivé síly menší než odpuzivé stérické síly.⁵⁰

Hlavní nevýhoda spojená se stérickou stabilizací je neustálá potřeba přizpůsobovat kotvící konec podle vlastností konkrétního léčiva. Koncentrace stabilizátoru může hrát také roli při vzniku nestability suspenze ovlivnění absorpční afinity neionických stabilizátorů k povrchu částic léčiva.⁵²

3.4.4 Růst krystalů

Růst krystalů v suspenzi je obecně známý jako Ostwaldovo zrání krystalů a je zodpovědné za změny velikosti částic a distribuce velikosti. Ostwaldovo zrání vzniká z rozpuštěných částic v závislosti na jejich velikosti. Malé částice se rozpouštějí lépe než větší, čím vzniká koncentrační gradient mezi malými a velkými částicemi. V důsledku toho molekuly z oblasti vyšší koncentrace difundují do oblasti nižší koncentrace. Takto vzniklý přesycený roztok kolem velkých částic vyvolá krystalizaci léčiva na velkých částicích. Tento proces pokračuje, dokud se všechny malé částičky nerozpustí. Ostwaldovo zrání je v podstatě proces, kdy velké částice rostou na úkor menších, což následně vede k posunu ve velikosti částic a zrnitosti koloidní suspenze.^{56,57}



Obr. 8: Schématické znázornění Ostwaldova zrání⁵¹

Úzká distribuce velikosti částic může vést ke snížení gradientu koncentrací léčiva v médiu, a tím pomáhá bránit vzniku Ostwaldova zrání.⁵⁷ Stabilizátory také mohou snižovat tento jev, ale pouze v případě, že nezvyšují rozpustnost léčiva. Mechanismus jejich působení je snižování povrchového napětí mezi částicemi a kapalným médiem. Další možností ovlivnění růstu krystalů je úprava teploty, rozpustnosti a mechanické míchání.⁶⁰

3.4.5 Změna krystalického stavu

Krystalický stav je jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňující stabilitu léčiv, rozpustnost, rozpouštění a účinnost. Hlavním problémem změny krystalického stavu je přeměna mezi krystalickým a amorfním stavem. Vysokoenergetické výrobní postupy mají tendenci vytvářet amorfní nanosuspenze. Vysokoenergetické amorfní částice jsou nestabilní a mají tendenci v průběhu času přecházet na nízkoenergetický krystalický stav. Tento přechod je závislý na různých parametrech, jako je teplota, disperzní prostředí, stabilizátory a přítomnost krystalických částic.⁵⁶

3.4.6 Chemická stabilita

Vzhledem k tomu, že nanokrystaly léčiv jsou obvykle dispergovány v nanosuspenzích, možnosti chemických reakcí zde nejsou tak zásadní jako v případě léčiv rozpuštěných. Na rozdíl od fyzikálních stabilitních problémů, chemická stabilita je specifická pro každé léčivo. Každá molekula má specifické funkční skupiny a mechanismy reakcí, které ovlivňují stabilitu. Např. estery nebo amidy jsou náchylné k degradaci hydrolytické, zatímco aminoskupina podléhá oxidační degradaci. Společnou strategií pro zvýšení chemické stability je přeměna nanosuspenze do pevné lékové formy, která je mnohem stabilnější.⁵⁷

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

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

Homogenizátor DiAx 900 Heidolph, 8000-26000 ot./min., 6 pásem

Homogenizační jednotka IKA Magic LAB, Ika

Magnetická míchačka IKA-WERKE RT 5 power, 100-1000 ot./min, Ika

Stopky DS 35 ZPA PRAGOTRON

Váhy Kern 440-53N, max. 400 g, d= 0,01 g

Zetasizer ZS, Malvern Instruments, UK Zetasizer ZS 90

4.2 Použité chemikálie

Aceton p. a., Penta

Cetrimid (N-cetyl-N, N, N-trimethylammoniumbromid), Merck, SRN

Chlorform p. a., Penta, Chrudim

Chlorid sodný, Penta, Chrudim

Ethylacetát (Butanon), Lachema a. s., Neratovice

Ethylmethylketon, Lachema a. s., Neratovice

Lecitin, Stern, SRN

Koenzym Q10, Chemopharma, Vídeň

Kyselina chlorovodíková 35%, Lachema a.s., Neratovice

Kyselina dusičná 65%, Lach-Ner, s. r. o., Neratovice

Methanol, Penta, Chrudim

Polysorbát 20, Dr. Kulich Pharma, s. r. o., Hradec Králové

Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu (T3), syntéza na KFT

4.3 Seznam zkratek k experimentální části

BT	baze terbinafinu
CET	cetrimid
EMK	ethylmethyketon
PkInt	pík intenzitního průměru
PkVol	pík objemového průměru
PSB	polysorbát 20
T3	terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu
Z-Ave	celkový střední rozměr

4.4 Pracovní postup

4.4.1 Příprava baze terbinafinu

Terbinafin hydrochlorid byl navážen na analytických vahách a za stálého míchání míchačkou byl při pokojové teplotě rozpuštěn v destilované vodě. Po jeho rozpuštění bylo pH roztoku upraveno na 8-9 přidáváním roztoku amoniaku. pH bylo kontrolováno pomocí pH indikátorových papírků. Po dosažení daného pH došlo k vysrážení baze terbinafinu z roztoku. Vzniklá suspenze baze terbinafinu byla vytřepávána v dělicí nálevce s chloroformem nebo dichlormethanem. Došlo k rozpuštění baze terbinafinu v organickém rozpouštědle. Poté byly fáze odděleny a organická fáze byla odpuštěna na Petriho misku, kde došlo k odpaření rozpouštědla a vzniku baze terbinafinu mazlavé konzistence. Baze terbinafinu byla připravena z 2 kg 0,5% roztoku terbinafin hydrochloridu.

4.4.2 Příprava vnitřní fáze

Na analytických vahách byl navážen polymer T3 a baze terbinafinu. U vzorků 19 - 26 byl navážen navíc lecitin a u vzorků 73 - 78 koenzym Q10. Všechny látky byly přemístěny do kádinky, kde k nim byl dovážen ethylmethylketon. Mícháním skleněnou tyčinkou byly látky rozpuštěny. Během míchání došlo k odpaření části ethylmethylketonu, který poté musel být dovážen. K vybraným vzorkům byl přidán aceton nebo metylalkohol v různých koncentracích. Vnitřní fáze byla připravována pro všechny vzorky v množství 10,0 g. Koncentrace směsi polymeru T3 a BT nebo směsi T3, BT a aditiva (lecitin nebo koenzym Q10) byla 1 nebo 3 %.

4.4.3 Příprava vnější fáze

Do 100ml kádinky byl na vahách navážen emulgátor cetrimid nebo polysorbát 20 a následně byl rozpuštěn v destilované vodě. Koncentrace roztoku emulgátoru byla 0,025-0,20 %. U vybraných vzorků byla vnější fáze sycena ethylmethylketonem v koncentraci 5-20 %. U vzorků 53-60 byl navážen chlorid sodný a mícháním rozpuštěn v roztoku emulgátoru. Koncentrace NaCl byla 0 až 25 %. Vnější fáze byla u všech vzorků připravována v množství 50,0 g

4.4.4 Příprava suspenze nanočástic

Suspenze nanočástic byla připravována 3 postupy.

- A. Kádinka s vnější fází byla umístěna pod turbínu homogenizátoru tak, aby její konec byl 1,5 cm ode dna kádinky. Homogenizátor byl zapnut a otáčky postupně zvyšovány na stupeň 6 (maximum). Poté byl k vnitřní fázi rychle přidán celý objem vnitřní fáze a za nejvyšších otáček byla emulze nanočástic míchána 60 s. Čas byl měřen stopkami. Po uplynutí času byly otáčky postupně snižovány na minimum a homogenizátor vypnut. Kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku, kde byla ponechána 2 hodiny. Po uplynutí 2 hodin, kdy došlo k odpaření rozpouštědla vnitřní fáze, byl vzorek podroben měření velikosti nanočástic na přístroji Zetasizer.⁶¹

- B. Kádinka s připravenou vnější fází byla umístěna pod homogenizátor tak, aby turbína byla ve výšce cca 1,5 cm ode dna kádinky. Homogenizátor byl zapnut a otáčky postupně zvyšovány na stupeň 6. Poté byl rychle přidán celý objem vnitřní fáze. Čas míchání byl 20 s. Poté byl vzorek nalit do přístroje IKA magic LAB® nastaveného na režim koloidní mlýn a celkem 5 minut homogenizován při otáčkách 26000. Vzhledem k technickým požadavkům přístroje IKA bylo při tomto postupu připraveno celkem 500,0 g vzorku (417,0 g vnější fáze a 83,0 g vnitřní fáze). Při homogenizaci na přístroji IKA docházelo ke vzniku pěny, proto muselo být míchání několikrát přerušeno na dobu 3 minut. Po uplynutí celkového času míchání (5 minut) byla kádinka umístěna na magnetickou míchačku na dobu 2 hodin.⁶¹

- C. Kádinka s připravenou vnější fází byla umístěna pod turbínu homogenizátoru stejným způsobem jako v bodě A. a B. Homogenizátor byl zapnut a otáčky byly zvyšovány na stupeň 3. Byl přidán roztok vnitřní fáze a při této intenzitě byl vzorek homogenizován 20 s. Poté byly otáčky zvýšeny na stupeň 6 a při této intenzitě byl vzorek míchán 60 s. Po uplynutí časového intervalu byly otáčky snižovány na minimum a homogenizátor vypnut. Vzorek byl dále zpracován stejně jako v bodech A a B.⁶¹

4.4.5 Měření velikosti nanočástic

Měření bylo prováděno na přístroji Zetasizer. Část suspenze nanočástic byla odebrána a přemístěna do měrné kyvety. Poté byla kyveta vložena do přístroje a bylo provedeno měření. Každý vzorek byl přístrojem proměřen 3x.



Obr. 9: Zetasizer⁶¹

4.5 Princip měření velikosti nanočástic metodou PCS

Měření velikosti nanočástic je založeno na Brownově pohybu, kdy rychlost termokinetického pohybu je úměrná velikosti nanočástic (malé částice se pohybují rychleji a velké pomaleji). Při svém pohybu odráží částice laserový paprsek, který prochází měřeným vzorkem v kyvetě, a ten se rozptýlí mnoha směry. Jev se nazývá dynamický rozptyl světla (DLS), metoda měření fotonová korelační spektroskopie (PCS). Detektor pak vyhodnocuje dopadající záření a zaznamenává rychlost pohybu částic v čase. Následně přístroj přepočítá přes korelátor a Stokesovu - Einsteinovu rovnici rychlost pohybu částic na jejich velikost.

$$d(H) = kT/3\pi\eta D$$

Kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, D je koeficient difúze, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí.

Zetasizer ZS 90, na kterém bylo provedeno měření, měří kolísání intenzity laserového paprsku. Korelátor, který je součástí přístroje, pak porovnává kolísání intenzity paprsku v čase a výstupem je velikost částic v podobě distribuce velikosti částic (distribuce podle intenzity nebo podle objemu). Změny v distribuci částic pak charakterizuje polydisperzita.⁶¹

5 VÝSLEDKY

V této části jsou popsány parametry nanočástic, které byly získány měřením na přístroji Zetasizer ZS 90.

- V Tab. 1 je popsáno složení vzorků.
- V Tab. 2 až Tab. 24 je zaznamenána granulometrická charakterizace nanočástic.
- Obr. 10 až Obr. 21 znázorňují vlivy různých proměnných na velikost nanočástic.
- Na Obr. 22 až Obr. 27 jsou zobrazeny frekvenční křivky několika měřených vzorků.

5.1 Tabulky

Tab. 1: Složení vzorků

vzorek č.	koncentrace směsi BT+T3 [%]	BT [%]	T3 [%]	lecitin [%]	emulgátor	sycení EMK [%]	aditivum	NaCl [%]	postup přípravy
1	1	0	100	-	CET 0,20%	-	-	-	A
2	1	5	95	-		-	-	-	
3	1	10	90	-		-	-	-	
4	1	15	85	-		-	-	-	
5	1	20	80	-		-	-	-	
6	1	25	75	-		-	-	-	
7	3	0	100	-		-	-	-	
8	3	5	95	-		-	-	-	
9	3	10	90	-		-	-	-	
10	3	15	85	-		-	-	-	
11	3	20	80	-		-	-	-	
12	3	25	75	-		-	-	-	
13	1	0	100	-		-	-	-	
14	1	5	95	-		-	-	-	
15	1	10	90	-		-	-	-	
16	1	15	85	-		-	-	-	
17	1	20	80	-		-	-	-	
18	1	25	75	-		-	-	-	
19	1	15	80	5		-	-	-	
20	1	10	80	10		-	-	-	
21	1	5	80	15		-	-	-	
22	1	0	80	20		-	-	-	

Tab. 1 a: Složení vzorků.

vzorek č.	koncentrace směsi BT+T3 [%]	BT [%]	T3 [%]	lecitin [%]	emulgátor	sycení EMK [%]	aditivum	NaCl [%]	postup přípravy
23	1	15	80	5	PSB 0,20%	-	-	-	A
24	1	10	80	10		-	-	-	
25	1	5	80	15		-	-	-	
26	1	0	80	20		-	-	-	
27	1	0	100	-		5	-	-	
28	1	0	100	-		10	-	-	
29	1	0	100	-		15	-	-	
30	1	0	100	-		20	-	-	
31	3	0	100	-		5	-	-	
32	3	0	100	-		10	-	-	
33	3	0	100	-		15	-	-	
34	3	0	100	-		20	-	-	
35	1	10	90	-		15	-	-	
36	1	20	80	-		15	-	-	
37	1	0	100	-	CET 0,20%	-	MeOH 0%	-	
38	1	0	100	-		-	MeOH 5%	-	
39	1	0	100	-		-	MeOH 10%	-	
40	1	0	100	-		-	MeOH 15%	-	
41	1	0	100	-		-	MeOH 20%	-	
42	1	0	100	-		-	MeOH 30%	-	

Tab. 1 b: Složení vzorků.

vzorek č.	koncentrace směsi BT+T3 [%]	BT [%]	T3 [%]	lecitin [%]	emulgátor	sycení EMK [%]	aditivum	NaCl [%]	postup přípravy
43	1	0	100	-	CET 0,20%	-	Acet. 0%	-	A
44	1	0	100	-		-	Acet. 5%	-	
45	1	0	100	-		-	Acet. 10%	-	
46	1	0	100	-		-	Acet. 15%	-	
47	1	0	100	-		-	Acet. 20%	-	
48	1	0	100	-		-	Acet. 30%	-	
49	1	0	100	-		-	Acet. 50%	-	
50	1	0	100	-		-	Acet. 70%	-	
51	1	0	100	-		-	Acet. 90%	-	
52	1	0	100	-		-	Acet. 100%	-	
53	1	0	100	-		-	-	0	
54	1	0	100	-		-	-	3	
55	1	0	100	-		-	-	5	
56	1	0	100	-		-	-	10	
57	1	0	100	-		-	-	15	
58	1	0	100	-		-	-	20	
59	1	0	100	-		-	-	25	
60	1	0	100	-	PSB 0,20%		-	10	

Tab. 1 c: Složení vzorků.

vzorek č.	koncentrace směsi BT+T3 [%]	BT [%]	T3 [%]	koenzym Q10 [%]	emulgátor	sycení EMK [%]	aditivum MeOH [%]	NaCl [%]	postup přípravy
61	1	10	90	-	CET 0,20%	-	0	-	A
62	1	10	90	-		-	10	-	
63	1	10	90	-		-	20	-	
64	1	10	90	-		-	30	-	
65	1	10	90	-		-	40	-	
66	1	30	70	-		-	0	-	
67	1	30	70	-		-	10	-	
68	1	30	70	-		-	20	-	
69	1	30	70	-		-	30	-	
70	1	30	70	-		-	40	-	
71	1	30	70	-		-	50	-	
72	1	10	90	-		-	50	-	
73	1	0	90	10	CET 0,20%	-	0	-	
74	1	0	90	10		-	10	-	
75	1	0	90	10		-	20	-	
76	1	0	90	10		-	30	-	
77	1	0	90	10		-	40	-	
78	1	0	90	10		-	50	-	

Tab. 1 d: Složení vzorků.

vzorek č.	koncentrace směsi BT+T3 [%]	BT [%]	T3 [%]	lecitin [%]	emulgátor	sycení EMK [%]	aditivum MeOH [%]	NaCl [%]	postup přípravy
79	1	0	100	-	CET 0,20%	-	-	-	A
80	3	0	100	-		-	-	-	
81	3	30	70	-		-	-	-	
82	3	10	90	-		-	-	-	
83	1	0	100	-		-	-	-	
84	1	0	100	-		-	-	-	
85	3	0	100	-		-	-	-	
86	1	0	100	-	CET 0,05%	-	-	-	
87	3	0	100	-		-	-	-	
88	1	0	100	-	CET 0,025%	-	-	-	
89	3	0	100	-		-	-	-	
90	1	0	100	-	CET 1%	-	-	-	
91	3	0	100	-		-	-	-	
92	1	10	90	-		-	-	-	
93	1	30	70	-		-	-	-	
94	3	10	90	-		-	-	-	
95	3	30	70	-		-	-	-	
96	1	10	90	-	CET 0,20%	-	-	-	
97	1	30	70	-		-	-	-	

Tab. 1 e: Složení vzorků.

vzorek č.	koncentrace směsi BT+T3 [%]	BT [%]	T3 [%]	lecitin [%]	emulgátor	sycení EMK [%]	aditivum MeOH [%]	NaCl [%]	postup přípravy
98	1	0	100	-	CET 0,20%	-	-	-	B
99	1	0	100	-		-	-	-	
100	1	0	100	-		-	-	-	
101	3	0	100	-		-	-	-	
102	1	0	100	-		-	-	-	
103	1	0	100	-		14	-	-	C
104	1	0	100	-		4,5	-	-	
105	1	0	100	-		-	-	-	
106	1	0	100	-		-	-	-	
107	1	0	100	-		7	-	-	
108	1	0	100	-		14	-	-	
109	1	0	100	-		21	-	-	
110	1	0	100	-		7	-	-	
111	1	0	100	-		10,5	-	-	
112	3	0	100	-		7	-	-	
113	3	0	100	-		14	-	-	
114	3	0	100	-		21	-	-	
115	3	30	70	-		-	-	-	A
116	3	10	90	-		-	-	-	

Tab. 2: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
1	1	700,2	0,586	584,8	4583	0	76,6	23,4	0
	2	901,2	0,654	571,6	5269	93,05	84,1	14,9	1
	3	846,9	0,819	470,5	5379	0	85,1	14,9	0
2	1	280,2	0,354	294,6	4713	0	91,2	8,8	0
	2	280,6	0,374	244,7	2397	0	74,4	25,6	0
	3	298,8	0,387	304,1	4635	0	88,7	11,3	0
3	1	386,3	0,415	335,4	88,29	0	97,8	2,2	0
	2	406,7	0,71	304,8	4096	1416	66,2	25,1	8,7
	3	404,2	0,666	341,4	3568	0	67,2	32,8	0
4	1	494,2	0,514	339,2	2208	0	50,8	49,2	0
	2	481,3	0,35	881,1	168,8	0	79	21	0
	3	461,2	0,655	1012	248,2	4993	50,9	41,5	7,6
5	1	372,3	0,804	341,8	0	0	100	0	0
	2	367,1	0,451	353,3	0	0	100	0	0
	3	355,1	0,325	349,5	0	0	100	0	0
6	1	621,5	0,605	264,2	0	0	100	0	0
	2	511,1	0,545	470,8	156,3	0	75,1	24,9	0
	3	427,6	0,665	525,2	155,5	4882	64,4	22	13,6

Tab. 3: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
7	1	738,2	0,731	861,5	258,2	5516	47,6	47,3	5,1
	2	750,4	0,705	527,6	162,6	5497	79,4	14,5	6,1
	3	606,2	0,768	496,3	4687	102,5	71,3	26,1	2,6
8	1	317,8	0,413	273,1	1233	4162	73,4	13,5	13,1
	2	313,8	0,391	247,2	2021	4620	73,2	19,3	7,5
	3	307,7	0,379	341,9	3640	0	84,7	15,3	0
9	1	383,7	0,622	212,9	1004	5373	55,6	40,4	4,1
	2	425,7	0,533	249,7	1151	5394	70,3	24,8	4,8
	3	370	0,58	219	1219	5185	58,4	36	5,5
10	1	606,4	0,577	515,5	139,3	0	83,5	16,5	0
	2	525,9	0,741	329,9	1565	4534	51,3	34,5	14,1
	3	545,9	0,496	370,4	1601	4051	55,3	26	18,6
11	1	699,7	0,828	1461	234,6	5161	57,4	32,8	9,8
	2	741,1	0,603	1928	230,3	0	76,7	23,3	0
	3	821	0,821	1189	239,5	5218	66,7	24,2	9,1
12	1	543,1	0,528	1145	278,8	4105	46,5	37,5	16
	2	535,1	0,543	1765	256,1	5238	59	40	1
	3	581,1	0,518	874	227,4	3721	49,9	25,9	24,2

Tab. 4: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
13	1	527,8	0,529	367,9	5275	2205	90,4	8,5	1,2
	2	517,8	0,453	362,5	4711	0	76,3	23,7	0
	3	427,3	0,482	322,6	5366	0	93,1	6,9	0
14	1	285,2	0,252	239,2	0	0	100	0	0
	2	283,5	0,242	267,3	0	0	100	0	0
	3	282	0,327	243	5379	0	96,5	3,5	0
15	1	272,9	0,341	240,5	1367	4519	75,9	20,1	4,1
	2	304,9	0,385	274,8	3990	0	84,9	15,1	0
	3	314,4	0,342	308	5229	80,7	90	5,1	4,9
16	1	309,6	0,364	306,3	4876	0	91,9	8,1	0
	2	308,6	0,349	306,9	4653	0	89,5	10,5	0
	3	330,7	0,485	427,4	4416	0	87,9	12,1	0
17	1	544,5	0,572	1119	211,3	0	65,1	34,9	0
	2	519,8	0,607	1727	240,4	0	65	35	0
	3	482,2	0,559	1372	203,6	0	68,3	31,7	0
18	1	483,9	0,665	1065	202,8	5387	60,4	36,8	2,8
	2	562,4	0,543	1842	249,4	5247	58,7	39,3	2
	3	701,3	0,652	812,8	264,5	5126	50,9	34,4	14,7

Tab. 5: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
19	1	368,8	0,441	415,3	4080	0	82,8	17,2	0
	2	397,9	0,492	249,1	2665	0	56,8	43,2	0
	3	451,9	0,525	293	0	0	100	0	0
20	1	460,6	0,656	298,1	5560	0	98,9	1,1	0
	2	374,6	0,568	340	3634	0	72,7	27,3	0
	3	429,9	0,629	327,6	5341	0	90,7	9,3	0
21	1	286,2	0,356	299,4	82,83	5175	86,1	8,2	5,7
	2	298,1	0,411	379,3	4858	0	92,1	7,9	0
	3	330,8	0,444	406,4	4194	0	86,8	13,2	0
22	1	306,4	0,485	237,9	976,8	5108	72,1	21,9	6
	2	323,1	0,423	446,2	4370	0	90,9	9,1	0
	3	318	0,401	335,1	4871	0	91,2	8,8	0

Tab. 6: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
23	1	1818	1	444,9	0	0	100	0	0
	2	2012	0,375	905,4	0	0	100	0	0
	3	3642	1	220,2	0	0	100	0	0
24	1	311,7	0,343	282,9	3260	0	81,2	18,8	0
	2	304,7	0,351	261,8	3764	0	80,7	19,3	0
	3	308,6	0,368	281,5	4262	1302	83,5	12,3	4,3
25	1	385,3	0,485	630,5	147,4	0	50,1	49,9	0
	2	380	0,672	321,6	5011	0	83,8	16,2	0
	3	373,7	0,711	207,9	1048	5034	57,4	29,9	12,6
26	1	520,9	0,803	349,7	5264	0	84,9	15,1	0
	2	545,4	0,593	233,1	731,4	5553	52,2	44,5	3,3
	3	541,8	0,755	362,2	5253	76,4	83	15,4	1,6

Tab. 7: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
27	1	367,1	0,308	361,7	0	0	100	0	0
	2	413,8	0,087	419,8	0	0	100	0	0
	3	411,2	0,255	403,8	0	0	100	0	0
28	1	331,4	0,256	443,8	0	0	100	0	0
	2	303,4	0,279	344,5	4012	0	92,1	7,9	0
	3	429,6	0,255	604,2	0	0	100	0	0
29	1	2762	1	40,49	0	0	100	0	0
	2	1130	1	107,2	0	0	100	0	0
	3	590,7	0,492	251,5	0	0	100	0	0
30	1	4096	1	21,8	0	0	100	0	0
	2	4,74E+04	1	0	0	0	0	0	0
	3	3,96E+04	1	0	0	0	0	0	0
35	1	261,2	0,166	281,2	4952	0	98,1	1,9	0
	2	318,2	0,218	368,7	4747	0	97,2	2,8	0
	3	324,1	0,248	327,4	4702	0	93,7	6,3	0
36	1	443,1	0,409	227,4	0	0	100	0	0
	2	349,7	0,281	305,3	0	0	100	0	0
	3	299,5	0,221	319,2	4419	0	94,7	5,3	0

Tab. 8: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
31	1	789,2	0,539	1685	248,6	0	80,2	19,8	0
	2	603,1	0,521	2245	293,5	0	58,5	41,5	0
	3	521,4	0,454	1527	329,6	0	55,6	44,4	0
32	1	346,8	0,225	456,2	0	0	100	0	0
	2	334,8	0,254	674,5	230,8	0	55,9	44,1	0
	3	336,8	0,251	543,8	0	0	100	0	0
33	1	329,9	0,18	391,8	0	0	100	0	0
	2	289,1	0,204	305,5	4890	0	96,9	3,1	0
	3	342,8	0,245	460,1	0	0	100	0	0
34	1	989	0,737	284	0	0	100	0	0
	2	959,8	0,714	287,5	0	0	100	0	0
	3	1617	1	143,1	0	0	100	0	0

Tab. 9: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 a.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
37	1	320,6	0,615	211,1	0	0	100	0	0
	2	329,1	0,565	182,2	0	0	100	0	0
	3	366,5	0,083	203	0	0	100	0	0
38	1	237,7	0,353	243,2	4052	1455	84,6	8,8	6,6
	2	261,8	0,357	259,1	5020	59,62	89,7	7,4	2,8
	3	268,8	0,447	267,2	4567	0	87,3	12,7	0
39	1	336,4	0,39	603,6	171,7	4996	64,9	31,8	3,3
	2	290,7	0,367	320,4	4504	0	91	9	0
	3	273,6	0,326	308,6	4914	0	94,7	5,3	0
40	1	244,7	0,228	278,1	4728	0	96,5	3,5	0
	2	235,9	0,22	258,2	4977	0	97,2	2,8	0
	3	242,4	0,244	254,5	4756	0	94,9	5,1	0
41	1	180,7	0,137	211,6	0	0	100	0	0
	2	176	0,162	213,2	0	0	100	0	0
	3	176,7	0,165	204,4	0	0	100	0	0
42	1	175,8	0,085	192,1	0	0	100	0	0
	2	173,4	0,084	187,2	0	0	100	0	0
	3	170	0,126	185,8	0	0	100	0	0

Tab. 10: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
43	1	392,1	0,413	304,2	4745	0	85,2	14,8	0
	2	366,8	0,402	284,8	0	0	100	0	0
	3	340,7	0,323	258,5	5560	0	97,7	2,3	0
44	1	403,8	0,694	532,5	175,3	4664	52,2	29,7	0
	2	430,4	0,623	319,2	1206	5016	68,2	15,4	18,1
	3	437,2	0,67	247,2	1457	5397	67,2	27,9	13
45	1	267	0,365	258,1	3500	0	82,5	17,5	0
	2	262,8	0,372	242,7	1088	4615	77,7	15,9	6,4
	3	236,1	0,299	237,5	4496	0	91,4	8,6	0
46	1	230,3	0,237	239,1	4757	0	95	5	0
	2	232,3	0,218	274,1	5172	0	98,8	1,2	0
	3	235,3	0,281	254,2	3159	0	89,8	10,2	0
47	1	367,8	0,365	469,6	4791	0	93,1	6,9	0
	2	339,2	0,42	287,3	2831	0	70,6	29,4	0
	3	316,5	0,367	294,4	3973	0	82,7	17,3	0

Tab. 11: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
48	1	194	0,169	221,6	4674	0	98,4	1,6	0
	2	190,6	0,189	227,2	0	0	100	0	0
	3	193	0,199	244	0	0	100	0	0
49	1	176,9	0,12	202,5	0	0	100	0	0
	2	176,1	0,167	187,6	0	0	100	0	0
	3	174,9	0,061	187,4	0	0	100	0	0
50	1	163	0,108	177,9	0	0	100	0	0
	2	163	0,08	177,1	0	0	100	0	0
	3	162,8	0,134	170	0	0	100	0	0
51	1	159,1	0,112	177,5	0	0	100	0	0
	2	158,6	0,094	175,1	0	0	100	0	0
	3	159,8	0,117	179,7	0	0	100	0	0
52	1	169,6	0,147	199,1	0	0	100	0	0
	2	171,4	0,138	192,3	0	0	100	0	0
	3	171,4	0,095	191,3	0	0	100	0	0

Tab. 12: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
53	1	260	0,328	235	0	0	100	0	0
	2	270,2	0,337	274,6	5319	0	96,6	3,4	0
	3	265,3	0,33	239,5	0	0	100	0	0
54	1	2356	1	141,8	0	0	100	0	0
	2	1794	1	1597	78,72	0	63,2	36,8	0
	3	1752	0,879	2770	81,23	0	86,5	13,5	0
55	1	1932	1	231,5	1,724	0	88,6	11,4	0
	2	2247	1	164,4	2,471	0	81,2	18,8	0
	3	1918	1	209,2	2,258	0	83,9	16,1	0
56	1	5033	1	75,8	0	0	100	0	0
	2	4493	1	81,64	1,504	0	78,2	21,8	0
	3	3,41E+04	0,583	0	0	0	0	0	0
57	1	1124	0,881	310,1	4,524	5434	55,6	26,8	17,6
	2	1968	1	187	5404	0	56,8	43,2	0
	3	1763	1	174,2	5560	40,5	68,9	18,7	12,4
58	1	2905	1	3756	0	0	100	0	0
	2	4256	1	4948	0	0	100	0	0
	3	2745	1	3566	0	0	100	0	0

Tab. 13: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 b.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
59	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1672	1	15,07	0,6627	5560	45,4	34,2	14,6
	3	2,61E+04	0,239	0,9218	0	0	100	0	0
60	1	1,75E+04	0,539	0	0	0	0	0	0
	2	2,27E+04	0,545	0	0	0	0	0	0
	3	2,81E+04	0,354	0	0	0	0	0	0

Tab. 14: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 c.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
61	1	296	0,4	316,1	5560	0	99	1	0
	2	307	0,425	216,2	1288	5145	63,5	33,8	2,7
	3	322,60	0,53	209,4	615,8	5108	49,7	44,6	5,7
62	1	355	0,427	320	5447	0	97,1	2,9	0
	2	347,9	0,43	344,4	4662	0	85,9	14,1	0
	3	336,1	0,469	263,8	1727	4417	69,3	20,8	9,9
63	1	214,1	0,125	247,6	0	0	100	0	0
	2	212,2	0,145	243,3	0	0	100	0	0
	3	209,4	0,159	231,3	5012	0	98,9	1,1	0
64	1	231,7	0,248	276,2	4178	0	95,5	4,5	0
	2	225,3	0,232	253,8	3959	0	94,5	5,5	0
	3	219,4	0,211	308,3	0	0	100	0	0
72	1	229,2	0,344	215,5	2707	0	80,4	19,6	0
	2	233,7	0,31	254,4	4790	0	94,2	5,8	0
	3	228,4	0,338	259	3257	0	88	12	0

Tab. 15: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 c.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
66	1	414,5	0,466	1020	237,2	4445	54,1	40,2	5,8
	2	413	0,447	342,2	1335	4591	63,3	30,8	5,9
	3	415,6	0,422	631,1	170,9	5241	74,1	19,5	6,5
67	1	494,4	0,512	1645	246,5	0	57,5	41,5	1,1
	2	475,8	0,465	1402	245,5	5229	62,7	37,3	0
	3	460,9	0,488	1086	224,3	0	56,4	40,7	2,8
68	1	256,3	0,165	255,9	0	0	100	0	0
	2	250,4	0,165	251,1	0	0	100	0	0
	3	262,3	0,233	258,6	0	0	100	0	0
69	1	226,2	0,197	255,7	4998	0	98,4	1,6	0
	2	220,9	0,199	233,8	5065	0	97,7	2,3	0
	3	224,9	0,214	230,9	4591	0	95	5	0
70	1	191,9	0,253	225,5	4593	42,07	95,5	3,8	0,7
	2	194,8	0,267	250,2	4529	0	95,8	4,2	0
	3	192,4	0,293	217,6	4632	0	94,5	5,5	0
71	1	318	0,372	212,9	78,35	0	85,2	14,8	0
	2	230	0,535	164,3	726	5036	62	32,6	5,5
	3	238,6	0,44	231,8	1408	4158	73,6	16,7	9,8

Tab. 16: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 c.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
73	1	299,7	0,239	408,6	4484	0	96,5	3,5	0
	2	331,3	0,248	520,8	0	0	100	0	0
	3	355,9	0,408	324,3	1492	4842	66,8	30,9	2,3
74	1	216,3	0,122	249,2	0	0	100	0	0
	2	216,6	0,137	242,4	0	0	100	0	0
	3	218	0,109	241	0	0	100	0	0
75	1	201,5	0,114	216,8	0	0	100	0	0
	2	203,5	0,064	216	0	0	100	0	0
	3	199,8	0,074	212,7	0	0	100	0	0
76	1	193,4	0,104	217,3	0	0	100	0	0
	2	193,9	0,101	216,7	0	0	100	0	0
	3	195,1	0,094	217,8	0	0	100	0	0
77	1	194,9	0,231	268	0	0	100	0	0
	2	193,8	0,231	245,3	4691	0	98,7	1,3	0
	3	199,5	0,234	238,1	5185	0	98,9	1,1	0
78	1	216,8	0,252	231,7	4429	0	94,1	5,9	0
	2	218,5	0,259	402,5	0	0	100	0	0
	3	217,5	0,255	224,4	4417	0	93	7	0

Tab. 17: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
79	1	397,9	0,402	302,2	4664	0	82,8	17,2	0
	2	379	0,111	265,3	0	0	100	0	0
	3	380,5	0,5	259,3	4368	0	80,7	19,3	0
83	1	276,6	0,328	300,2	5467	0	98,7	1,3	0
	2	282,3	0,342	348	4688	0	94	6	0
	3	290	0,297	359,6	5181	0	97,5	2,5	0
84	1	213,5	0,098	239,4	0	0	100	0	14,8
	2	210,3	0,122	242,6	0	0	100	0	0
	3	208,9	0,131	232,3	0	0	100	0	0
86	1	328,3	0,567	224	2003	4389	66,1	19,2	0
	2	316,2	0,472	221,4	4835	0	79,8	20,2	9,2
	3	311,7	0,361	221,9	5048	0	85,2	14,8	0
88	1	266,1	0,378	215,8	5158	0	90,9	9,1	0,7
	2	262,4	0,453	219	4591	1598	79,9	10,9	0
	3	260,1	0,396	232	5419	0	96,9	3,1	0
90	1	260,7	0,245	306,40	4593	52,36	95,8	3,5	0
	2	252	0,211	282,3	4931	0	97,7	2,3	0
	3	266,7	0,244	310,5	5004	0	97,6	2,4	0

Tab. 18: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
92	1	274,9	0,355	493,4	4675	0	97,6	2,4	0
	2	241,3	0,307	219,8	2599	0	81,1	18,9	0
	3	229,9	0,253	310,9	0	0	100	0	0
93	1	260,6	0,322	282,8	5125	0	96,2	3,8	0
	2	254,5	0,291	284	5269	0	97,7	2,3	0
	3	253,6	0,345	359	4921	0	97,9	2,1	0
96	1	205,2	0,153	231,1	0	0	100	0	0
	2	203,7	0,07	222,9	0	0	100	0	0
	3	197	0,119	218,1	0	0	100	0	0
97	1	324,5	0,464	283,4	2353	0	67,1	32,9	0
	2	315,7	0,425	217,6	987	0	56,8	39,4	3,8
	3	262,9	0,387	233,3	997,7	4461	69,8	25,2	5

Tab. 19: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
80	1	289,3	0,333	267,6	5560	0	98,8	1,2	0
	2	280,9	0,275	269,7	3541	0	86,8	13,2	0
	3	300,4	0,392	220,3	0	0	100	0	0
85	1	256,1	0,276	362	4759	0	97,5	2,5	6
	2	260,3	0,317	261,9	2944	0	85,8	14,2	4,1
	3	271,7	0,386	262,6	5553	0	98,7	1,3	0
87	1	394,3	0,389	287,6	2344	4925	72,3	21,7	10,8
	2	391,3	0,488	272,4	711,5	5303	59,2	36,6	19,2
	3	364,5	0,335	279,8	5365	0	94,1	5,9	7,4
89	1	492,5	0,49	851,3	197,8	4841	56,1	33,1	1,2
	2	491,3	0,722	805,3	242,9	4595	43	37,8	0
	3	524,7	0,736	815	191,5	5262	62,2	30,4	0
91	1	272,2	0,219	319,1	68,28	5183	97,4	1,3	0
	2	269,3	0,254	334	4983	0	97,9	2,1	0
	3	274,6	0,234	356,8	0	0	100	0	0

Tab. 20: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 d.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
81	1	480	0,67	838,9	233,4	5136	45,6	44,3	10,2
	2	601,9	0,615	612,7	225,1	0	58,4	41,6	0
	3	631,5	0,648	878,8	229,1	5560	63,7	34,5	1,7
82	1	280	0,34	251,6	955,6	4957	71,9	25,9	2,2
	2	286,8	0,399	322,9	5025	0	94,4	5,6	0
	3	290	0,359	329	4749	0	93	7	0
94	1	247,2	0,217	306,3	4418	0	98,4	1,6	0
	2	238,8	0,196	263,6	5163	0	98,5	1,5	0
	3	244	0,211	285,9	4977	0	98,3	1,7	0
95	1	231	0,169	283,8	0	0	100	0	0
	2	224,8	0,178	275,2	58,05	0	99,1	0,9	0
	3	224,2	0,15	249,7	0	0	100	0	0

Tab. 21: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
98	1	119,4	0,264	216,8	75,62	0	61,6	38,4	0
	2	121,5	0,341	122,6	24,38	0	98,1	1,9	0
	3	121	0,283	102,3	340	0	61,1	38,9	0
99	1	91,98	0,069	99,8	0	0	100	0	0
	2	91,02	0,071	99,61	0	0	100	0	0
	3	90,04	0,057	96,77	0	0	100	0	0
100	1	172,8	0,243	158,3	5195	0	95,2	4,8	0
	2	166,7	0,233	223,6	0	0	100	0	0
	3	165,6	0,21	220,8	0	0	100	0	0
101	1	104,6	0,168	128,9	0	0	100	0	0
	2	105,5	0,157	126,3	0	0	100	0	0
	3	104,5	0,149	124,8	23,48	0	99,5	0,5	0
102	1	86,46	0,067	93,31	0	0	100	0	0
	2	86,08	0,066	93,68	0	0	100	0	0
	3	85,56	0,073	92,82	0	0	100	0	0
103	1	129,5	0,128	147,8	0	0	100	0	0
	2	130	0,094	145,5	0	0	100	0	0
	3	128	0,083	140,7	0	0	100	0	0

Tab. 22: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.

vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
104	1	245,3	0,246	290,8	4210	0	95,5	4,5	0
	2	209,3	0,214	212,9	4151	0	93,3	6,7	0
	3	225,9	0,234	285,1	4789	0	98,1	1,9	0
105	1	436,5	0,277	655,6	68,04	4934	98,3	1,2	0,6
	2	349,3	0,307	506,7	0	0	100	0	0
	3	302,8	0,342	235,4	678,5	5089	57,3	40,7	2
106	1	389,6	0,49	201,1	0	0	100	0	0
	2	337	0,549	288,8	95,06	0	78,9	21,1	0
	3	289,9	0,543	252,1	95,5	0	82,3	17,7	0
107	1	538,2	0,481	446,8	3806	124,8	63,3	30,9	5,8
	2	534,5	0,577	659	167,7	5234	74,2	19	6,8
	3	553,3	0,445	742,4	189,6	5093	66,8	24,9	8,3

Tab. 23: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.

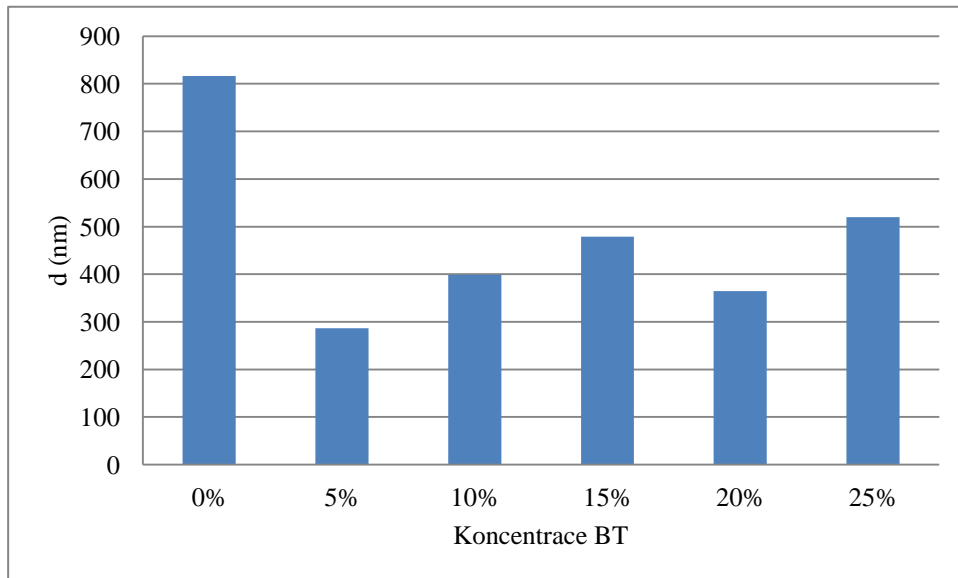
vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
108	1	115,1	0,097	129	0	0	100	0	0
	2	114	0,08	124,9	0	0	100	0	0
	3	113,1	0,1	126,7	0	0	100	0	0
109	1	124,4	0,119	143	0	0	100	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	123,2	0,077	133,9	0	0	100	0	0
110	1	410,5	0,4	517,1	132,7	5393	83	14,8	2,2
	2	389,9	0,386	535	4692	0	95,4	4,6	0
	3	391,6	0,394	590,2	146,2	5253	82,1	16,1	1,8
111	1	189,4	0,119	217,5	0	0	100	0	0
	2	186,7	0,136	208	0	0	100	0	0

Tab. 24: Granulometrická charakterizace nanočástic. Složení vzorků v Tab. 1 e.

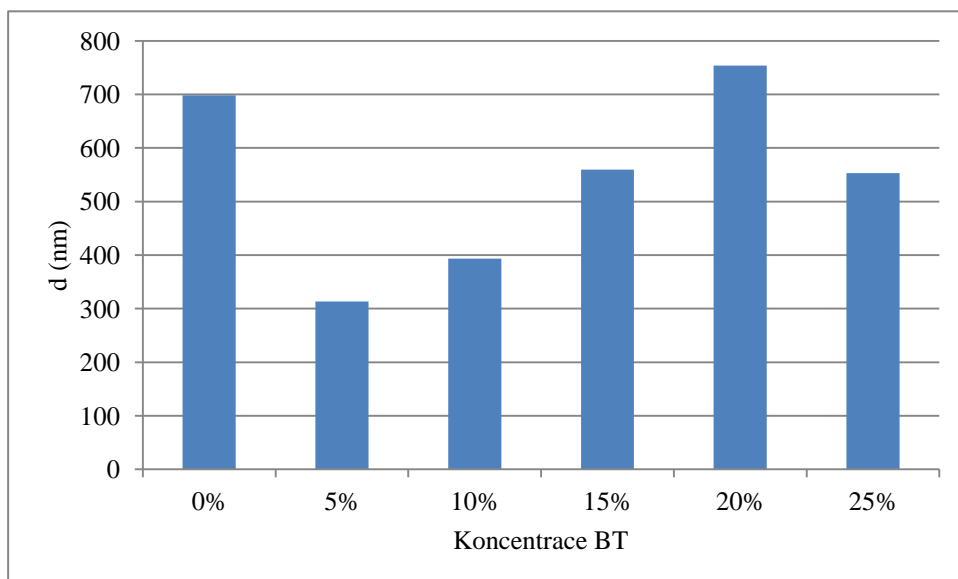
vzorek	číslo měření	Z- Ave [d.nm]	Pdl	Pk1 Int [d.nm]	Pk2 Int [d.nm]	Pk3 Int [d.nm]	Pk1 Vol [%]	Pk2 Vol [%]	Pk3 Vol [%]
112	1	784,8	0,794	995,2	235,6	4990	54,6	26,1	19,3
	2	750,7	0,927	642	4297	137,4	56,1	36,6	7,3
	3	784,9	0,778	618,5	5016	0	78,3	21,7	0
113	1	161,3	0,051	170,5	0	0	100	0	0
	2	161,2	0,031	169,3	0	0	100	0	0
	3	161,1	0,034	169,4	0	0	100	0	0
114	1	175,5	0,019	183,5	0	0	100	0	0
	2	173,7	0,016	181,2	0	0	100	0	0
	3	172	0,003	177,8	0	0	100	0	0
115	1	577,8	0,661	1053	267,3	5043	51,9	37,9	10,2
	2	501,1	0,52	1500	236,3	5076	60,6	38,2	1,2
	3	461,1	0,487	1097	248,4	5163	51,4	44,4	4,2
116	1	303,6	0,383	355,6	4697	0	91,1	8,9	0
	2	346,4	0,499	355,5	5207	0	93,8	6,2	0
	3	342,8	0,515	247,8	932,3	4997	66	25,5	8,5

5.2 Obrázky

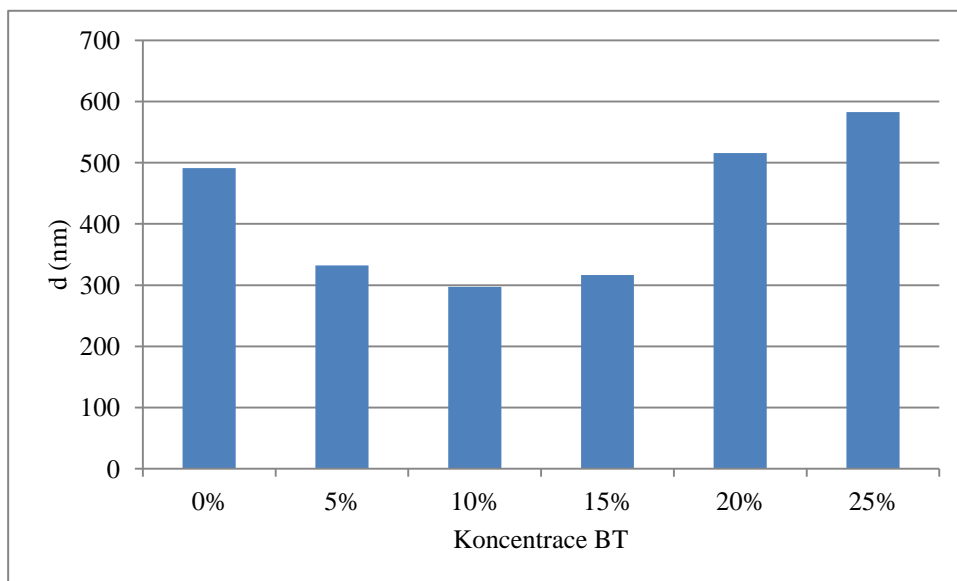
Obr. 10: Vliv koncentrace BT. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 1-6.



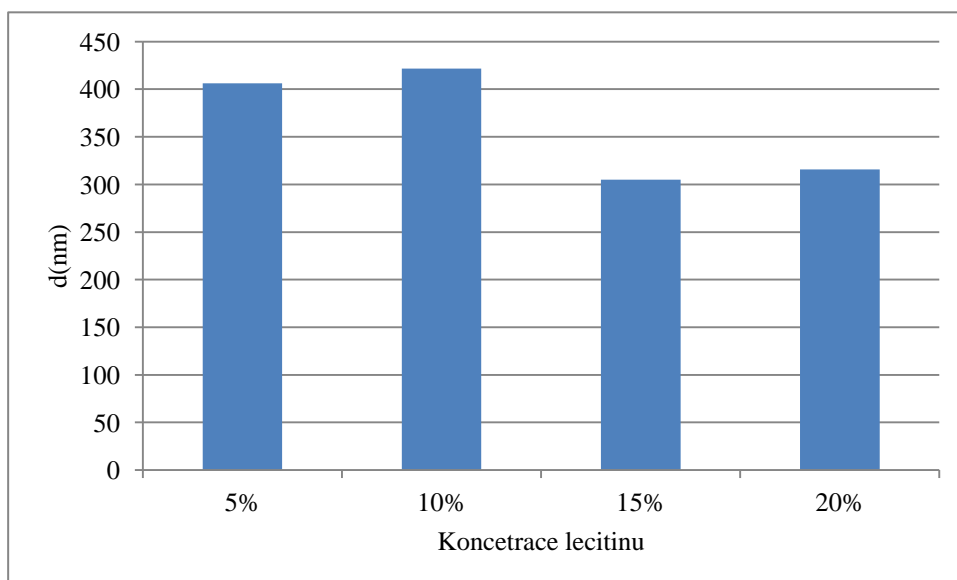
Obr. 11: Vliv koncentrace BT. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 3 %, postup přípravy A. Vzorky 7-12.



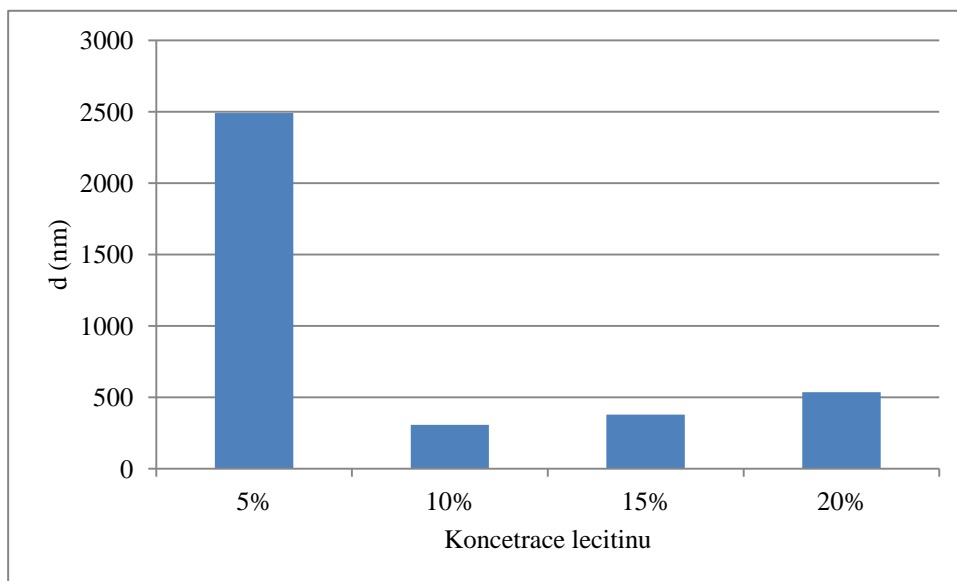
Obr. 12: Vliv koncentrace BT. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 13-17.



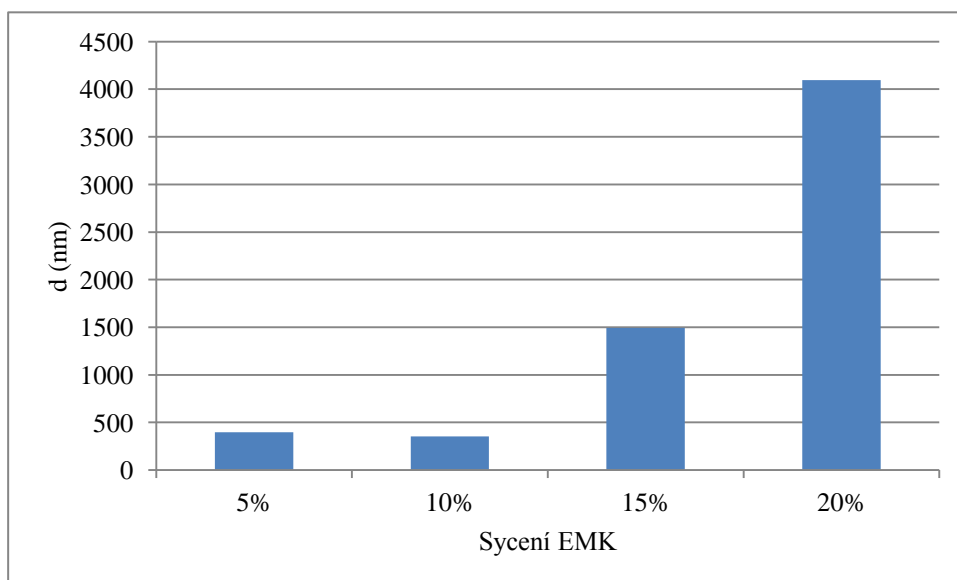
Obr. 13: Vliv koncentrace lecitinu. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 19-22.



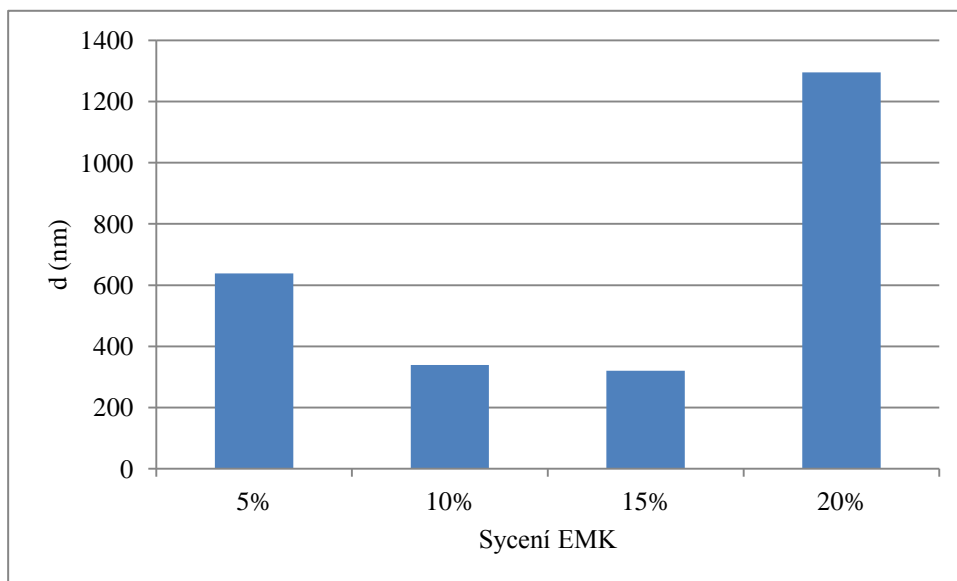
Obr. 14: Vliv koncentrace lecitinu. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor PSB 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 23-26.



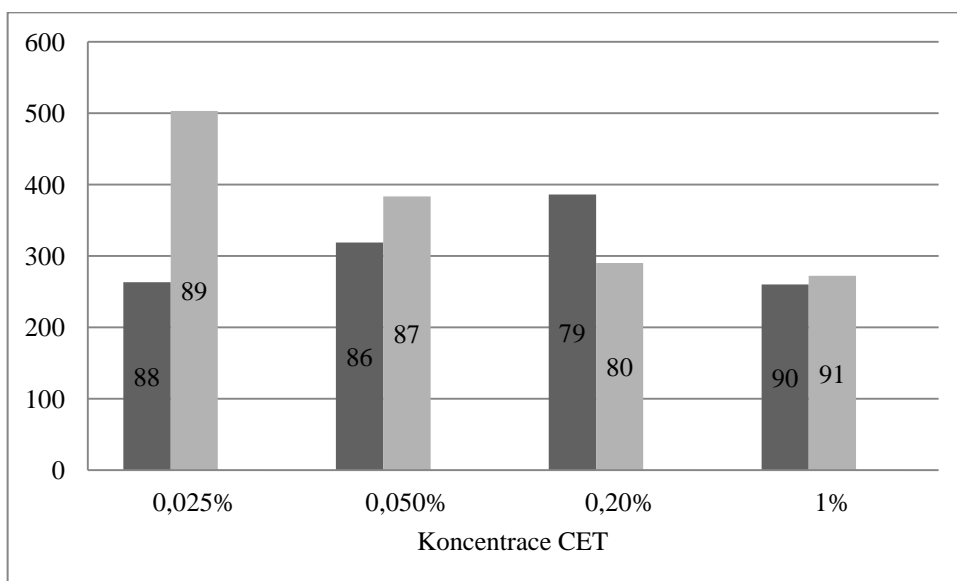
Obr. 15: Vliv koncentrace sycení EMK. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor PSB 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, postup přípravy A. Vzorky 27-30.



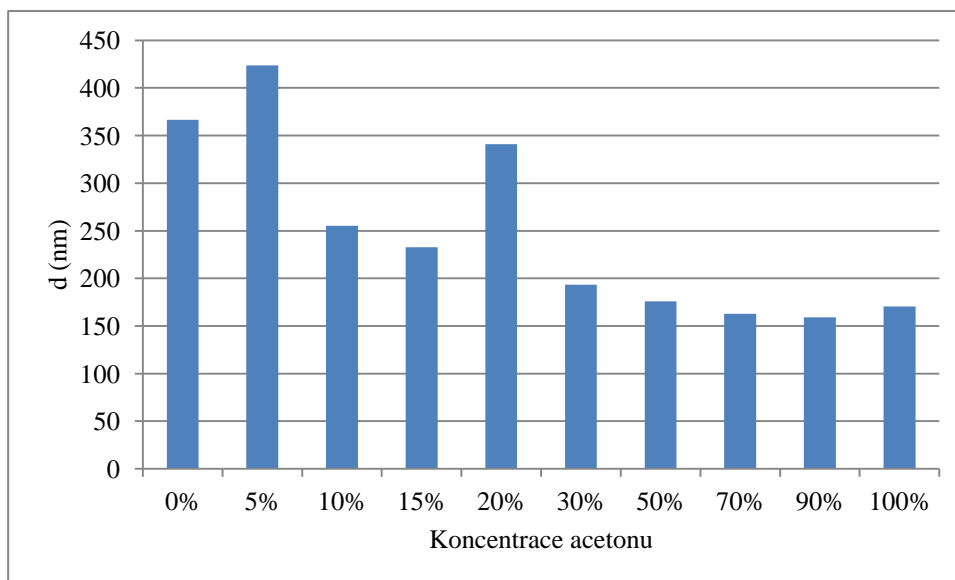
Obr. 16: Vliv koncentrace sycení EMK. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor PSB 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 3 %, postup přípravy A. Vzorky 31-34.



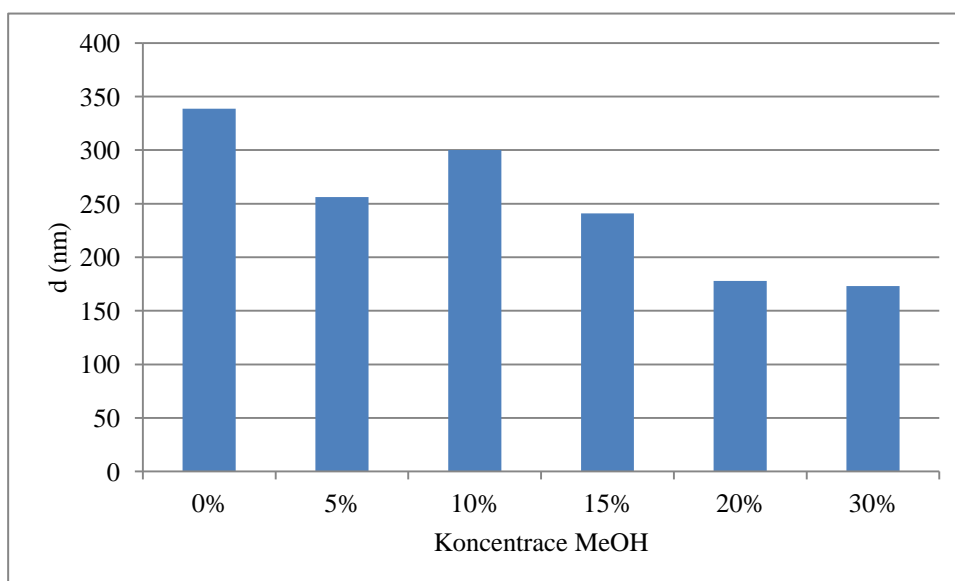
Obr. 17: Vliv koncentrace emulgátoru CET. Velikost nanočástic (nm). Koncentrace směsi BT+T3 1 % (vzorky 79, 86, 88, 90) a 3 % (vzorky 80, 87, 89 a 91), koncentrace T3 100 %, postup přípravy A.



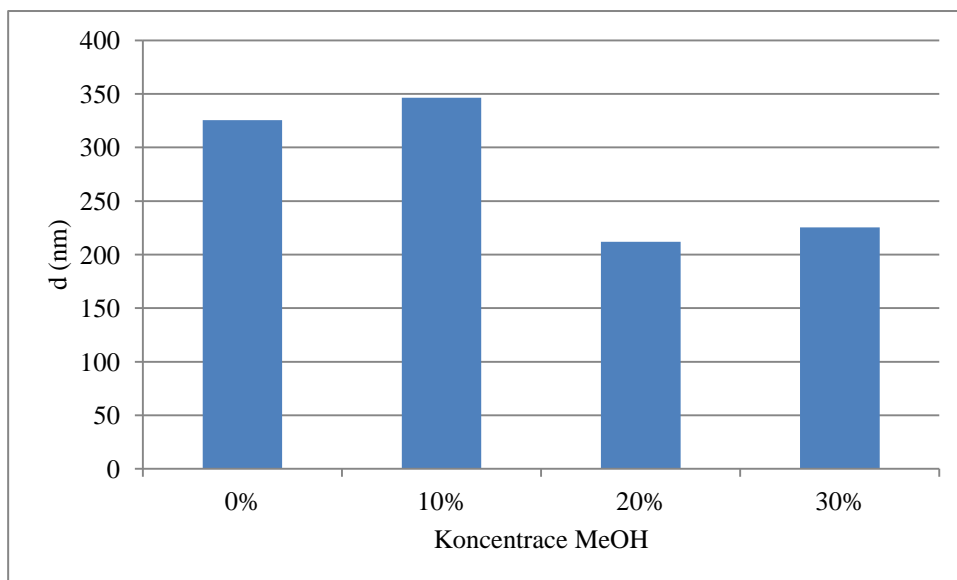
Obr. 18: Vliv koncentrace acetonu. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1%, koncentrace T3 100%. Postup přípravy A. Vzorke 43-52.



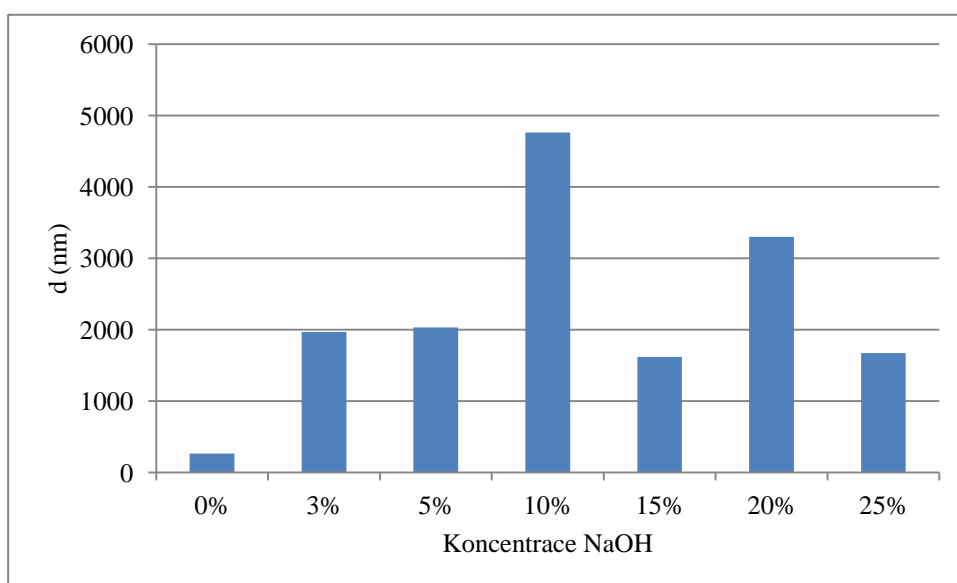
Obr. 19: Vliv koncentrace MeOH. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1 %, koncentrace 100 %, postup přípravy A. Vzorke 37-42.



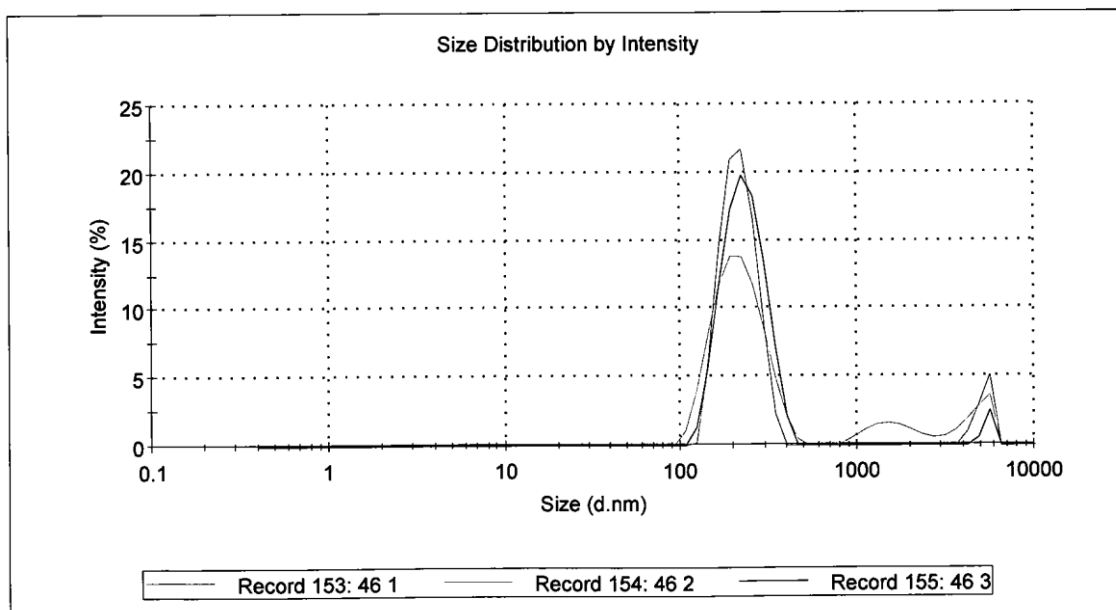
Obr. 20: Vliv koncentrace MeOH. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1%, koncentrace BT 10 % a koncentrace T3 90 % postup přípravy A. Vzorky 61-64.



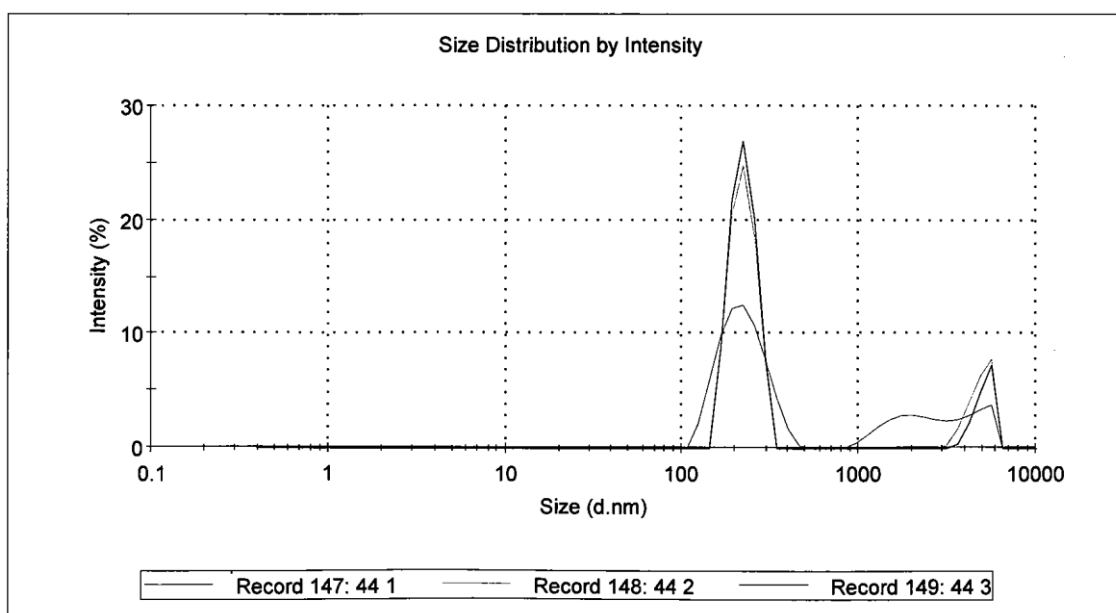
Obr. 21: Vliv koncentrace NaOH. Velikost nanočástic (nm). Emulgátor CET 0,20%, koncentrace směsi BT+T3 1%, koncentrace T3 100 %, postup přípravy A. Vzorky 53-59.



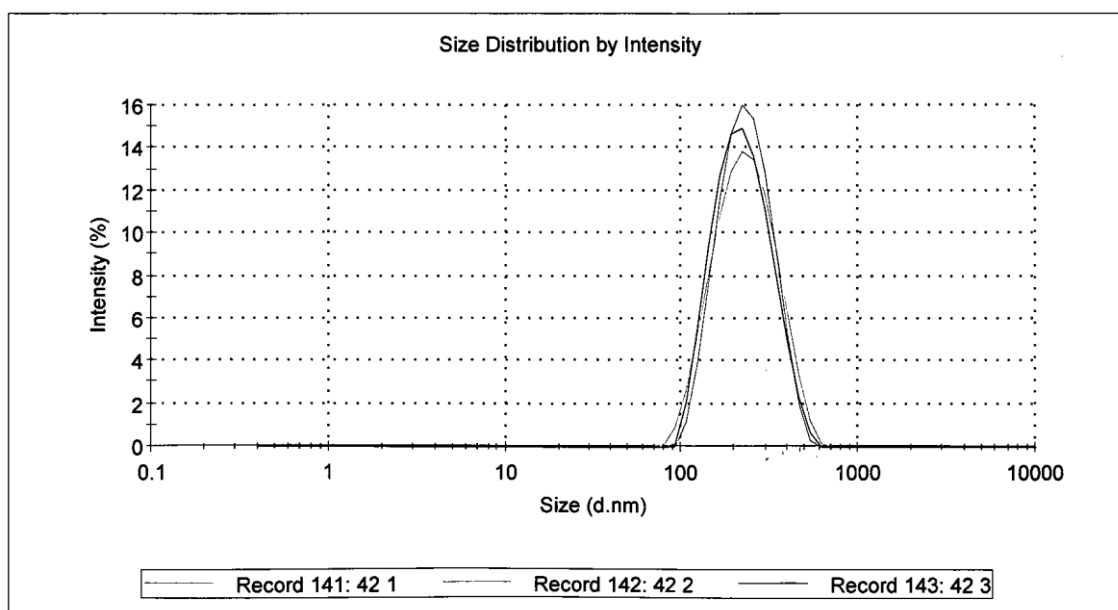
Obr. 22: Vzorek 88 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 0,025%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.



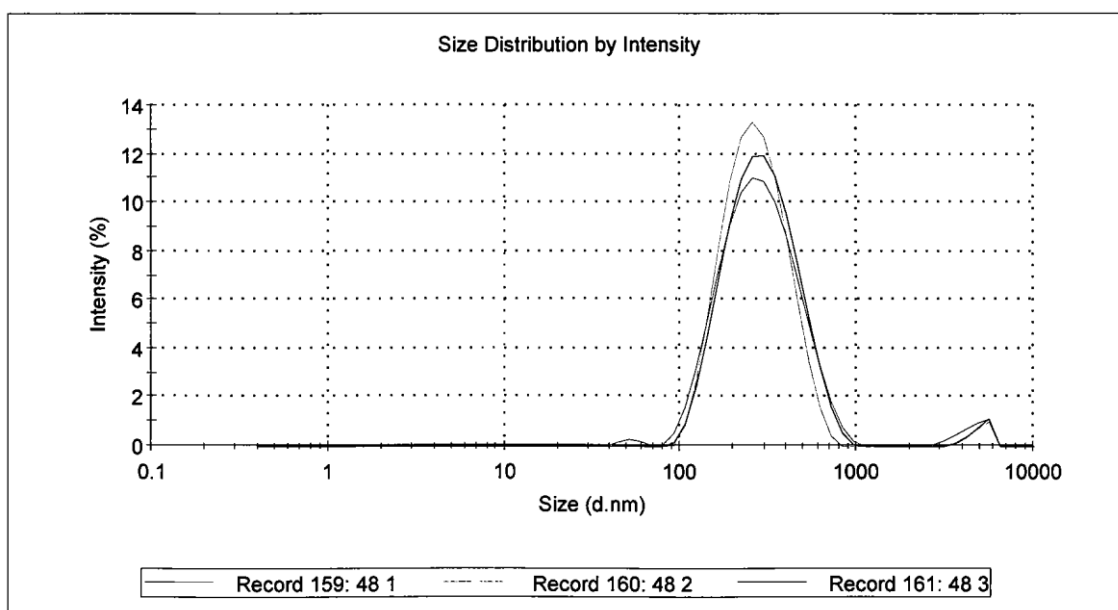
Obr. 23: Vzorek 86 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 0,05%, postup přípravy A). Intenzitní průměr- frekvenční křivka.



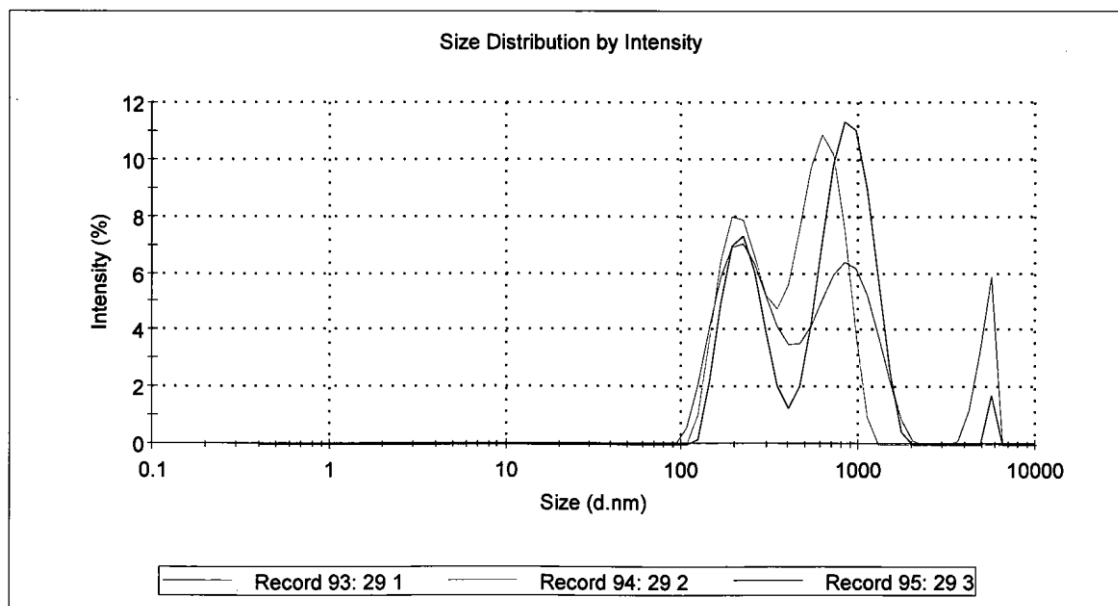
Obr. 24: Obrázek 84 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 0,20%, postup přípravy A. Intenzitní průměr- frekvenční křivka.



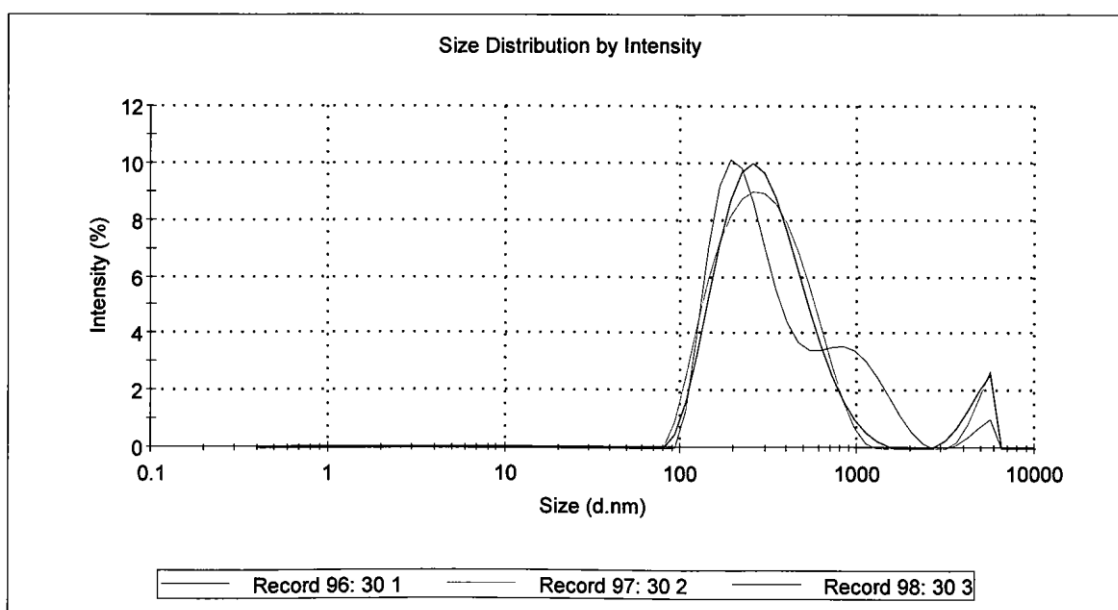
Obr. 25: Obrázek 90 (složení: koncentrace směsi BT+T3 1 %, emulgátor CET 1%, postup přípravy A. Intenzitní průměr- frekvenční křivka.



Obr. 26: Vzorek 81 (složení: koncentrace směsi BT+T3 3 %, koncentrace BT 30 %, koncentrace T3 70 %, emulgátor CET 0,20%, postup přípravy A). Intenzitní průměrfrekvenční křivka.



Obr. 27: Vzorek 82 (složení: koncentrace směsi BT+T3 3 %, koncentrace BT 10 %, koncentrace T3 90 %, emulgátor CET 0,20%, postup přípravy A). Intenzitní průměrfrekvenční křivka.



6 DISKUSE

6.1 K zaměření práce a řešenému tématu.

Práce je zaměřena na získání dalších poznatků o možnostech přípravy velmi malých nanočástic obsahujících bazi terbinafinu emulzní metodou za rozdělování rozpouštědla. Pozornost byla zaměřena na ovlivnění velikosti a distribuce velikosti polyesterových nanočástic s terbinafinem obsaženým v částicích v různých koncentracích. Vzhledem k tomu, že baze terbinafinu použité jako modelová aktivní látka má ve vodě velmi malou rozpustnost, je možno očekávat velmi malou rychlost její liberace. Dostatečná čistota baze terbinafinu připravené z hydrochloridu byla na katedře analytické chemie potvrzena.⁶¹ Další osud sloučeniny inkorporované do nanočástic nebylo možno z důvodu technických problémů kvalifikovaně posoudit.

Kromě polyesteru ve funkci nosiče, methylethylketonu (butanon) jako rozpouštědla a terbinafinu jako léčivé látky byl vyzkoušen hydrogenovaný lecitin jako látka, která by mohla pozitivně ovlivnit proces dispergace vnitřní fáze emulze, případně stabilizovat léčivou látku při přípravě nanodisperze nebo při jejím dalším zpracování do formy vhodné pro dlouhodobé uchování. Od přísady acetonu ve vysoké koncentraci se očekávalo nejen snížení viskozity při dispergaci, ale také dispergační efekt rychlého rozdělování acetonu do vnější fáze. Methanol jako alternativa k acetonu by také mohl urychlit proces rozdělování butanonu.

Pozornost byla věnována také složení vnější fáze emulze. Při využití kationického a anionického emulgátoru byla řada experimentů zaměřena na formulaci vnější fáze emulze. Přísada methylethylketonu, při omezené mísitelnosti ve vnější fázi mohla mít opačný efekt než methanol ve vnitřní fázi. Zpomalením rozdělování rozpouštědla by teoreticky mohla být dosažena dlouhodobější a tedy i účinnější dispergace. Přísada chloridu sodného nebo jiného elektrolytu je doporučována jako opatření ke zvýšení účinnosti emulgátoru při zvýšení kontrastu mezi fázemi emulze. Metoda se využívá především při formulaci emulzí typu v/o.

6.2 K vlivu koncentrace terbinafinu na granulometrické parametry nanočástic.

Terbinafin má velmi nízkou rozpustnost ve vodě, proto je látkou vhodnou pro formulaci nanočástic za využití emulzních metod. Výhodné je, když je možno inkorporovat léčivou látku v relativně vysoké koncentraci. V těchto případech je nutno počítat s tím, že léčivá látka významně modifikuje vlastnosti nosiče ve smyslu jeho hydrofilizace nebo hydrofobizace.

Na Obr. 10 a Obr. 12 je závislost střední hodnoty intenzitního rozměru nanočástic na koncentraci terbinafinu v nich. Roztok obsahoval celkem 1 % nosiče a terbinafinu. V první sérii vzorků (Obr. 10 a Obr. 11) je možno pozorovat výrazné (téměř trojnásobné) zmenšení nanočástic po přidání terbinafinu v 5% koncentraci. Tuto pronikavou změnu ve velikosti je možno vysvětlit vazbou aminoskupiny terbinafinu na koncové karboxyly polyesterového nosiče. Se stoupající koncentrací terbinafinu dochází ke zvětšování nanočástic. Možným vysvětlením je zvýšení interakce nanočástic na základě zvýšené koncentrace aminoskupin, případně může jít o zvýšenou viskozitu vnitřní fáze v procesu solidifikace nebo i o zkrácení doby solidifikace. Tendence k výrazným změnám velikostního parametru nanočástic s koncentrací terbinafinu byla potvrzena ve druhé sérii experimentů (Obr. 12). Rozdíl je poloze minima závislosti, které je v úrovni 10%, tedy vyšší koncentrace terbinafinu. V dalším úseku do koncentrace terbinafinu 25 % se nanočástice zvětšovaly, při nejvyšší koncentraci měly intenzitní průměr větší než nanočástice bez terbinafinu.

Při počáteční 3% koncentraci směsi polyesteru a terbinafinu ve vnitřní fázi emulze byl pozorován stejný jev výrazného zmenšení nanočástic po přidání 5% terbinafinu a postupného zvyšování velikosti do 20% koncentrace léčivé látky (Obr. 11). Pokles parametru při 25% podílu léčivé látky by bylo vhodné ověřit. Srovnáním naměřených hodnot u vzorků č. 80, 82 a 81 s 3% sušinou a bylo možno dojít k názoru o zvyšující se velikosti částic s obsahem terbinafinu v řadě 0 %, 10 % a 30 %.

6.3 K vlivu koncentrace lecitinu na granulometrické parametry nanočástic.

Lecitin je amfoterní látka, která má v prostředí vody bez látek ovlivňujících hodnotu pH záporný náboj. To znamená, že interakce této látky s koncovými karboxylovými skupinami je slabá. Roztoky lecitinu mají nižší viskozitu než polyester. Dalším faktorem při usnadnění dispergace vnitřní fáze může být povrchová aktivita lecitinu. Dokladem o účinku nižší viskozity a povrchové aktivity roztoků je tendence ke snižování velikosti nanočástic se zvyšující se koncentrací lecitinu. Nanočástice bez lecitinu měly intenzitní průměr 500 nm, nanočástice s 15 % lecitinu 350 nm (Obr. 13). Výše uvedené výsledky byly dosaženy za použití roztoku 0,20% cetrimidu jako emulgátoru.

Při použití polysorbátu ve stejné 0,20% koncentraci došlo k pozoruhodné změně. Soustava s 5% lecitinem je evidentně nepoužitelná. Nebylo studováno, jestli dochází k interakci v nanočásticích, nebo jestli probíhá agregace primárních nanočástic po jejich vzniku dispergací (Obr. 14). Po zvýšení koncentrace lecitinu na 10 % došlo k výraznému zlepšení parametrů nanočástic. Totéž platí pro vyšší koncentrace tohoto aditiva. Pozoruhodné je mírné zvyšování hodnot velikostního parametru nanočástic s rostoucí koncentrací lecitinu na rozdíl od dispergace pomocí cetrimidu.

6.4 K vlivu koncentrace acetonu na granulometrické parametry nanočástic.

Aceton se z vnitřní fáze emulze rychle rozděluje. Při jeho vysoké koncentraci je popisován jev turbulentních toků tohoto rozpouštědla, které jsou tak intenzivní, že mohou vést k desintegraci částice na menší částice. V mnoha publikovaných pracích je popisováno využití samotného acetonu.

Na Obr. 18 jsou výsledky měření intenzitního průměru nanočástic obsahujících různý podíl dimethylketonu v methylethylketonu. Emulgátorem byl cetrimid v 0,20% koncentraci. Vyšší koncentrace dimethylketonu (acetonu) by podle předpokladu měla vést k rychlejšímu rozdělování rozpouštědla a k ovlivnění dispergačního procesu. Z obrázku je patrné, že po zvýšení koncentrace acetonu z 20 % na 30 % dochází k markantnímu snížení velikosti nanočástic spojením principu dispergace stříhem rotoru nástavce homogenizátoru s principem intenzivního přechodu rozpouštědla z vnitřní fáze

do vnější a snížené viskozity. Tímto opatřením je docíleno zmenšení nanočástic na necelou polovinu. Uvedené opatření by mohlo být zajímavé z hlediska výtěžku léčivé látky a jeho případných ztrátami rozpouštěním ve vnější fázi emulze.

6.5 K vlivu koncentrace methanolu na granulometrické parametry nanočástic.

Přísada methanolu do vnitřní fáze by mohla mít podobný vliv na proces dispergace jako přísada acetonu. Výsledky hodnocení velikosti nanočástic bez léčivé látky jsou na Obr. 19, s 10% terbinafinem na Obr. 20. Předpoklad se splnil, již při 20% koncentraci se projevilo markantní zmenšení nanočástic i v případě 10% obsahu terbinafinu.

Také při 30% koncentraci terbinafinu bylo prokázáno, že při zvyšování koncentrace metanolu z 10 % na 40 % se nanočástice zmenšují, při 50% koncentraci metanolu byly ve větším podílu nadmikronové částice (Tab. 15).

Po záměně terbinafinu za koenzym Q10 v koncentraci 10 % se z hlediska granulometrického přísada metanolu osvědčila, jak je patrné z výsledků měření uvedených v Tab. 16. Také v tomto případě zvýšení koncentrace metanolu na 50 % vedlo k mírnému zvýšení podílu velkých částic. Jako optimální se prokázala 20% až 30% koncentrace metanolu ve vnitřní fázi emulze.

6.6 K vlivu koncentrace cetrimidu ve vnější fázi na granulometrické parametry nanočástic.

Cetrimid je emulgátor, které velmi účinně disperguje roztoky polyesteru a stabilizuje polyesterové nanočástice. Již dříve bylo prokázáno, že je možno připravit polyesterové nanočástice ve vnější fázi obsahující 0,025% cetrimid. Kromě této koncentrace byly vyzkoušeny také 0,05%; 0,20% a 1,00% roztoky cetrimidu připravené z 1% a 3% vnitřní fáze s obsahem 10 % a 30 % terbinafinu. Výsledky měření velikosti částic jsou v Tab. 17 až Tab. 19.

U částic bez terbinafinu s vnitřní fází obsahující 1 % sušiny nebyla prokázána výrazná závislost velikosti nanočástic na koncentraci (Tab. 17, Obr. 17). Po přípravě nanočástic z 3% roztoků se projevilo velmi výrazné zmenšení nanočástic v případě zvýšení koncentrace cetrimidu z 0,025% na 0,050%. Další zvyšování koncentrace tenzidu se neprojevilo (Tab. 19, Obr. 17).

U nanočástic s terbinafinem (Tab. 18) se více než 0,20% roztok osvědčil 1,00% roztok tenzidu při přípravě nanočástic s 30% léčivou látkou. Nanočástice s 10% terbinafinem nebyly ovlivněny změnou koncentrace cetrimidu.

6.7 K vlivu koncentrace ethylmethyleketonu ve vnější fázi na granulometrické parametry nanočástic.

Sycením vnější fáze emulze rozpouštědlem polyesteru se dosáhne zpomalení procesu dispergace. Prodlouží se tak doba, po kterou je vnitřní fáze v kapalném nízkoviskózním stavu a tak může být dispergována.

Srovnání průběhu hodnot rozměrového parametru nanočástic v závislosti na koncentraci methylethylketonu připravených dispergací vnitřní fáze lišící se koncentrací polyesteru v 0,20% roztoku polysorbátu 20 je možno konstatovat značnou podobnost z hlediska reagrace částic při vyšší koncentraci methylethylketonu (Obr. 15 a Obr. 16). Při 3% podílu polyesteru ve vnitřní fázi se osvědčila 10% až 15% koncentrace rozpouštědla ve vnější fázi. Z toho plyne, že prodloužení doby dispergace je výhodné v případě vyšší koncentrace polyesteru, při jeho nižší koncentraci nemá vliv na velikost nanočástic. Příliš vysoká koncentrace rozpouštědla polymeru ve vnější fázi vede k výrazné reaglomeraci nanočástic.

6.8 K vlivu chloridu sodného ve vnější fázi na granulometrické parametry nanočástic.

Přidání chloridu sodného do vnější fáze emulze mělo význam z hlediska vyzkoušení vlivu zvýšení polaritativy vnější fáze na parametry nanočástic. Opatření tohoto typu se využívá především pro zvýšení účinnosti silikonových emulgátorů v emulzích typu v/o.

Jak je patrné z Obr. 21, nesetkalo se takové opatření s úspěchem. Je možno se domnívat, že po přidání elektrolytu se snížila rozpustnost emulgátoru a také došlo k ovlivnění stabilizační elektrické dvojvrstvy v okolí nanočástic. Koncentrace soli v rozmezí od 3 % do 25 % se nelišila z hlediska ovlivnění granulometrických parametrů nanočástic.

6.9 K vlivu způsobu dispergace emulze na granulometrické parametry nanočástic.

Způsoby dispergace jsou popsány na straně 39. Využití koloidního mlýna souvisí s možnostmi kontinuální výroby nanočástic, gradientové zvyšování stříhového napětí souvisí s možnostmi využití fáze emulgace následované další fází homogenizace.

V Tab. 20 je přehled granulometrických charakteristik vzorků připravených dispergací v koloidním mlýnu (postup B) z emulzí s 1% nebo 3% vnitřní fází emulgovanou 0,20% cetrimidem bez sycení methylethylketonem. Byly získány nanočástice s velmi příznivými parametry velikosti. Vzorek obsahující ve vnitřní fázi 1% roztok byl čtyřikrát opakovaně připravený. Ve dvou opakováních byly získány nanočástice menší než 100 nm, maximální střední intenzitní rozměr byl 120 nm. V případě 3% vnitřní fáze byl střední rozměr těsně nad hranicí 100 nm. Z toho plyne závěr, že metoda dispergace emulze v koloidním mlýnu je velmi vhodná pro přípravu nanočásticových systémů z polyesterových nosičů.

V Tab. 20 až 22 jsou údaje o vzorcích připravených metodou označenou jako C, která vycházela z využití dvojité turbíny a dvojstupňového procesu emulgace menší intenzitou míchání následované homogenizací maximální intenzitou v zařízení IKA Magic LAB. Vnější fáze byla sycena methylethylketonem v různém rozsahu. Z výsledků je možno dojít k poznatku o nejednoznačném vlivu sycení vnější fáze rozpouštědlem polyesteru na velikost nanočástic. To souvisí s polydisperzitou velikostí nanočástic připravených z 1,00% roztoku polyesteru. Nejmenší nanočástice byly získány při vysokém stupni sycení 14% a 21% rozpouštědlem (Tab. 22 a 23). V tabulce 24 je důkaz o stejně pozitivním vlivu vyššího stupně sycení vnější fáze na velikost nanočástic.

7 ZÁVĚRY

- A. Terbinafin přidaný do vnitřní fáze k roztoku polyesteru v ethylmethylketonu v koncentraci 5 % pravděpodobně interaguje s koncovými karboxylovými skupinami a ovlivňuje proces dispergace tak, že vznikají výrazně menší nanočástice než v soustavě bez terbinafinu. Se stoupající koncentrací terbinafinu dochází při stejné intenzitě míchání ke vzniku větších nanočástic.
- B. Lecitin použitý jako aditivum do nanočástic zvyšuje účinnost dispergace vnitřní fáze svým tenzioaktivním účinkem.
- C. Dimethylketon při koncentraci vyšší než 20 % ve směsi s ethylmethylketonem zvyšuje účinnost dispergace patrně mechanismem intenzifikace turbulentního toku rozpouštědla z vnitřní fáze do vnější fáze emulze.
- D. Stejný účinek jako po přidání dimethylketonu do vnitřní fáze je možno docílit použitím methanolu v optimální koncentraci v rozmezí od 20 % do 30 %.
- E. Byl potvrzen poznatek získaný dříve o dostatečné stabilizační účinnosti cetrimidu v 0,025% koncentraci, pro získání nanodisperzí standardních granulometrických parametrů je dostatečnou koncentrací 0,05% cetrimid ve vnější fázi.
- F. Při 3% koncentraci polyesteru ve vnitřní fázi je dosažen účinnější proces dispergace tohoto roztoku sycením vnější fáze rozpouštědlem, při 1% koncentraci se toto opatření neuplatní.
- G. Přidání chloridu sodného v koncentraci 3 % a vyšší vede k výrazné agregaci částic.
- H. Dispergace pomocí koloidního mlýna je velmi vhodný postup přípravy jednak z hlediska kontinuity procesu, jednak z hlediska možnosti dosáhnout velmi dobré granulometrické parametry.

8 SEZNAM LITERATURY

1. MORA-HUERTAS, C. E., H. FESSI and A. ELAISSARI. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010, 38 (1), 113-142. ISSN 0378-5173
2. RABIŠKOVÁ, M. Nanočástice pro léčivé formy. *Remedia.* 2007, 17, 495–501. ISSN 0862-8947.
3. GECKELER, K. E. and J. STIRN. Polyreaktionen - Mechanismen, Systematik, Relevanz. *Naturwissenschaften.* 1993, 80, 487-500. ISSN 0028-1042.
4. ASUA, J. M. Emulsion polymerization: from fundamental mechanism to process developments. *J Polym Sci Part, A Polym Chem.* 2004, 42, 1025-41. ISSN 1099-0518.
5. KREUTER, J. The mechanism of termination in heterogeneous polymerization. *J Polym Sci, Polym Lett Ed.* 1982, 20, 543-5. ISSN 0360-6384.
6. VAUTHIER, C., D. LABARRE and G. PONCHEL. Design aspects of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. *J Drug Target.* 2007, 15, 641-63. ISSN 1061-186X.
7. NICOLAS, J. and P. COUVREUR. Synthesis of poly(alkylcyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdiscipl Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009, 1, 111-27. ISSN 1939-0041.
8. EL SAMALIGY, M. S., P. ROHDEWALD and H. A. MAHMOUD. Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules. *J Pharm Pharmacol.* 1986, 38, 216-8. ISSN 0022-3573.
9. HEARN, J, et al. Kinetics of the surfactant-free emulsion polymerization of styrene: the post nucleation stage. *J Polym Sci, Polym Chem Ed.* 1985, 23, 1869-83. ISSN 0360-6376.

-
10. SONG, Z. and G. W. POEHLEIN. Kinetics of emulsifier-free emulsion polymerization of styrene. *J Polym Sci Part, A Polym Chem*. 1990, 28, 2359-92. ISSN 1099-0518.
 11. AKLONIS, J.J., et al. Model filled polymers V. Synthesis of crosslinked monodisperse polymethacrylate beads. *J Polym Sci Part, A Polym Chem* . 1992, 30, 137-44. ISSN 1099-0518.
 12. SHOULDICE, G. T. D., G. A. VANDEZANDE a A. RUDIN. Practical aspects of the emulsifier-free emulsion polymerization of styrene. *Eur Polym J*. 1994, 30, 179-83. ISSN 0014-3057.
 13. PANG, S. W., et al. Effects of charge density and particle size of poly (styrene/(dimethylamino)ethyl methacrylate) nanoparticle for gene delivery in 293 cells. *Colloid Surf B*. 2002, 26, 213-22. ISSN 0927-7765.
 14. AKGOL, S., N. OZTURK and A. DENIZLI. New generation polymeric nanospheres for lysozyme adsorption. *J Appl Polym Sci*. 2010, 115, 1608-15. ISSN 1097-4628.
 13. LIU, G. and P. LIU. Synthesis of monodispersed crosslinked nanoparticles decorated with surface carboxyl groups via soapless emulsion polymerization. *Colloid Surf A*. 2010, 354, 377-81. ISSN 0927-7757.
 14. GOODALL, A. R., M. C. WILKINSON and J. HEARN. On Mechanism of emulsion polymerization of styrene in soap-free systems. *J Polym Sci, Polym Chem Ed*. 1977, 15, 2193-218. ISSN 0360-6376.
 17. JIANG, X., et al. Specific effects of surface amines on polystyrene nanoparticles in their interaction with mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*. 2010, 11, 748-53. ISSN 1525-7797.
 18. LANDFESTER, K., M. WILLERT and M. ANTONIETTI. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules*. 2000, 33, 2370-6. ISSN 0024-9297.

-
19. PUIG, J. E. Microemulsion polymerization (oil-in-water). SALAMONE, J. C. *Polymeric materials encyclopedia*. 6. vyd., Boca Raton: CRC Press, 1996, 4333-41. ISBN 0849326516.
 20. XU, X. J. and F. CHEN. Semi-continuous emulsion copolymerization of butyl methacrylate with polymerizable anionic surfactants. *Polymer*. 2004, 45, 4016-9. ISSN 0032-3861.
 21. KARODE, S. K., et al. New insights into kinetics and thermodynamics of interfacial. *Chem Eng Sci*. 1998, 53, 2649-63. ISSN 0009-2509.
 22. KHOURY-FALLOUH, A. N., et al. Development of a new process for the manufacture of poly isobutylcyanoacrylate nanocapsules. *Int J Pharm*. 1986, 28, 125-36. ISSN 0378-5173.
 23. PUGLISI, G., et al. Influence of the preparation conditions in poly (ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation. *Int J Pharm*. 1995, 125, 283-7. ISSN 0378-5173.
 24. Living polymerization. In: *Wikipedia: the free encyclopedia [online]*. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2011 [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Living_polymerization.
 25. PRASAD RAO, J. and K. E. GECKELER, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci*. 2011, 36, 887-913. ISSN 0079-6700.
 26. MATYJASZEWSKI, K. and J. XIA. Atom transfer radical polymerization. *Chem Rev*. 2001, 101, 2921-90. ISSN 1468-4837.
 27. NICOLAS, J., et al. Nitroxide-mediated controlled free-radical emulsion polymerization using a difunctional water-soluble alkoxyamine initiator. Toward the control of particle size, particle size distribution, and the synthesis of triblock copolymers. *Macromolecules*. 2005, 38, 9963-73. ISSN 0024-9297.
 28. ZHANG, L., D. PORNPATTANANANGKUL and C. M. J. HU. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Curr Med Chem*. 2010, 17 (6), 585-594. ISSN 0929-8673.

-
29. ZHANG, L. and S. GRANICK. How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles). *Nano Letters*. 2006, 6 (4), 694-698. ISSN 1530-6984.
 30. WEMURI, S. and C. T. RHODES. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv*. 1995, 102 (1), 95-111. ISSN 0031-6865.
 31. RADTKE, M. and R. H. MULLER. Novel concept of topical cyclosporine delivery with supersaturated SLN creams. *Symp Control Rel Bioact Mater*. 2001, 28, 95-111.
 32. MUDSHINGE, SAGAR R, AMOL B DEORE a SACHIN PATIN. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical J*. 2011, 19 (3), 129-141. ISSN 1319-0164.
 33. CHOI, H. S., W. LIU and P. MISTRA. Renal clearance of qantum dots. *Nat Biotechnol*. 2007, 25 (10), 1165-1170. ISSN 1087-0156.
 34. QI, L. and X. GAO. Emerging application of quantum dots for drug delivery and therapy. *Exp Opin Drug Del*. 2008, 5 (10), 63-67. ISSN 1742-5247.
 35. IRWING, B. Nanoparticle drug delivery systems. *Pharm Biotechnol*. 2007, 24, 58-62. ISSN 1078-0467.
 36. GUPTA, A. K. and A. S. G. CURTIS. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*. 2004, 101 (12), 3029-3040. ISSN 0142-9612.
 37. GRAYSON, S. M. and J.M. FRECHET. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. *Chem Rev*. 2001, 101 (12), 3819-3868. ISSN 0009-2665.
 38. LHOTÁK, P. Dendrimery. In: *Collection of Czechoslovak chemical communications* [online]. Prague: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic [etc.], 2005 [cit. 2012-03-06]. Dostupné z: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/2_Lhotak.pdf.

-
39. HOLISTER, P., R. V. CRISTINA and T. HARPER. CIENTIFICA. *Nanoparticles: Technology White papers nr. 3*. 2003, 1-12.
40. QUINTANAR, D., E. ALLÉMANN and E. FESSI. Preparation techniques and mechanism of formaton of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998, 24 (12), 1113-1128. ISSN 0363-9045.
41. LETCHFORD, K. and H. BURT. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007, 65 (12), 259-269. ISSN 0939-6411.
42. FESSI, H., F. PUISIEUX and J. P. DEVISSAGUET. *Process for preparing a colloidal and disperse system in the shape of nanocapsules* [patent]. France. B1, EP0274961. Uděleno 12/28/1987. Zapsáno 03/25/1992.
43. PLASARI, E. and P. H. VILLERMAUX. Influence of process parameters on the precipitation of organic nanoparticles by drowning-out. *Chem Eng Res Des*. 1997, 75 (1), 113-142. ISSN 0263-8762.
44. CHORNY, M., I. FISHBEIN and H. D. DANENBERG. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size; drug recovery and release kinetics. *J Contr Rel*. 2002, 83 (3), 389-400. ISSN 0168-3659.
45. GUINEBRETIERE, S., H. FESSI and S. BRIANCON. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Mater Sci Eng: C*. 2002, 21 (1), 137-142. ISSN 0928-4931.
46. GARTI, N. Double emulsions-scope, limitations and new achievements. *Coll Surf A: Physicoch Eng Asp*. 1997, 123/124 (23), 233-246. ISSN 0927-7757.
47. KHOEE, S. and M. YAGHOUBIAN. An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur J Med Chem*. 2008, 44 (6), 2392-2399. ISSN 0223-5234.

-
48. LERTSUTTHIWONG, P., K. NOOMUN and N. JONGAROONNGAMSANG. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydr. Polym.* 2008, 74 (2), 209-214. ISSN 0144-8617.
 49. KRAUSE, H. J. and P. ROHDEWALD. Preparation of gelatin nanocapsules and their pharmaceutical characterization. *Pharm Res.* 1985, 5 (2), 239-243. ISSN 0724-8741.
 50. GANDER, B. and M. J. BLANCO-PRÍETO. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Healthcare, 2007, 481-496. ISBN 9780849393983.
 51. WU, L., J. ZHANG and W. WATANBE. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011, 63 (6), 456-469. ISSN 0169-409X.
 52. ROGUEDA, P. and W. WATANBE. Novel hydrofluoroalkane suspension formulations for respiratory drug delivery. *Exp Opin Drug Deliv.* 2005, 2 (4), 625-638. ISSN 1742-5247.
 53. EERDENBRUGH, B. V., G. V. D. MOOTER and P. AUGUSTIJNS. Top-down production of drug nanocrystals. Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm.* 2008, 364 (1), 64-75. ISSN 0378-5173.
 54. ABDELWAHED, W., G. DEGOBERT and S. STAINMESSE. Freeze-drying of nanoparticles formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006, 58 (15), 1688-1713. ISSN 0169-409X.
 55. KIM, CHERNG-JU. *Advanced pharmaceuticals: physicochemical principles*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2004, 193-256. ISBN 0849317290.
 56. KULSHRESHTHA, A. K., O. N. SINGH and G. WALL. *Pharmaceutical suspensions: from formulation development to manufacturing*. New York: Springer, 2009, 39-66. ISBN 1441910875.

-
57. ENGSROMT, J. D., J. M. TAM, M. A. MILLER, R. O. WILLIAMS and K. P. JOHNSTON. Templated open flocs of nanorods for enhanced pulmonary delivery with pressurized metered dose inhalers. *Pharm Res.* 2009, 26 (1), 101-117. ISSN 0724-8741.
58. DELLAMARY, L. A., T. E. TARARA, D. J. SMITH, C. H. WOELK, A. ADRACTAS, M. L. COSTELLO, H. GILL and J. G. WEERS. Hollow porous particles in metered dose inhalers. *Pharm Res.* 2000, 17 (2), 168-174. ISSN 0724-8741.
59. TADROS, T. F. *Applied surfactants: principles and applications*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 978-3-527-30629-9.
60. ALI, H. S. M., P. YORK and N. BLAGDEN. Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *Int J Pharm.* 2009, 375, 107-113. ISSN 0378-5173.
61. SULÍKOVÁ, Barbora. *Příspěvek k formulaci polyesterových nanočástic s terbinafinem*. Hradec Králové, 2011. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Karlova univerzita. Vedoucí práce Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.