

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

**Optimalizace přípravy nanočástic z větvených
polyesterů s terbinafinem**

**Optimisation of preparation of nanoparticles from
branched polyesters with terbinafine**

Rigorózní práce

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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.“

V Hradci Králové 16. 11. 2013

Mgr. Eliška Königová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu rigorózní práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při zpracování této práce. Velké poděkování patří celé mé rodině za podporu při psaní této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Kandidát: Mgr. Eliška Königová

Konzultant: Doc. RNDr. Milan Dittrich CSc.

Název rigorózní práce: Optimalizace přípravy nanočástic z větvených polyesterů s terbinafinem

V teoretické části této práce je pozornost věnována metodám mikroenkapsulace a nanoenkapsulace léčivých látek do polymerních nosičů se zvláštním důrazem na částicové systémy z kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové. Experimentální část je zaměřena na formulaci a testování částic z terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu vyznačujícího se větvenou konstitucí molekuly. Částice byly připraveny emulzní metodou za rozdělování a odpařování rozpouštědla. Byl do nich inkorporován terbinafin a případně také hydrobromid cetrimidu. Hydrobromid cetrimidu byl využit také v extrémně nízkých koncentracích ve vodném roztoku jako emulgátor, který vhodným způsobem modifikuje povrchový náboj. Jako stabilizační přísada ve vnější fázi byly použity polyhydrikové sloučeniny jako je mannitol, trehalosa a mannososa. Hodnocenou veličinou byla granulometrická charakteristika, zvláště intenzitně střední průměr mikročástic a nanočástic, dále distribuce velikosti a také celková polydisperzita. Byly získány nové poznatky, které se týkají možnosti krátkodobé stabilizace nanodisperzí těsně po jejich přípravě, perspektivy dalšího zpracování sušením a potenciálu pro modifikaci parametrů disoluce vhodnými aditivami.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical technology

Candidate: Mgr. Eliška Königová

Consultant: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Title of Thesis: Optimisation of preparation of nanoparticles from branched polyesters with terbinafine

The theoretical part of the thesis describes methods of microencapsulation and nanoencapsulation of drugs into polymeric carriers with a particular emphasis on nanoparticulate systems from copolymers of lactic and glycolic acids. Experimental part of the thesis focuses on formulation and testing of particles from terpolymer of DL-lactic acid, glycolic acid and tripentaerythritol characterised by a branched molecular structure. The particles were prepared by using of emulsion distribution and evaporation method. Terbinafine and cetrimide hydrobromide was incorporated into the particles. Cetrimide hydrobromide in very low concentrations in water solution was also used as an emulsifying agent, which adjusts properly surface charge. Polyhydric compounds such as mannitol, trehalose and mannose were used in emulsion outer phase as a stabilising agent. Granulometric characteristics, mainly Z-average of intensity diameter of microparticles and nanoparticles, also particle size distribution, and their polydispersity were monitored. The findings further include the possibilities of further processing of dispersions by drying and a potential of modification of dissolution parameters by the use of appropriate additives.

Obsah

1	Seznam zkratek	9
2	Zadání práce	10
3	Úvod.....	11
4	Teoretická část.....	12
4.1	Mikroenkapsulace.....	12
4.1.1	Cíle mikroenkapsulace	12
4.1.2	Mikroenkapsulační metody	13
4.2	Mikroenkapsulované léčivé látky ostatní farmaceutika	17
4.3	PLGA nanočástice.....	19
4.3.1	Syntéza PLGA nanočástic	19
5	Experimentální část	23
5.1	Použité přístroje	23
5.2	Použité chemikálie	23
5.3	Postup přípravy	24
5.3.1	Příprava baze terbinafinu	24
5.3.2	Příprava vnější fáze emulze	24
5.3.3	Příprava vnitřní fáze.....	25
5.3.4	Příprava nanočástic	25
5.3.5	Měření velikosti nanočástic	26

5.4	Výsledky měření.....	27
5.4.1	Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci cetrimidu ve vnější fázi, koncentraci baze terbinafinu ve vnitřní fázi s přidavkem 5% cetrimidu, Zpracování částic s mannitolem.....	27
5.4.2	Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci cetrimidu ve vnější fázi, koncentraci terbinafinu ve vnitřní fázi. Zpracování s mannitolem, trehalosou, maltosou.....	38
5.4.3	Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci MANN ve vnější fázi, při použití dvou různých rozpouštědel a různých koncentrací TB ve vnitřní fázi.....	42
5.4.4	Velikost nanočástic v závislosti na pH vnější fáze. Vnější fáze 0,2% CET s přidavkem 5% MANN, 5% GLY.....	45
5.4.5	Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci TB ve vnitřní fázi.....	46
5.4.6	Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci TB ve vnitřní fázi a přítomnosti MANN ve vnější fázi.....	49
6	Diskuse.....	51
6.1	K řešenému problému.....	51
6.2	K vlivu výrazné hydrofilizace vnitřní fáze a k vlivu mannitolu ve vnější fázi emulze na velikost a stabilitu nanočástic.....	52
6.3	K vlivu slabé hydrofilizace vnitřní fáze a k vlivu mannitolu ve vnější fázi emulze na velikost a stabilitu nanočástic.....	53
6.4	K vlivu terbinafinu v nanočásticích a polyhydričních alkoholů ve vnější fázi na velikost částic připravených sušením a následným rozpuštěním.....	54
6.5	K vlivu rozpouštědla ve vnitřní fázi v přítomnosti mannitolu ve vnější fázi.....	55
6.6	K vlivu terbinafinu ve vnitřní fázi a směsi mannitolu a glycinu ve vnější fázi na velikost částic.....	55
6.7	K vlivu terbinafinu ve vnitřní fázi na velikost částic při nízké koncentraci emulze.....	56

6.8	K vlivu terbinafinu ve vnitřní fázi a mannitolu ve vnější fázi na velikost částic.	56
7	Závěry	58
8	Literatura	59

1 Seznam zkratek

TB	terbinafin
CET	cetrimid
EtOAc	ethylacetát
EMK	ethylmethyketon
MANN	mannitol
TRE	trehalosa
MAL	maltosa
GLY	glycin
Pdl	index polydisperzity
PLGA	kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné
T3	Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu
Z-Ave	střední intenzitní průměr velikosti

2 Zadání práce

Formulace problému zadaného k řešení byla předložena v návaznosti na dříve dosažené výsledky na pracovišti školitele. Jednalo se o zájem studovat postupy přípravy mikročástic a nanočástic disperzací roztoků alifatických oligoesterů a polyesterů. Mikročásticové a nanočásticové systémy s terbinafinem jako modelovou látkou bylo zadáno připravit emulzní metodou za rozdělávání a odpařování rozpouštědla. Jako rozpouštědlo nosiče a léčiva byl na základě zkušeností zvolen ethylmethylketon (2-butanon). Ve funkci emulgátoru byl doporučen hydrobromid cetyltrimethylamonia ve velmi nízkých koncentracích. Stejnou látku bylo úkolem inkorporovat ve vyšších koncentracích do částic s cílem jejich hydrofilizace. Jako užitečné z hlediska dalšího zpracování vodné nanodisperze bylo pozorovat a případně vhodným technologickým zásahem zajistit stabilitu nanodisperzí při jejich krátkodobém uchovávání a případně také při dalším zpracování sušením.

3 Úvod

Mikroenkapsulace nabývá důležitosti jak v oblasti buněčného a tkáňového inženýrství, tak ve vývoji lékových forem. Existuje již několik na trh uvedených farmaceutických produktů, které jsou vyrobeny pomocí mikroenkapsulace [1]. S mikroenkapsulací je spojeno několik pojmů a to: mikrokapsuly, mikročástice, mikrosféry a mikroemulze. Mikrosféra je homogenní struktura tvořená jednou fází, zatímco mikrokapsule má jádro a obal.

Existuje řada typů mikrokapsul, které se liší velikostí, složením a funkcí. Tyto charakteristiky se odvíjí od konečného terapeutického cíle enkapsulovaného produktu. Enkapsulovány mohou být rozmanité substance, jako jsou pevné látky, tekutiny, léčiva, proteiny, bakteriální stěny, kmenové buňky.

Z této široké palety substancí vyplývá i široké využití mikrokapsul jak v lékových formách, tak při aplikaci umělých buněk a tkání, mikroorganismů nebo při enzymové substituci. Mikroenkapsulované mikroorganismy mohou být využity při renálních, kardiovaskulárních onemocněních, rakovině tlustého střeva, zánětlivého onemocnění střev a dalších. Mikroenkapsulace savčích buněk našla uplatnění v léčbě diabetes, jaterních onemocnění, anemii, rakovině a neurodegenerativních nemocech. Mikroenkapsulace léčiv se zaměřuje na hormonální terapii, léčbu gastrointestinálních poruch, diabetes, plicních poruch, paradontózy a hypertenze [2].

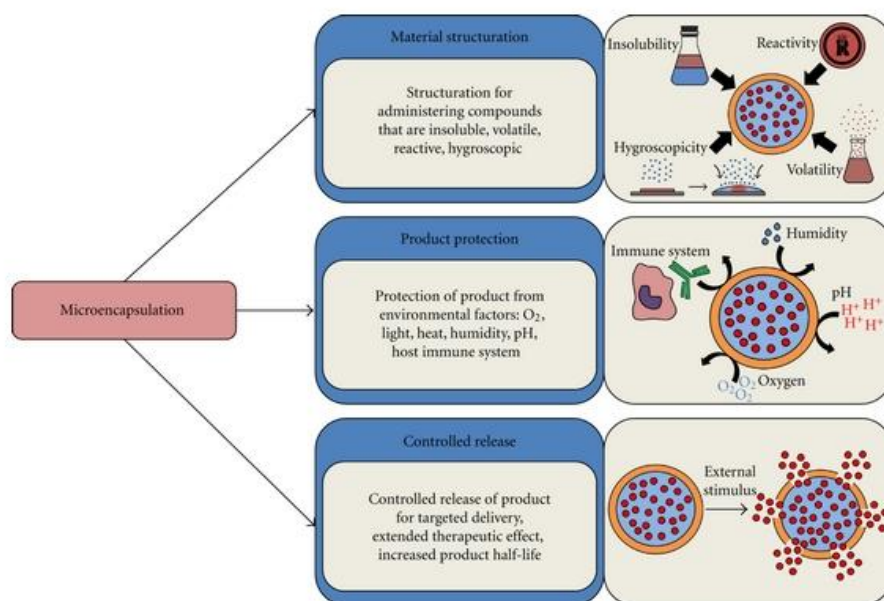
Syntetické polymery a přírodní makromolekuly jsou intenzivně zkoumány jako materiály pro produkci nanočástic jako různé lékové formy. Syntetické polymery mají oproti přírodním polymerům výhodu ve vysoké čistotě a reprodukovatelnosti. Jedny z nejdůležitějších syntetických polymerů v biomedicínské oblasti patří polyesterová rodina polymerů (polymléčná kyselina (PLA), poly(ϵ -caprolakton) (PCL), polyglykolová kyselina (PGA). Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové byl FDA povolen pro humánní použití.

4 Teoretická část

4.1 Mikroenkapsulace

4.1.1 Cíle mikroenkapsulace

Cíle mikroenkapsulace jsou ochrana enkapsulovaných struktur a kontrolované uvolňování.



Obrázek 1 Hlavní biofarmaceutické cíle mikroenkapsulace [3]

U léčiv, která jsou normálně těžko aplikovatelná z důvodu špatné rozpustnosti, nestálosti, reaktivitě, hygroskopicitě nebo mají špatné fyzikální vlastnosti, může tento problém řešit enkapsulace [4]. Mikrokapsule mohou sehrávat roli v ochraně enkapsulovaného obsahu před rozkladem vlivem vnějších faktorů jako je kyslík, světlo, teplota, vlhkost. Ochrana pomocí enkapsulace je vzhledem k drsnému prostředí horního gastrointestinálního traktu často využívána také při perorálním podání léčiva. Enkapsulace může být také ochranou před imunitním systémem člověka. Dále může být dosaženo imunoprotekce a imunoizolace, což je důležité pro podání in vivo a při implantaci lidských buněk, jako jsou kmenové buňky, dále pro tkáňové a buněčné inženýrství. Imunoprotekce je využívána při léčbě několika onemocnění, jako je

diabetes mellitus prvního typu, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova choroba, rakovina a další onemocnění [5]. Mikroenkapsuly mohou umožňovat řízené uvolňování jejího obsahu, které je regulováno fyzikálními, chemickými a mechanickými faktory.

4.1.2 Mikroenkapsulační metody

Existuje několik metod výroby mikrokapsul v závislosti na požadovaných vlastnostech. Tyto metody jsou rozděleny na chemické, fyzikální a fyzikálně- chemické.

Tabulka 1 Metody mikroenkapsulace [2].

chemické metody
Metoda za odpařování rozpouštědla
Mezifázového zesítní
Mezifázová polykondenzace
In situ polymerizace
Polymerizace v matrix
Fyzikální metody
Sprejové sušení
Fluidní obalování
Centrifugační extruze
Vibrační tryska
Rotující disk
Fyzikálně-chemické metody
Ionotropní gelace
Polyelektrolytová komplexace
Koacervace
Metoda superkritické technologie

4.1.2.1 Chemické metody mikroenkapsulace

Chemické metody mikroenkapsulace zahrnují metodu za odpařování rozpouštědla, mezifázové zesítní, mezifázovou polykondenzaci, *in situ* polymerizaci a matrix polymerizaci.

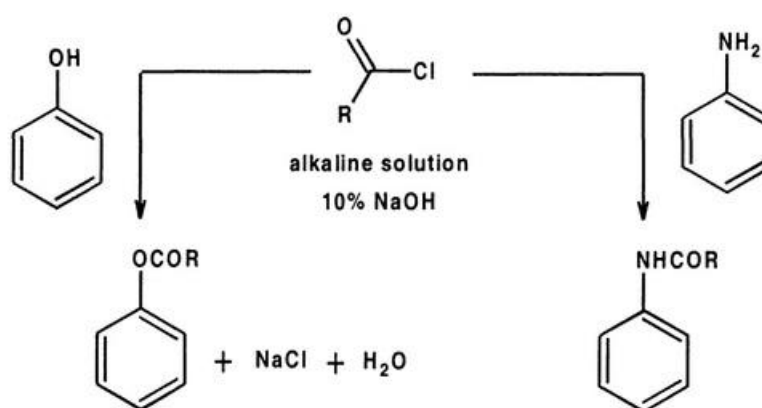
4.1.2.1.1 Metoda za odpařování rozpouštědla

Metoda založená na odpařování rozpouštědla je používána mnoha společnostmi především pro enkapsulaci léčiv [6]. Proces vyžaduje, aby byl materiál jádra rozpuštěn nebo rozptýlen v roztoku obalového materiálu. Dále následuje míchání až do dosažení

požadované velikosti částic [6]. Směs je poté zahřívána, dokud se nevypaří rozpouštědlo obalu, a poté je teplota opět snížena.

4.1.2.1.2 Metoda mezifázové polykondenzace

Mikroenkapsulační metoda mezifázové polykondenzace je také nazývána mezifázová kondenzační polymerizace. Metoda zahrnuje Schotten-Baumannovu reakci mezi chloridem kyseliny a sloučeninou obsahující aktivní atom vodíku [7]. V této reakci se setkávají dva polymerní reaktanty, které tvoří stěnu na povrchu mikrokapsule [8].



Obrázek 2 Schotten- Baumannova reakce [44]

4.1.2.1.3 Metoda mezifázového zesítnění

Metoda mezifázového zesítnění pochází z mezifázové polykondenzace a také zahrnuje Schotten-Baumannovu reakci. Monomery se dvěma funkčními skupinami obsahujícími aktivní atomy vodíku, které jsou během enkapsulace zaměněny za biopolymery, jako jsou proteiny [9]. Membrána mikrokapsuly je poté formována na mezifázi reakcí chloridu kyseliny s funkčními skupinami proteinu.

4.1.2.1.4 In situ polymerizace, polymerizace v matrix

In situ polymerizace a polymerizace v matrix jsou metody využívané v řadě mikroenkapsulačních procesů. V případě in situ polymerizace reaktanty nejsou součástí materiálu jádra, ale polymerizují a tvoří částicový obal [10]. Na druhé straně při polymerizaci v matrix dochází k vkládání jaderného materiálu do polymerní matrix obalu během formulace částice [10].

4.1.2.2 Fyzikální metody mikroenkapsulace

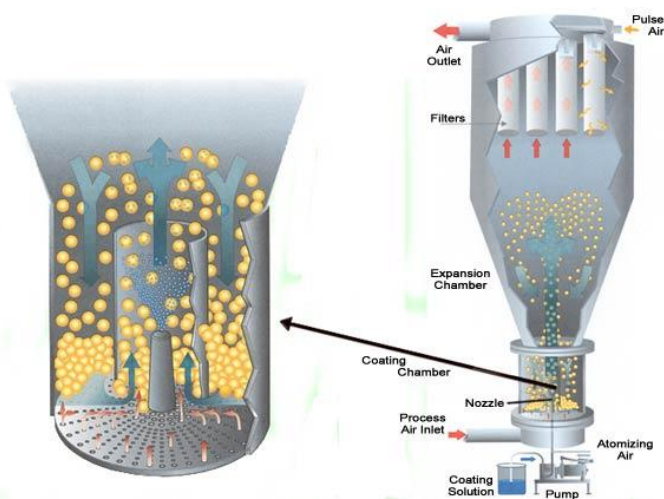
Fyzikální metody polymerizace zahrnují sprejové sušení, fluidní obalování, odstředivou extruzi, vibrační trysku, a mikroenkapsulace na otáčivém disku.

4.1.2.2.1 Sprejové sušení

Emulze pro sprejové sušení je připravena dispergací olejovitého materiálu jádra nebo vodou rozpustné aktivní ingredience v koncentrovaném roztoku obalového materiálu. Emulze je dále rozprašována v kapičkách pomocí rotujícího disku a krátce vystavena vytápěnému prostoru, aby se odpařilo rozpouštědlo. Sprejové sušení je ekonomická metoda, která umožňuje enkapsulaci labilních materiálů jako jsou proteiny a mikroorganismy [11].

4.1.2.2.2 Fluidní obalování

Fluidní obalování je mikroenkapsulace, která je široce využívána k enkapsulaci léčiv do tablet [12]. V této metodě jsou pevné částice smíchány s práškovým potahovým materiálem a celá směs je zahřívána a vzniká obal [13]. Pevné částice (nebo kapalné absorbované na porézní pevné látce) jsou suspendovány v proudu vzduchu, následuje aplikace obalového materiálu použitím tekutého postřiku. Vzniklé částice jsou zpevněny ochlazením nebo za pomoci odpaření rozpouštědla. Proces je opakován, dokud nejsou stěny mikrokapsul dostatečně silné. U Wurster systému fluidizace jsou sprejové trysky lokalizovány pod fluidní vrstvou [25].



Obrázek 3 Fluidní obalování [24]

4.1.2.2.3 Centrifugační extruze

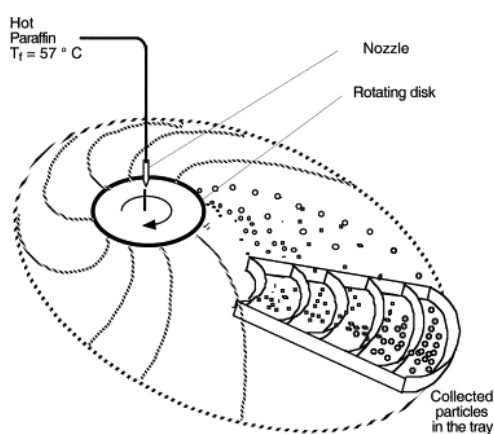
Centrifugační extruze je jednoduchá metoda mikroenkapsulace, při které se používá otáčecí extruzní hlavice tvořená z koncentrických trysek [14]. Jádru a obalový materiál, které jsou mezi sebou nemísitelné, jsou tlačeny přes koncentrické trysky tvořící proud a tvoří se kapky. Dále následuje čištění trysek. Tuhnutí kapiček může být prováděno pomocí zchlazování nebo gelace v závislosti na materiálu používaném během enkapsulace.

4.1.2.2.4 Vibrační tryska

Vibrační tryska je populární metoda enkapsulace při které je kapalný materiál, který má být mikroenkapsulován, protlačován přes trysku určitou silou proudu. Na rozdíl od metody centrifugační extruze, která je závislá na přirozeně tvořených, nepravidelných výkyvech proudu vytvářejících kapičky nepravidelné velikosti a tvaru, jsou u této metody pravidelné, sinusoidální výkyvy určité frekvence, které tvoří mikrokapsuly podobných rozměrů [15]. Tuhnutí kapiček probíhá stejně jako u předešlé metody pomocí ochlazení nebo gelace.

4.1.2.2.5 Rotující disk

Rotující disk je další z fyzikálních technik mikroenkapsulace. Z materiálu pro jádro a obal mikrokapsuly je vytvořena směs. Disperze je poté hnána na otáčející se disk, který rozptyluje částice přes okraj. Dále probíhá tuhnutí kapiček jako u předešlých metod.



Obrázek 4 Schematická ukázka rotujícího disku [28]

4.1.2.3 Fyzikálně-chemické metody mikroenkapsulace

Fyzikálně-chemické mikroenkapsulační metody zahrnují ionotropní gelaci, komplexaci polyelektrolytů, koacervaci, technologii nadkritických kapalin.

4.1.2.3.1 Ionotropní gelace

Ionotropní gelace je založená na schopnosti elektrolytů se v přítomnosti opačných iontů podélně síťovat, což vede ke gelaci [16]. Tento proces byl intenzivně zkoumán používáním přírodních polyelektrolytů, jako jsou alginát [17], chitosan [18], a karboxymethylcelulóza [19] a další. Gelované kapky jsou tvořeny přidáním polymerních částecek obsahujících anionickou terapeutickou látku, která má být enkapsulována do vodného roztoku polyvalentních kationtů [16].

4.1.2.3.2 Koacervace

Koacervace je také nazývána fázová separace, je to jedna z nejstarších a nejrozšířenějších metod mikroenkapsulace. Tato metoda je založena na vzájemné interakci dvou polymerů [20]. Může být členěna na jednoduchou a komplexní koacervaci. Při jednoduché koacervaci se přidává sůl nebo alkohol k polymerní směsi, což podnítl separaci kapalina-kapalina a formulaci koacervovaných polymerních kapiček [21]. Komplexní koacervace se vyskytuje v přítomnosti 2 fází a modifikací pH vodné fáze. Tak vzniká na mezifázi membrána koacervovaných polymerních rezervoárů. Následně může být membrána zpevněna a stabilizována polymerním síťováním.

4.1.2.3.3 Technologie nadkritických kapalin

Technologie nadkritických kapalin nedávno nabyla farmaceutického významu kvůli formulaci částic, které jsou monodisperzní s možností tvořit částice v nanorozměrech [22]. Nadkritické kapaliny mohou tvořit částice pomocí snížení tlaku nebo překročením bodu nasycení roztoku pomocí ředění nebo také kombinací obou těchto postupů [23].

4.2 Mikroenkapsulované léčivé látky ostatní farmaceutika

Největší přínos mikroenkapsulační technologie ve farmaceutickém výzkumu je ve vývoji lékových forem. Tento interdisciplinární obor, který zahrnuje polymerní vědy a emulzní technologie, se zabývá nejen enkapsulací léčiv, ale i enkapsulací peptidů, bílkovin a DNA a RNA molekul. Tyto enkapsulované částice se používají jako lékové

formy s řízeným uvolňováním. Pomocí řízeného uvolňování se zvyšuje terapeutický efekt látek s nízkými dávkovými požadavky a látek se schopností být dodány na místo účinku bez enzymové degradace.

Řízené uvolňování pomocí mikrosfér či mikrokapsul probíhá čtyřmi známými mechanismy: difuzí, disolucí, osmózou, erozí. Řízené uvolňování léčiva nechrání pouze léčivo před degradací, ale také chrání tělo před potenciálními toxickými efekty drogy [13].

Nejčastěji používanými polymery pro lékovou aplikaci jsou polymer kyseliny mléčné (PLA) a kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) [26]. Dále se používají polysacharidy, jako je algináty [17], chitosan [18] a lipidy [27]. Volba polymeru, rozpouštědla, stabilizátorů, povrchově aktivních látek a také tuhost, degradabilita a integrita jsou důležité parametry, které rozhodují o formulaci mikročástic [6].

Biodegradabilní a biokompatibilní polymery, např. PLGA, jsou používány při enkapsulaci biologicky aktivních agens, jako je risperidon a testosteron [29]. Mikroenkapsulační metody byly také vyvinuty pro podávání adjuvancií a antigenů jako vakcín pro imunizační terapii [30]. Pomocí emulzní technologie byly enkapsulovány potravinové doplňky stravy, kterými jsou např. vitamíny [31].

Mikroenkapsulace byla využita v přípravě lékových forem celé řady dalších struktur protirakovinných léčiv, genů, proteinů nebo i hormonů [31].

Dalším využitím enkapsulace je nanoenkapsulace nanočástic. Nanoenkapsulované kovy s antioxidantním efektem mohou být chráněny před buněčnou internalizací při zachování jejich povrchově závislých biomimetických vlastností. Nanoenkapsulace nanočástic může předcházet počátečnímu rychlému burst efektu, což je významná limitace nanočásticových formulací. Dále může být pomocí nanoenkapsulace nanočástic dosaženo kontrolovaného uvolňování léčiva [32]. Ve studii prováděné Hasanem a spol. je použit ibuprofen a triptorelin acetát jako modelové lipofilní a hydrofilní látky. Ty jsou enkapsulovány v poly- ϵ -kaprolaktonových (PCL) nanočásticích a zachyceny v mikročásticích z ethylu celulózy a ERS. Tato studie odhalila významný pokles v difuzi léčiva přes dvojitou polymerní stěnu, což poskytuje prodloužené a více kontrolované uvolňování [33]. Dalším přínosem nanoenkapsulace je

snížení cytotoxických efektů. Nedávná studie od Li a spol. sledovala mikroenkapsulaci nanoemulze pomocí sprejového sušení, ve které byl jako lipofilní molekula použit vitamín E acetát. Nanoenkapsulace pomohla snížit nestabilitu, agregaci a hydrolyzu nanočástic v suspenzi [34]. Nanoenkapsulační membrána vykazovala rezistenci proti různému pH gastrointestinálního traktu a tím ochranu enkapsulovaného léčiva. Dále bylo pomocí nanoenkapsulace dosaženo kontrolovaného systému uvolňování léčiva [2].

4.3 PLGA nanočástice

4.3.1 Syntéza PLGA nanočástic

Metody syntézy PLGA nanočástic mohou být rozděleny na bottom-up a top-down. Bottom-up metody, jako je mikroenkapsulace (emulzní, mikroemulzní polymerizace), mezifázová polymerizace a polymerní precipitace, používají jako výchozí surovinu monomery. Emulzní metoda za odpařování rozpouštědla, emulzní difuze, výměna rozpouštědla a vysolování jsou top-down metody, ve kterých jsou nanočástice syntetizovány z roztoků polymerů.

4.3.1.1 Emulzně difúzní metoda

V této metodě je polymer (PLGA) rozpuštěn v organické fázi (benzyl alkohol, ethyl acetát, propylen karbonát), která musí být částečně mísitelná s vodou. Organická fáze je za míchání emulgována s vodným roztokem vhodné povrchově aktivní látky (anionický dodecyl sulfát sodný (SDS), neionický polyvinyl alkohol (PVA), nebo kationický didodecyl dimethyl ammonium bromid (DMAB)) a tím je stimulována tvorba nanočástic [35]. Důležité parametry, které ovlivňují velikost nanočástic syntetizované touto metodou jsou: poměr mléčné a glykolové kyseliny, koncentrace polymeru, vlastnosti rozpouštědla (solvent nature), molekulová hmotnost polymerní povrchově aktivní látky, viskozita, fázový poměr, teplota a rychlost přidávané vody.

Poměr mléčné a glykolové kyseliny bývá 50:50 a 75:25. Při použití dvou různých poměrů je detekován minimální rozdíl ve velikosti výsledných nanočástic. Podle Konana a spol. při poměru kyseliny mléčné a glykolové 75:25 mají částice v průměru 95 nm a při poměru 50:50 mají v průměru 93 nm.

Při této metodě se nepoužívají vysoce toxická rozpouštědla. Obecně je při ní použito méně energie, protože vyžaduje pouze pomalé míchání, není třeba ultrazvuk či vysokorychlostní míchání.

Mezi nevýhody této metody patří velká spotřeba vody pro výrobu nanočástic a dlouhý čas míchání. Pokud není použit ultrazvuk či vysokorychlostní míchání pro redukci velikosti nanočástic, je metoda vysoce citlivá na změny koncentrace polymeru. Je výhodnější pro hydrofobní molekuly [36].

4.3.1.2 Metoda vysolování (*Salting out method*)

V této metodě je polymer rozpuštěn v organické fázi, která by měla být s vodou mísitelná, jako je například aceton nebo tetrahydrofuran. Organická fáze je pod vysokým smykovým napětím emulgována ve vodné fázi. Vodná fáze obsahuje emulgátor a vysokou koncentraci solí, které nejsou rozpustné v organické fázi. Do emulze v/o se rychle přidá čištěná voda a lehce se míchá, což redukuje iontové síly a vede k přestupu ve vodě rozpustných organických rozpouštědel do vodné fáze a dochází k tvorbě nanočástic [37]. Konečným krokem je čištění pomocí cross-flow filtrace nebo centrifugace k odstranění vysolených částic.

Důležité parametry této metody jsou koncentrace polymeru a jeho molekulová hmotnost, rychlost a čas míchání, charakter a koncentrace povrchově aktivní látky a rozpouštědla a také kryoprotektanty.

Nevýhodou metody je konečný krok čištění vysolených částic. Vzhledem k tomu, že vysolené částice jsou ve vodě rozpustné, je metoda vhodná pro hydrofobní molekuly. Jsou používána netoxická, ale vysoce výbušná rozpouštědla (aceton).

4.3.1.3 Nanoprecipitační metoda

Tato metoda je používána pro hydrofobní léčiva, ale byla adaptována i na hydrofilní léčiva. Polymer a léčivo jsou rozpuštěny v polárním, ve vodě rozpustném rozpouštědle jako je aceton, ethanol, methanol. Roztok je poté po kapkách přidáván do vodného roztoku povrchově aktivní látky. Částice jsou okamžitě tvořeny pomocí rychlého rozptylu rozpouštědla. Nakonec je rozpouštědlo za vakua odstraněno.

Důležité parametry této metody jsou poměr koncentrace polymeru a povrchově aktivní látky, koncentrace polymeru, charakter a koncentrace povrchově aktivní látky, charakter rozpouštědla, viskozita, aditiva, aktivní látky a fáze vstříkování.

Určité sloučeniny mohou zlepšit stabilitu a také mohou mít vliv na velikost nanočástic. Jsou to mastné kyseliny, uhlovodíky. Dále mohou ovlivnit účinnost zachycení aktivní látky. Govender a spol. vyzorovali, že přidáním mastných kyselin se ovlivnila účinnost zachycení látky (prokain hydrochlorid, prokain dihydrát, ve vodě rozpustné léčiva), ale také velikost výsledných nanočástic [38].

Nanoprecipitace má ve srovnání s ostatními metodami výroby nanočástic z PLGA několik výhod a nevýhod. Výhodou je užití méně toxických rozpouštědel a snížená spotřeba energie, protože metoda vyžaduje pouze mírné míchání a není třeba ultrazvuk či mikrofluidizace. Pro redukci velikosti nanočástic mohou být použita aditiva.

Mezi nevýhody metody patří odstraňování rozpouštědla pomocí vypařování, které je časově náročné. Největší nedostatek metody je fakt, že léčiva by měla být vysoce rozpustná v polárních rozpouštědlech (aceton) a méně rozpustná ve vodě, aby se minimalizovaly ztráty během rozptylu rozpouštědla [39].

Drug loading je nižší pro hydrofilní léčiva ve srovnání s hydrofobními kvůli jejich nízké interakci s polymerem, což vede k difuzi léčiva během přechodu rozpouštědla polymeru z organické fáze do vnější vodné fáze [40]. Velikost nanočástic je z velké části ovlivněna koncentrací polymeru, při vyšší koncentraci polymeru jsou získány větší nanočástice [36].

4.3.1.4 Emulsion evaporation method (emulzní metoda za odpařování rozpouštědla)

Emulzní metoda za odpařování rozpouštědla je založena na emulgaci organického roztoku polymeru ve vodné fázi následované odpařením organického rozpouštědla. Polymer je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, jako je ethylacetát (EtOAc), chloroform, methylenchlorid. Organická nebo vodná fáze je vlita do kontinuální fáze (vodná nebo organická) ve které je rozpuštěna povrchově aktivní látka, která stabilizuje emulzi. Emulgace je prováděna pod vysokým tlakem, aby byla redukována velikost emulzních kapiček. Jejich velikost je přímo spojena s konečnou

velikostí nanočástic. Emulgace je následována vypařením organického rozpouštědla ve vakuu, což vede k precipitaci polymeru a následné formulaci nanočástic.

Emulze v/o je používána u hydrofobních sloučenin, naopak emulze v/o/v je používána pro hydrofilní sloučeniny. Metoda je široce využívána pro mikroenkapsulaci, protože je jednoduše převeditelná do velkovýroby (*scaling-up*) a může pomoci dvojité emulgace enkapsulovat ve vodě rozpustná léčiva [41].

Emulze může být specifikována jako mikroemulze, nanoemulze a makroemulze. Mikroemulze jsou průhledné a termodynamicky stálé emulze s částicemi mezi 20 a 50nm [42]. Velikost částic v nanoemulzi je mezi 40 až 500 nm [43]. Při stabilizaci nanoemulze je třeba vysokého smykového tření a dostatek povrchově aktivní látky. Makroemulze jsou tvořeny jemným mícháním a pro stabilitu je přidána povrchově aktivní látka. Makroemulze mají tendenci k agregaci.

Při této metodě nejsou používána vysoce toxická rozpouštědla. Pro redukci velikosti nanočástic mohou být použita aditiva. Metoda je vhodná jak pro hydrofilní tak pro hydrofobní aktivní sloučeniny. Nevýhodou je vysoká spotřeba energie při homogenizaci.

Existuje mnoho metod pro syntézu PLGA nanočástic. Každá má své výhody a nevýhody. Hlavní kritéria pro výběr správné metody by měly být chemické vlastnosti aktivní sloučeniny, její interakce s organickými rozpouštědly, polymery a povrchově aktivními látkami a v neposlední řadě konečné využití výsledných nanočástic.

Pokud chceme dosáhnout průměrné velikosti nanočástic 200 nm při metodách založených na difuzi, musíme použít nízké koncentrace polymerů. To je jedna z hlavních limitací těchto metod. Metody, které zahrnují vypaření rozpouštědla, jsou časově náročné a drahé, ale jsou méně citlivé na změny v koncentraci polymeru. Metoda může být použita u hydrofobních i hydrofilních sloučenin, což je výhoda. Metoda vysolování je vhodná pro formulaci nanočástic s vyšší koncentrací polymeru, ale proces čištění je limitací této metody.

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje

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

Váhy Kern 440 - 35N, max. 400 g, d= 0,01 g

Homogenizátor DIAX 9000, Heidolph

Magnetická míchačka IKA – WERKE RT, 100 – 1000 ot./ min

Zetasizer ZS, Malvern Instruments, UK Zetasizer ZS 90

Vakuová sušárna Memmert

5.2 Použité chemikálie

Cetrimid (N- cetyl- N, N, N- trimethylammonium bromid), Merck

Čištěná voda FaF UK, čištěná reverzní osmózou

Terbinafin, Zentiva a.s.

Ethylmethylketon, Lachema a.s., Neratovice

Ethylacetát p.a., Penta, Chrudim

Mannitol p.a., Aldrich, Praha

Trehalosa kosmet., Aldrich, Praha

Maltosa, p.a., Sigma, Praha

Glycin p.a., Lachema, Brno

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

5.3 Postup přípravy

5.3.1 Příprava baze terbinafinu

Na analytických vahách bylo naváženo 12,0 g terbinafinu a 3000 g čištěné vody. Terbinafin s destilovanou vodou byl poté v kádince umístěn pod míchadlo do vodní lázně a míchán do rozpuštění. Roztok byl zfiltrován a byl přikapáván amoniak do dosažení hodnoty pH 7,0. Z roztoku se vysrážela baze terbinafinu (BT). Tekutina byla dekantována a BT umístěna do vakuové sušárny.

5.3.2 Příprava vnější fáze emulze

Na analytických vahách byla navážena čištěná voda a cetrimid (CET). Protože CET má při laboratorní teplotě špatnou rozpustnost, byla kádinka umístěna do mikrovlnné trouby a zahřívána po dobu 10 vteřin. V některých případech se do vnější fáze přidával mannitol a glycin.

Tabulka 2 Navážka CET, čištěné vody, MANN a GLY podle požadované koncentrace

složení vnější fáze	Navážka CET [g]	Navážka čištěné vody [g]	Navážka MANN [g]	Navážka GLY [g]
0,05% CET	0,25	499,75	-	-
0,2% CET	1	499	-	-
0,8% CET	4	496	-	-
0,2% CET, 5% MANN	1	499	25	-
0,2% CET, 10% MANN	1	499	50	-
0,2% CET, 5% MANN, 5% GLY	1	499	25	25

5.3.3 Příprava vnitřní fáze

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu (T3) a bylo rozpuštěno v přidaném organickém rozpouštědle, kterým byl ethylmethylketon (EMK) nebo v tab. 20 ethylacetát (EtOAc). V některých případech se do vnitřní fáze přidával cetrimid v dané koncentraci.

Tabulka 3 Navážka T3, EMK, EtOAc a CET podle požadované koncentrace

Složení vnitřní fáze	Navážka T3 [g]	Navážka EMK nebo EA [g]	Navážka CET [g]
1% T3, 0% CET	2	198	
1% T3, 5% CET	2	198	10,526
1% T3, 1% CET	2	198	2,02
2% T3, 0% CET	4	196	

5.3.4 Příprava nanočástic

Kádinka s vnější fází byla umístěna pod homogenizátor tak, aby konec turbíny byl 0,5 cm ode dna kádinky. Homogenizátor byl spuštěn na nejnižší otáčky. Poté byla naráz přidána vnitřní fáze a otáčky byly zvýšené na maximum 26000 RPM a byla míchána po dobu 30 sekund. Přesný čas byl měřen stopkami. Poté bylo ukončeno míchání a vzniklá suspenze nanočástic byla vlita do kádinky umístěné na magnetické míchačce.

Směs byla stabilizována za míchání po dobu cca 2 hodin. Odebírali jsme vzorky a měřili velikost částic, polydisperzitu a střední hodnotu Z-Ave.

Koncentrace emulze byla 5%, 10% a 20%.

Do vzorků z tabulek 4, 6, 8, 10, 12, 14 byl přidán mannitol tak, aby ho ve výsledné směsi bylo 10%. Vzorky bez a s mannitolem byly umístěny na 17 hodin do lednice a poté se měření opakovalo (tab. 5, 7, 9, 11, 13, 15). Obsah kádinky jsme těsně před měřením promíchali.

Do vzorků z tabulek 16, 18 byl přidán mannitol (MAN) nebo trehalosa (TRE), maltosa (MAL) (10%). Vzorky byly sušeny v sušárně a poté opět rozpuštěny v čištěné vodě a byla měřena jejich velikost.

5.3.5 Měření velikosti nanočástic

Pro měření velikosti nanočástic byl použit Zetasizer ZS 90.

Tabulky s výsledky obsahují charakteristiky: Z-Ave, Pdl. Z-Ave je střední průměr velikosti částic. Pdl je index polydisperzity. Pdl nabývá hodnot od 0 do 1. Čím více je blíže 1 tím více jsou částice polydisperzní. Píky charakterizují střední velikost částic (Pk Mean Int) a jejich procentuální zastoupení (Pk Area Int).

5.4 Výsledky měření

5.4.1 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci cetrimidu ve vnější fázi, koncentraci baze terbinafinu ve vnitřní fázi s přidavkem 5% cetrimidu, Zpracování částic s mannitolem.

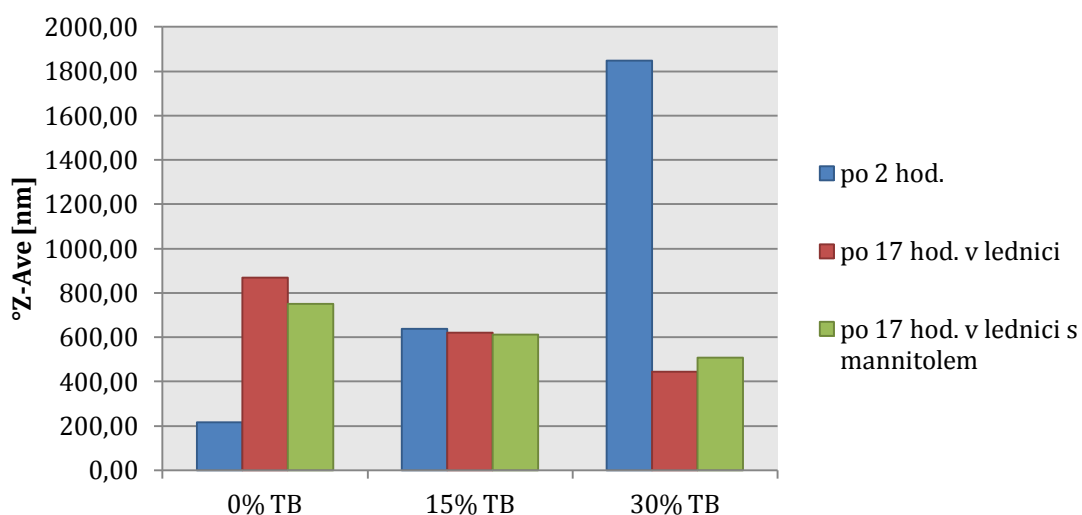
Tabulka 4 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,05% CET, Vnitřní fáze 1% T3 a 5% CET a TB podle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	275,8	0,455	274,8	0	0	100	0	0
	183,8	0,132	206	0	0	100	0	0
	184,8	0,037	202,4	0	0	100	0	0
15%	706,8	0,022	733	0	0	100	0	0
	593	0,574	559,4	0	0	100	0	0
	614,6	1	552,6	0	0	100	0	0
30%	2019	0,379	1377	5357	0	89,7	10,3	0
	1731	0,724	4215	450,9	0	69,9	30,1	0
	1790	0,79	4041	513,6	0	72,8	27,2	0

Tabulka 5 Velikost nanočástic. Vzorčky z tab. 4. Bez mannitolu, s mannitolem. Měřeno po 17 hod v lednici.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	875,9	0,14	1060	0	0	100	0	0
	805,6	0,118	960,2	0	0	100	0	0
	920,6	0,205	1184	194,1	0	94,9	5,1	0
0% s MANN	686,6	0,226	680,4	0	0	100	0	0
	788,3	0,425	1587	280,4	0	76,5	23,5	0
	774,6	0,434	1439	0	0	100	0	0
15%	588,8	0,416	626,9	3951	0	82,6	17,4	0
	619,9	0,458	1833	353,9	0	59,8	40,2	0
	648,9	0,488	1782	329,9	0	65,1	34,9	0
15% s MANN	624,7	0,365	698,3	3398	0	81,5	18,5	0
	619,6	0,343	436,1	1987	0	52,9	47,1	0
	586,7	0,319	991,1	0	0	100	0	0

30%	460,5	0,4	450,5	0	0	100	0	0
	469,4	0,643	443,5	0	0	100	0	0
	403,6	0,453	396,3	0	0	100	0	0
30% s MANN	549,2	1	485,3	0	0	100	0	0
	462,5	1	433,5	0	0	100	0	0
	514,8	1	473,3	0	0	100	0	0



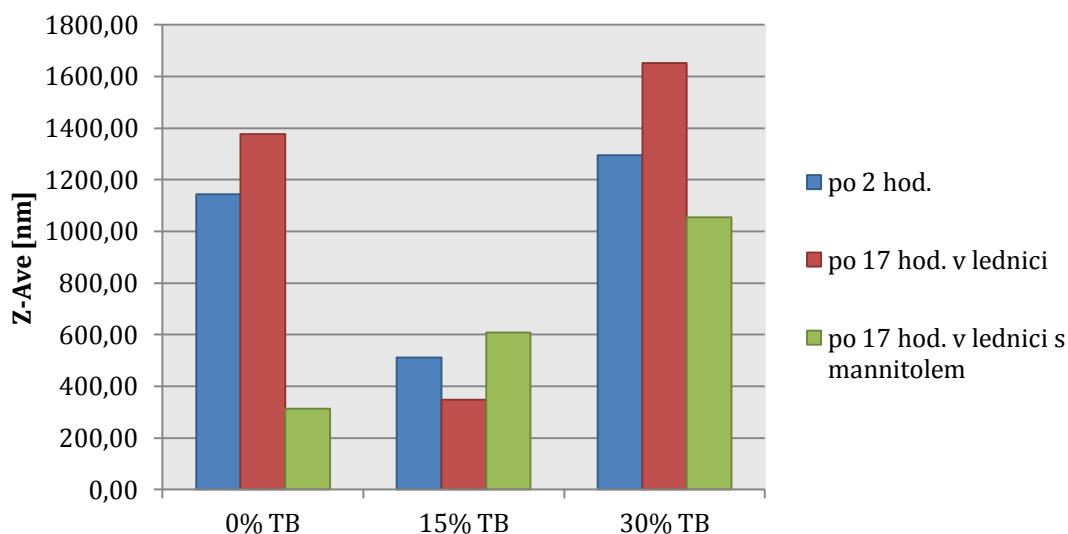
Obrázek 5 Velikost nanočástic. Tab. 4, 5.

Tabulka 6 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, Vnitřní fáze 1% T3, 5% CET a TB podle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%TB	993,8	0,755	431,2	4961	0	54,4	45,6	0
	1374	0,779	558,3	5333	0	70,6	29,4	0
	1063	0,486	381,6	5560	0	89,8	10,2	0
15%TB	573,4	0,762	531,5	0	0	100	0	0
	578	0,747	536,4	0	0	100	0	0
	381,3	0,177	395,1	0	0	100	0	0
30%TB	738,5	1	4057	574,8	0,8521	45,6	35,9	18,5
	1565	0,8	4380	560,7	0	64	36	0
	1581	0,718	565,2	5115	0	62,3	37,7	0

**Tabulka 7 Velikost nanočástic. Vzorky z tab. 6. Bez mannitolu, s mannitolem.
Měřeno po 17 hod v lednici.**

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	1331	0,108	1518	0	0	100	0	0
	1237	0,148	1529	0	0	100	0	0
	1565	0,139	1900	0	0	100	0	0
0% s MANN	232	0,568	183,1	0	0	100	0	0
	351,6	0,48	280,1	0	0	100	0	0
	358,7	1	208	0	0	100	0	0
15%	475,3	0,769	439,9	0	0	100	0	0
	356,2	1	328,1	0	0	100	0	0
	215,7	0,294	222,9	0	0	100	0	0
15% s MANN	640	0,165	648,2	0	0	100	0	0
	525,1	0,254	553,2	0	0	100	0	0
	662,1	0,26	662,6	0	0	100	0	0
30%	1473	0,797	950,8	283,1	0	74,4	25,6	0
	1597	0,635	4526	664,6	0	51,8	48,2	0
	1883	0,991	828,5	5376	275,7	66,9	23,4	9,8
30% s MANN	1076	0,53	777	0	0	100	0	0
	1026	0,4	933,5	0	0	100	0	0
	1059	0,243	1007	0	0	100	0	0



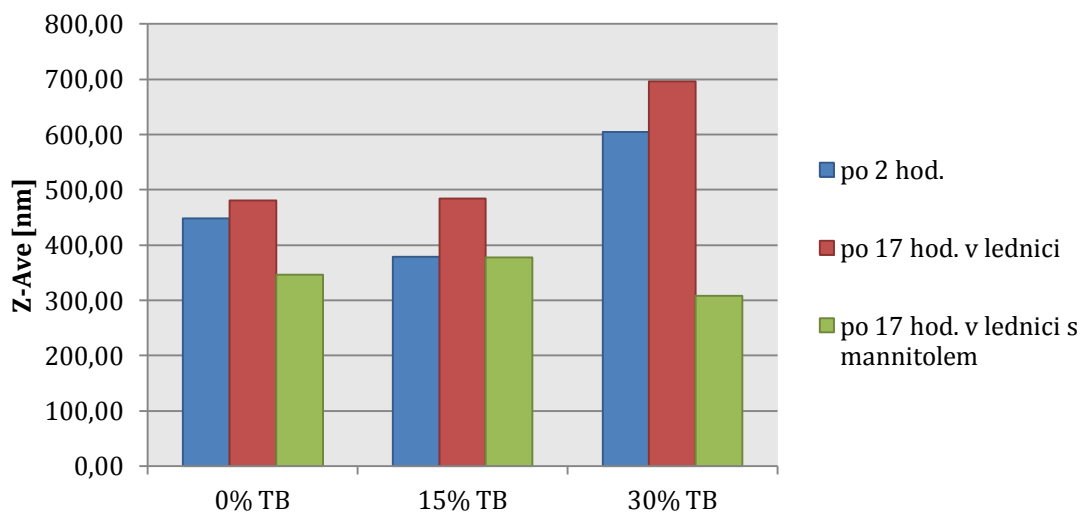
Obrázek 6 Velikost nanočástic. Tab. 6, 7.

Tabulka 8 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,8% CET, Vnitřní fáze 1% T3, 5% CET a TB podle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

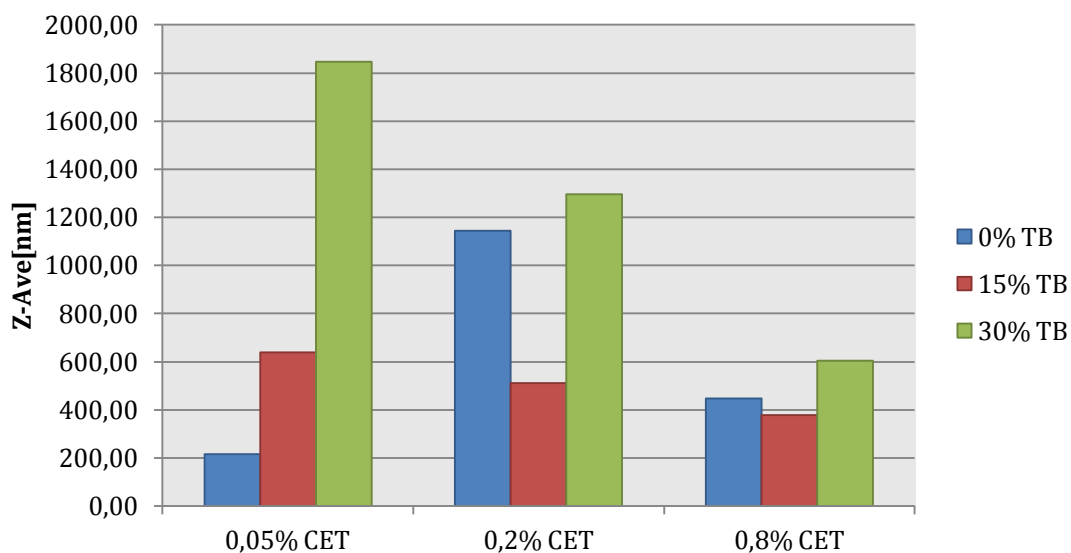
TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%TB	482,3	0,261	485,9	0	0	100	0	0
	416,5	0,231	423,6	0	0	100	0	0
	445,3	0,673	423,7	0	0	100	0	0
15%TB	308	0,204	349,6	0	0	100	0	0
	432,5	0,056	464,7	0	0	100	0	0
	394,6	0,181	440	0	0	100	0	0
30%TB	570	1	184,5	5560	0	96,2	3,8	0
	670,8	1	240,9	5560	0	95,1	4,9	0
	573,5	0,771	237,8	5002	0	63,1	36,9	0

Tabulka 9 Velikost nanočástic. Vzorky z tab. 8. Bez mannitolu, s mannitolem.
Měřeno po 17 hod v lednici.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	474,7	0,181	520,6	0	0	100	0	0
	426,9	0,227	476,5	0	0	100	0	0
	541,3	0,008	541,2	0	0	100	0	0
0% s MANN	347,9	0,287	346,6	0	0	100	0	0
	354,1	0,288	338,4	0	0	100	0	0
	335,9	0,211	361,6	0	0	100	0	0
15%	476,7	0,183	521,3	0	0	100	0	0
	520,5	0,271	519,9	0	0	100	0	0
	453,5	0,086	483,7	0	0	100	0	0
15% s MANN	396,7	0,052	414,9	0	0	100	0	0
	376	0,076	394,1	0	0	100	0	0
	358,5	0,122	383,4	0	0	100	0	0
30%	885,2	0,623	516	0	0	100	0	0
	655,7	0,297	448,5	0	0	100	0	0
	546,9	0,618	361,6	0	0	100	0	0
30% s MANN	253,7	0,781	134,3	4748	0	70,4	29,6	0
	321,6	0,475	257,1	0	0	100	0	0
	347,6	0,174	227,2	5161	0	84,8	15,2	0



Obrázek 7 Velikost nanočástic. Tab. 7, 8.



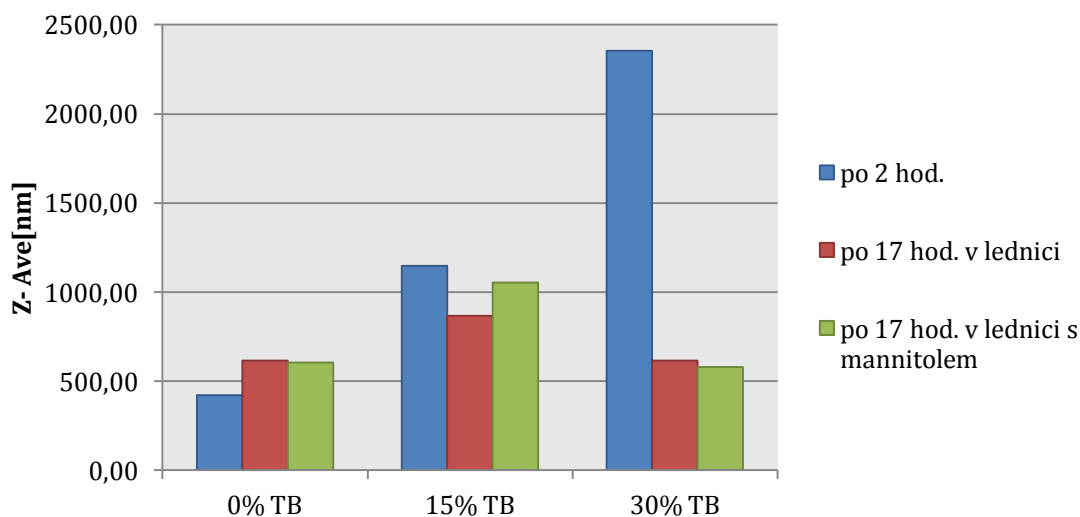
Obrázek 8 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci CET ve vnější fázi a na koncentraci TB. Po 2hod, 5% CET ve vnitřní fázi. Tab. 4, 6, 8.

Tabulka 10 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,05% CET, Vnitřní fáze 1% T3, 1% CET a TB podle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	419,3	0,12	457,8	0	0	100	0	0
	389,8	0,173	423,9	0	0	100	0	0
	460,7	0,03	494,9	0	0	100	0	0
15%	1079	0,823	1730	292,1	5322	69,3	23,4	7,2
	1225	0,612	913,1	225,2	0	84,8	15,2	0
	1136	0,605	668,7	3932	0	51,7	48,3	0
30%	2647	1	433,8	0	0	100	0	0
	2187	0,953	480,2	0	0	100	0	0
	2223	0,797	719,5	0	0	100	0	0

Tabulka 11 Velikost nanočástic. Vzorky z tab. 10. Bez mannitolu, s mannitolem.
Měřeno po 17 hod v lednici.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	711,7	0,156	722,5	0	0	100	0	0
	620,3	0,067	655,5	0	0	100	0	0
	515,6	0,134	533,6	0	0	100	0	0
0% s MANN	687,7	0,185	747,3	0	0	100	0	0
	537	0,312	526,8	0	0	100	0	0
	589,1	0,077	627,7	0	0	100	0	0
15%	771,9	0,447	1718	336,2	4965	64,7	32,8	2,5
	907	0,167	1077	0	0	100	0	0
	926	0,516	1778	266	0	83,8	16,2	0
15% s MANN	1146	0,377	898,6	0	0	100	0	0
	1222	0,485	763,5	4766	0	70,8	29,2	0
	793,7	0,376	698,6	0	0	100	0	0
30%	637	1	534,6	0	0	100	0	0
	612,5	0,322	601,9	0	0	100	0	0
	597	0,636	567,1	0	0	100	0	0
30% s MANN	530,2	1	486,6	0	0	100	0	0
	549,1	0,878	525	0	0	100	0	0
	661,5	1	513,2	0	0	100	0	0



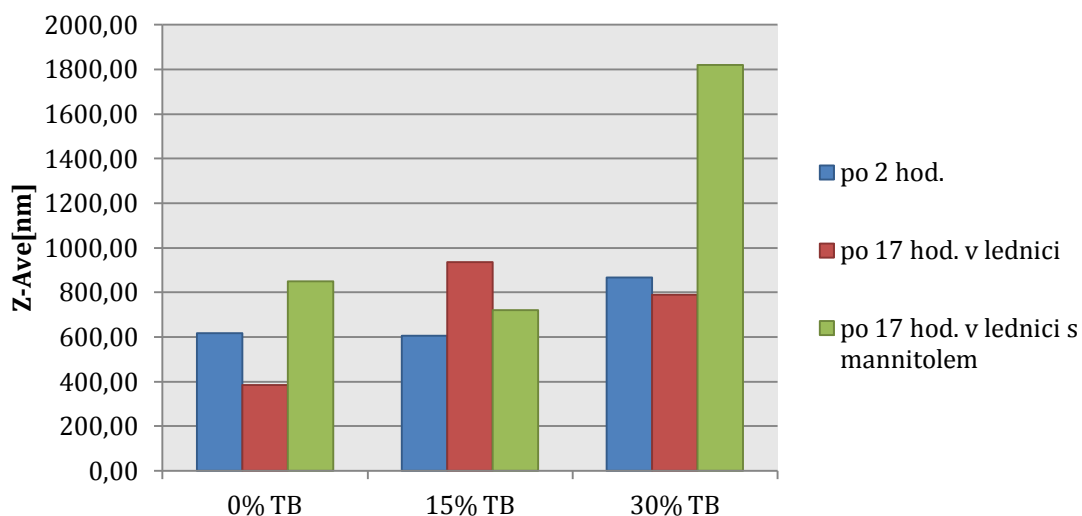
Obrázek 9 Velikost nanočástic. Tab. 10, 11.

Tabulka 12 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, Vnitřní fáze 1% T3, 1% CET a TB podle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	483,6	0,021	517,5	0	0	100	0	0
	597,2	0,259	595,7	0	0	100	0	0
	547,1	0,088	569,8	0	0	100	0	0
15%	513,1	0,191	516,6	0	0	100	0	0
	515,6	0,395	513,3	0	0	100	0	0
	638,5	0,155	645,9	0	0	100	0	0
30%	707,4	0,168	707,5	0	0	100	0	0
	773,4	0,102	833,9	0	0	100	0	0
	686	0,206	682,7	0	0	100	0	0

Tabulka 13 Velikost nanočástic. Vzorky z tab. 12. Bez mannitolu, s mannitolem. Měřeno po 17 hod v lednici.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	465,7	1	399,8	0	0	100	0	0
	440,2	0,14	457,6	0	0	100	0	0
	245,2	0,178	279,3	0	0	100	0	0
0% s MANN	865,9	1	709,4	0	0	100	0	0
	820,4	0,022	875,8	0	0	100	0	0
	866	0,285	873,7	0	0	100	0	0
15%	1097	0,213	1370	0	0	100	0	0
	751,7	0,51	1790	347,6	0	71,8	28,2	0
	962,3	0,34	966,2	0	0	100	0	0
15% s MANN	772,6	0,24	767,5	0	0	100	0	0
	728,6	0,141	782,7	0	0	100	0	0
	658,9	0,142	713,7	0	0	100	0	0
30%	743,8	0,117	751,1	0	0	100	0	0
	805,8	0,327	1329	0	0	100	0	0
	815	0,233	1093	164,1	0	97,9	2,1	0
30% s MANN	2763	1	140,8	0	0	100	0	0
	1172	0,483	822,2	3552	0	55,2	44,8	0
	1525	0,638	3707	610,3	0	66,7	33,3	0



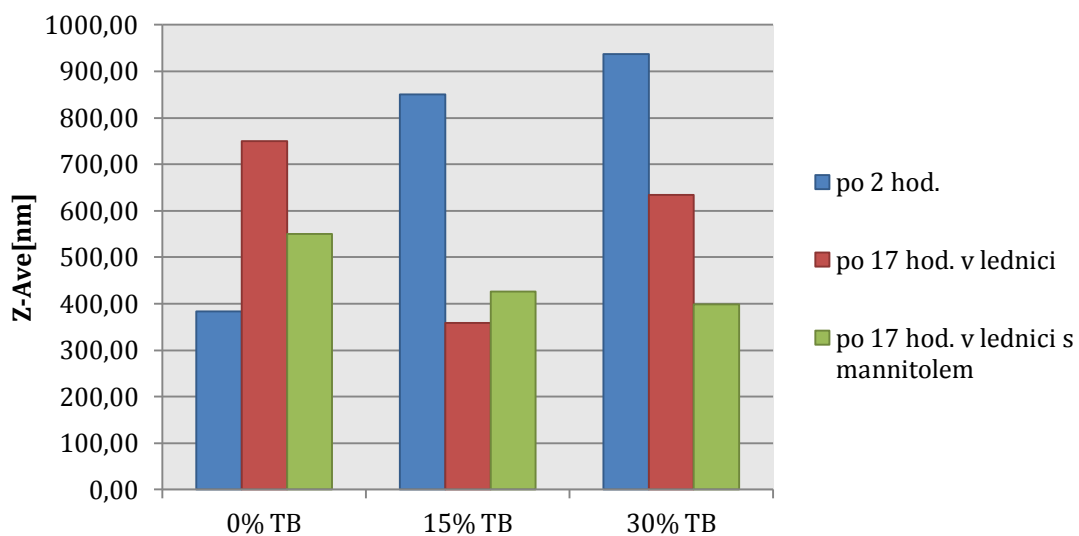
Obrázek 10 Velikost nanočástic. Tab. 12, 13.

Tabulka 14 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,8% CET, Vnitřní fáze 1% T3, 1% CET a TB podle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

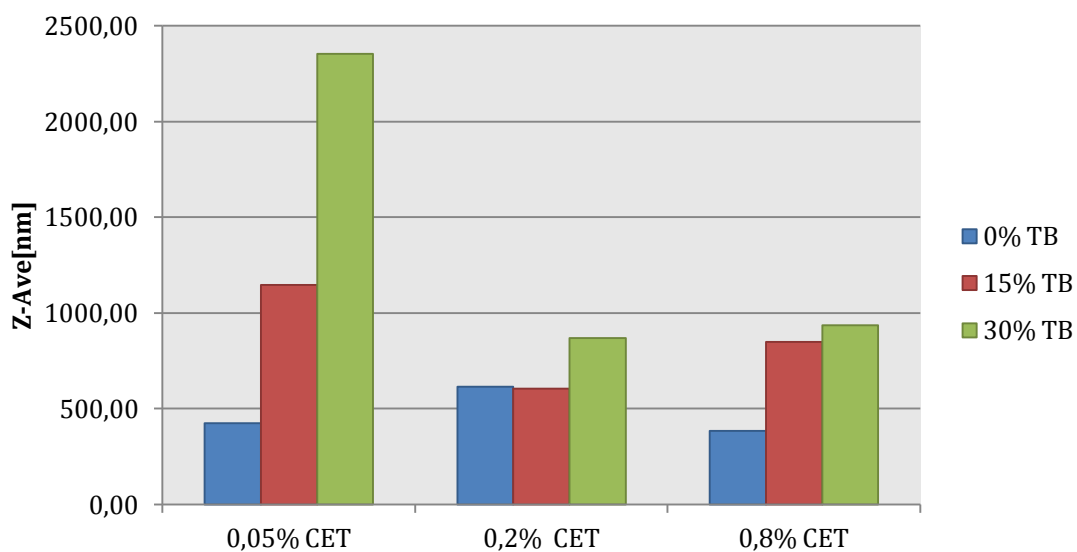
TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	655,1	0,241	698,9	0	0	100	0	0
	573,7	0,148	612,2	0	0	100	0	0
	471,7	0,319	449,6	0	0	100	0	0
15%	485	0,137	519,1	0	0	100	0	0
	540,4	0,192	483,8	0	0	100	0	0
	437,8	0,334	426,9	0	0	100	0	0
30%	514,3	1	5118	153,1	0	56,1	43,9	0
	674,2	1	198,8	5560	0	86,4	13,6	0
	785,7	1	203,1	0	0	100	0	0

**Tabulka 15 Velikost nanočástic. Vzorky z tab. 14. Bez mannitolu, s mannitolem.
Měřeno po 17 hod v lednici.**

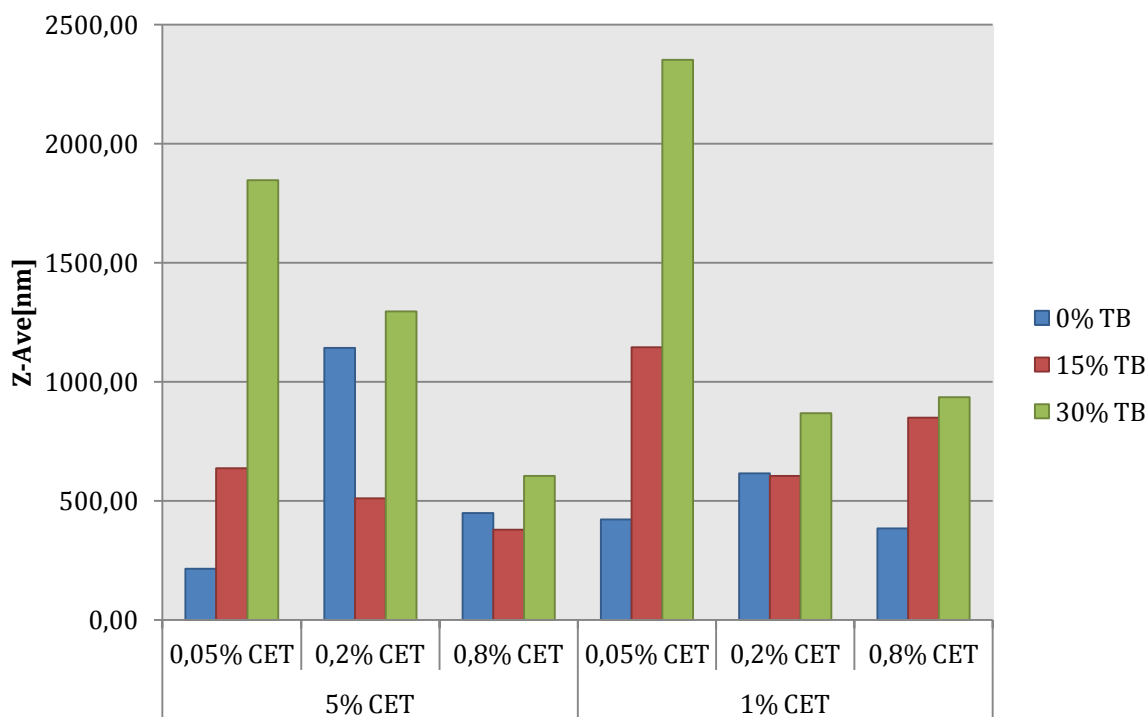
TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	853,9	0,4	2041,0	402,2	0	70,2	29,8	0
	775,7	0,5	1690,0	287,9	0	80,9	19,1	0
	620,6	0,2	774,8	0	0	100	0	0
0% s MANN	461,3	0,4	403,4	0	0	100	0	0
	533,4	0,1	356,8	0	0	100	0	0
	655,4	0,1	449,7	0	0	100	0	0
15%	330,0	0,3	371,8	0	0	100	0	0
	383,3	0,3	372,4	0	0	100	0	0
	364,5	0,2	398,5	0	0	100	0	0
15% s MANN	451,9	0,5	370,8	0	0	100	0	0
	449,2	0,4	389,1	0	0	100	0	0
	377,5	0,4	347,8	0	0	100	0	0
30%	637,0	0,8	534,6	0	0	100	0	0
	612,5	0,3	657,3	0	0	100	0	0
	654,0	0,6	567,1	0	0	100	0	0
30% s MANN	376,5	0,4	327,3	0	0	100	0	0
	432,4	0,1	332,3	0	0	100	0	0
	386,4	0,4	321,0	0	0	100	0	0



Obrázek 11 Velikost nanočástic. Tab. 14, 15.



Obrázek 12 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci CET ve vnější fázi a na koncentraci TB. Tab. 10, 12, 14.



Obrázek 13 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci CET ve vnitřní fázi. Tab. 4, 6, 8, 10, 12, 14.

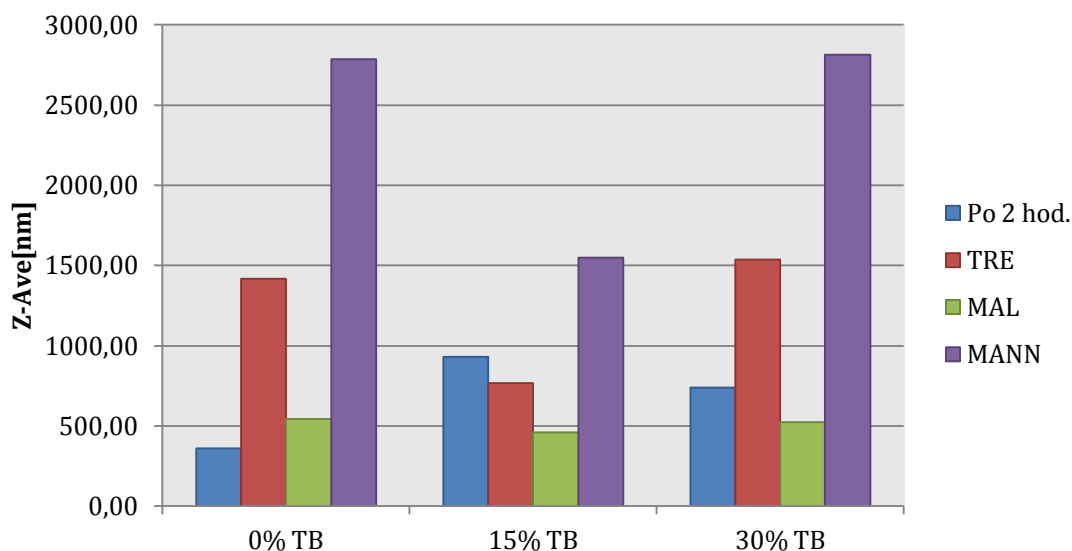
5.4.2 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci cetrimidu ve vnější fázi, koncentraci terbinafinu ve vnitřní fázi. Zpracování s mannitolem, trehalosou, maltosou.

Tabulka 16 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, Vnitřní fáze 1% T3 a TB dle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	463,2	1	385,9	0	0	100	0	0
	279	0,038	311,8	0	0	100	0	0
	342,7	0,46	346,2	0	0	100	0	0
15%	911,6	0,569	2359	367	0	72,9	27,1	0
	906,4	0,5	474,3	3634	0	50,8	49,2	0
	970,3	0,734	673,9	5015	0	77,4	22,6	0
30%	730,2	0,161	729,8	0	0	100	0	0
	730,5	0,273	720,4	0	0	100	0	0
	761,6	0,183	760,5	0	0	100	0	0

Tabulka 17 Velikost nanočástic. Vliv kryoprotektantů na velikost částic po sušení.
Vzorky z Tab. 16.

BT	POLYOL	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
(%)		d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0	TRE	1380	0,585	1635	194,8	0	87,7	12,3	0
		1462	0,568	2259	171,8	0	90,2	9,8	0
		1409	0,349	1998	151,7	0	92,9	7,1	0
0	MAL	558,8	0,458	917,8	239,2	4994	60,4	31,8	7,8
		510,6	0,487	2252	306,6	0	50,8	49,2	0
		557,5	0,465	681	213,7	4836	62,2	24,5	13,3
0	MANN	2986	0,217	3383	0	0	100	0	0
		2835	0,851	794,8	0	0	100	0	0
		2540	1	245,9	0	0	100	0	0
15	TRE	792,7	0,413	1070	229,3	5345	76,8	19,5	3,7
		759,2	0,502	859,2	206,4	4934	76,5	11,9	11,6
		745,7	0,45	1021	4293	97,32	83,9	14,2	1,9
15	MAL	451,3	0,484	1799	267,6	0	53	47	0
		454,5	0,447	604,3	4016	0	85,3	14,7	0
		470,9	0,515	1172	236,7	5160	55,8	40,7	3,4
15	MANN	1682	0,285	2256	206,7	0	94,1	5,9	0
		1466	0,866	1823	4506	351,8	51,2	30,8	18
		1501	0,96	916	189,9	0	87,9	12,1	0
30	TRE	1790	1	358,1	0	0	100	0	0
		1435	0,813	860,7	172,4	0	79,8	20,2	0
		1391	0,758	999,1	163,6	0	81,3	18,7	0
30	MAL	535,1	0,236	716,8	0	0	100	0	0
		521	0,415	1333	322,6	0	59,8	40,2	0
		512,7	0,436	627,1	166,8	5011	81	12,4	6,7
30	MANN	3540	0,347	3102	124,9	0	92,6	7,4	0
		2830	1	247,3	5560	0	92,9	7,1	0
		2076	1	202,9	0	0	100	0	0



Obrázek 14 Velikost nanočástic, po 2 hodinách míchání a po zpracování s trehalosou, maltosou, mannosou. Tab. 16, 17.

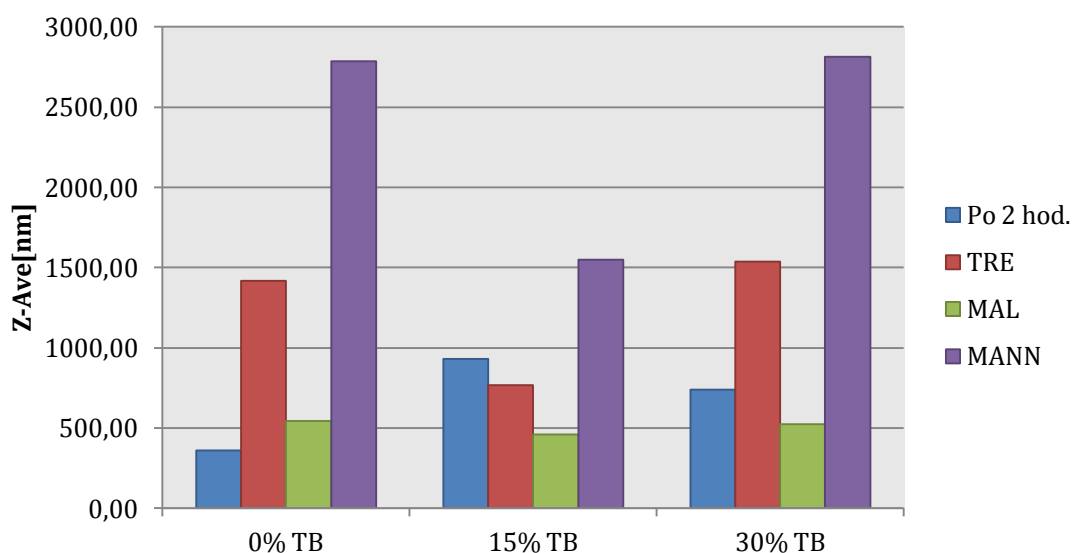
Tabulka 18 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,05% CET, Vnitřní fáze 1% T3 a TB dle koncentrace. Měření po 2 hod míchání.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	280,9	0,604	216,2	5363	0	92,7	7,3	0
	416,3	0,205	455,4	0	0	100	0	0
	283,9	0,545	227,7	5187	0	90,5	9,5	0
15%	730,9	0,195	764,3	0	0	100	0	0
	828,1	0,467	1281	189,1	4615	83,6	10,2	6,2
	837,5	0,295	1286	0	0	100	0	0
30%	804,3	0,833	735	0	0	100	0	0
	603,1	0,457	582,6	0	0	100	0	0
	593,1	0,033	630,9	0	0	100	0	0

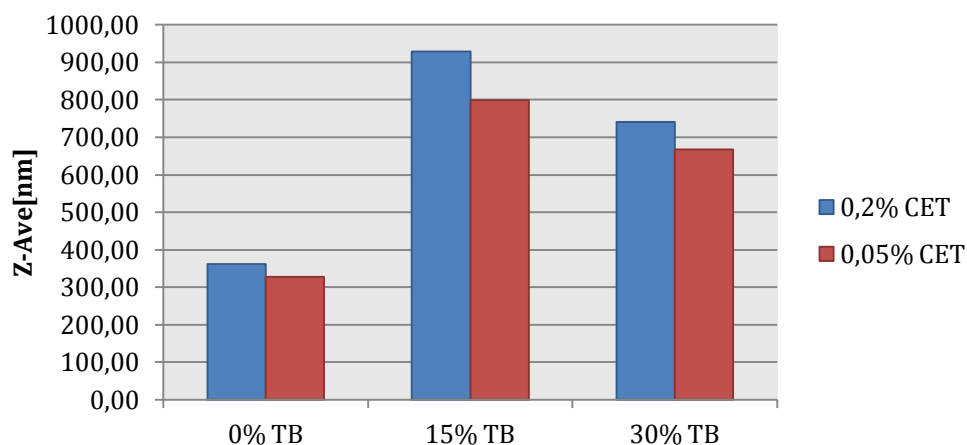
Tabulka 19 Velikost nanočástic. Vliv kryoprotektantů na velikost částic po sušení. Vzorky z tab. 18.

TB	POLYOL	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
(%)		d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0	TRE	2904	0,744	1137	5502	0	84,1	15,9	0
		2551	1	490,9	0	0	100	0	0
		2565	1	459,9	0	0	100	0	0

0	MAL	1853	0,382	2862	146,4	0	91,7	8,3	0
		1632	1	3694	168,9	0	88,6	11,4	0
		2222	0,47	3770	157	0	89,6	10,4	0
0	MANN	739,8	1	4288	197,2	0	71,3	28,7	0
		736,8	1	237,9	5425	0	79,6	20,4	0
		742,5	1	222,9	0	0	100	0	0
15	TRE	2387	0,425	2798	200,6	5219	82,1	12,1	5,8
		2380	1	1608	259,2	0	55,5	44,5	0
		1569	1	936,6	190,1	0	72,7	27,3	0
15	MAL	714,6	0,19	539,8	0	0	100	0	0
		707	0,302	674,6	0	0	100	0	0
		656,9	0,737	1104	228,6	5376	56,6	36,9	6,5
15	MANN	594	0,644	1632	223,6	0	68,6	31,4	0
		590,9	0,783	2563	240,8	0	65,5	34,5	0
		596,7	0,836	1474	237,6	4821	41,8	41,3	16,9
30	TRE	4645	0,737	615,1	0	0	100	0	0
		7174	0,183	396,1	0	0	100	0	0
		5340	0,334	1380	0	0	100	0	0
30	MAL	1627	0,976	499	121,3	0	90,5	9,5	0
		3042	1	337,5	0	0	100	0	0
		2232	1	352,8	0	0	100	0	0
30	MANN	2239	0,618	1010	0	0	100	0	0
		2740	1	572	0	0	100	0	0
		2559	0,891	897,2	118,2	0	93,7	6,3	0



Obrázek 15 Velikost nanočástic. po 2 hodinách míchání a po zpracování s trehalosou, maltosou, mannosou. Tab. 18, 19.

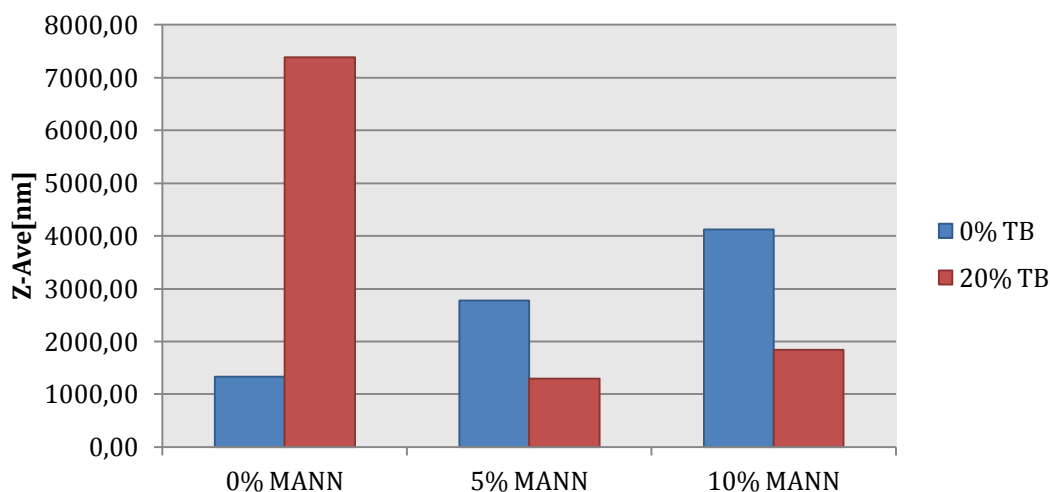


Obrázek 16 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci CET ve vnější fázi a koncentraci TB ve vnitřní fázi. Měřeno po 2 hod míchání. Tab. 16, 18.

5.4.3 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci MANN ve vnější fázi, při použití dvou různých rozpouštědel a různých koncentraci TB ve vnitřní fázi.

Tabulka 20 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, MANN, vnitřní fáze 1%T3 a TB v EtOAc. 20% emulze.

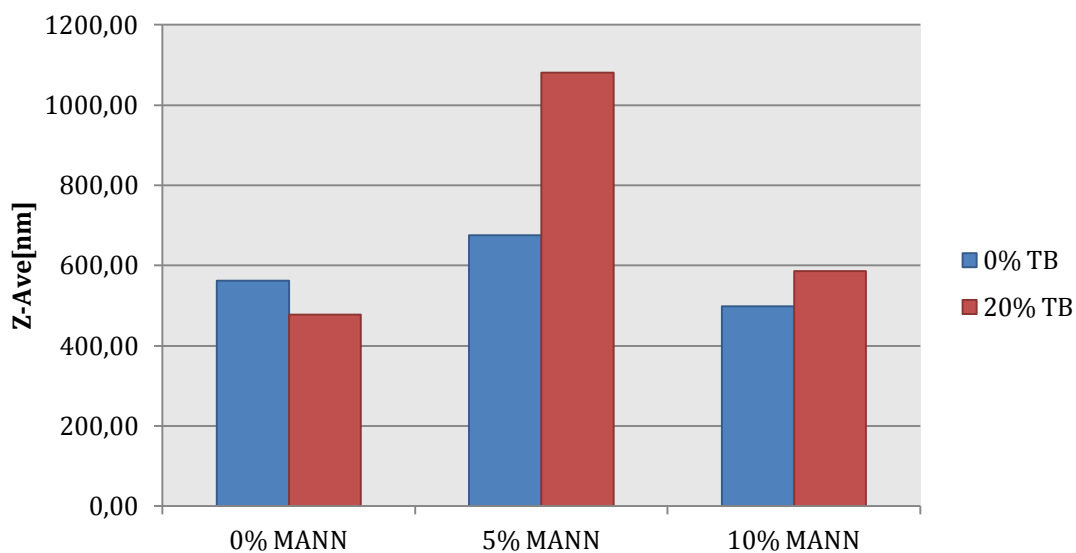
TB	MAN	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	0%	1221	0,374	2095	260	0	90,3	9,7	0
		1693	0,876	549,4	0	0	100	0	0
		1081	0,488	1994	256,9	76,87	90,3	9,3	0,5
20%	0%	5760	0,565	408,6	0	0	100	0	0
		6466	1	102,8	0	0	100	0	0
		9926	0,386	21,04	0	0	100	0	0
0%	5%	3806	0,565	4635	353,1	0	86,7	13,3	0
		1983	0,437	1423	5469	0	94,3	5,7	0
		2551	0,931	881	122,7	0	94,2	5,8	0
20%	5%	1578	0,197	1947	0	0	100	0	0
		1098	0,589	1310	205,5	5210	83	10,1	6,9
		1212	0,519	1094	175,5	5425	86,8	8,2	5
0%	10%	1853	0,726	1394	0	0	100	0	0
		3995	1	1919	0	0	100	0	0
		6510	0,293	627,8	0	0	100	0	0
20%	10%	3156	1	119,8	0	0	100	0	0
		1276	0,418	579,7	0	0	100	0	0
		1083	0,123	923	0	0	100	0	0



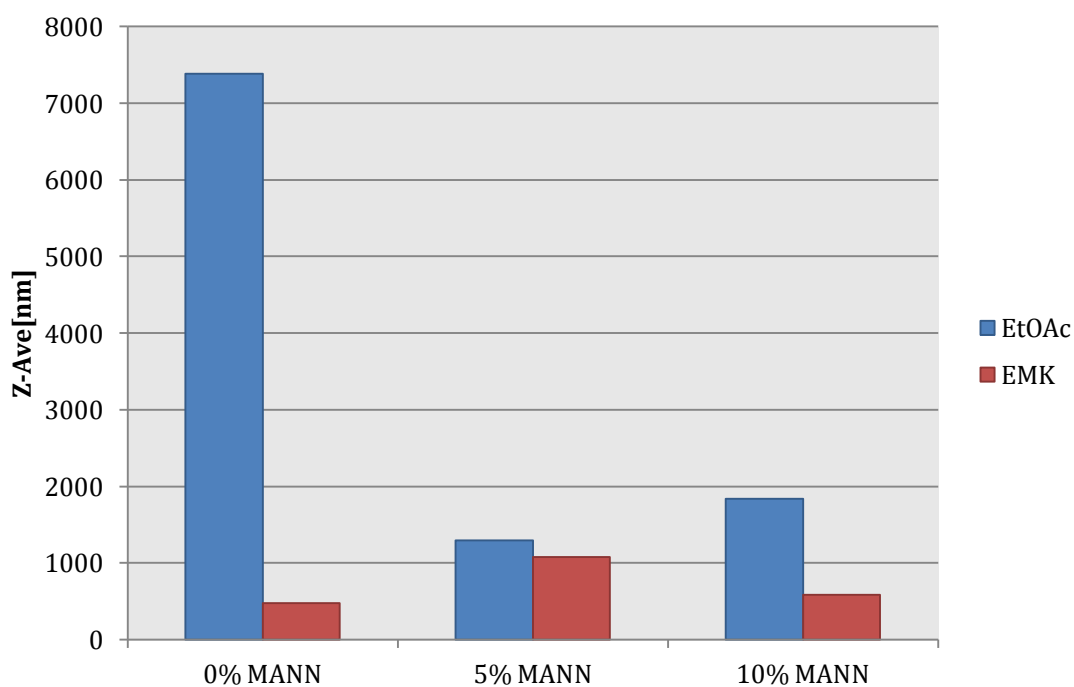
Obrázek 17 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci MANN ve vnější fázi a přítomnosti TB ve vnitřní fázi. Tab. 20.

Tabulka 21 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, MANN, vnitřní fáze 1%T3 a TB v EMK. 20% emulze.

TB	MAN	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	0%	535,3	0,153	577,5	0	0	100	0	0
		597,2	0,032	613,2	0	0	100	0	0
		554,8	0,132	593,9	0	0	100	0	0
20%	0%	527,5	0,269	518,1	0	0	100	0	0
		454	0,497	435,1	0	0	100	0	0
		451,3	1	404,2	0	0	100	0	0
0%	5%	632,5	0,461	1411	280,8	0	71,9	28,1	0
		825,9	0,326	1404	273,6	0	85,3	14,7	0
		566,1	0,419	378,2	1764	0	50,1	49,9	0
20%	5%	918,5	0,363	1606	247,8	0	84,5	15,5	0
		1167	0,51	2285	378,4	0	84,4	15,6	0
		1155	0,341	1806	0	0	100	0	0
0%	10%	482	0,271	936,5	315,3	0	60,4	39,6	0
		506	0,283	831,4	0	0	100	0	0
		509	0,311	599,2	3990	0	90,6	9,4	0
20%	10%	625,8	0,434	602,6	0	0	100	0	0
		570,5	0,174	579,8	0	0	100	0	0
		563,9	0,262	567,1	0	0	100	0	0



Obrázek 18 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci MANN ve vnější fázi a přítomnosti TB ve vnitřní fázi. Tab. 21.

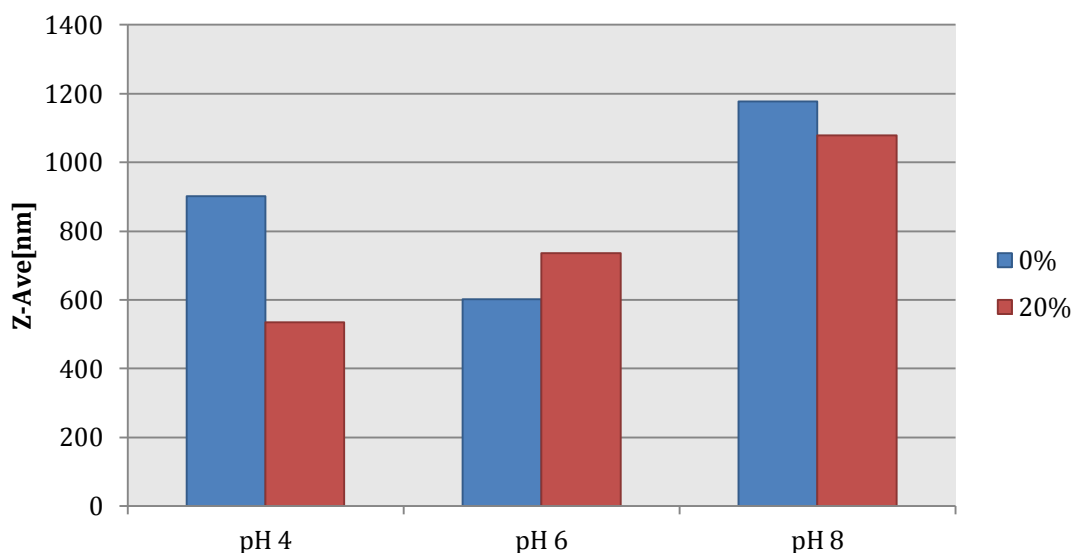


Obrázek 19 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci MANN ve vnější fázi a na použitém rozpouštědle ve vnitřní fázi. 20% TB ve vnitřní fázi. Tab. 20, 21.

5.4.4 Velikost nanočástic v závislosti na pH vnější fáze. Vnější fáze 0,2% CET s přídatkem 5% MANN, 5% GLY.

Tabulka 22 Velikost nanočástic v závislosti na pH vnější fáze. Vnější fáze 0,2% CET s 5%MANN a 5%GLY, Vnitřní fáze 1%T3 bez TB, 20%TB. Koncentrace emulze 10%.

TB	pH	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%		d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	pH 8	1176	0,41	1740	345,3	4872	77,6	14	8,5
		1172	0,477	2184	348	0	86,5	13,5	0
		1184	0,498	1171	4520	0	77,9	22,1	0
20%	pH 8	1205	0,747	920,2	342,9	5560	76,7	21,2	2
		967,5	0,69	1297	430,6	5381	47,9	44,6	7,5
		1064	0,775	530	3892	0	50,9	49,1	0
0%	pH 6	601,3	0,444	407,1	1434	4753	52,1	40,9	7
		597,3	0,428	1230	0	0	100	0	0
		607,5	0,484	627,4	3357	0	72,1	27,9	0
20%	pH 6	735,2	0,505	633,1	0	0	100	0	0
		653,8	0,354	503,7	2625	0	63,9	36,1	0
		816,3	0,432	1065	316,1	5217	72,5	22,3	5,2
0%	pH 4	853,8	0,237	1253	317,8	0	86,3	13,7	0
		891,8	0,427	977	4141	0	81,2	18,8	0
		961,3	0,651	2217	457	4857	51,4	36	12,6
20%	pH 4	546,4	0,381	601,6	3934	0	84,4	15,6	0
		520,7	0,359	689,1	4371	0	94,3	5,7	0
		534,7	0,434	366,6	2260	0	55,9	44,1	0



Obrázek 20 Velikost nanočástic v závislosti na pH vnější fáze. Tab. 22.

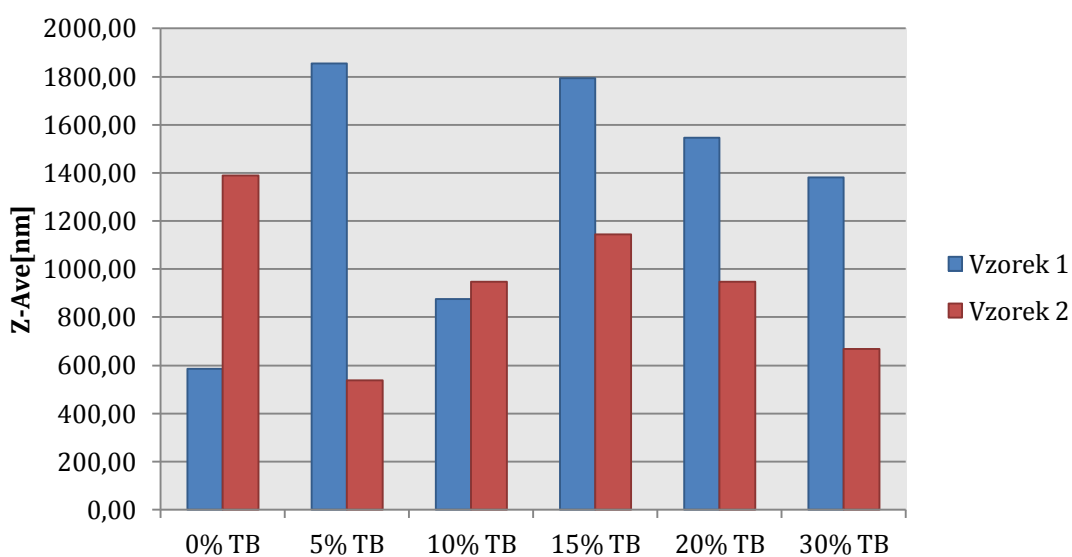
5.4.5 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci TB ve vnitřní fázi.

Tabulka 23 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, vnitřní fáze 1%T3 a různé koncentrace TB. Koncentrace emulze 5%. 1. Vzorky.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	619,9	0,532	1299	232	4739	55,9	33,5	10,6
	551,6	0,787	1184	204,1	5039	60	31,5	8,5
	584	0,688	989,2	227	5380	65,9	30,2	3,9
5%	1663	1	478,6	0	0	100	0	0
	2046	0,544	1128	5415	0	87,5	12,5	0
	1858	0,579	1138	0	0	100	0	0
10%	924,3	0,727	1641	220,2	0	59,2	40,8	0
	790,7	0,746	1141	206,3	0	59,7	40,3	0
	914,1	0,737	858,6	207,2	0	57,5	42,5	0
15%	2129	1	220,2	0	0	100	0	0
	2186	1	220,7	0	0	100	0	0
	1062	0,682	527,3	123,1	0	88,2	11,8	0
20%	1903	0,961	378	0	0	100	0	0
	1403	0,852	457,4	0	0	100	0	0
	1333	0,719	441,6	0	0	100	0	0
30%	1594	0,663	767,8	0	0	100	0	0
	1183	0,19	737,7	0	0	100	0	0
	1367	0,201	1054	0	0	100	0	0

Tabulka 24 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, vnitřní fáze 1%T3 a různé koncentrace TB. Koncentrace emulze 5%. Opakování pokusu v Tab. 23.

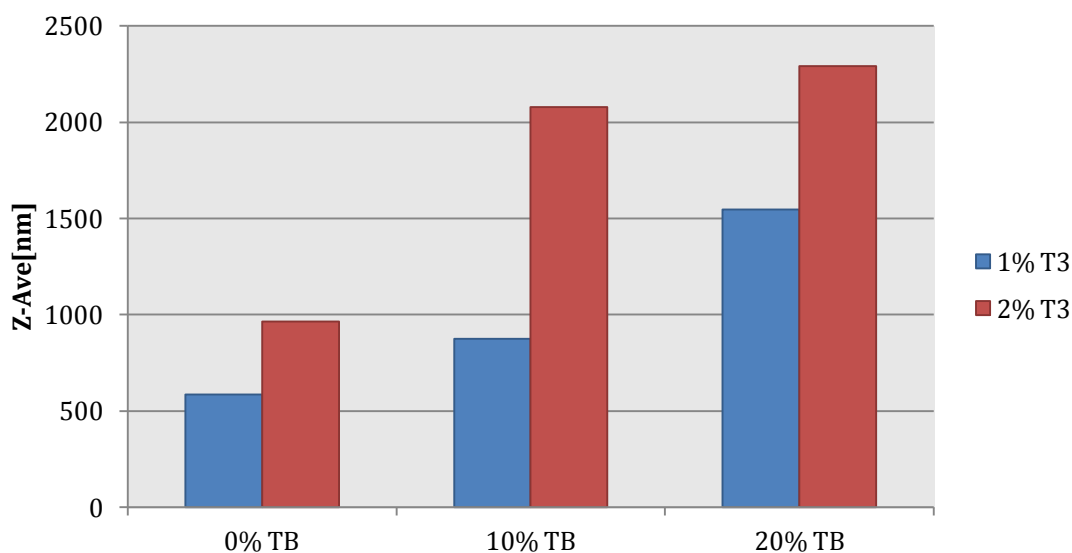
TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	2252	1	114,6	0	0	100	0	0
	1111	0,76	318,9	0	0	100	0	0
	807,2	0,626	516,4	117,5	0	84,6	15,4	0
5%	640,7	0,562	563,2	159,2	0	62,8	37,2	0
	482,2	0,606	588	187,9	5560	62,6	35,6	1,8
	491,8	0,512	209,4	627,7	0	50,4	49,6	0
10%	1082	0,722	564,2	148,3	0	76,7	23,3	0
	921,4	0,722	590,7	167,3	0	73,5	26,5	0
	840,1	0,799	1157	160	0	79,1	20,9	0
15%	1136	0,732	515,5	117,9	0	86,9	13,1	0
	1354	0,919	279	0	0	100	0	0
	939,5	0,688	929	201,9	0	69,4	30,6	0
20%	1350	0,806	348	0	0	100	0	0
	904,5	0,566	1191	191,2	0	71,9	28,1	0
	591,1	0,539	2211	327,7	0	58,3	41,7	0
30%	747,7	0,605	378,2	81,3	0	94,5	5,5	0
	696,8	0,629	528,2	166,8	0	80,6	19,4	0
	557,5	0,467	929,8	230,4	5372	62,3	34,3	3,5



Obrázek 21 Velikost nanočástic. Tab. 23, 24.

Tabulka 25 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, vnitřní fáze 2%T3 a 3 různé koncentrace TB. Koncentrace emulze 5%.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	998,8	0,766	1702	237,5	0	74,3	25,7	0
	964,5	0,631	3231	448,1	90,01	60,8	37,5	1,7
	933,7	0,604	974,7	4302	190,4	52,3	32,8	14,9
10%	1875	0,909	633,4	0	0	100	0	0
	2948	1	244,3	0	0	100	0	0
	1418	0,694	835,3	127,7	0	92,3	7,7	0
20%	2647	1	295,3	0	0	100	0	0
	2739	1	427,1	0	0	100	0	0
	1485	0,695	1082	172,4	0	88,3	11,7	0



Obrázek 22 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci T3 ve vnitřní fázi. Tab. 23 a 25.

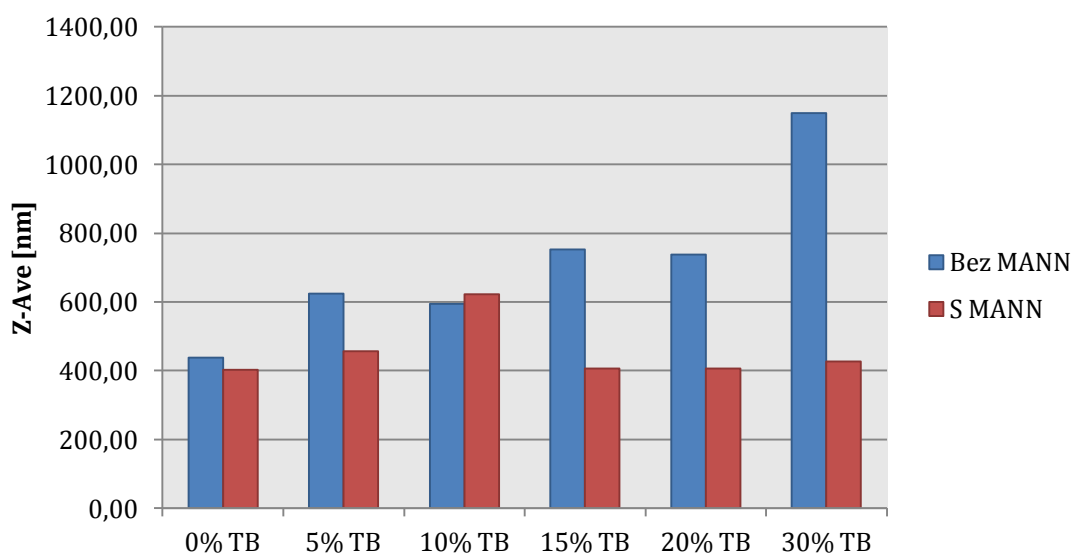
5.4.6 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci TB ve vnitřní fázi a přítomnosti MANN ve vnější fázi.

Tabulka 26 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET, Vnitřní fáze 1% T3 s přidavkem různých koncentrací TB. 20% emulze.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	399,8	0,292	401,1	0	0	100	0	0
	465,3	0,062	475,4	0	0	100	0	0
	447	0,275	439,9	0	0	100	0	0
5%	630,3	0,299	566,6	4405	0	86,4	13,6	0
	540,8	0,227	493,9	0	0	100	0	0
	700,7	0,054	752,9	0	0	100	0	0
10%	566,2	0,417	569,6	5244	116,2	90,4	5,7	4
	584,2	0,48	1845	331,1	0	60,3	39,7	0
	634,7	0,539	2284	338	0	59	41	0
15%	840,5	0,36	894,6	136,1	0	93,4	6,6	0
	861,2	0,419	1390	223,9	0	85,5	14,5	0
	557,2	0,455	342,6	1187	5429	52,1	46,3	1,6
20%	736,5	0,517	1310	324,1	4574	57,3	31,5	11,2
	728,5	0,582	991,1	236,4	5560	74,6	23,9	1,5
	748,8	0,4	768,4	151,8	5208	85,7	7,6	6,6
30%	1209	0,239	1608	0	0	100	0	0
	1323	0,678	3597	943,3	375,2	56,5	25,3	18,3
	916	0,548	1336	224,2	5406	85,7	12,4	1,9

Tabulka 27 Velikost nanočástic. Vnější fáze 0,2% CET a 10% MANN. Vnitřní fáze 1%T3 s přidavkem různých koncentrací TB. 20% emulze.

TB	Z-Ave	Pdl	Pk 1 Mean Int	Pk 2 Mean Int	Pk 3 Mean Int	Pk 1 Area Int	Pk 2 Area Int	Pk 3 Area Int
%	d.nm		d.nm	d.nm	d.nm	%	%	%
0%	406,4	0,167	481,2	4376	0	98,7	1,3	0
	410,7	0,187	520,4	0	0	100	0	0
	390,7	0,173	450,8	0	0	100	0	0
5%	484,7	0,268	482,9	4910	0	93,8	6,2	0
	448,4	0,194	513,6	0	0	100	0	0
	437,7	0,224	434,7	4742	0	94,1	5,9	0
10%	846,3	0,098	990	0	0	100	0	0
	564	0,321	482,8	2408	0	66,9	33,1	0
	454	0,204	466,9	4963	0	96,4	3,6	0
15%	426,1	0,023	443,4	0	0	100	0	0
	402,2	0,091	431,1	0	0	100	0	0
	390,3	0,131	454,4	0	0	100	0	0
20%	419	0,171	517,5	0	0	100	0	0
	402,3	0,131	469,1	0	0	100	0	0
	398,1	0,148	437,9	0	0	100	0	0
30%	432,1	0,169	510,1	0	0	100	0	0
	427,2	0,187	531,4	4068	0	98,4	1,6	0
	423,1	0,177	483,5	0	0	100	0	0



Obrázek 23 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci TB ve vnitřní fázi a přítomnosti MANN ve vnější fázi. Tab. 26, 27.

6 Diskuse

6.1 K řešenému problému

Příprava nanočásticových systémů s dlouhodobou liberací léčiva je tématem mnoha, především farmaceuticko-technologických prací. Formulace systémů s cílenou distribucí, včetně vložení vektoru do buňky a uvolňujícího v ní dlouhodobě biologicky aktivní látku je atraktivní pro mnoho biologicky zaměřených disciplín, protože má značný potenciál uplatnění v terapii mnoha nemocí.

Téma předložené rigorózní práce navazuje na řadu kvalifikačních prací realizovaných na pracovišti školitele, včetně diplomové práce autorky [45]. V kvalifikačních pracích dříve obhájených na pracovišti školitele byla prokázána výhodnost cetrimidu jako emulgátoru při emulzní metodě přípravy nanočástic z alifatických polyesterů. Při použití cetrimidu byly získány relativně malé nanočástice s úzkou distribucí velikosti a kladným povrchovým nábojem. Byla hodnocena velikost nanočástic jako velmi důležitý parametr ovlivňující řadu jejich dalších vlastností.

Při využití emulzní metody přípravy nanočástic je nutno vodnou nanodisperzi sušit. V případě termolabilních inkorporovaných látek se zpravidla využívá velmi náročná metoda lyofilizace. Pokud je aktivní látka dostatečně stabilní, jeví se jako výhodná metoda sprejového sušení. Úspěšnost mikroenkapsulace sprejovým sušením závisí především na volbě správného nosiče a na optimálním způsobu technologického zpracování. V této práci byl jako vhodný nosič nanočástic vyzkoušen mannitol s možností jeho použití buď při formulaci před fází dispergace nebo jeho rozpuštění v nanosuspenzi po dispergaci. Kromě způsobu využití mannitolu byla pozornost zaměřena na dlouhodobé sušení nanodisperze při obyčejném tlaku. Byl použit nejen mannitol, ale také disacharidy trehalosa a maltosa, používané běžně jako kryoprotektanty.

Jako nosič byl zvolen vysoce větvený terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu. Jako modelové léčivo byl použit terbinafin, který má potenciál pro formulaci systémů s prolongovaným extracelulárním i intracelulárním

uvolňováním. Hydrofilizaci nanočástic a úpravu povrchového náboje bylo snahou provést inkorporaci cetrimidu do vnitřní fáze emulze.

6.2 K vlivu výrazné hydrofilizace vnitřní fáze a k vlivu mannitolu ve vnější fázi emulze na velikost a stabilitu nanočástic

Přísada hydrobromidu cetrimidu do nanočástic spolu s bazí terbinafinu měla mít význam jednak z hlediska hydrofilizace materiálu, jednak možnosti zmenšit nanočástice. Jak je patrné z tabulky 4, v případě vysoké koncentrace cetrimidu, tedy 5% koncentrace, byly získány malé nanočástice pouze v případě bez přítomnosti terbinafinu. Se zvyšováním jeho koncentrace se nanočástice výrazně zvětšovaly, jak je patrné z obr.5. Po uchovávání nanočástic v 0,05% cetrimidu v lednici (tab. 5) se projevila opačná tendence ke zmenšování nanočástic. Patrně dochází k solubilizaci nosiče. Trend k rozpouštění nosiče je zmírněn přidáním 10% mannitolu a jeho osmotickým působením na míru bobtnání.

Obdobné experimentální schéma je v tab. 6 a 7 a na obr. 6. Odlišná je vyšší, 0,2% koncentrace soli cetrimidu. Vliv cetrimidu nebyl prokázán jako jednoznačný. Jednoznačná je tendence nanočástic k jejich agregaci při uchovávání v roztoku cetrimidu a mannitolu. Menší nanočástice při 15% terbinafinu by bylo nutno potvrdit reprodukováním pokusu s důrazem na mísitelnost terbinafinu s nosičem a tenzidem, na solubilizaci terbinafinu a nosiče cetrimidem a na viskozitu soustavy.

Třetí schéma se od předchozích liší pouze nejvyšší, 0,8% koncentrací hydrobromidu cetrimidu. Je patrný pozitivní účinek mannitolu na stabilizaci disperzního stavu. Tento účinek byl nejvýraznější v případě nanočástic s 30% terbinafinu, které bez mannitolu ve vnější fázi měly střední rozměr téměř 700 nm, s mannitolem 300 nm (tab. 8, 9, obr. 7).

Na obr. 8 je shrnutí vlivu koncentrace cetrimidu jako emulgátoru a následně stabilizátoru suspenze na velikost nanočástic. Zatímco v případě částic bez terbinafinu se vliv emulgátoru neprojevil jednoznačně, v případě nanočástic s 15% terbinafinem se zvyšující koncentrace tenzidu projevilo očekávaně zmenšování středního průměru. U nanočástic s 30% terbinafinem byl vliv emulgátoru velmi silný. Při 0,05% cetrimidu dochází patrně k asociaci částic (tab. 4, 5, 8, obr. 8). Uvedený výsledek je možno

pokládat za významný v případě jeho využití v praxi nejen z hlediska vhodné koncentrace emulgátoru ve vnější fázi, ale také z hlediska vhodné koncentrace terbinafinu v nanočásticích, která je kolem 15 %.

6.3 K vlivu slabé hydrofilizace vnitřní fáze a k vlivu mannitolu ve vnější fázi emulze na velikost a stabilitu nanočástic

V tabulkách 11 a 12 a na obrázku 9 je vliv koncentrace terbinafinu na velikost nanočástic při 0,05% koncentraci cetrimidu. Je evidentní, že se vzrůstající koncentrací léčiva se částice zvětšují. Není vyloučeno agregační působení terbinafinu jako kationické látky na anionický nosič. Po 17 hodinách uchovávání při snížené teplotě nebyl vliv koncentrace terbinafinu tak markantní, totéž platí i pro disperzi částic v roztoku tenzidu a mannitolu. Pozoruhodné je, že největší nanočástice byly připraveny v přítomnosti střední koncentrace léčiva.

Po zvýšení koncentrace cetrimidu na 0,2 % byl vliv zvyšující se koncentrace terbinafinu na zvětšování částic méně výrazný. Přítomnost terbinafinu měla vliv na zvětšování nanočástic patrně jejich agregací, jak je možno posoudit z tab. 12 a 13 a z obr. 10. V disperzi s 0,8% cetrimidem se také projevil terbinafin síťujícím nebo agregačním efektem (tab. 14, 15, obr. 11). Jako pozitivní je možno hodnotit stabilizační efekt mannitolu ve vnější fázi. Po dobu 17 hodin při 7 °C byla střední velikost částic kolem 400 nm.

Na obr. 12 je vliv koncentrace cetrimidu ve vnější fázi na velikost nanočástic. Je možno pozorovat nestabilitu částic připravených při nízké koncentraci cetrimidu. Koncentrace tohoto tenzidu 0,20 % je dostačující pro získání nanočástic se středním rozměrem kolem 500 nm.

Vliv stoupající koncentrace cetrimidu jako emulgátoru při různé koncentraci stejné látky v nanočásticích a v mikročásticích při různém obsahu terbinafinu je komparativně shrnut na obr. 13. Jednoznačně byla prokázána nevhodnost nejnižší koncentrace cetrimidu při nejvyšším obsahu terbinafinu bez ohledu na obsah cetrimidu. Až na jednu výjimku, způsobenou pravděpodobně náhodnými vlivy, bylo prokázáno, že nejmenší nanočástice byly připraveny bez terbinafinu. Z toho je možno dojít k poznatku o silnějším účinku síťovacího efektu na viskozitu dispergované kompozice než by byl

primární účinek nízkomolekulárního terbinafinu na snížení viskozity. Hypotézu o zvýšení viskozity terbinafinem by bylo nutné potvrdit měřením.

6.4 K vlivu terbinafinu v nanočásticích a polyhydrických alkoholů ve vnější fázi na velikost částic připravených sušením a následným rozpuštěním

Nanočástice byly připraveny na třech úrovních koncentrace terbinafinu a na dvou úrovních koncentrace emulgátoru. V tabulce 16 jsou výsledky měření velikosti nanočástic s různou koncentrací terbinafinu. Při nulové a 30% koncentraci tohoto léčiva byly získány submikronové částice, při 15% koncentraci byla polovina částic v nadmikronové velikostní třídě. Je patrný silný náhodný vliv na sledovaný parametr. Uvedené tři vzorky byly podrobeny dalšímu zpracování v podobě přísady cukru nebo cukerného alkoholu, sušení a následnému rozpuštění v čištěné vodě. Z výsledků v tabulce 17 jasně vyplývá, že proces zpracování nanodisperzí vede ke zvětšení částic. Výjimkou jsou částice s terbinafinem zpracované z roztoků maltosy. Na obrázku 14 je tento fakt zcela zřetelný. Při 15% koncentraci terbinafinu se také pozitivně projevila trehalosa. Zmenšení částic je patrně ovlivněno osmotickým působením vnější fáze, méně pravděpodobná je eroze nanočástic. Největší částice byly získány v soustavě s mannitolem.

Stejné schéma, jaké je popsáno v odstavci výše, bylo reprodukováno s jediným rozdílem a tím byla čtvrtinová, tedy 0,05% koncentrace cetrimidu jako emulgátoru. Výsledky měření velikosti částic jsou v tabulkách 18 a 19 a na obrázku 15. Opětovně byly jako největší prokázány nanočástice s 15% obsahem terbinafinu. Překvapivě se jako největší, a tedy nejhorší, se prezentovaly vzorky s trehalosou, nejmenší částice byly v soustavách s mannitolem, případně s maltosou u částic obsahujících terbinafin. Vliv koncentrace terbinafinu při různých koncentracích cetrimidu na velikost částic je na obrázku 16. Je patrný slabý vliv koncentrace emulgátoru na velikost částic. Již dříve bylo prokázáno, že je možno připravit menší nanočástice při nižší koncentraci cetrimidu. To souvisí patrně s interakcí roztoku nosiče s kvartérním dusíkem s důsledkem ve zvýšené viskozitě. Hypotézu by bylo nutné potvrdit experimentálně.

6.5 K vlivu rozpouštědla ve vnitřní fázi v přítomnosti mannitolu ve vnější fázi

Experiment byl realizován za standardních podmínek při 0,2% koncentraci emulgátoru a 1% koncentraci polyesteru v 20% emulzi. Byl srovnáván vliv ethylacetátu a ethylmethylketonu na velikost částic. Výsledky měření vzorků lišících se koncentrací mannitolu ve vnější fázi emulze při přípravě nanočástic emulgací jsou v tabulkách 20 a 21 a na obrázcích 17 a 18.

V případě ethylacetátu jako rozpouštědla je možno konstatovat, že byly připraveny poměrně velké částice. Se stoupající koncentrací mannitolu se v případě částic bez terbinafinu jejich rozměr zvětšoval. Projevila se patrně změna viskozity vlivem stoupající koncentrace mannitolu. V případě částic s terbinafinem byla situace komplikovanější. Částice nad měřitelným limitem pokládáme za výsledek vlivu změny technologie přípravy. Částice s terbinafinem byly v přítomnosti mannitolu menší než srovnatelné částice bez terbinafinu. Přesto není možno ethylacetát hodnotit jako vhodné rozpouštědlo.

Částice připravené z ethylmethylketonu jako rozpouštědla vnitřní fáze byly značně menší. Na obrázku 18 je střední hodnota intenzitního průměru částic připravených při různé koncentraci terbinafinu ve vnitřní fázi a mannitolu ve vnější fázi. Nejmenší částice byly připraveny, pokud nebyl do vnější fáze přidán žádný mannitol, nebo byl přidán v nejvyšší koncentraci. Při 5% koncentraci mannitolu byl vliv 20% terbinafinu na velikost částic výrazný. Střední intenzitní průměr vzrostl vlivem přidaného terbinafinu z 600 nm, na 1000 nm.

6.6 K vlivu terbinafinu ve vnitřní fázi a směsi mannitolu a glycinu ve vnější fázi na velikost částic

O směsi mannitolu a glycinu je známo, že v podílu větším než 25 % jedné ze složek netvoří krystalickou fázi, dále jako pozitivní skutečnost je možno hodnotit, že tato směs má relativně vysokou hodnotu teploty skelného přechodu, což ji předurčuje k použití jako stabilizátoru při lyofilizaci.

Výsledky měření velikosti částic připravených v přítomnosti výše uvedené směsi upravené na různé hodnoty pH jsou v tabulce 22 a na obrázku 20. Výsledky vedou k závěru o rostoucí interakci mezi glycinem a emulgátorem se vzrůstem hodnot pH. Kolem pH 6 je deklarován isoelektrický bod glycinu, pod ním dochází k ionizaci aminoskupin se zvýšenou kompatibilitou s emulgátorem i s povrchem nanočástic. Důkazem jsou větší částice neobsahující terbinafin, které mají jiné parametry povrchu než ty s terbinafinem. Pro bližší vysvětlení je nutné získat další experimentální data.

6.7 K vlivu terbinafinu ve vnitřní fázi na velikost částic při nízké koncentraci emulze

Byla připravena řada 5% emulzí s 0,2% cetrimidem jako emulgátorem a terbinafinem v 6 koncentracích včetně nulové, experiment byl dvakrát opakován. Výsledky měření velikosti nanočástic jsou v tabulkách 23 a 24 a na obrázku 21. I když výsledky opakovaných experimentálních schémat byly do značné míry odlišné zvláště v případě vzorků bez terbinafinu a s terbinafinem v nejnižší koncentraci, je možno v řadě od 15% koncentrace terbinafinu vysledovat shodný pokles hodnot středních intenzitních průměrů nanočástic. Pracovní hypotézou může být snižování viskozity roztoků ve vnitřní fázi emulze při dispergaci. Pro značné kolísání středních hodnot průměru v případě koncentrace 0 % a 5 % nemáme v této fázi vysvětlení.

Po zvýšení koncentrace polyesteru z 1% na 2% byl prokázán jednoznačný růst velikosti částic, jak je uvedeno v tabulce 25 a na obrázku 22. Kromě markantního vlivu zvýšené viskozity se jednoznačně v případě obou koncentrací nosiče projevilo zvyšování koncentrace terbinafinu v nosiči zvětšováním částic. V této fázi je možno předpokládat, že se jedná o síťovací efekt terbinafinu na nosič s důsledkem ve vyšší viskozitě vnitřní fáze emulze.

6.8 K vlivu terbinafinu ve vnitřní fázi a mannitolu ve vnější fázi na velikost částic

Experiment byl realizován v 20% emulzi se stoupající koncentrací terbinafinu. Byly připraveny dvě řady vzorků, jedna s vnější fázi obsahující 0,2% cetrimid ve vodě a druhá, která obsahovala navíc 10 % mannitolu. Výsledky měření velikosti částic jsou

v tabulkách 26 a 27 a na obrázku 23. V řadě bez mannitolu charakteristika stoupá se stoupající koncentrací terbinafinu pravděpodobně již dříve popsanou interakcí aminoskupiny terbinafinu s karboxylovými skupinami polyesteru. V řadě nanočástic připravených dispergací v roztoku mannitolu byla pozorována pozoruhodně blízká velikost mírně přesahující 400 nm.

7 Závěry

- A) Do polyesterových nanočástic s terbinafinem je možno inkorporovat hydrobromid cetrimidu v 5% koncentraci s cílem jejich hydrofilizace a modifikace uvolňování léčivé látky
- B) Při uchovávání nanodisperzí částic s terbinafinem a solí cetrimidu při snížené teplotě dochází ke zmenšování částic, patrně solubilizací nosiče a/nebo léčiva. Jev je možno dostatečně zmírnit přísadou 10% mannitolu do vnější fáze.
- C) Se zvyšováním koncentrace terbinafinu v nanočásticích do 30 % dochází k jejich zvětšování patrně vlivem zvýšené viskozity roztoku ve vnitřní fázi na základě interakce mezi léčivou látkou a nosičem.
- D) Při sušení nanodisperzí po jejich přípravě se v případě nanočástic s 30% terbinafinem osvědčila jako přísada do vnější fáze 10% maltosa, nevhodná byla trehalosa, vhodnost mannitolu závisela na koncentraci emulgátoru a terbinafinu.
- E) Jako rozpouštědlo nosiče a léčiva byl z granulometrického hlediska vhodnější ethylmethylketon než běžně používaný ethylacetát.
- F) Použití směsi 5% mannitolu a 5% glycinu jako stabilizátoru nanodisperzí je možné po úpravě hodnoty pH do kyselé oblasti.
- G) Snížením koncentrace emulze z 20% na 5% při přípravě nanočástic mechanickou dispergací nebylo dosaženo výrazného zvýšení stupně disperzity výsledných nanočástic. Významná změna je v poklesu hodnot velikostního parametru vlivem stoupající koncentrace terbinafinu pravděpodobně vlivem snižování viskozity dispergované fáze.
- H) Vliv změny koncentrace terbinafinu na velikost nanočástic byl prakticky eliminován přísadou 10% mannitolu do vnější fáze ještě před zahájením procesu dispergace.

8 Literatura

1. WISCHKE, C., SCHWENDEMAN, S.P., Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 364 (2), 2008, 298-327.
2. TOMARO-DUCHESNEAU, C., SHYAMALI, S., MALHOTRA, M. et. al., Microencapsulation for Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions, *Journal of Pharmaceutic*, 2013, (article ID 103527), 1-2.
3. TOMARO-DUCHESNEAU, C., SHYAMALI, S., MALHOTRA, M. et. al., Microencapsulation for Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions, *Journal of Pharmaceutic*, 2013, (article ID 103527) <http://www.hindawi.com/journals/jphar/2013/103527/fig1/>, k 27.10.2013
4. BRANNON-PEPPAS, L., Controlled release in the food and cosmetic industries, *Polymeric Delivery Systems*, chapter 3, 1993, 42-43.
5. JOKI, T., MACHLUF, M., ATALA, A. et al., Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy, *Nature Biotechnology* 19 (1), 2001, 35-39.
6. LI, M., ROUAUD, O., PONCELET, D., Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for proces engineering approaches, *International Journal of Pharmaceutics* 363 (1-2), 2008, 26-39.
7. WITTBECKER, E. L., MORGAN, P.W., Interfacial polycondensation, *Journal of Polymer Science* 40 (137), 1959, 289-297.
8. ARSHADY, R., Preparation of microspheres and microcapsules by interfacial polycondensation techniques, *Journal of Microencapsulation* 6 (1), 1989, 13-28.
9. LEVY, M. C., LEFEBVRE, S., RAHMOUNI, M. et al. Fourier transform infrared spectroscopic studies of human serum albumin microcapsules prepared by interfacial cross-linking with terephthaloylchloride: influence of polycondensation pH on spectra and relation with microcapsule morphology and size, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80 (6), 1991, 578-585.
10. BROWN, E. N. , KESSLER, M.R., SOTTOS, N. R. et al., In situ poly(urea-formaldehyde) microencapsulation of dicyclopentadiene, *Journal of Microencapsulation*, 20 (6), 2003, 719-730.

11. MOK, H., PARK, T.G., Water-free microencapsulation of proteins within PLGA microparticles by spray drying using PEG-assisted protein solubilization technique in organic solvent, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70 (1), 2008, 137-144.
12. TEUNOU, E., PONCET, D., Batch and continuous fluid bed coating-review and state of the art, *Journal of Food Engineering*, 53(4), 2002, 325-340.
13. SINGH, M. N., HEMANT, K. S. Y., RAM, M. et al., Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery, *Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 5 (2), 2010, 65-77.
14. ARSHADY, R., Microencapsules for food, *Journal of Microencapsulation*, 10 (4), 1993, 413-435.
15. HAAS, P.A., Formation of uniform liquid drops by application of vibration to lamellar jets, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 31(3), 1992, 959-967.
16. PATIL, J. S., KMALAPUR, M., V., MARAPUR, S. C. et al., Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1), 2010, 241-248.
17. PRAKASH, S., TOMARO-DUCHESNEAU, C., SAHA, S. et al., The gut microbiota and human health with emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011,(article ID 981214)2011.
18. CHEN, H., OUYANG, W., JONES, M. et al., Preparation and characterization of novel polymeric microcapsules for live cell encapsulation and therapy, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47 (1), 2007, 159-168.
19. OGUSHI, Y., SAKAI, S., KAWAKAMI, K., Synthesis of enzymatically-gellable carboxymethylcellulose for biomedical applications, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (1), 2007, 30-33.
20. MADAN, P. I., Microencapsulation I. Phase separation or coacervation, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 4 (1), 1978, 95-116.
21. MOHANTY, B., BOHIDAR, H. B., Systematic of alcohol-induced simple coacervation in aqueous gelatin solutions, *Biomacromolecules*, 4(4), 2003, 1080-1086.

22. YEO, S. D., KIRAN, E., Formation of polymer particles with supercritical fluids: a review, *Journal of Supercritical Fluids*, 34 (3), 2005, 287-308.
23. LACROIX, C., GRATTEPANACHE, F., DOLEYRES, Y. et al., Immobilised cell technologies for the dairy industry, *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, chapter 18, 2005, 295-319.
24. Ronald T. Dodge Company, firemní literatura,
<http://microencapsulation.net/fluidBed.html> k 1.11.2013
25. DREU, R., LUSTRIK, M., PERPAR et al., Fluid-bed coater modifications and study of their influence on the coating proces of pellets, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 38 (4), 2012, 501-511.
26. ANDERSON, J. M., SHIVA, M.S., Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(1), 1997, 5-24.
27. REITHMEIER, H. HERRMANN, J., GÖPFERICH, A., Lipid nanoparticles as a parenteral controlled release device for peptides, *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 2001, 339-350.
28. TEUNOU, E., PONCELET, D., Rotary disc atomisation for microencapsulation application - prediction of the particle trajectories, *Journal of Food and Engineering*, 71, (4), 2005
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404005370>
k 1.11.2013
29. RAMSTACK, J.M., HERBERT, P. F., STROBEL, J. et al., Preparation of biodegradable microparticles containing a biologically active agent, vol. 08725439, US PATENT 565017 3A, 1997.
30. MESENS J. RICKEY, M. E., ATKIS, T. J. Microencapsulated 3-piperidyl-substituted 1,2-benzisothiazoles, no. US PATENT 7118763 B2, 2006
31. BABTSOV, V., SHAPIRO, Y., KVITNITSKY, E., Method of microencapsulation, vol. 10, 130, 529, US PATENT 6932984, 2005.
32. JELVEHGARI, M., BARAR, J., VALIDAYEDEH, H. et al., Preparation of diclofenac sodium composite microparticles with improved initial release property, *Scientia Iranica*, 17 (2), 2010, 78-89.

33. HASAN, A.S., SOCHA, M., LAMPRECHT, A. et al, Effect of microencapsulation of nanoparticles on reduction of burst release, *International Journal of Pharmaceutics*, 344 (1-2), 2007, 53-61.
34. LI, X., ANTON, N., TA, T. M. et al. Microencapsulation of nanoemulsion: novel Trojan particles for bioactive lipid molecule delivery, *International Journal of Nanomedicine*, 6 (1), 2011, 1313-1325.
35. QUINTANAR-GUERRERO, D., ALLEMANN, E., FESSI, H. et al., Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24 (1113), 1998.
36. ASTETE, C., E., SABLIOV, C., M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17 (3), 2006, 247-289.
37. BARRAT, G., COURRAZE, G., COUVREUR, P., *Polymeric Micro- and Nanoparticles as drug carriers, In Polymeric Biomaterials*, 2nd edition, Marcel Dekker, NY, 2000, 753.
38. GOVENDER, T., STOLNIK, S., GARNETT, M, et al., PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of water soluble drug, *Journal of Controlled Release*, 57 (171), 1999.
39. JAEGHERE, F., D., DOELKER, E., GURNY, R., *Encyclopedia of Control Drug Delivery*, Wiley, NY, 1999, 641.
40. BALA, I., HARIBARAN, KUMAR, R. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21 (387), 2004
41. PARK, S., KIM, S., Preparation and characterization of biodegradable poly(L-lactide)/poly(ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique, *Journal of Colloid and Interface Science*, 271 (336), 2004.
42. LOPEZ-QUINTELA, M., Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8 (137), 2003.

43. BOUCHEMAL, K., BRIANCON, S., E. PERRIER et al., Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation, *International Journal of Pharmaceutics*, 280 (241), 2004.
44. PARIKH, A., PARIKH, H., PARIKH, K., Schotten- Baumann Reaction, Name reactions in organics syntesis, 2006, 379-383.
<http://universitypublishingonline.org/foundation/chapter.jsf?bid=CBO9788175968295&cid=CBO9788175968295A113> k 9.11.2013
45. KÖNIGOVÁ, E., Vliv rozpouštědla na velikost polyesterových nanočástic, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 2013, 65 s.