

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

**VLIV ROZPOUŠTĚDLA NA VELIKOST
POLYESTEROVÝCH NANOČÁSTIC**

Diplomová práce

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

V Hradci Králové 2013

Eliška Königová

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.

V Hradci Králové 13.9. 2013

Eliška Königová

Poděkování

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

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Studentka: Eliška Königová

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

Název práce: Vliv rozpouštědla na velikost polyesterových nanočástic

V teoretické části jsou popsány metody výroby nanočástic a jejich charakterizace. Dále se teoretická část věnuje biodegradabilnímu polymeru kyseliny glykolové a kyseliny mléčné a zvláště pak nanočásticím z tohoto polymeru. Hlavní pozornost byla zaměřena na experiment, ve kterém byly řešeny některé relevantní technologické parametry přípravy biodegradabilních částic z terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu emulzní metodou typu o/v. Snahou bylo připravit co nejmenší nanočástice dostatečně standardním a robustním postupem. Byla hledána optimální koncentrace cetrimidu jako emulgátoru. Byl hodnocen vliv koncentrace emulze, koncentrace polyesterového nosiče a terbinafinu jako modelového léčiva na granulometrické parametry částic. Pro případné praktické využití metody byl granulometricky vyhodnocen faktor uchovávání vzorků disperzí při snížené teplotě a po přidání mannitolu.

Abstract

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Studentka: Eliška Königová

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

Název práce: Influence of solvent on the size of polyester nanoparticles

In the theoretical part of this thesis the methods of fabrication of nanoparticles and their evaluation are described. It further explores the biodegradable polymer of glycolic acid and lactic acid and in particular the nanoparticles prepared from this polymer. The main objective were the results of an experiment which explored some of the technological parameters of formulation of biodegradable particles made from terpolymer of DL-lactic acid, glycolic acid and tripentaerythritole by o/w emulsion method. The aim was to create the smallest possible nanoparticles using the standard procedure. The study sought the optimal concentration of emulsifier cetrimide. It evaluated the influence of the concentration of emulsion and the concentration of the polyester carrier and terbinafine as a model drug for the assessment of granulometric parameters of prepared particles. For an intended use of the method the storage of samples at low temperature after the addition of mannitol was granulometrically evaluated.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Seznam tabulek | 9 |
| 2 | Seznam obrázků..... | 11 |
| 3 | Seznam zkratek | 13 |
| 4 | Zadání práce | 14 |
| 5 | Úvod..... | 15 |
| 6 | Teoretická část..... | 16 |
| 6.1 | Výroba nanočástic | 16 |
| 6.1.1 | Dispergační metody..... | 16 |
| 6.1.2 | Metody založené na precipitaci látky..... | 18 |
| 6.2 | Charakterizace nanočástic..... | 19 |
| 6.3 | Biodegradabilní polymery..... | 20 |
| 6.3.1 | PLGA..... | 20 |
| 7 | Experimentální část | 28 |
| 7.1 | Použité přístroje | 28 |
| 7.2 | Použité chemikálie | 28 |
| 7.3 | Postup přípravy | 29 |
| 7.3.1 | Příprava baze terbinafinu | 29 |
| 7.3.2 | Příprava vnější fáze emulze..... | 29 |
| 7.3.3 | Příprava vnitřní fáze..... | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.3.4 | Příprava nanočástic | 30 |
| 7.3.5 | Měření velikosti nanočástic..... | 31 |
| 7.4 | Výsledky měření..... | 31 |
| 7.4.1 | Parametry nanočástic. Vliv celkového objemu emulze a koncentrace vnitřní fáze..... | 31 |
| 7.4.2 | Parametry nanočástic. Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci polymeru T3, poměru hmotnosti vnitřní a vnější fáze, přítomnosti terbinafinu na velikost nanočástic..... | 35 |
| 7.4.3 | Parametry nanočástic. Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci báze terbinafinu a koncentraci polymeru T3..... | 37 |
| 7.4.4 | Parametry nanočástic. Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci terbinafinu a koncentraci cetrimidu ve vnější fázi. Zpracování částic s mannitolem..... | 43 |
| 8 | Diskuze..... | 55 |
| 8.1 | K zaměření práce | 55 |
| 8.2 | K vlivu hydrodynamických parametrů a koncentrace emulze na velikost částic..... | 56 |
| 8.3 | K vlivu koncentrace emulze, nosiče a léčivé látky na velikost částic..... | 56 |
| 8.4 | K vlivu koncentrace léčivé látky na velikost částic při různé koncentraci roztoku nosiče..... | 56 |
| 8.5 | K vlivu molekulové hmotnosti nosiče a koncentrace léčivé látky na velikost částic..... | 57 |
| 8.6 | K vlivu koncentrace léčivé látky při snížené koncentraci emulgátoru na velikost částic..... | 57 |
| 8.7 | K vlivu podmínek uchovávání při různé koncentraci vnitřní fáze a léčivé látky při snížené koncentraci emulgátoru na velikost částic..... | 58 |

| | | |
|------|--|----|
| 8.8 | K vlivu koncentrace léčivé látky při zvýšené koncentraci emulgátoru na velikost částic..... | 59 |
| 8.9 | K vlivu podmínek uchování při různé koncentraci vnitřní fáze a léčivé látky při zvýšené koncentraci emulgátoru na velikost částic..... | 59 |
| 8.10 | K vlivu koncentrace emulgátoru při různé koncentraci vnitřní fáze a léčivé látky na velikost částic..... | 60 |
| 9 | Závěry | 61 |
| 10 | Literatura | 62 |

1 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 Parametry Terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu (T3) | 29 |
| Tabulka 2 Složení vnější fáze - 0,2% roztok cetrimidu v destilované vodě | 29 |
| Tabulka 3 Složení vnitřní fáze - 1% roztok polymeru T3 v ethylmethylketonu (EMK) | 30 |
| Tabulka 4 Složení vnitřní fáze - 3% roztok T3 v EMK | 30 |
| Tabulka 5 Navážka TB podle požadované koncentrace | 30 |
| Tabulka 6 Charakteristika vzorků pro Tabulku 7. | 31 |
| Tabulka 7 Velikost nanočástic v závislosti na objemu kádinek a hmotnosti vnější a vnitřní fáze. 0,2% CET, 1% T3 v EMK. | 32 |
| Tabulka 8 Charakteristika vzorků pro Tabulky 9 a 10 | 36 |
| Tabulka 9 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci polymeru T3, poměru vnitřní a vnější fáze a přítomnosti terbinafinu | 36 |
| Tabulka 10 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. 1% polymer T3 | 38 |
| Tabulka 11 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. 3% polymer T3 | 39 |
| Tabulka 12 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. 1% polymer T3/2 | 41 |
| Tabulka 13 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 1%T3 | 43 |
| Tabulka 14 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 1%T3, s mannitolem, měřeno po 17 hodinách. | 44 |
| Tabulka 15 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 3%T3 | 45 |

| | |
|---|----|
| Tabulka 16 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 3%T3. S mannitolem. Měřeno po 17 hod..... | 46 |
| Tabulka 17 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimid ve vnější fázi. 1% T3..... | 48 |
| Tabulka 18 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimid ve vnější fázi. 1%T3. Zpracování s mannitolem..... | 49 |
| Tabulka 19 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimid ve vnější fázi. 3%T3..... | 50 |
| Tabulka 20 Velikost nanočástic, 0,8% cetrimid ve vnější fázi, zpracování s mannitolem..... | 51 |

2 Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 Nanokapsula a nanosféra. [38] | 16 |
| Obrázek 2 Hydrolýza PLGA [5] | 20 |
| Obrázek 3 Schématické znázornění vstupu částic do buněk [29] | 21 |
| Obrázek 4 PEG [38] | 22 |
| Obrázek 5 Schematické obrázky nanočástic: nanosféra, nanokapsula a pegylovaná nanočástice. [48] | 22 |
| Obrázek 6 Targetované nanočástice [48] | 23 |
| Obrázek 7 PLGA [40] | 24 |
| Obrázek 8 Potenciální nástrahy nanočástic založených na PLGA [48] | 26 |
| Obrázek 9 Tabulka 7, vzorek 1A | 33 |
| Obrázek 10 Tabulka 7, vzorek 1B..... | 33 |
| Obrázek 11 Tabulka 7, vzorek 2A..... | 34 |
| Obrázek 12 Tabulka 7, vzorek 2B..... | 34 |
| Obrázek 13 Tabulka 7, vzorek 3B..... | 35 |
| Obrázek 14 Tabulka 7, vzorek 4B..... | 35 |
| Obrázek 15 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci polymeru T3, poměru vnitřní a vnější fáze a přítomnosti terbinafinu(Tab. 9) | 37 |
| Obrázek 16 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT a koncentraci vnější fáze (Tab. 10, 11) | 40 |
| Obrázek 17 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. (Tab. 12) | 42 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 18 Velikost nanočástic. Srovnání T3 a T3/2. (Tab. 10 a 12)..... | 42 |
| Obrázek 19 Velikost nanočástic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. Srovnání 1% a 3% T3. (Tab. 13, 15)..... | 47 |
| Obrázek 20 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přidavkem mannitolu. (Tab. 13, 14) | 47 |
| Obrázek 21 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přidavkem mannitolu. (Tab. 15, 16) | 48 |
| Obrázek 22 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. Srovnání 1% T3 a 3% T3. (Tab. 17, 19)..... | 52 |
| Obrázek 23 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimidu ve vnější fázi. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přidavkem mannitolu. (Tab 17, 18)..... | 52 |
| Obrázek 24 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimidu ve vnější fázi. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přidavkem mannitolu. (Tab 19, 20)..... | 53 |
| Obrázek 25 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků s 0,05%, 0,2% a 0,8% cetrimidu ve vnější fázi (Tab. 10, 13, 17)..... | 53 |
| Obrázek 26 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků s 0,05%, 0,2% a 0,8% cetrimidu ve vnější fázi (Tab. 11, 15, 19)..... | 54 |

3 Seznam zkratk

| | |
|-------|--|
| BT | terbinafin |
| CET | cetrimid |
| EMK | ethylmethyketon |
| Pdl | index polydisperzity |
| PGA | polyglykolová kyselina |
| PLGA | kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné |
| PLA | polymléčná kyselina |
| T3 | Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu |
| Z-Ave | střední intenzitní průměr velikosti |

4 Zadání práce

Téma předložené diplomové práce je součástí dlouhodobého vývoje emulzní metody přípravy biodegradabilních nanočásticových a mikročásticových systémů realizovaného na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty University Karlovy. Cílem této fáze prací je hledání podmínek přípravy co nejmenších částic výrobně realizovatelnou dostatečně standardní a robustní metodou. Úkolem této diplomové práce bylo ověřit a upřesnit některé dříve získané poznatky o vlivu některých formulačních faktorů, jako je koncentrace cetrimidu jako emulgátoru ve vnější fázi, koncentrace větveného polyesteru a terbinafinu ve vnitřní fázi emulze a o vlivu podmínek uchovávání čerstvě připravených disperzí po technologicky dostatečnou dobu na jejich granulometrické parametry.

5 Úvod

Nanověda se zabývá studiem jevů týkajících se materiálů na atomové, molekulové a makromolekulové úrovni a zásadami manipulace s nimi. Vlastnosti těchto materiálů se významně liší od těch ve větším měřítku.

Nanotechnologie se zabývají návrhem, charakterizací, produkcí a aplikací struktur, zařízení a systémů v měřítku nanometrů [1]. Nanotechnologie zahrnuje využití uměle vytvořených materiálů, které se uplatňují v praxi v reálném světě.

Výraz „Nano“ je odvozen z řeckého slova znamenajícího trpaslík. Nanometr je miliardtina metru, což je přibližně 1/80,000 průměru lidského vlasu, nebo také desetinásobek průměru atomu vodíku. Slovo nanotechnologie bylo odvozeno od nanometru. Představa provázející nanotechnologie je jednoduchá: Každá hmota na Zemi je složena z molekul, které se skládají z jednoho nebo několika atomů. Kdybychom byli schopni manipulovat s individuálními atomy a molekulami, skládat je dohromady v určité konfiguraci, měli bychom být schopni vytvořit vše, co bychom si přáli [2].

Nanočástice jsou pevné, obvykle sférické struktury, dosahující velikosti kolem 100 nm. Nanočásticové lékové formy jsou široce využívány. K jejich přednostem patří zmírnění nežádoucích účinků, jak lokální, tak systémové povahy, a zvýšení léčebného účinku. Umožňují cílený targeting léčiva do specifických orgánů nebo buněk, nebo řízené uvolňování léčiv [3,4].

Nanočástice jsou připravovány z přírodních nebo syntetických polymerů. Kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné (PLGA) patří mezi nejúspěšnější používané biodegradabilní polymery, protože jeho hydrolýza vede k produktům, které jsou lehce metabolizovány lidským tělem.

6 Teoretická část

6.1 Výroba nanočástic

Existuje několik metod výroby nanočástic. V závislosti na použité metodě můžeme vyrobit částice různé struktury. Nanokapsuly mají jádro a obal a léčivo je většinou situované uvnitř jádra. U nanosfér je léčivo částicově dispergované nebo rozpuštěné v nanočástici nebo je adsorbované na jejím povrchu.

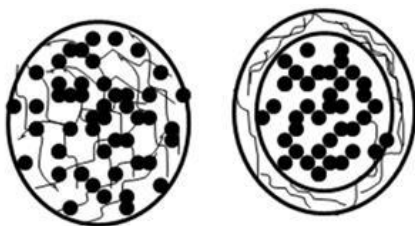


Fig. 1: Schematic representation of nanosphere (left) , nanocapsule (right)

Obrázek 1 Nanokapsula a nanosféra. [38]

Nanočástice mohou být vyráběny metodami na principu dispergace, které zahrnují dispergování větších mikročástic v nanočástice. Další způsob výroby nanočástic je založen na principu precipitace, což je srážení částic z rozpuštěných molekul nebo atomů. Metoda výroby nanočástic by měla být jednoduchá, kontinuální a efektivní. Výroba by měla minimalizovat polydisperzitu částic a měla by být akceptovatelná pro regulační autority. Dále by měla umožnit výrobu většího množství nanočástic obsahující různou koncentraci léčiva.

6.1.1 Dispergační metody

6.1.1.1 Mokrý mletí

Mokrý mletí je proces založený na obrušování. Léčivo je nejdříve rozptýleno ve vodném rozpouštědle a výsledná suspenze je podrobena vlhkému mletí v perlovém mlýnu v přítomnosti mlecího média [6]. V mlecím médiu se vytvoří dostatek energie k rozdrobnění krystalů v nanočástice. Mlecí kuličky jsou obvykle složeny ze skla, oxidu zirkonia stabilizovaného křemičitanem zirkoničitým, nebo vysoce síťované polystyrenové pryskyřice ve sférické formě (0,4-3,0-mm v

průměru). Teplota při výrobě je nižší než 40 °C a tlak je asi 20 psi, což je asi 138 kPa. Čas mletí se pohybuje od několika hodin do několika dnů v závislosti na pevnosti látky.

Ve studii prováděné Liversidgem a Cundym, se biodostupnost danazolu, špatně biologicky dostupného gonadotropního inhibitoru, zvýšila z 5,2% u komerčně vyráběného danazolu makrosuspenze na 82,3% u nanokrystalické suspenze připravované mokrým mletím.[7].

Jediným omezením mokrého mletí je riziko kontaminace kvůli oděru mlecího média, což by bylo problémem hlavně při parenterálním podání. Dalšími limitacemi je dávkové plnění přístroje a riziko výroby polydisperzních částic [8].

6.1.1.2 Vysokotlaká homogenizace

Vysokotlaká homogenizace je založena na principu kavitace, stříhu a impaktu. Kavítace je složitý jev charakterizovaný vznikem a zánikem dutin v proudící kapalině [9,10]. V této metodě je léčivo společně s povrchově aktivní látkou vpraveno do fluidního mlýnu. Tím je nejdříve vyrobena suspenze, která obsahuje částčky léčiva v rozsahu mikrometrů. Dále je tato suspenze ve vysokotlakému homogenizátoru protlačována přes úzkou štěrbinu. Změny energie způsobují zvýšenou kavitaci, turbulenci a smyk, což vede k desintegraci mikročástic léčiva [10].

Hlavní předností vysokotlaké homogenizace je fakt, že je vhodná pro laboratorní výrobu i velkovýrobu, protože vysokotlaké homogenizátory jsou k dispozici v několika velikostech. Další předností je, že při homogenizaci se nekontaminují vyrobené nanočástice, což je jeden z nejdůležitějších cílů výroby nanočástic. Navíc je zlepšena rozpustnost a biodostupnost špatně rozpustných léčiv.

Omezením tohoto postupu výroby nanočástic je vysoký tlak, který může někdy měnit krystalovou strukturu léčiva. Tento efekt zvyšuje podíl amorfní frakce léčiva. Změny v krystalové struktuře mohou vést k nestabilitě a představují problém při kontrole kvality.

6.1.1.3 Metoda emulgace

V této metodě je organický roztok léčiva dispergován ve vodné fázi obsahující povrchově aktivní látku. Tento krok je následován odpařováním organického rozpouštědla pod sníženým tlakem, čímž dochází k precipitaci léčiva za vzniku nanočástic, které jsou stabilizované přidanou povrchově aktivní látkou. Klíčovými parametry této metody jsou homogenizační tlak a počet homogenizačních cyklů. Tlak je většinou mezi 100 až 1500 bar a počet cyklů může být 3, 5 nebo 10 v závislosti na tvrdosti léčiva, požadované velikosti částice a požadované homogenitě produktu [11].

Disoluce antifungálního Griseofulvinu se výrobou nanosuspenze pomocí emulgační metody zvýšila třikrát ve srovnání s komerčními produkty [12].

Metoda emulgace nemůže být použita pro léčiva, která jsou špatně rozpustná v obou mediích, jak v organických tak vodných. Používání organických rozpouštědel navíc přináší ekologické obavy.

6.1.2 Metody založené na precipitaci látky

6.1.2.1 Spray freezing into liquid (SFL) - Sprejová lyofilizace

Tato metoda byla vyvinuta na Texaské Univerzitě v Austinu a komercializovaná chemickou firmou Dow. Roztok, emulze nebo suspenze jsou rozprašovány do kryogenní (silně chladivé) tekutiny jako je například tekutý dusík, čímž vznikají zmrzlé nanočástice, které jsou následně lyofilizovány a poté vzniká sypký prášek [13,14,15,16]. Mimo tekutého dusíku se může jako kryogenní tekutina použít stlačený tekutý oxid uhličitý, helium, propan nebo argon. Touto metodou byly například vyrobeny nanočástice Danazolu [17].

6.1.2.2 Evaporative precipitation into aqueous solution (EPAS) – Srážení a odpařování ve vodném médiu

Tato metoda byla také vyvinuta na Texaské Univerzitě v Austinu a komercializovaná chemickou firmou Dow. Nejdříve je připraven roztok léčiva v organickém rozpouštědle s nízkou teplotou varu. Tento roztok je pod tlakem zahříván nad jeho normální teplotu varu a poté rozprašován do zahřívávaného vodného rozpouštědla obsahujícího povrchově aktivní látku [18]. Tato metoda

byla použita pro výrobu nanočástic Cyklosporinu A a Danazolu, které jsou velmi rychle rozpustné. Tyto nanočásticové suspenze mohou být použity v parenterálních lékových formách nebo mohou být vysušeny a použity v perorálních lékových formách [19, 20].

Podle prováděných studií obě poslední metody produkovaly amorfni částice Danazolu s vysokou teplotou skelného přechodu a nízkou hodnotu kontaktního úhlu. Rychlost rozpouštění byla vyšší při výrobě nanočástic pomocí metody sprejového sušení (SFL) [21].

6.1.2.3 *Rapid expansion from a liquefied-gas solution (RESS) – Rozprašování do superkritické kapaliny*

Během této metody je nejdříve vyroben roztok nebo disperze fosfolipidů nebo dalších povrchově aktivních látek. Poté dochází k rozprašování léčiva do superkritické tekutiny obsahující povrchově aktivní látku [22, 23]. Tato metoda byla použita pro výrobu nanočástic cyklosporinu ve velikosti 500 – 700 nm (Young et al.) [24]. Aby bylo dosaženo stabilní nanosuspenze, byla RESS také kombinována s vysokotlakou homogenizací (Pace et al.)

6.1.2.4 *Precipitation with Compressed Fluid Antisolvent (PCA) – Precipitace v superkritickém srážedle*

Tato metoda byla patentována RTP Pharmaceuticals a licencována SkyePharma Plc. Superkritický oxid uhličitý je smísen s organickými rozpouštědly obsahujícími léčivou látku. Rozpouštědlo expanduje do superkritického oxidu uhličitého, což zvyšuje koncentraci rozpuštěné látky v roztoku. Roztok se stává přesyceným a léčivo se sráží nebo krystalizuje z roztoku. Tímto přenosem hmoty vznikají mikročástice a nanočástice [25].

6.2 Charakterizace nanočástic

Nanočástice jsou charakterizovány svojí velikostí, hustotou, elektroforetickou mobilitou, úhlem kontaktu a specifickým povrchem.

Velikost částic je jeden z nejdůležitějších parametrů nanočástic. Fotonová korelační spektroskopie (PCS) a elektronová mikroskopie jsou dvě hlavní metody používané při měření velikosti částic [26]. Fotonová korelační spektroskopie je

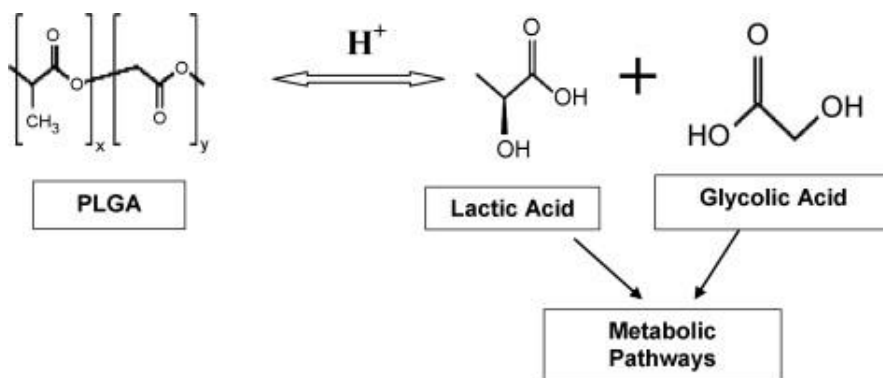
založena na měření rozptylu světla. Nanočástice, které se pohybují na základě Brownova pohybu, jsou zdrojem rozptýleného světla. [36] Dalšími metodami jsou rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) a transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a techniky mrazového lámání.

6.3 Biodegradabilní polymery

Biodegradabilní materiály mohou být přírodního nebo syntetického původu. In vivo jsou degradovány enzymaticky nebo neenzymaticky, nebo jejich degradace probíhá oběma způsoby. Produkují biokompatibilní, netoxické meziprodukty, které jsou plně eliminovány normálními metabolickými cestami v organismu. Počet takovýchto materiálů, které jsou používány při cílené distribuci léčiv, v poslední době významně stoupl. Mohou být rozděleny na syntetické biodegradabilní polymery, které zahrnují poměrně hydrofobní materiály, jako jsou α -hydroxy kyseliny (PLGA), polyanhydridy, a přírodní biodegradabilní polymery jako jsou polysacharidy (chitosan, hyaluronan) a anorganické sloučeniny a minerály (hydroxyapatit) [27, 28]. Biokompatibilita není jen vlastností materiálu, ale je závislá na biologickém prostředí [28].

6.3.1 PLGA

Kopolymer kyseliny glykolové a kyseliny DL-mléčné (PLGA) patří mezi nejúspěšnější používané biodegradabilní polymery, protože jeho hydrolýza vede k metabolickým monomerům kyselině mléčné a glykolové, které jsou tělem částečně metabolizovány v Krebsově cyklu.



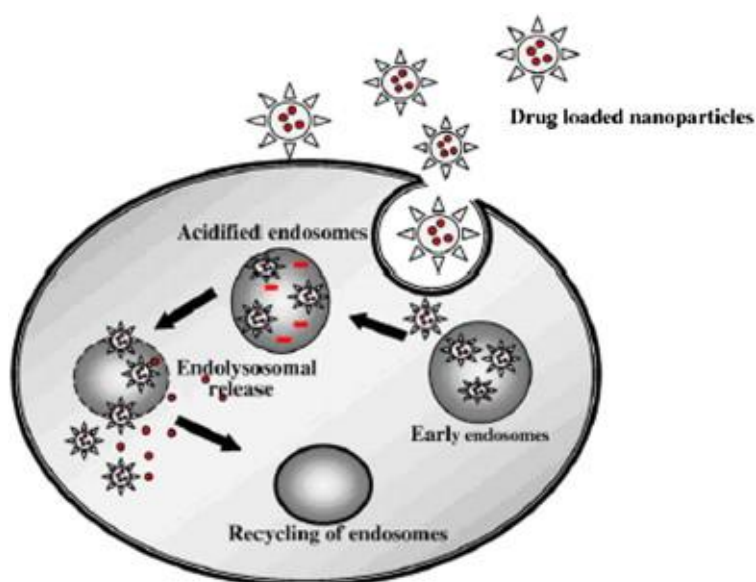
Obrázek 2 Hydrolýza PLGA [5]

Minimální systémová toxicita je spojena se širokým využitím jak v lékových formách, tak při aplikaci biomateriálů [5]. PLGA je schválena americkou FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) a EMA (Evropská léková agentura) v mnoha humánních lékových formách. PLGA patří mezi mnoha dostupnými biodegradabilními polymery mezi nejoblíbenější, protože je v klinické praxi dlouho známa a používána.

Je to kopolymer kyseliny mléčné (LA) a glykolové (GA). Kyselina polymléčná obsahuje asymetrický uhlík, který se typicky označuje jako D nebo L stereoizomer nebo jako R a S forma. PLGA je racemát, tedy opticky inaktivní směs enantiomerů, kde jsou kyseliny D-mléčná (DLA) a L-mléčná (LLA) ve stejném poměru.

6.3.1.1 Vstup nanočástic PLGA do buněk

PLGA nanočástice vstupují do buněk pomocí pinocytózy, nebo pomocí endocytózy. Poté částice během 10 minut unikají z lysozomů do cytoplazmy.



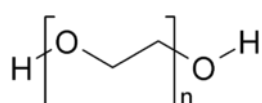
Obrázek 3 Schématické znázornění vstupu částic do buněk [29]

Lidské tělo rozeznává hydrofobní částice jako cizí a jeho retikuloendoteliální systém je vychytává z krve a odvádí je do jater a sleziny. Tento proces je jedním z největších biologických bariér pro cílenou distribuci léčiv

pomocí nanočástic [5]. Dochází k vazbě opsoninu přítomného v krvi na injekčně podané nanočástice a tyto částice jsou poté vychytávány makrofágy [30].

6.3.1.2 Modifikace povrchu částic PLGA

Ve snaze snížit vychytávání nanočástic retikuloendoteliálním systémem (RES) bylo vyvinuto několik možností modifikací povrchu nanočástic. Nanočástice mohou být obaleny molekulami, které vytvářejí adsorbovanou hydrofilní vrstvičku na povrchu nanočástic a skryjí tak jejich hydrofobní vlastnosti. Nejčastější modifikací povrchu je hydrofilní a neionogenní polymer polyethylenglykol (PEG).



Obrázek 4 PEG [38]

F. Danhier et al. / Journal of Controlled Release 161 (2012) 505–522

A Non-targeted nanoparticles

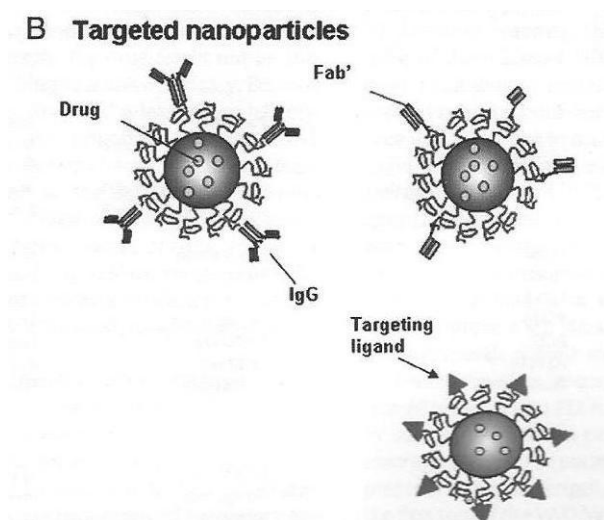


Obrázek 5 Schematické obrázky nanočástic: nanosféra, nanokapsula a pegylovaná nanočástice. [48]

Pegylace, jak se nazývá navázání polyethylenglykolu na povrch nanočástice nebo na jednotlivé molekuly nosiče nebo léčiva, prodlužuje cirkulaci v krvi o polovinu [30], navíc PEG vykazuje výbornou biokompatibilitu. Také poloxamery, poloxaminy a chitosan byli studováni pro jejich možné využití jako povrchové modifikátory [3,5]. Tyto skupiny polymerů mohou blokovat elektrostatické a

hydrofobní interakce, které vedou k navázání molekul opsoninu na povrch nanočástic.

Dalším možným využitím povrchové modifikace nanočástic je targeting nanočástic do cílových orgánů nebo nádorové tkáně. Targetingem je umožňován vstup do buněk pomocí receptorově zprostředkované endocytózy. Targetingové ligandy jsou často připojeny k nanočásticím přes PEG řetězce. [31]



Obrázek 6 Targetované nanočástice [48]

Povrchová modifikace nanočástic má důležitý vliv na jejich vstup do buněk a na jejich buněčné interakce. Pozitivně nabitě nanočástice lépe vstupují do buněk, zřejmě je to výsledek iontových interakcí vznikajících mezi pozitivně nabitými nanočásticemi a negativně nabitou buněčnou membránou [32,33]. PLGA nanočástice mají negativní náboj, který může být přeměněn na neutrální nebo pozitivní pomocí povrchové modifikace, jako například pegylace nebo adsorpce chitosanu.

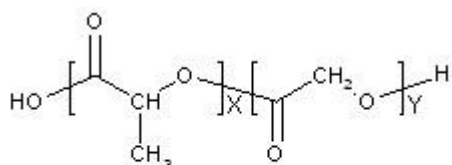
Nejčastější metodou pro výrobu PLGA nanočástic je emulgace za odpařování rozpouštědla. Tato metoda umožňuje enkapsulaci hydrofobních léčiv. Dochází k rozpouštění nebo bobtnání polymeru a léčiva v organickém rozpouštědle. Poté je přidáním vody a povrchově aktivní látky připravena emulze voda v oleji (v/o). Dále jsou připraveny kapičky pomocí ultrazvuku nebo homogenizátoru. Modifikací této metody je dvojitá emulgace v/o/v, která bývá

používána pro enkapsulaci hydrofilních léčiv jako jsou peptidy, proteiny a nukleové kyseliny. [3]

Účinnost povrchové modifikace může být odhadována pomocí měření. Jedna z metod spočívá ve stanovení zeta potenciálu (ζ) nanočástic prostřednictvím pohybu nabitých částic sledovaného pomocí elektrického potenciálu. V závislosti na polymeru a na povrchové modifikaci může být zeta potenciál pozitivní, neutrální nebo negativní [35].

6.3.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti PLGA

Polymer PLA může být v krystalické formě (stereoizomer PLLA) nebo ve formě amorfní (stereoizomer PDLA). Polymer PGA nemá žádnou methylovou skupinu a může se vyskytovat ve vysoce krystalickém uspořádání ve srovnání s PLA.



x - Number of units of Lactic Acid
y - Number of units of Glycolic Acid

Obrázek 7 PLGA [40]

PLGA je rozpustný v mnoha běžných rozpouštědlech včetně chlorovaných rozpouštědel, tetrahydrofuranu, acetonu nebo ethylacetátu. Ve vodě je hydrolyzován na již zmiňovanou kyselinu mléčnou a kyselinu glykolovou. Přítomnost methylových skupin v PLA způsobuje, že je hydrofobnější než PGA, proto kopolymery PLGA s převahou polymléčné kyseliny jsou méně hydrofobní, absorbují méně vody a následkem toho se pomaleji degradují.

6.3.1.4 Problémy nanočástic založených na PLGA

Nanočástice potřebují mít vysokou tzv. enkapsulační efektivitu. Enkapsulační efektivita vyjadřuje procento enkapsulovaného léčiva z celkového množství léčiva použitého k formulaci nanočástic. Dále nanočástice potřebují mít vysoký tzv. *drug loading*. Drug loading vyjadřuje maximální efektivní procentuální

obsah léčiva v celkovém množství nanočástic. Přesné určení obsahu léčiva není jednoduché, protože nanočástice jsou koloidní systémy [5]. Nejvhodnější způsob oddělení nanočástice od neenkapsulovaného a neabsorbovaného léčiva je ultracentrifugace. Enkapsulační účinnost se může pohybovat mezi 6% až 90%. Průměrná enkapsulační účinnost se pohybuje v rozmezí 60% až 70% pro léčiva jako je extradiol a xanthony. Až 90% dosahuje dexamethasone a paclitaxel především z důvodu velmi malé rozpustnosti [5].

Jeden z největších problémů při výrobě nanočástic je „drug loading“. Částice založené na PLGA mají většinou dobrou enkapsulační efektivitu, ale velmi nízký *drug loading*. Ten se pohybuje kolem 1%, což znamená, že nanočástice obsahují 1 mg účinné látky na 100 mg polymeru nanočástic. Tato nízká hodnota představuje jeden z hlavních problémů tvorby nanočástic založených na PLGA.

Druhým významným problémem tvorby nanočástic je rychlé uvolnění dávky léčiva z nanočástic. Tento jev, tzv. *burst efekt* je popisován u většiny nanočástic založených na PLGA. To může vést k tomu, že léčivo není schopno dosáhnout cílových tkání nebo buněk a dochází k ztrátě účinku. Účinek ovlivňuje také mechanismus uvolňování léčiva z nanočástic. Podle Kumariho a kolegů existuje pět mechanismů uvolňování léčiva: (i) desorpce léčiva vázaného na povrch, (ii) difuze přes polymerní matrix, (iii) difuze přes polymerní stěnu nanočástic, (iv) eroze nanočásticového matrixu a (v) kombinace eroze a difuze. Mechanismy uvolňování závisí na použitém polymeru a na *drug loading*. Rychlé uvolnění léčiva je obvykle přisuzováno absorbování léčiva na nanočásticový povrch [5].

Nanotoxikologie je nová subdisciplína nanotechnologie. Interakce nanonosičů s biologickými systémy jsou extrémně komplexní. Velikost a povrchové vlastnosti nanonosičů modifikuje chování v těle. Některé nanočástice obdržely schválení regulačních autorit zatímco některé ještě nebyly testovány. Toxikologické studie jsou nezbytné pro prokázání biokompatibility nanočástic v lidském těle. Studie *in vitro* většinou poskytují povzbudivé výsledky, ale tyto výsledky jsou bohužel vzdálené od reality *in vivo*.

Před uvedením nového léku na trh musí být brány v potaz finanční aspekty a to nejen pro farmaceutický průmysl, ale také pro pacienta. Výroba nanočástic

založených na PLGA Správnou výrobní praxí může být velmi nákladná. Navíc, mnoho postupů v experimentální produkci nanočástic je neproveditelných v průmyslovém měřítku, jako je dialýza, ultracentrifugace a ultrazvuk.

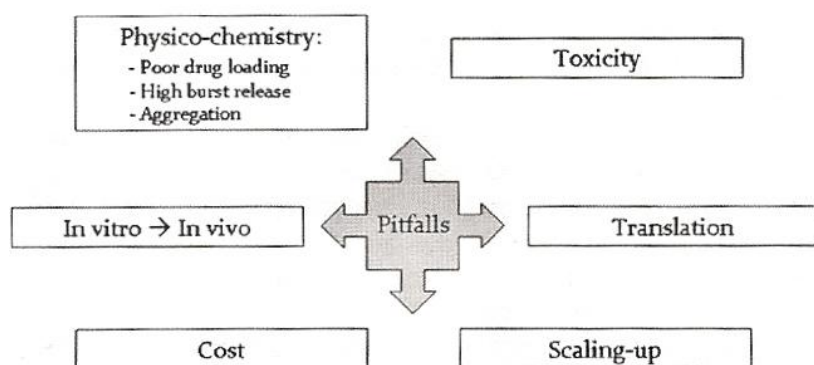


Fig. 4. Potential pitfalls of PLGA-based nanoparticles.

Obrázek 8 Potenciální nástrahy nanočástic založených na PLGA [48]

6.3.1.5 *Enkapsulace malých hydrofobních léčiv*

Nanočástice z PLGA s hydrofobními špatně rozpustnými léčivy jsou nejčastěji formulovány pomocí precipitace. Uvolňování léčiva a účinek je ovlivňován (i) povrchovou modifikací, (ii) metodou přípravy, (iii) velikostí částice, (iv) molekulární hmotností enkapsulovaného léčiva, (v) poměrem mléčné a glykolové kyseliny v PLGA [5]. Nanočástice založené na PLGA jsou v literatuře popisovány jako efektivní nosiče různých protirakovinných léčiv jako je paclitaxel [40], cisplatina [41] a nebo také různých dalších léčiv jako je haloperidol [42].

6.3.1.6 *Enkapsulace proteinů*

Podání proteinů samotných představuje skutečný problém, protože jejich perorální biologická dostupnost je limitována epiteliálními bariérami gastrointestinálního traktu, jejich citlivostí k degradaci pomocí trávicích enzymů, jejich krátkým poločasem rozpadu in vivo. Navíc většina z nich nemůže prostupovat přes některé biologické bariéry. Dnes jsou podávány především invazivními cestami jako podkožními injekcemi. Dosáhnutí terapeutického účinku vzhledem k jejich rychlé degradaci a eliminaci navíc vyžaduje opakované podávání. Enkapsulace proteinů do nanočástic založených na PLGA poskytuje ochranu proti enzymatické a hydrolytické degradaci in vivo, udržuje jejich integritu a aktivitu a

může zlepšovat jejich biologickou dostupnost a v některých případech umožňuje targeting do cílového místa účinku.

Jedna z nejpoužívanějších technik pro enkapsulaci proteinů do PLGA nanočástic je dvojitá emulgace systému v/o/v za odpařování rozpouštědla, protože proteiny jsou hydrofilní makromolekuly. Enkapsulace proteinů s sebou ale přináší problémy s nestálostí. [43]

6.3.1.7 Enkapsulace nukleových kyselin

Nukleové kyseliny způsobují genovou expresi. Jsou nestabilní a mají slabou vnitřní účinnost transfekce kvůli jejich značné velikosti a zápornému náboji. Nanočástice založené na polymerech byly vytvořeny jako alternativa k podávání pomocí viru (*viral delivery*). Nukleové kyseliny mohou být buďto zachyceny v polymerním matrix [44] nebo adsorbovány elektrostatickými interakcemi na povrch nanočástice pomocí povrchově aktivních látek nebo přidáním kationického polymeru do matrix [45].

Nanočástice obsahující nukleové kyseliny jsou formulovány pomocí emulgace v/o/v za odpaření rozpouštědla [46] nebo pomocí modifikované precipitace [47].

7 Experimentální část

7.1 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

7.2 Použité chemikálie

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

Čištěná voda FaF UK, čištěná reverzní osmózou

Terbinafin, Zentiva a.s.

Ethylmethyleketon, Lachema a.s., Neratovice

Amoniak p.a., Penta

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

Tabulka 1 Parametry Terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu (T3)

| POLYMER | Mn | Mw | Tg [°C] |
|----------------|-----------|-----------|----------------|
| T3 | 8600 | 18400 | 32,5 |
| T3/2 | 3355 | 13334 | 21,7 |

7.3 Postup přípravy

7.3.1 Příprava baze terbinafinu

Na analytických vahách bylo naváženo 12,0 g terbinafinu. V odměrném válci bylo odměřeno 3000 ml destilované 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). Tekutinu jsme dekantovali a BT umístili do vakuové sušárny.

7.3.2 Příprava vnější fáze emulze

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství cetrimidu (CET). Protože CET má při laboratorní teplotě špatnou rozpustnost, byla kádinka umístěna do mikrovlnné trouby a zahřívána po dobu 10 vteřin na 35°C.

Tabulka 2 Složení vnější fáze - 0,2% roztok cetrimidu v destilované vodě

| Navážovaná látka | Navážované množství |
|-------------------------|----------------------------|
| CET | 4,0 g |
| Destilovaná voda | 1996,0 g |

7.3.3 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 třepáním v lékovce.

Tabulka 3 Složení vnitřní fáze - 1% roztok polymeru T3 v ethylmethylethylketonu (EMK)

| Navažovaná látka | Navažované množství |
|-------------------------|----------------------------|
| Polymer T3 | 2,0 g |
| Methylethylketon | 198,0 g |

Tabulka 4 Složení vnitřní fáze - 3% roztok T3 v EMK

| Navažovaná látka | Navažované množství |
|-------------------------|----------------------------|
| Polymer T3 | 6,0 g |
| Methylethylketon | 196,0 g |

Do roztoku polymeru byla přidávána BT podle požadované koncentrace:

Tabulka 5 Navážka TB podle požadované koncentrace

| Koncentrace BT | Navážka BT | |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | 40 g 1% roztok T3 polymeru | 40g 3% roztok T3 polymeru |
| 30% | 171,42 mg | 514,26 mg |
| 20% | 100,00 mg | 300,00 mg |
| 15% | 70,59 mg | 211,76 mg |
| 10% | 44,44 mg | 133,34 mg |
| 5% | 21,05 mg | 63,15 mg |

7.3.4 Příprava nanočástic

1. 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 míchače.

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

2. Z kádinek byla směs odlita a byl do ní 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. Obsah kádinky jsme těsně před měřením promíchali.

7.3.5 Měření velikosti nanočástic.

Pro měření velikosti nanočástic se použil Zetasizer ZS 90. Kvyety se naplnili do stanovené výšky a vložili do přístroje.

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).

7.4 Výsledky měření

7.4.1 Parametry nanočástic. Vliv celkového objemu emulze a koncentrace vnitřní fáze.

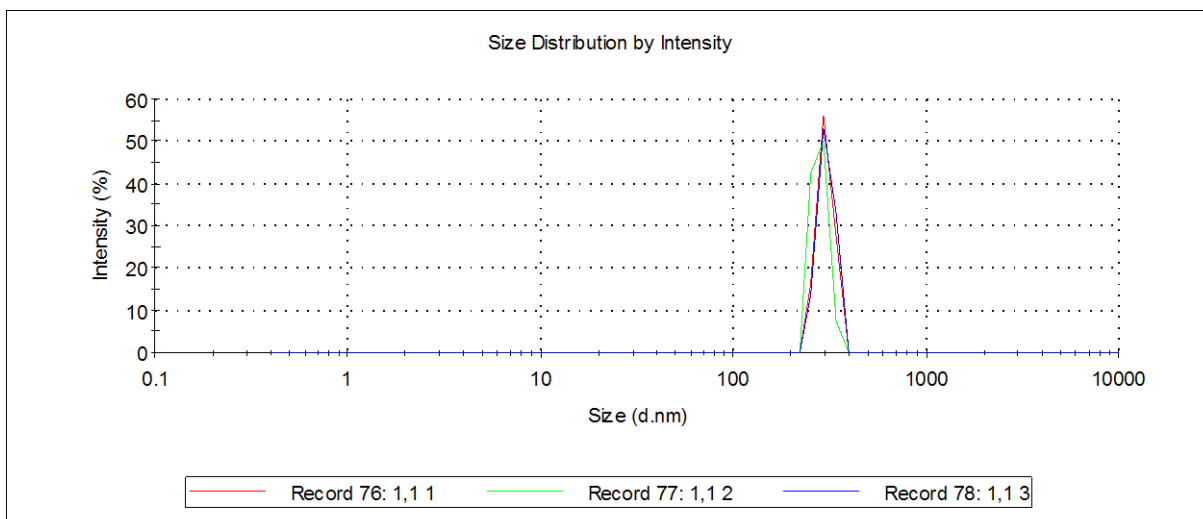
Příprava nanočástic probíhala podle Přípravy nanočástic 1. (7.3.4). Na přípravu vzorků byl jako vnitřní fáze použit 1% polymer T3. Jako vnější fáze byl použit 0,2% roztok cetrimidu. Vzorky byly připraveny podle rozpisu v tabulce 6 (7.3.4). Každá příprava byla opakována dvakrát a přístroj u každého ze vzorků provedl tři měření.

Tabulka 6 Charakteristika vzorků pro Tabulku 7.

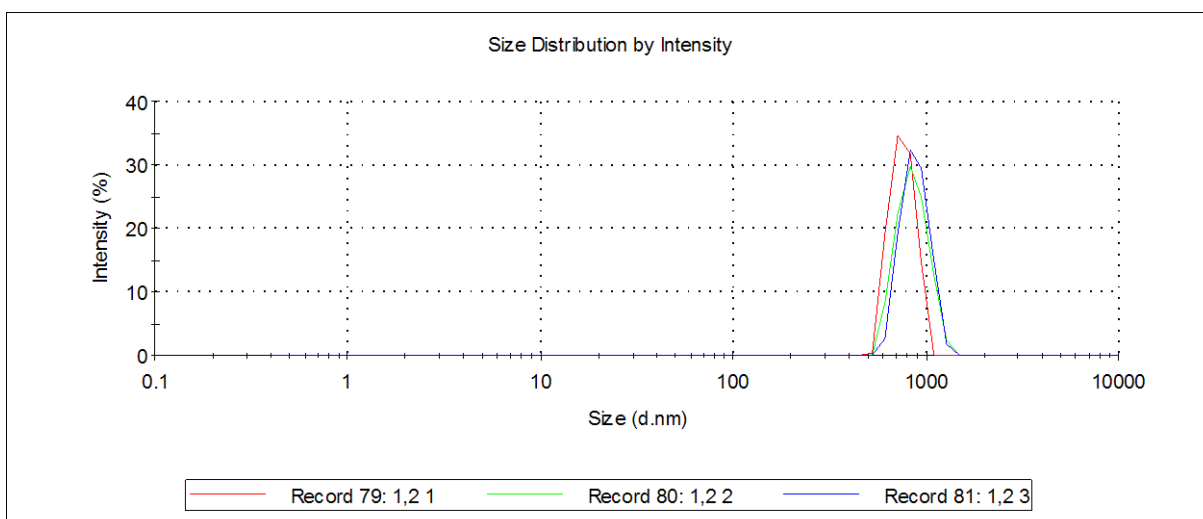
| číslo vzorku | objem kádinky | vnější fáze | vnitřní fáze |
|--------------|---------------|------------------------|---------------------------|
| | | 0,2% roztok CET | 1% roztok T3 v EMK |
| 1 | 150 ml | 80 g | 20 g |
| 2 | 150 ml | 90 g | 10 g |
| 3 | 250 ml | 160 g | 40 g |
| 4 | 250 ml | 180 g | 20 g |

Tabulka 7 Velikost nanočástic v závislosti na objemu kádinek a hmotnosti vnější a vnitřní fáze. 0,2% CET, 1% T3 v EMK.

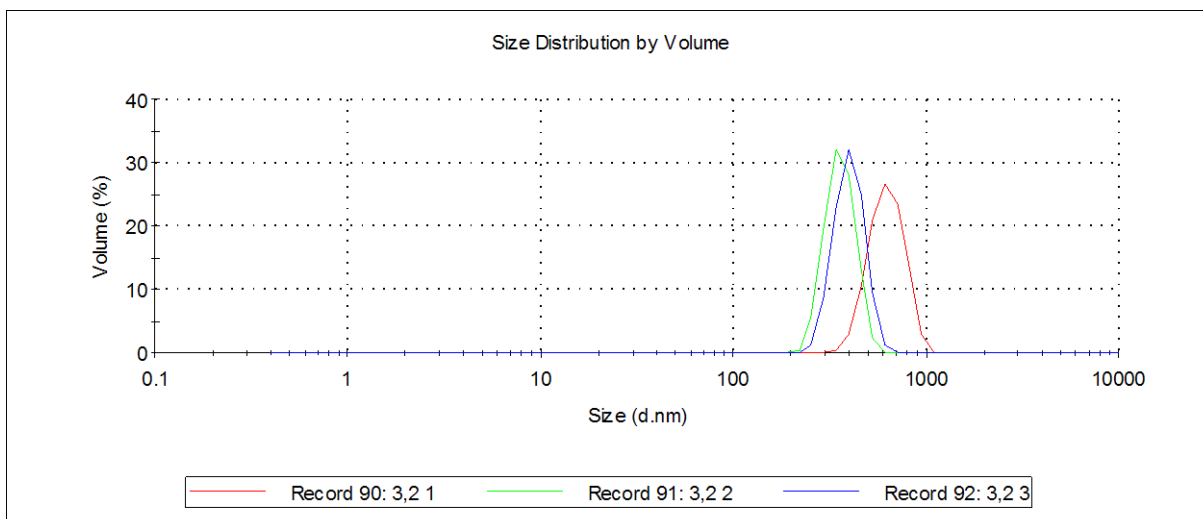
| ČÍSLO VZORKU | Z- Ave | Pdl | Pk 1 Mean Int | Pk 2 Mean Int | Pk 3 Mean Int | Pk 1 Area Int | Pk 2 Area Int | Pk 3 Area Int |
|-----------------|-----------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | d.nm | | d.nm | d.nm | d.nm | % | % | % |
| 1A | 1043 | 0,791 | 301,7 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 901,5 | 0,660 | 281,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 973,7 | 0,899 | 305,2 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 1B | 1067 | 0,473 | 764,6 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1093 | 0,438 | 860,1 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1258 | 0,452 | 885,1 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2A | 763,8 | 0,011 | 807,6 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 824,0 | 0,012 | 869,7 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 755,8 | 0,105 | 823,6 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2B | 695,9 | 0,670 | 928,6 | 244,4 | 5071 | 72,2 | 18,6 | 9,2 |
| | 674,8 | 0,515 | 547,7 | 3198 | 0,000 | 57,7 | 42,3 | 0,0 |
| | 633,3 | 0,484 | 1295 | 263,4 | 5158 | 62,4 | 33,2 | 4,4 |
| 3A | 410,9 | 0,429 | 406,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 409,4 | 0,172 | 459,2 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 410,3 | 0,029 | 433,9 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3B | 581,4 | 0,031 | 604,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 392,3 | 1,000 | 353,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 381,7 | 0,129 | 394,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4A | 472,3 | 0,082 | 504,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 524,9 | 0,192 | 576,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 523,3 | 0,037 | 555,2 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4B | 583,4 | 0,433 | 561,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 529,5 | 0,094 | 565,9 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 464,0 | 0,056 | 492,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |



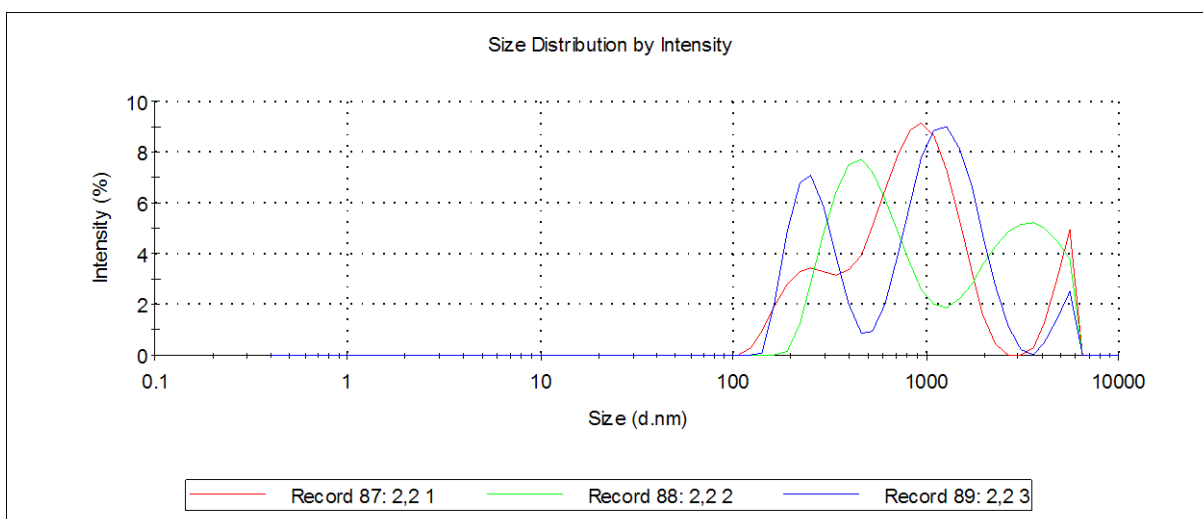
Obrázek 9 Tabulka 7, vzorek 1A



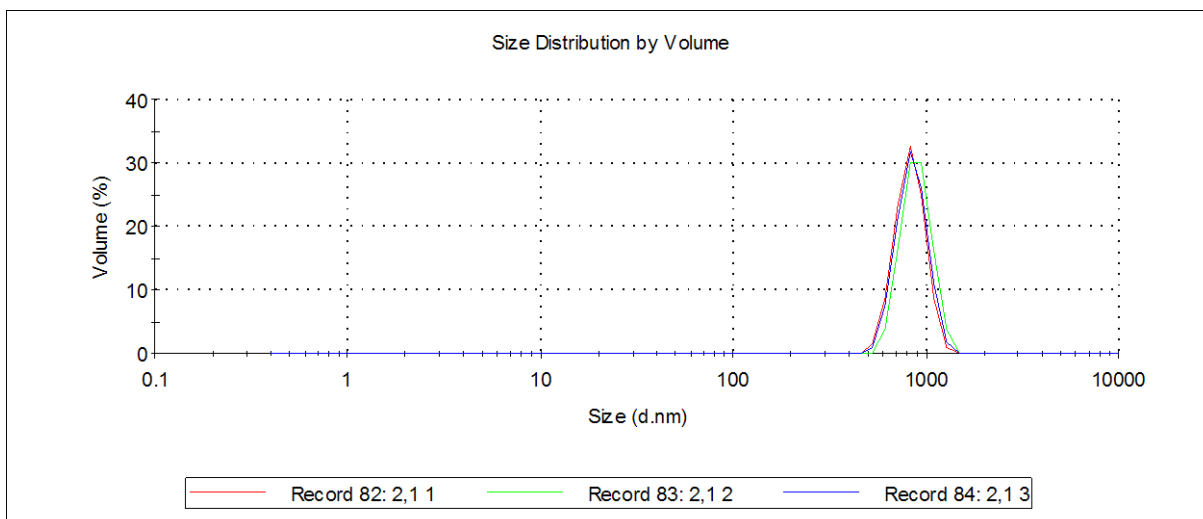
Obrázek 10 Tabulka 7, vzorek 1B



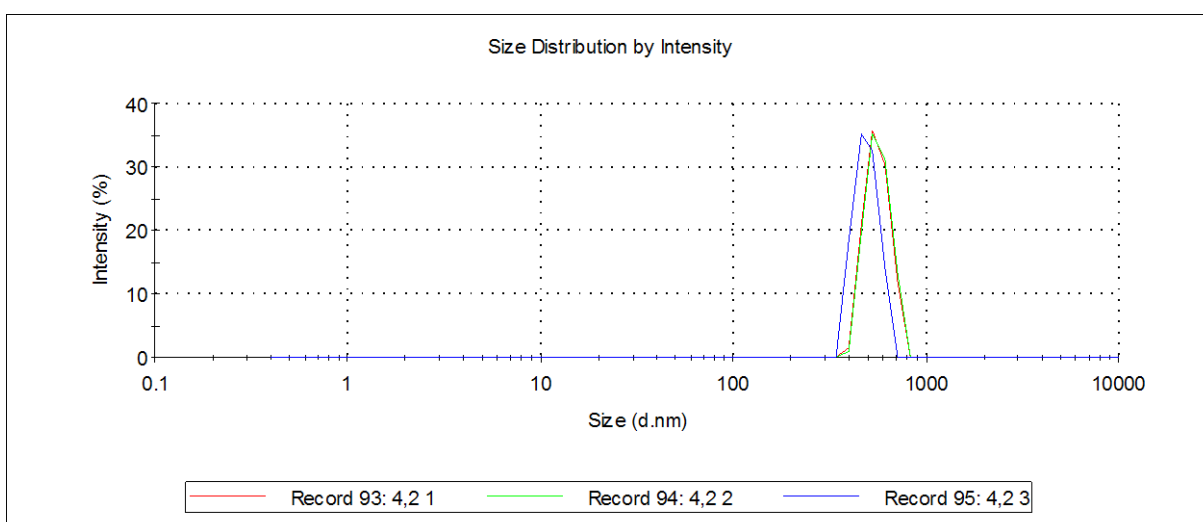
Obrázek 11 Tabulka 7, vzorek 2A



Obrázek 12 Tabulka 7, vzorek 2B



Obrázek 13 Tabulka 7, vzorek 3B



Obrázek 14 Tabulka 7, vzorek 4B

7.4.2 Parametry nanočástic. Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci polymeru T3, poměru hmotnosti vnitřní a vnější fáze, přítomnosti terbinafinu na velikost nanočástic.

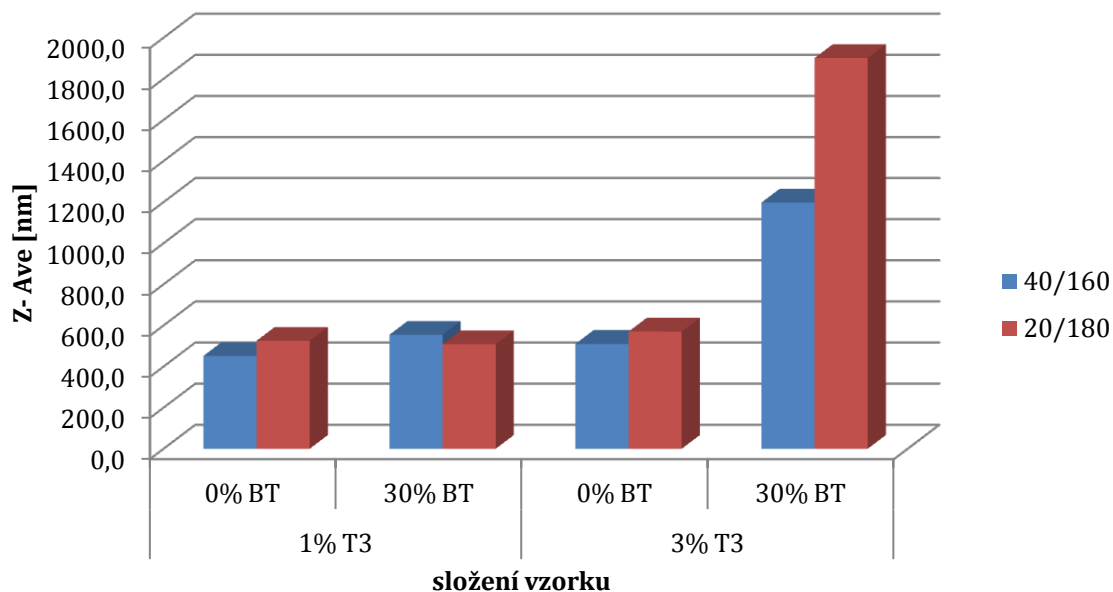
Příprava nanočástic probíhala podle Přípravy nanočástic 1. (7.3.4). Na přípravu vzorků byl jako vnitřní fáze použit 1% a 3% polymer T3. Jako vnější fáze byl použit 0,2% roztok cetrimidu. Vzorky byly připraveny podle rozpisu v tabulce 8 (7.3.4). Na homogenizaci byly použity 250 ml kádinky. Každá příprava byla opakována dvakrát a přístroj u každého ze vzorků provedl tři měření

Tabulka 8 Charakteristika vzorků pro Tabulky 9 a 10

| číslo vzorku | objem vnitřní / vnější fáze (g) | Vnitřní fáze | |
|--------------|---------------------------------|--------------|--------|
| | | T3 (%) | TB (%) |
| 1. | 40/160 | 1 | 0 |
| 2. | 20/180 | 1 | 0 |
| 3. | 40/160 | 1 | 30 |
| 4. | 20/180 | 1 | 30 |
| 5. | 40/160 | 3 | 0 |
| 6. | 20/180 | 3 | 0 |
| 7. | 40/160 | 3 | 30 |
| 8. | 20/180 | 3 | 30 |

Tabulka 9 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci polymeru T3, poměru vnitřní a vnější fáze a přítomnosti terbinafinu

| ČÍSLO VZORKU | Z- Ave | Pdl | Pk 1 | Pk 2 | Pk 3 | Pk 1 | Pk 2 | Pk 3 |
|---------------------|-----------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | Mean Int | Mean Int | Mean Int | Area Int | Area Int | Area Int |
| | d.nm | | d.nm | d.nm | d.nm | % | % | % |
| 1. 1%T3 0%TB | 581,4 | 0,031 | 604,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 392,3 | 1,000 | 353,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 381,7 | 0,129 | 394,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2. 1%T3 0%TB | 583,4 | 0,433 | 561,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 529,5 | 0,094 | 565,9 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 464,0 | 0,056 | 492,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3. 1%T3 30%TB | 662,2 | 0,257 | 657,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 488,7 | 0,258 | 495,9 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 513,5 | 0,163 | 571,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4. 1%T3 30%TB | 599,0 | 0,118 | 612,6 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 453,9 | 0,195 | 488,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 474,2 | 0,084 | 500,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5. 3%T3 0%TB | 486,8 | 0,677 | 455,1 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 549,3 | 0,637 | 512,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 495,2 | 1,000 | 427,7 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6. 3%T3 0%TB | 581,5 | 0,114 | 592,7 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 517,8 | 1,000 | 454,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 611,5 | 1,000 | 530,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7. 3%T3 30%TB | 1140 | 0,728 | 2476 | 256,8 | 0,000 | 84,4 | 15,6 | 0,0 |
| | 1216 | 0,652 | 2846 | 331,1 | 0,000 | 80,6 | 19,4 | 0,0 |
| | 1238 | 0,328 | 1725 | 164,7 | 0,000 | 93,9 | 6,1 | 0,0 |
| 8. 3%T3 30%TB | 2027 | 0,975 | 901,6 | 151,1 | 0,000 | 87,5 | 12,5 | 0,0 |
| | 1786 | 0,941 | 1131 | 205,3 | 0,000 | 75,6 | 24,4 | 0,0 |
| | 1891 | 0,962 | 1798 | 257,3 | 0,000 | 71,8 | 28,2 | 0,0 |



Obrázek 15 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci polymeru T3, poměru vnitřní a vnější fáze a přítomnosti terbinafinu (Tab. 9)

7.4.3 Parametry nanočástic. Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci baze terbinafinu a koncentraci polymeru T3

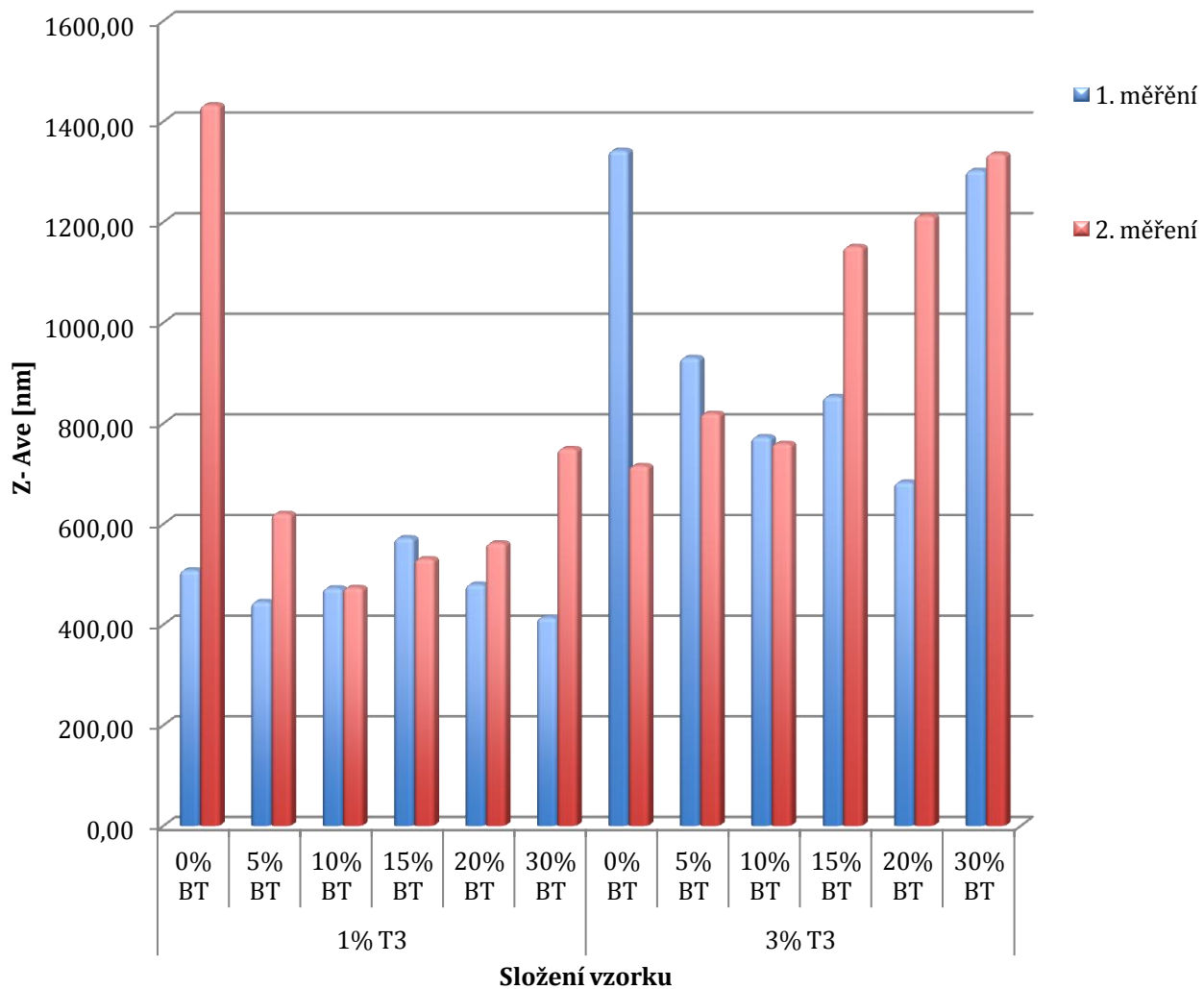
Příprava nanočástic probíhala podle Přípravy nanočástic 1. (7.3.4). Směs byla homogenizována v 400 ml kádinkách s podélnými žebry. Na přípravu vzorků bylo jako vnější fáze použito 160g 0,2% roztoku cetrimidu. Jako vnitřní fáze byl použito 40 g 1% polymeru T3 a 3% polymeru T3. Každý vzorek byl připraven dvakrát.

Tabulka 10 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. 1% polymer T3

| ČÍSLO VZORKU | Z-Ave | Pdl | Pk 1 | Pk 2 | Pk 3 | Pk 1 | Pk 2 | Pk 3 |
|-----------------|--------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | d.nm | | Mean Int | Mean Int | Mean Int | Area Int | Area Int | Area Int |
| | d.nm | | d.nm | d.nm | d.nm | % | % | % |
| 1A 0% BT | 596,4 | 0,120 | 642,3 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 375,1 | 0,179 | 415,9 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 552,5 | 1,000 | 400,6 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 1B | 1257,0 | 0,400 | 1064,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1336,0 | 0,600 | 920,1 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1704,0 | 0,500 | 1277,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2A 5% BT | 369,6 | 0,028 | 395,9 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 573,6 | 0,311 | 570,7 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 392,1 | 0,210 | 440,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2B | 632,2 | 0,900 | 415,6 | 105,7 | 0,0 | 89,2 | 10,8 | 0,0 |
| | 608,3 | 0,500 | 376,8 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 620,3 | 0,700 | 369,3 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3A 10%BT | 495,0 | 0,277 | 378,1 | 1146,0 | 0,0 | 52,7 | 47,3 | 0,0 |
| | 448,8 | 0,183 | 454,2 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 473,0 | 0,033 | 496,3 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3B | 455,2 | 0,200 | 579,2 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 467,3 | 0,400 | 769,9 | 192,7 | 5086,0 | 80,3 | 18,4 | 1,3 |
| | 496,8 | 0,400 | 752,3 | 163,3 | 5024,0 | 85,0 | 12,9 | 2,1 |
| 4A 15%BT | 570,9 | 0,147 | 679,6 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 609,1 | 0,282 | 943,0 | 214,6 | 0,0 | 85,7 | 14,3 | 0,0 |
| | 535,1 | 0,195 | 682,7 | 145,6 | 0,0 | 94,4 | 5,6 | 0,0 |
| 4B | 397,8 | 0,400 | 635,8 | 4402,0 | 0,0 | 94,8 | 5,2 | 0,0 |
| | 512,6 | 0,500 | 345,8 | 1143,0 | 5176,0 | 52,9 | 41,0 | 5,1 |
| | 680,3 | 0,500 | 1693,0 | 276,0 | 0,0 | 73,6 | 26,4 | 0,0 |
| 5A 20%BT | 505,6 | 0,252 | 713,9 | 168,9 | 0,0 | 89,6 | 10,4 | 0,0 |
| | 459,8 | 0,241 | 622,2 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 472,7 | 0,266 | 772,0 | 220,7 | 0,0 | 78,9 | 21,1 | 0,0 |
| 5B | 614,5 | 0,500 | 1445,0 | 247,5 | 0,0 | 73,0 | 27,0 | 0,0 |
| | 501,5 | 0,500 | 446,0 | 2037,0 | 0,0 | 59,7 | 40,3 | 0,0 |
| | 569,0 | 0,500 | 476,1 | 2780,0 | 118,6 | 55,6 | 40,5 | 3,8 |
| 6A 30%BT | 377,8 | 0,169 | 407,6 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 414,6 | 0,214 | 414,3 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 449,0 | 0,205 | 457,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6B | 684,7 | 0,300 | 1173,0 | 305,5 | 0,0 | 77,9 | 22,1 | 0,0 |
| | 866,0 | 0,300 | 1186,0 | 178,2 | 0,0 | 92,6 | 7,4 | 0,0 |
| | 696,7 | 0,300 | 1053,0 | 245,5 | 0,0 | 86,2 | 13,8 | 0,0 |

Tabulka 11 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. 3% polymer T3.

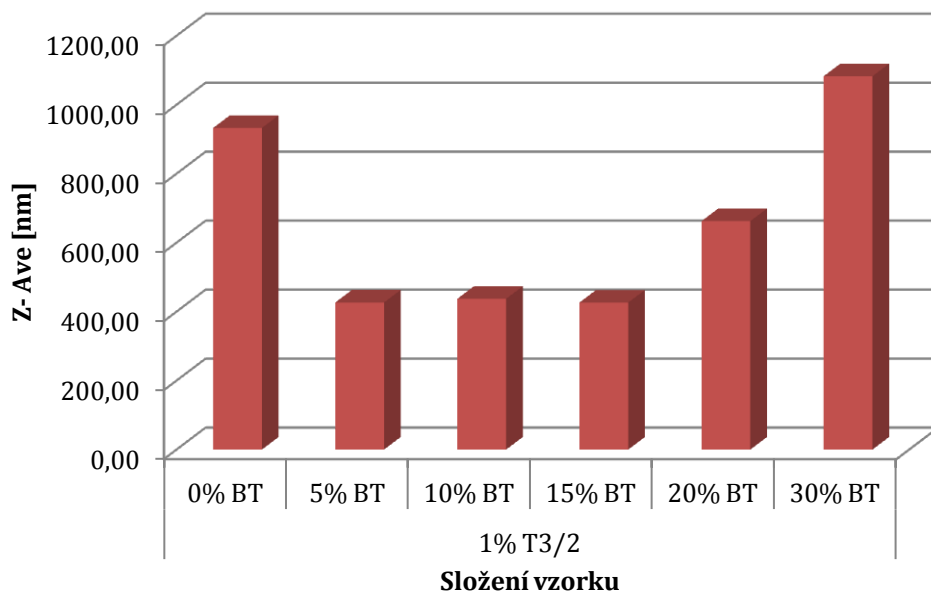
| ČÍSLO VZORKU | Z-Ave | PDI | Pk 1 | Pk 2 | Pk 3 | Pk 1 | Pk 2 | Pk 3 |
|-----------------|--------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | d.nm | | Mean Int | Mean Int | Mean Int | Area Int | Area Int | Area Int |
| | d.nm | | d.nm | d.nm | d.nm | % | % | % |
| 7A 30% BT | 1291,0 | 0,648 | 817,3 | 159,1 | 0,0 | 92,2 | 7,8 | 0,0 |
| | 1284,0 | 0,711 | 881,7 | 237,6 | 0,0 | 77,3 | 22,7 | 0,0 |
| | 1451,0 | 0,813 | 652,4 | 154,4 | 0,0 | 89,0 | 11,0 | 0,0 |
| 7B | 567,7 | 0,500 | 554,5 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 791,3 | 1,000 | 679,6 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 786,7 | 0,000 | 827,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 8A 5% BT | 897,6 | 0,607 | 763,1 | 171,5 | 0,0 | 82,3 | 17,7 | 0,0 |
| | 781,8 | 0,447 | 617,7 | 107,0 | 0,0 | 94,8 | 5,2 | 0,0 |
| | 1111,0 | 0,609 | 892,2 | 215,8 | 5560 | 78,3 | 18,0 | 3,7 |
| 8B | 818,6 | 0,300 | 1182,0 | 201,5 | 0,0 | 90,0 | 10,0 | 0,0 |
| | 842,5 | 0,500 | 1517,0 | 230,9 | 0,0 | 84,8 | 15,2 | 0,0 |
| | 796,8 | 0,400 | 1321,0 | 202,2 | 0,0 | 85,4 | 14,6 | 0,0 |
| 9A 10%BT | 789,8 | 0,473 | 1702,0 | 294,4 | 0,0 | 75,8 | 24,2 | 0,0 |
| | 744,9 | 0,413 | 1811,0 | 404,4 | 0,0 | 63,0 | 37,0 | 0,0 |
| | 783,1 | 0,450 | 1701,0 | 328,2 | 0,0 | 73,0 | 27,0 | 0,0 |
| 9B | 760,3 | 0,200 | 1009,0 | 215,1 | 0,0 | 93,5 | 6,5 | 0,0 |
| | 786,6 | 0,300 | 1298,0 | 305,6 | 0,0 | 82,4 | 17,6 | 0,0 |
| | 731,5 | 0,300 | 1143,0 | 279,1 | 0,0 | 84,4 | 15,6 | 0,0 |
| 10A 15%BT | 609,2 | 0,586 | 927,7 | 302,6 | 5393 | 57,8 | 38,6 | 3,6 |
| | 684,0 | 0,411 | 653,9 | 5161,0 | 0,0 | 91,9 | 8,1 | 0,0 |
| | 1265,0 | 0,787 | 658,8 | 4954,0 | 0,0 | 65,5 | 34,5 | 0,0 |
| 10B | 1107,0 | 0,600 | 3056,0 | 389,2 | 0,0 | 71,5 | 28,5 | 0,0 |
| | 1266,0 | 0,600 | 3509,0 | 596,8 | 0,0 | 61,4 | 38,6 | 0,0 |
| | 1079,0 | 0,700 | 742,3 | 5270,0 | 0,0 | 85,9 | 14,1 | 0,0 |
| 11A 20%BT | 674,8 | 0,235 | 948,5 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 706,3 | 0,283 | 1118,0 | 272,0 | 0,0 | 83,1 | 16,9 | 0,0 |
| | 666,3 | 0,199 | 860,1 | 206,3 | 0,0 | 95,0 | 5,0 | 0,0 |
| 11B | 883,6 | 0,600 | 2251,0 | 320,0 | 0,0 | 73,7 | 26,3 | 0,0 |
| | 1251,0 | 0,700 | 2840,0 | 299,4 | 0,0 | 82,3 | 17,7 | 0,0 |
| | 1501,0 | 0,700 | 3150,0 | 314,0 | 0,0 | 84,5 | 15,5 | 0,0 |
| 12A 30%BT | 968,5 | 0,882 | 3262,0 | 335,4 | 0,0 | 72,0 | 28,0 | 0,0 |
| | 1731,0 | 0,471 | 3100,0 | 263,8 | 0,0 | 87,5 | 12,5 | 0,0 |
| | 1207,0 | 0,711 | 2928,0 | 310,2 | 0,0 | 77,5 | 22,5 | 0,0 |
| 12B | 1499,0 | 0,600 | 1918,0 | 4633,0 | 240,2 | 67,8 | 21,0 | 11,3 |
| | 1436,0 | 0,600 | 3273,0 | 447,7 | 0,0 | 75,4 | 24,6 | 0,0 |
| | 1069,0 | 0,800 | 674,2 | 3902,0 | 0,0 | 50,5 | 49,5 | 0,0 |



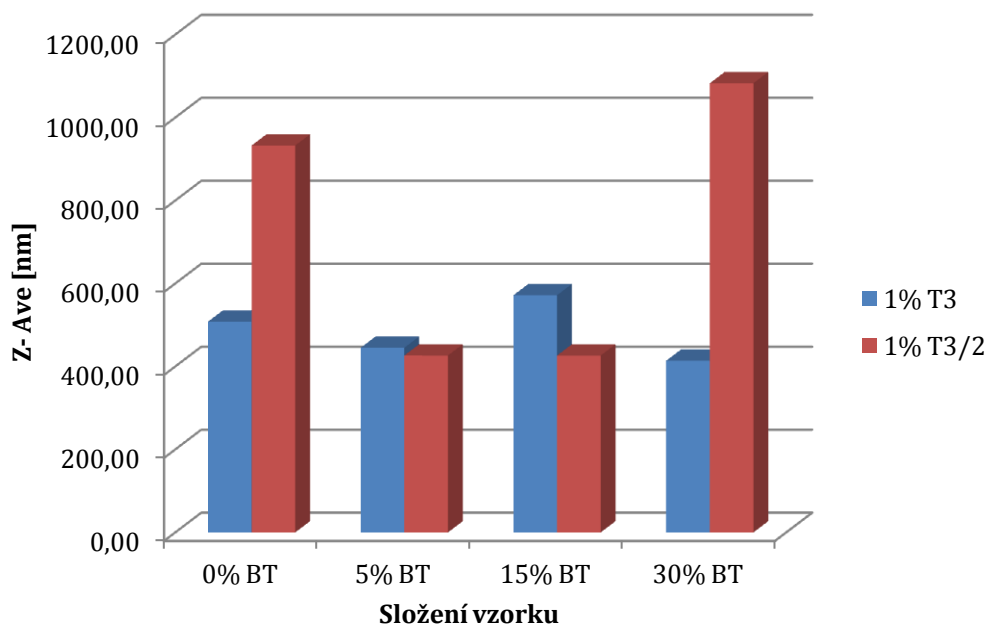
Obrázek 16 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT a koncentraci vnější fáze (Tab. 10, 11)

Tabulka 12 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. 1% polymer T3/2

| ČÍSLO VZORKU | Z- Ave | PdI | 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% BT | 779,9 | 0,216 | 776,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 990,0 | 0,056 | 1069 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1028 | 0,082 | 1113 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5% BT | 421,4 | 0,270 | 768,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 435,6 | 0,301 | 588,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 422,4 | 0,291 | 731,6 | 247,0 | 4998 | 62,5 | 35,4 | 2,1 |
| 10% BT | 435,0 | 0,266 | 535,5 | 4479 | 0,000 | 95,6 | 4,4 | 0,0 |
| | 436,6 | 0,368 | 563,3 | 5012 | 0,000 | 96,4 | 3,6 | 0,0 |
| | 440,3 | 0,391 | 1304 | 292,7 | 0,000 | 51,4 | 48,6 | 0,0 |
| 15% BT | 376,5 | 0,421 | 363,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 400,4 | 0,077 | 421,9 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 502,1 | 0,158 | 502,9 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 20% BT | 594,6 | 0,002 | 616,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 699,6 | 0,336 | 1084 | 143,4 | 0,000 | 89,2 | 10,8 | 0,0 |
| | 693,3 | 0,304 | 1053 | 156,2 | 0,000 | 89,0 | 11,0 | 0,0 |
| 30% BT | 1066 | 0,321 | 1503 | 172,5 | 0,000 | 93,1 | 6,9 | 0,0 |
| | 1108 | 0,317 | 1624 | 210,2 | 0,000 | 91,2 | 8,8 | 0,0 |
| | 1074 | 0,497 | 1890 | 195,3 | 0,000 | 89,9 | 10,1 | 0,0 |



Obrázek 17 Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci BT. (Tab. 12)



Obrázek 18 Velikost nanočástic. Srovnání T3 a T3/2. (Tab. 10 a 12)

7.4.4 Parametry nanočástic. Velikost nanočástic v závislosti na koncentraci terbinafinu a koncentraci cetrimidu ve vnější fázi. Zpracování částic s mannitolem.

7.4.4.1 0,05% cetrimid ve vnější fázi

Příprava nanočástic probíhala podle Přípravy nanočástic 1. (7.3.4). Na přípravu vzorků bylo jako vnější fáze použito 0,05% roztok cetrimidu. Jako vnitřní fáze byl použito 1% polymeru T3.

Tabulka 13 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 1%T3.

| ČÍSLO VZORKU | Z-Ave | PdI | 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%BT | 748,4 | 0,619 | 501,1 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 776,8 | 0,578 | 507,7 | 5162 | 0,000 | 81,8 | 18,2 | 0,0 |
| | 757,6 | 0,541 | 517,1 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5%BT | 709,0 | 0,116 | 767,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 786,4 | 0,081 | 803,2 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 896,7 | 0,122 | 959,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10%BT | 1130 | 0,290 | 1523 | 155,6 | 0,000 | 94,0 | 6,0 | 0,0 |
| | 1143 | 0,546 | 2110 | 238,3 | 0,000 | 86,8 | 13,2 | 0,0 |
| | 1399 | 0,676 | 3173 | 277,1 | 0,000 | 83,3 | 16,7 | 0,0 |
| 15%BT | 613,5 | 0,734 | 569,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 579,9 | 0,340 | 569,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 581,0 | 0,340 | 570,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 20%BT | 831,6 | 0,648 | 1182 | 266,0 | 5560 | 71,9 | 26,6 | 1,5 |
| | 1047 | 0,615 | 1120 | 249,0 | 0,000 | 69,1 | 30,9 | 0,0 |
| | 1076 | 0,498 | 1409 | 270,5 | 4922 | 70,7 | 17,6 | 11,7 |
| 30%BT | 1052 | 0,300 | 1620 | 304,3 | 0,000 | 87,6 | 12,4 | 0,0 |
| | 1035 | 0,422 | 1849 | 305,7 | 0,000 | 85,7 | 14,3 | 0,0 |
| | 1136 | 0,312 | 1681 | 232,8 | 0,000 | 91,6 | 8,4 | 0,0 |

Dále bylo postupováno podle Přípravy nanočástic 2. (7.3.4). Ke vzorkům z tabulky 12 byl přidán mannitol a byly uloženy do lednice a měřeny po 17ti hodinách. Pro srovnání byly do lednice uloženy a po 17ti hodinnách měřeny i vzorky bez mannitolu.

Tabulka 14 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 1%T3, s mannitolem, měřeno po 17 hodinách.

| ČÍSLO VZORKU | Z-Ave | PdI | 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 | % | % | % |
| 5%BT | 613,6 | 0,216 | 624,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 561,5 | 0,095 | 596,0 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 584,1 | 0,272 | 546,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5%BT s 10% mannitolu | 598,2 | 0,103 | 642,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 543,8 | 0,300 | 536,6 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 418,8 | 0,408 | 385,9 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 15%BT | 697,8 | 1,000 | 623,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 638,1 | 0,042 | 667,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 566,7 | 0,163 | 578,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 15%BT s 10% mannitolu | 604,8 | 0,334 | 656,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 657,6 | 0,377 | 605,6 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 793,8 | 0,338 | 703,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 30%BT | 960,2 | 0,563 | 1986 | 302,2 | 0,000 | 79,8 | 20,2 | 0,0 |
| | 972,5 | 0,487 | 2160 | 349,7 | 0,000 | 76,2 | 23,8 | 0,0 |
| | 1343 | 0,541 | 3678 | 700,7 | 0,000 | 55,4 | 44,6 | 0,0 |
| 30%BT s 10% mannitolu | 539,9 | 1,000 | 465,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 542,9 | 0,577 | 526,1 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 521,6 | 0,155 | 586,5 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |

Příprava nanočástic probíhala podle Přípravy nanočástic 1. (7.3.4). Na přípravu vzorků bylo jako vnější fáze použito 0,05% roztoku cetrimidu. Jako vnitřní fáze byl použit 3% polymeru T3.

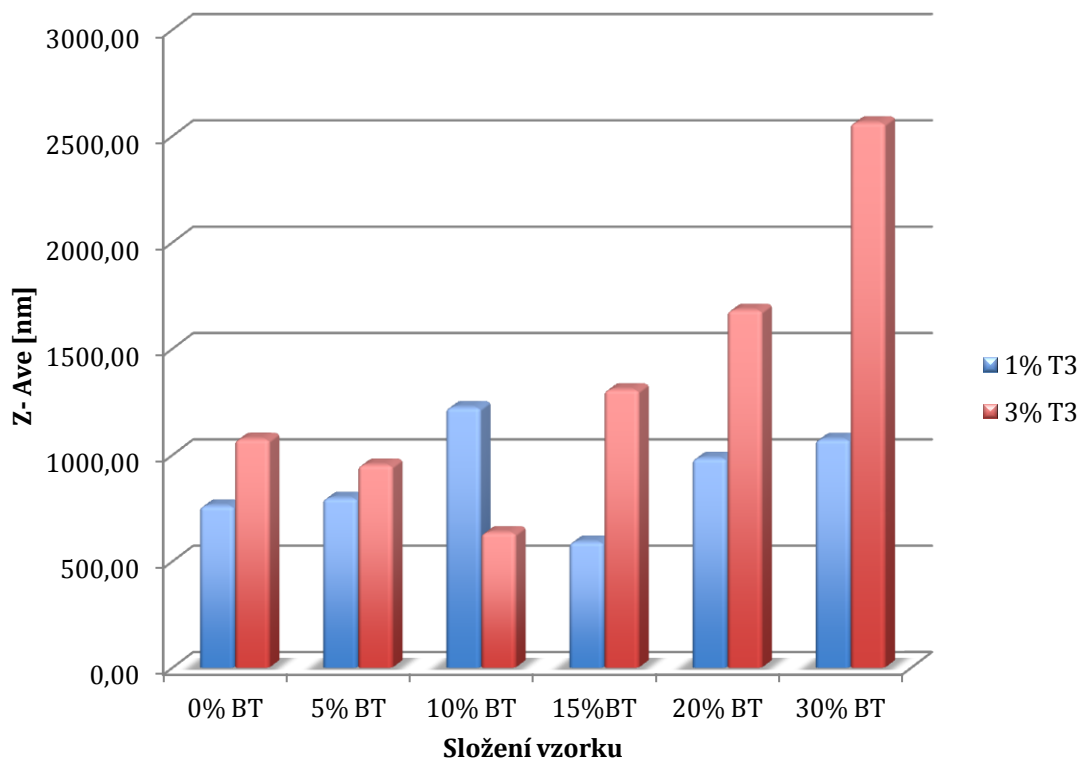
Tabulka 15 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 3%T3.

| ČÍSLO VZORKU | 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%BT | 911,0 | 0,101 | 925,7 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1126 | 0,064 | 1240 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 1188 | 0,245 | 1604 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5%BT | 1027 | 0,863 | 669,5 | 154,7 | 0,000 | 92,6 | 7,4 | 0,0 |
| | 844,8 | 0,799 | 432,9 | 5560 | 0,000 | 95,8 | 4,2 | 0,0 |
| | 987,6 | 0,653 | 630,3 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10%BT | 664,2 | 0,287 | 649,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 622,5 | 0,372 | 603,8 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 620,6 | 0,093 | 635,7 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| 15%BT | 1476 | 0,623 | 1078 | 230,6 | 0,000 | 90,7 | 9,3 | 0,0 |
| | 1509 | 0,783 | 842,0 | 184,2 | 5560 | 89,1 | 5,9 | 4,9 |
| | 937,3 | 0,589 | 886,8 | 264,0 | 0,000 | 75,2 | 24,8 | 0,0 |
| 20%BT | 2043 | 0,924 | 816,0 | 103,9 | 0,000 | 94,4 | 5,6 | 0,0 |
| | 1507 | 0,576 | 1989 | 279,5 | 0,000 | 81,7 | 18,3 | 0,0 |
| | 1495 | 0,980 | 913,6 | 249,9 | 0,000 | 83,1 | 16,9 | 0,0 |
| 30%BT | 2786 | 0,968 | 796,4 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 2355 | 0,786 | 870,1 | 0,000 | 0,000 | 100,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 2548 | 0,356 | 1579 | 160,9 | 0,000 | 94,9 | 5,1 | 0,0 |

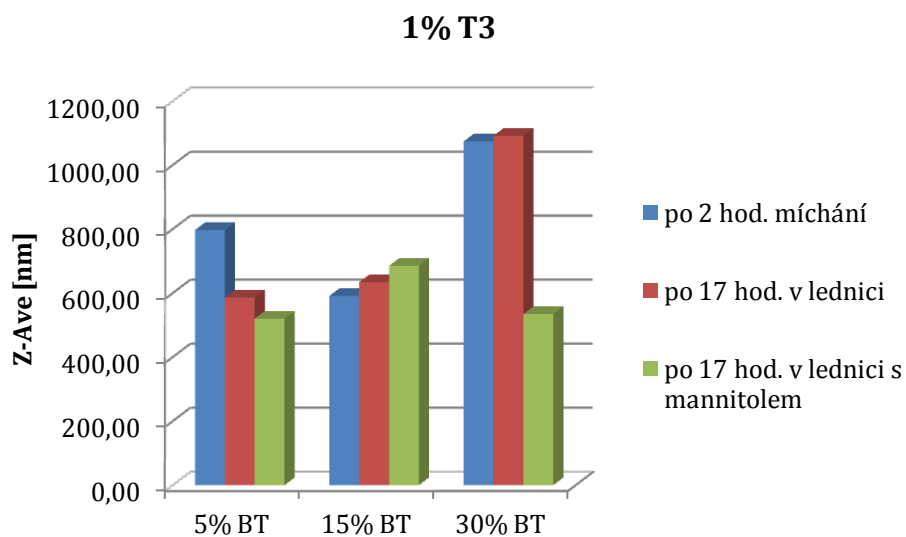
Dále bylo postupováno podle Přípravy nanočástic 2. (7.3.4). Ke vzorkům z tabulky 14 byl přidán mannitol a byly uloženy do lednice a měřeny po 17ti hodinách. Pro srovnání byly do lednice uloženy a po 17ti hodinnách měřeny i vzorky bez mannitolu.

Tabulka 16 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. 3%T3. S mannitolem. Měřeno po 17 hod.

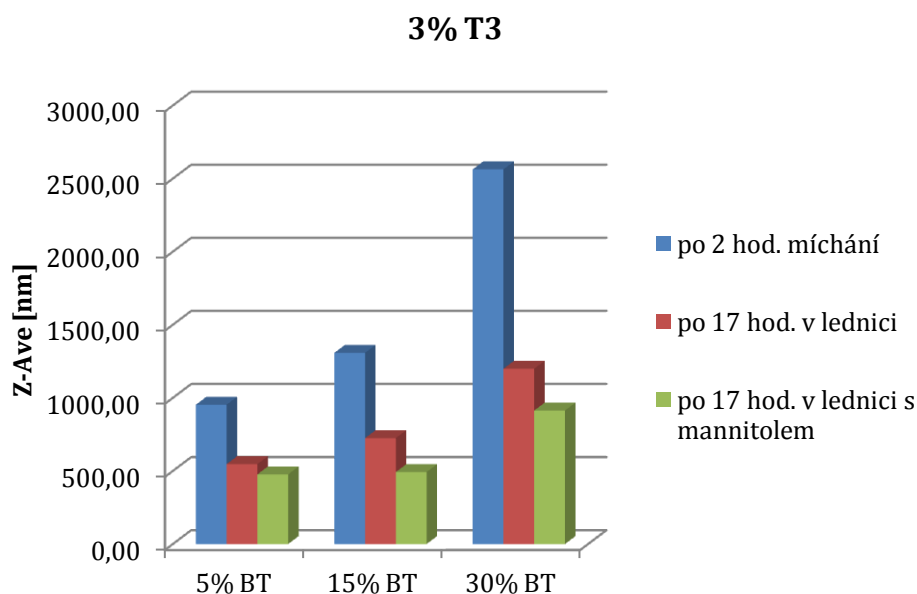
| ČÍSLO VZORKU | Z-Ave | PdI | Pk 1 Mean Int | Pk 2 Mean Int | Pk 3 Mean Int | Pk 1 Area Int | Pk 2 Area Int | Pk 3 Area Int |
|------------------------------|-------|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | d.nm | | d.nm | d.nm | d.nm | % | % | % |
| 5%BT | 643.3 | 0.319 | 670.1 | 5226 | 0 | 96.1 | 3.9 | 0 |
| | 529.6 | 0.291 | 818.3 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 467.8 | 0.261 | 766 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 5%BT s 10% mannitolu | 472.5 | 0.116 | 475.1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 485.9 | 0.08 | 519.7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 471.5 | 0.004 | 486.7 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 15%BT | 605.5 | 0.245 | 849.6 | 178.9 | 0 | 90.5 | 9.5 | 0 |
| | 856.2 | 0.441 | 1662 | 335.4 | 0 | 79.3 | 20.7 | 0 |
| | 711.9 | 0.403 | 643.5 | 3089 | 0 | 69 | 31 | 0 |
| 15%BT s 10% mannitolu | 591.9 | 0.335 | 573 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 474.7 | 0.208 | 475 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 409.2 | 0.352 | 409 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 30%BT | 1354 | 0.276 | 1921 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 1198 | 0.592 | 2708 | 380 | 0 | 78.3 | 21.7 | 0 |
| | 1046 | 0.666 | 1416 | 249.1 | 0 | 80.6 | 19.4 | 0 |
| 30%BT s 10% mannitolu | 956.3 | 0.247 | 1066 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 809.5 | 0.328 | 849 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 974.7 | 0.359 | 748.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |



Obrázek 19 Velikost nanočástic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. Srovnání 1% a 3% T3. (Tab. 13, 15)



Obrázek 20 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přísávkem mannitolu. (Tab. 13, 14)



Obrázek 21 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přidavkem mannitolu. (Tab. 15, 16)

7.4.4.2 0,8% cetrimidu ve vnější fázi

Příprava nanočástic probíhala podle Přípravy nanočástic 1. (7.3.4). Na přípravu vzorků bylo jako vnější fáze 0,8% roztok cetrimidu. Jako vnitřní fáze byl použit 1% polymer T3.

Tabulka 17 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimid ve vnější fázi. 1% T3.

| VZOREK | Z-Ave | PdI | 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 | 691.5 | 0.326 | 1099 | 237.3 | 0 | 85.1 | 14.9 | 0 |
| | 711 | 0.265 | 1088 | 263.2 | 0 | 84.9 | 15.1 | 0 |
| | 700.5 | 0.24 | 957.4 | 163.7 | 0 | 92.2 | 7.8 | 0 |
| 5%TB | 646.6 | 0.374 | 747.6 | 216.5 | 5176 | 83.3 | 11.7 | 5.1 |
| | 659.6 | 0.364 | 720.7 | 5075 | 140.5 | 87.4 | 6.4 | 6.2 |
| | 642.4 | 0.488 | 1659 | 290.4 | 0 | 67.4 | 32.6 | 0 |
| 15%TB | 728.9 | 0.303 | 635.3 | 5560 | 0 | 98.5 | 1.5 | 0 |
| | 751.4 | 0.394 | 589.9 | 5326 | 0 | 93.1 | 6.9 | 0 |
| | 771.9 | 0.409 | 708.5 | 162.1 | 5356 | 86.6 | 7.4 | 6 |
| 30%TB | 704.3 | 0.691 | 360.4 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 670.9 | 0.842 | 330.1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 620.8 | 0.738 | 333 | 5454 | 0 | 89.1 | 10.9 | 0 |

Dále bylo postupováno podle Přípravy nanočástic 2. (7.3.4). Ke vzorkům z tabulky 17 byl přidán mannitol a byly uloženy do lednice a měřeny po 17ti hodinách. Pro srovnání byly do lednice uloženy a po 17ti hodinnách měřeny i vzorky bez mannitolu.

Tabulka 18 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimid ve vnější fázi. 1%T3. Zpracování s mannitolem.

| ČÍSLO VZORKU | Z-Ave | PdI | 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 | % | % | % |
| 5%TB | 425.1 | 0.194 | 465.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 526.5 | 0.176 | 487.9 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 510.2 | 0.31 | 448.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 5%TB s mannitolem | 576.5 | 0.13 | 614.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 575.9 | 0.423 | 449 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 612.5 | 0.285 | 563.6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 15%TB | 800.3 | 0.313 | 1242 | 206.4 | 0 | 91.4 | 8.6 | 0 |
| | 828.8 | 0.372 | 1180 | 4848 | 0 | 94.8 | 5.2 | 0 |
| | 723.7 | 0.244 | 1015 | 216.1 | 0 | 92 | 8 | 0 |
| 15%TB s mannitolem | 518.7 | 0.209 | 562.5 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 509.9 | 0.192 | 555.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 521.8 | 0.155 | 561.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 30%TB | 1178 | 0.751 | 393.4 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 1104 | 0.661 | 480.6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 1114 | 0.653 | 475.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 30%TB s mannitolem | 401.3 | 0.268 | 417.9 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 447.1 | 0.028 | 461.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 376.6 | 0.198 | 410 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |

Příprava nanočástic probíhala podle Přípravy nanočástic 1. (7.3.4). Na přípravu vzorků bylo jako vnější fáze 0,8% roztok cetrimidu. Jako vnitřní fáze byl použit 3% polymer T3.

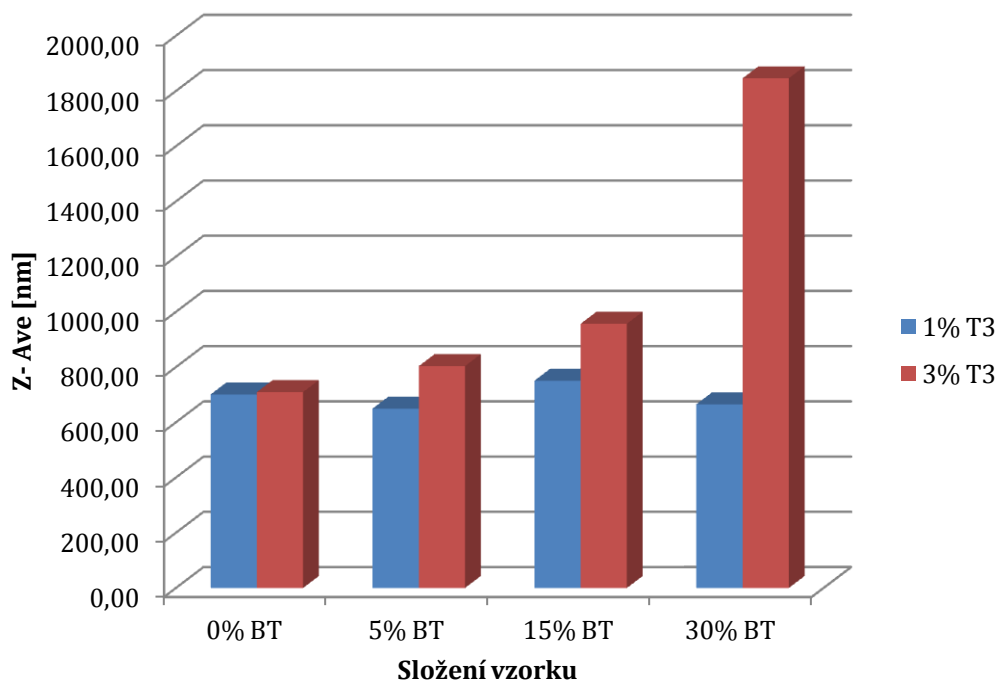
Tabulka 19 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimid ve vnější fázi. 3%T3.

| ČÍSLO VZORKU | Z- Ave | PdI | 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%BT | 698.2 | 0.281 | 1148 | 315.6 | 0 | 78.8 | 21.2 | 0 |
| | 714.9 | 0.322 | 1471 | 359.4 | 0 | 68.3 | 31.7 | 0 |
| | 715.2 | 0.447 | 1591 | 299 | 0 | 71.6 | 28.4 | 0 |
| 5%BT | 981.2 | 0.64 | 2362 | 298.5 | 0 | 78 | 22 | 0 |
| | 765.7 | 0.433 | 1258 | 255.8 | 0 | 76.6 | 23.4 | 0 |
| | 663.4 | 0.483 | 1633 | 304.3 | 0 | 70.5 | 29.5 | 0 |
| 15%BT 1.opakování | 971.3 | 0.443 | 651 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 949.2 | 0.616 | 541.6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 950.9 | 0.574 | 554.1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 15%BT 2.opakování | 943 | 0.314 | 1467 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 964.6 | 0.456 | 1640 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 937.3 | 0.475 | 1665 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 30%BT | 1721 | 0.426 | 2663 | 212.7 | 0 | 93.1 | 6.9 | 0 |
| | - | 0.637 | 38.13 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 1971 | 0.479 | 3063 | 196.1 | 0 | 92.8 | 7.2 | 0 |

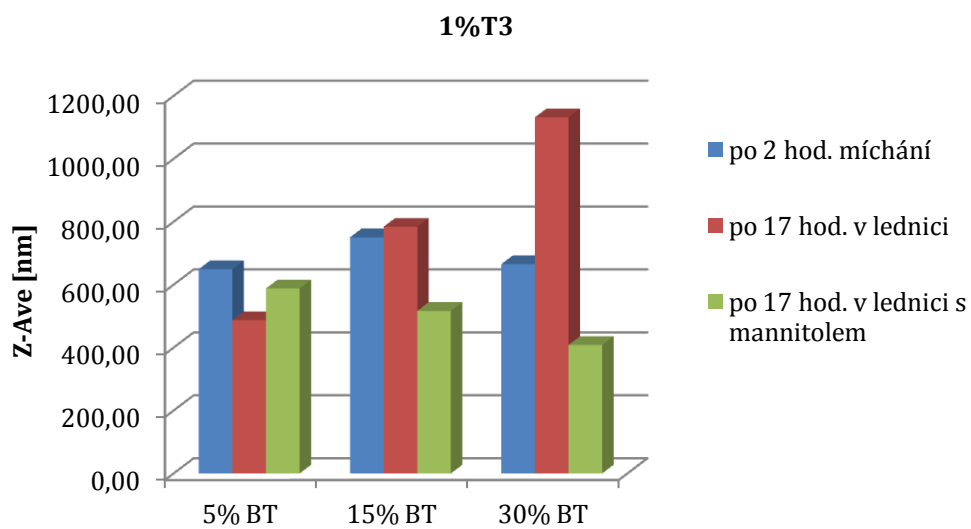
Dále bylo postupováno podle Přípravy nanočástic 2. (7.3.4). Ke vzorkům z tabulky 19 byl přidán mannitol a byly uloženy do lednice a měřeny po 17ti hodinách. Pro srovnání byly do lednice uloženy a po 17ti hodinnách měřeny i vzorky bez mannitolu.

Tabulka 20 Velikost nanočástic, 0,8% cetrimid ve vnější fázi, zpracování s mannitolem.

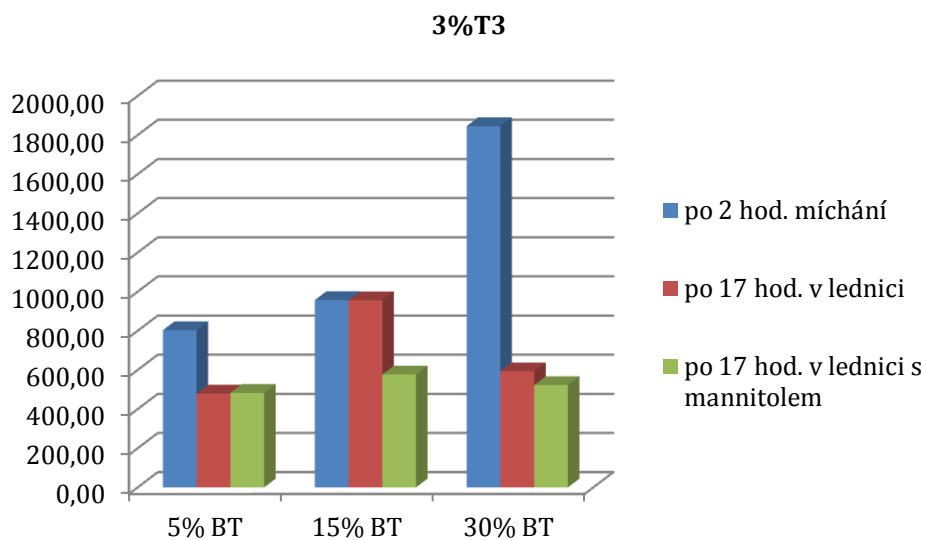
| ČÍSLO VZORKU | Z- Ave | PdI | Pk 1 Mean Int | Pk 2 Mean Int | Pk 3 Mean Int | Pk 1 Area Int | Pk 2 Area Int | Pk 3 Area Int |
|---|-----------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | d.nm | | d.nm | d.nm | d.nm | % | % | % |
| 5%TB | 502.1 | 0.201 | 554.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 469.6 | 0.196 | 519.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 466.4 | 0.073 | 500.3 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 5%TB s mannitolem | 444.2 | 0.254 | 494.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 562 | 0.188 | 613.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 443.7 | 0.304 | 461 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 15%TB 1.opakování | 940.7 | 1 | 3940 | 339.9 | 0 | 70.6 | 29.4 | 0 |
| | 2640 | 0.727 | 5270 | 244.1 | 0 | 71.1 | 28.9 | 0 |
| | 3198 | 0.557 | 5335 | 349.9 | 0 | 63.9 | 36.1 | 0 |
| 15%TB s mannitolem 1.opakování | 4828 | 0.256 | 5287 | 280.8 | 0 | 86.5 | 13.5 | 0 |
| | 5479 | 0.079 | 5395 | 179.2 | 0 | 84.9 | 15.1 | 0 |
| | 7002 | 0.228 | 247.6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 15%TB 2.opakování | 486.2 | 0.096 | 464.4 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 614.9 | 0.929 | 378.4 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 701 | 0.081 | 469.6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 15%TB s mannitolem 2.opakování | 598.2 | 1 | 319.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 423.3 | 0.538 | 320.9 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 547.1 | 1 | 300.9 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 30%TB | 518.1 | 0.375 | 396.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 523.6 | 0.342 | 458.6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 503.7 | 0.235 | 473.3 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| 30%TB s mannitolem | 551.8 | 0.06 | 538.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 545.6 | 0.128 | 487.1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| | 535.8 | 0.034 | 557.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |



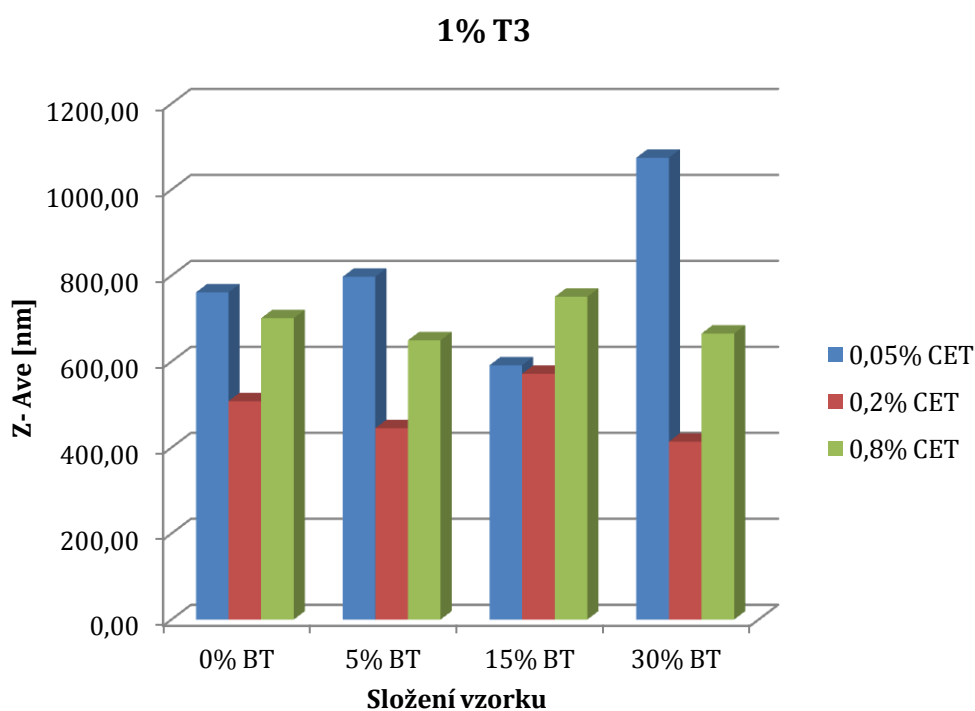
Obrázek 22 Velikost částic. 0,05% cetrimid ve vnější fázi. Srovnání 1% T3 a 3% T3. (Tab. 17, 19)



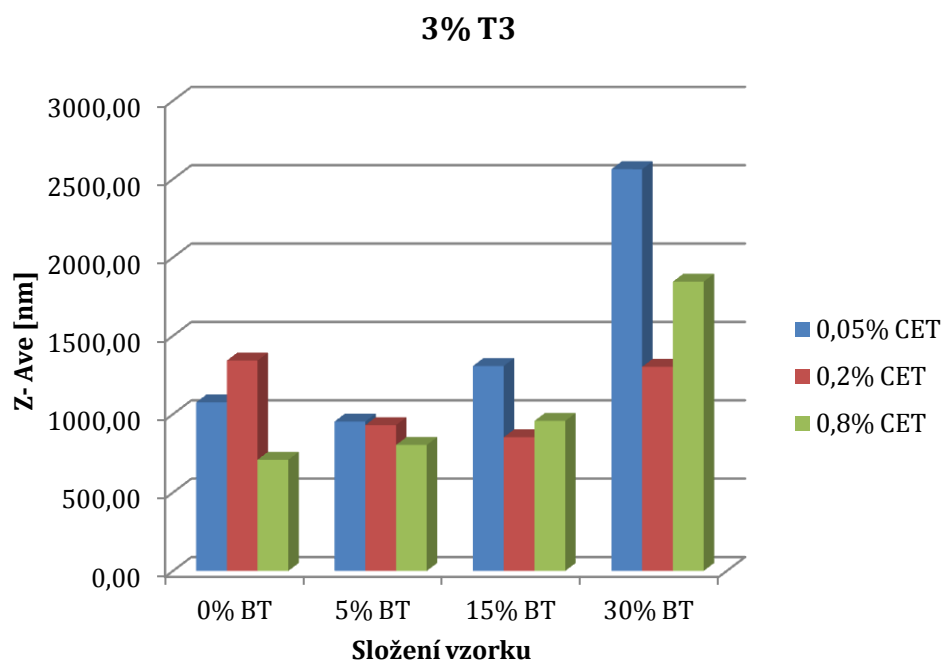
Obrázek 23 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimidu ve vnější fázi. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přísávkem mannitolu. (Tab 17, 18)



Obrázek 24 Velikost nanočástic. 0,8% cetrimidu ve vnější fázi. Srovnání vzorků po 2 hodinách míchání, po 17 hodinách v lednici bez a s přidavkem mannitolu. (Tab 19, 20)



Obrázek 25 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků s 0,05%, 0,2% a 0,8% cetrimidu ve vnější fázi (Tab. 10, 13, 17)



Obrázek 26 Velikost nanočástic. Srovnání vzorků s 0,05%, 0,2% a 0,8% cetrimidu ve vnější fázi (Tab. 11, 15, 19)

8 Diskuze

8.1 K zaměření práce

Diplomová práce je zaměřená experimentálně. Téma bylo formulováno v návaznosti na dosavadní výsledky studia procesu přípravy nanočásticových biodegradabilních systémů emulzní metodou dosažené na pracovišti školitele. Jako modelová léčivá látka vhodná pro formulaci nanočásticových systémů bylo zadáno antimykotikum terbinafin. Jako nosič byly využity různé alifatické oligoestery a polyestery s lineární a větvenou konstitucí molekuly. Osvědčily se především polymery s větvenými molekulami. V práci byl využit terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu. K dispozici byly dva vzorky, které se lišily parametry molekulové hmotnosti. Z řady rozpouštědel byl vybrán jako nejvhodnější ethylmethylketon. Důvodem byly jednak velmi dobré parametry velikosti nanočástic a mikročástic, jednak dobrá biokompatibilita sloučeniny. Již dříve byl na pracovišti školitele získán překvapivý poznatek o příznivé účinnosti emulgačního procesu v soustavě o/v za použití cetrimidu jako emulgátoru. Proto byla tato lékopisná substance využita v této práci. Byly vyzkoušeny tři její velmi odlišné koncentrace. Při dalším zpracování nanodisperzí je nutné zohlednit vliv doby působení vnější vodné fáze na hydrolyticky labilní nosič a případně i na léčivo inkorporované do nanočástic.

Z praktického hlediska má proces přípravy nanočástic emulzní metodou význam pouze v případě využití vhodné metody dalšího zpracování nanodisperze. V úvahu přicházejí dvě možnosti, klasická je časově náročná metoda lyofilizace. Výhodnější je metoda sprejového sušení, která je použitelná pouze v případě dostatečné stability nosiče a léčiva. Byla vyzkoušena možnost uchovávání nanodisperzí při snížené teplotě nebo po přidání osmoticky aktivního mannitolu. Měřenou charakteristikou byla distribuce velikosti částic. Granulometrický popis nanočástic má značnou důležitost z hlediska předpokladů pro dostatečnou biodostupnost léčivých látek.

8.2 K vlivu hydrodynamických parametrů a koncentrace emulze na velikost částic

Experiment byl naplánován jako pilotní pro získání informace o vlivu objemu disperzní soustavy a koncentrace emulze na granulometrické parametry disperze. Výsledky měření jsou v tab. 7 a na obr. 9 až 14. Bylo prokázáno, že ve všech případech převažovaly submikronové částice s malými rozdíly v hodnotách intenzitního průměru. Vzorky se lišily polydisperzitou, značně odlišný je vzorek připravený v menším objemu při nižší koncentraci emulze (obr. 11). Tento výsledek odporuje předpokladům. Je možné se domnívat, že se jedná o nestandardní postup patrně ovlivněný odlišným umístěním dispergačního nástavce v nádobě s důsledkem v nadměrné tvorbě pěny.

8.3 K vlivu koncentrace emulze, nosiče a léčivé látky na velikost částic

Bylo připraveno 8 vzorků, které se lišily třemi parametry. Výsledky měření velikosti částic jsou v tabulce 9 a na obr. 15. Je možno vyvodit závěr o velmi dobré reprodukovatelnosti procesu přípravy z hlediska granulometrické charakteristiky. Koncentrace emulze ani koncentrace roztoku nosiče neměla vliv na velikost nanočástic. Výjimkou je soustava s vyšší koncentrací nosiče a s 30% obsahem terbinafinu. V tomto uspořádání byly získány mikročástice nadmikronové střední velikosti. Je možno se domnívat, že mezi polymerem a terbinafinem dochází k interakci. Aminoskupina v bazi terbinafinu patrně interaguje s opačně nabitým koncovým karboxylem. Důsledkem může být zvýšení viskozity slabými silami síťované soustavy.

8.4 K vlivu koncentrace léčivé látky na velikost částic při různé koncentraci roztoku nosiče

Výsledky měření velikosti částic jsou v tabulkách 10 a 11. Týkají se dvou řad po pěti hodnotách z navážek terbinafinu. Navážky odpovídají rozmezí od 0 % do 30 % koncentrace léčivé látky obsažené v hotových částicích. To platí za předpokladu, že nedochází k žádným ztrátám léčivé látky ani nosiče v procesu přípravy částic. Jednotlivé řady vzorků se lišily koncentrací roztoku nosiče a léčivé látky ve vnitřní fázi nosiče na začátku procesu dispergace.

V tabulkách 10 a 11 a na obr. 16 jsou výsledky měření velikosti částic. Je patrné, že z 1% roztoku ve vnitřní fázi a 0,2% roztoku emulgátoru byly očekávaně získány

menší částice než z 3% roztoku. Vliv stoupající koncentrace terbinafinu v případě použití 1% roztoku ve vnitřní fázi se prakticky neprojevil, byl ovlivněn poměrně malou variabilitou dvou opakovaných vzorků s náznakem vzrůstu velikosti s koncentrací léčivé látky. Velikost nanočástic prezentovaná formou intenzitního průměru byla mezi 400 nm a 500 nm.

V případě trojnásobné koncentrace složek rozpuštěných ve vnitřní fázi (3 %) byly připraveny větší částice s větší variabilitou hodnot středního intenzitního průměru. Hodnota charakteristiky se pohybovala od 700 nm do 1200 nm. V tomto případě je také možno předpokládat tendenci k větší velikosti částic se stoupající koncentrací terbinafinu. Výrazně větší byly nanočástice s nejvyšší, 30% koncentrací léčivé látky, které byly v průměru větší než 1200 nm. Jednalo patrně o interakci rozpuštěného terbinafinu s nosičem rezultující ve zvýšené viskozitě vnitřní fáze emulze.

8.5 K vlivu molekulové hmotnosti nosiče a koncentrace léčivé látky na velikost částic

Kromě nosiče s vyšší molekulovou hmotností byl také vyzkoušen nosič, který měl molekulovou hmotnost M_w přibližně o třetinu nižší a hodnotu M_n asi dvaapůlkrát nižší. Vnitřní fáze obsahovala 1% koncentraci roztoku nosiče. Výsledky měření jsou v tabulkách 10 a 12 a na obrázcích 17 a 18. Jako pozoruhodný výsledek je možno pokládat podstatně vyšší hodnoty charakteristiky velikosti v případě použití nížemolekulárního nosiče v případě samotného polymeru a polymeru s 30% bazí terbinafinu. Jako pracovní hypotéza se nabízí odlišná kompozice větvených a lineárních molekul v těchto nosičích. Tento výsledek bude nutno podpořit opakováním experimentu.

8.6 K vlivu koncentrace léčivé látky při snížené koncentraci emulgátoru na velikost částic

V předešlé části jsou diskutovány výsledky měření velikosti částic připravených v 0,2% cetrimidu. Tato koncentrace emulgátoru byla dříve nalezena jako optimální. Jako dostatečně účinná při nižší stabilitě byla dříve prokázána 0,05% koncentrace cetrimidu. Snížení koncentrace emulgátoru má význam z hlediska snížení pravděpodobnosti jeho

inkorporace do mikročástic a snížení pravděpodobnosti vyvolání změn parametrů částic včetně možných inkompatibilit.

Pro posouzení vlivu stoupající koncentrace léčivé látky ve vnitřní fázi emulze s nízkou koncentrací emulgátoru byla použita 1% (tabulka 13) a 3% (tabulka 15) koncentrace nosiče v ethylmethyketonu. Grafický záznam průměrových hodnot je na obr. 19. V případě 3% roztoků nosiče došlo ke zřetelnému vlivu stoupající koncentrace terbinafinu na zvýšení hodnot intenzitního průměru nanočástic. Tento celkový trend není jednoznačný, mezi 5% a 10% koncentrací léčivé látky došlo ke snížení hodnot středního průměru. Při 15% koncentraci léčivé látky střední rozměr přesáhl hranici jednoho mikrometru. V případě 1% roztoku nosiče nebyl prokázán jednoznačný vliv stoupající koncentrace léčivé látky na změnu velikosti nanočástic v submikronové oblasti. Celková situace v celém souboru s 0,05% emulgátorem je obdobná jako v případě vyšší, 0,2% koncentrace cetrimidu, rozdíl je ve vyšší účinnosti této vyšší koncentrace při dispergaci projevující se menším rozměrem částic, jak je patrné srovnáním obr. 19 a obr. 16.

8.7 K vlivu podmínek uchovávání při různé koncentraci vnitřní fáze a léčivé látky při snížené koncentraci emulgátoru na velikost částic

Účelem bylo zjistit, jestli při krátkodobém uchovávání disperzí částic dochází ke změnám velikostních parametrů částic. Z případných změn je možno usuzovat na jejich příčiny s možnostmi jejich ovlivnění. Jako stabilizační faktory byly vyzkoušeny snížená teplota umístěním vzorků v lednici a snížená teplota kombinovaná přísadou 10% mannitolu jako osmoticky aktivního agens. Všechny vzorky v rámci tohoto bloku byly připraveny při využití extrémně nízké, tedy 0,05% koncentrace cetrimidu jako emulgátoru.

Výsledky měření jsou v tab. 13, 14, 15 a 16 a na obr. 20 a 21. Bylo prokázáno, že v případě 3% koncentrace nosiče ve vnitřní fázi (obr. 21) dochází jednoznačně ke zmenšení částic po jejich uchovávání za snížené teploty. Příčinou může být dokončení rozdělování rozpouštědla polymeru do vnější fáze a snížení stupně bobtnání. Po přidání mannitolu je tento proces zmenšování částic ještě výraznější pro všechny tři koncentrace terbinafinu, tedy 5%, 15% a 30%. V případě nanočástic připravených z 1% vnitřní fáze je situace méně přehledná především z důvodu neúčinného stabilizačního

opatření ochlazením částic s 15% a 30% terbinafinem (obr. 20). V případě nanočástic 15 % terbinafinem se osmotické působení mannitolu tako neprojeví pozitivně. Vysvětlením může být podlimitní velikost nanočástic. Tuto hypotézu by bylo nutno potvrdit nebo vyvrátit opakováním experimentu. Celkově je možno zhodnotit mannitol jako složku, která v kombinaci se sníženou teplotou uchovávání vzorků je velmi dobrým stabilizátorem agregátního stavu disperzí částic větších než 600 μm .

8.8 K vlivu koncentrace léčivé látky při zvýšené koncentraci emulgátoru na velikost částic

Pro rozšíření znalostí o vlivu cetrimidu jako emulgátoru na granulometrické parametry částic byla vyzkoušena jeho 0,8% koncentrace, která byla 16krát vyšší než minimální. V tabulkách 17 a 19 a na obr. 22 jsou hodnoty intenzitního průměru vzorků se stoupající koncentrací terbinafinu připravených z vnitřní fáze, která měla dvě úrovně koncentrace nosiče. Je patrné, že při nižší (1%) koncentraci vnitřní fáze se neprojevil vliv stoupající koncentrace terbinafinu až do její 30% úrovně. Jinak tomu bylo v případě vyšší (3%) koncentrace nosiče. V rozmezí do 15% koncentrace terbinafinu velikost částic mírně stoupala. Při 30% koncentraci byla vyvolána silná interakce mezi nosičem a léčivou látkou, která se projevila dvojnásobným vzrůstem hodnoty intenzitního průměru.

8.9 K vlivu podmínek uchovávání při různé koncentraci vnitřní fáze a léčivé látky při zvýšené koncentraci emulgátoru na velikost částic

Byly zvoleny stejné podmínky uchovávání vzorků jako v případě experimentálního bloku diskutovaného v části 8.6. Porovnáním obr. 23 a 24 zřetelně plynou některé odlišnosti ve vlivu stoupající koncentrace terbinafinu na velikost částic při různé vstupní koncentraci vnitřní fáze. V případě dispergace 1% vnitřní fáze a uchováváním při snížené teplotě se vzrůstající koncentrace léčivé látky projeví zvětšováním velikosti částic. Pokud se za stejných podmínek přidá do vnější fáze 10% mannitol, je tendence opačná, tedy se vzrůstem koncentrace mannitolu se částice zmenšují (obr. 23).

Při 3% koncentraci vnitřní fáze (obr. 24) není tendence vlivu koncentrace terbinafinu jednoznačná, stejně tak je tomu po přidání mannitolu. Výrazný je vliv

uchovávání disperze částic při snížené teplotě na jejich zmenšování a ještě větší je tento vliv po přidání mannitolu. Mannitol je aditivum, které se projevilo významně z hlediska stabilizace velikosti a agregátového stavu částic nosiče s terbinafinem.

8.10 K vlivu koncentrace emulgátoru při různé koncentraci vnitřní fáze a léčivé látky na velikost částic

Hlavním faktorem byl v tomto bloku vliv koncentrace cetrimidu na velikost nanočástic. Příliš nízká koncentrace emulgátoru může vést k nestabilitě disperze, jeho příliš vysoká koncentrace může vést ke zvýšení tendence k mísení emulgátoru s nosičem a k nestandardním parametrům částic. V této studii byl jako jediný parametr kvality částic hodnocen jejich intenzitní průměr.

Z obr. 25 (tab. 10, 13 a 17) je patrné, že při přípravě částic z 1% vnitřní fáze byly za stejných podmínek připraveny jednoznačně nejmenší za použití 0,2% koncentrace emulgátoru. Potvrdily se tak již dříve dosažené výsledky. Jako pozitivní skutečnost je možno hodnotit jednak jejich velikost mezi 400 nm a 500 nm a také malý vliv změny koncentrace terbinafinu na jejich velikost. Při 0,8% koncentraci cetrimidu také nebyl prokázán vliv koncentrace cetrimidu, částice byly asi o 100 nm větší. Při využití cetrimidu v 0,05% koncentraci bylo kolísání velikosti nanočástic při různé koncentraci léčivé látky značné, byly prokázány tendence k zvětšování částic se stoupající koncentrací terbinafinu, obdobně s výsledky diskutovanými v části 8.5.

Poněkud odlišná je situace v případě velikosti částic připravených dispergací vnitřní fáze v 3% koncentraci (tab. 11, 15 a 19, obr. 26). Jednoznačný vliv stoupající koncentrace terbinafinu na zvětšování nanočástic byl prokázán při použití 0,05% emulgátoru a také v soustavě s 0,8% emulgátorem, nevýrazný vliv byl u soustavy s 0,2% emulgátorem. Jako nestandardní z hlediska granulometrického byla v tomto případě kompozice s 30% obsahem terbinafinu.

9 Závěry

- A. Bylo prokázáno, že emulzní metoda za použití biodegradabilního alifatického polyesteru s větvenou konstitucí molekuly rozpuštěného v ethylmethyketonu ve vnitřní fázi a roztoku cetyl trimethylamonium bromidu jako emulgátoru ve vnější fázi je vhodnou metodou pro přípravu nanočástic a mikročástic.
- B. Metoda je vhodná pro inkorporaci terbinafinu do polyesterových částic v maximální koncentraci 30 procent.
- C. Nejvhodnější koncentrace emulgátoru ve vnější fázi byla v oblasti desetin procenta.
- D. Zvýšení koncentrace vnitřní fáze z 1 % na 3 % má vliv na zvýšení střední hodnoty intenzitního průměru částic vlivem zvýšené viskozity.
- E. Zvyšování velikosti částic se zvyšováním koncentrace terbinafinu může být důsledkem interakce aminoskupiny terbinafinu a karboxylové skupiny nosiče s důsledkem ve zvýšení viskozity vnitřní fáze emulze.
- F. Mezi koncentrací nosiče a koncentrací terbinafinu se z hlediska velikosti částic projevují interakce prvního řádu.
- G. Molekulová hmotnost nosiče není jediným parametrem, který ovlivňuje velikost částic, důležitý je také stupeň větvení a podíl lineárních molekul.
- H. Stabilizace částic připravených optimalizovanou emulzní metodou za daných podmínek probíhá po několik hodin, výhodná je snížená teplota a přísada mannitolu.

10 Literatura

1. Yash Nanotech, India (2006) From <http://www.yashnanotech.com/nanotech.php>.
2. Anon. , Nano application (2005-2006) From <http://www.yashnanotech.com/nano-application.php.India>.
3. 3, A. M. Lowman, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6 (2002) 319-327.
4. H. Hillaireau, P. Couvreur, Nanocarriers' entry into cell : relevance to drug delivery, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2873-2896.
5. A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75 (2010) 1- 18.
6. E.M. Liversidge, G.G. Liversidge, and E.R. Cooper, Nanosizing: A Formulation Approach for Poorly Water-Soluble Compounds, *Eur.J.Pharm.Sci.* (2003) 18, 113-120.
7. G.G. Liversidge and K.C. Cundy, Particle Size Reduction for Improvement of Oral Bioavailability of Hydrophobic Drugs, *Int. J. Pharm.* (1995) 125, 91-97.
8. R.H. Muller, B.H.L. Bohm, Nanosuspensions in Emulsions & Nanosuspension For Formulation of Poorly Soluble Drugs (1998) 149-174.
9. Muller et al., Pharmaceutical Nanosuspensions for Medicament Administration as Systems with Increased Saturation Solubility and Rate of Solution, US patent 5,858,410 (1999).
10. K.P. Klause and R.H. Muller, Production and Charakterization of Highly Concentrated Nanosuspensions by High Pressure Homogenization, *Int. J. Pharm.* (2001) 214, 21-24.
11. C. Jacobs, O. Kayser, and R.H. Muller, Nanosuspensions as a New Approach for the Formulation for the the Poorly Soluble Drug Tarazepide, *Int. J. Pharm.* (2000) 196, 161-164.
12. Lopez -Quintela M.A & Rivas J, J. *Colloid. Interface Sci.* (1993) 158, 446
13. R.O. Williams et al, Process for Production of Nanoparticles and Micro particles by Spray Freezing in to Liquid, US Patent 6, 862, 890 (2005).
14. T.L. Rodgers et al, A Novel Particle Engineering Technology: Spray Freezing in to Liquid, *Int. J. Pharm.* (2002) 242, 93-100.

15. T.L.Rogers et al, Enhanced Aqueous Dissolution of a Poorly Water-Soluble Drug by Novel Particle Engineering Technology: Spray Freezing in Liquid with Atmospheric Freeze-Drying, *Pharm. Res.* (2003) 20, 485-493.
16. J.Hu, K.P. Johnston, and R.O. Williams III, Rapid Dissolving High Potency Danazol Powders Produced by Spray Freezing into Liquid Process, *Int. J. Pharm.* (2001) 271, 145-154.
17. J. Hu, K.P. Johnston, and R.O. Williams, Spray Freezing into Liquid (SFL) Particle Engineering Technology to Enhance Dissolution of Poorly Water Soluble Drugs: Organic Solvent vs. Aqueous-Organic Co-solvent Systems, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2003) 20, 295-303.
18. X. Chen et al., Preparation of Cyclosporine A Nanoparticles by Evaporative Precipitation into Aqueous Solution, *Int. J. Pharm.* (2002) 242, 3-14.
19. M. Sarkari et al., Enhancer Drug Dissolution Using Evaporative Precipitation into Aqueous Solution, *Int. J. Pharm.* (2002) 243, 17-31.
20. X. Chen, R.O. Williams, and K.P. Johnston, Rapid Dissolution of High Potency Danazol Powders Produced by Evaporative Precipitation into Aqueous Solution, *J.Pharm. Sci.* (2004) 93, 1867-1878.
21. J.M. Vaughn et al, Comparison of Powder Produced by Evaporative Precipitation into Aqueous Solution (EPAS) and Spray Freezing into Liquid (SFL) Technologies Using Novel Z-contrast STEM and Complimentary Technoques, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2005) 60, 81-89.
22. T.J Young et al, Encapsulation of Lysozyme in Biodegradable Polymer by Precipitation with a Vapor-Over-Liquid Antisolvent, *J. Pharm. Sci* (2000) 88, 640 - 650.
23. M. Turk et al, Micronization of Pharmaceutical Substances by Rapid Expansion of Supercritical Solutions (REES): A Promising Method to Improve Bioavailability of Poorly Soluble Pharmaceutical Agents, *J. Supercrit. Fluids* (2002) 22, 7544-84.
24. T.J. Young et al, Rapid expansion from Supercritical to Aqueous Solution to Produce Submicron Suspensions of Water-Insoluble Drugs, *Biotechnol. Prog.* (2000) 16, 402-407.
25. G.W. Pace et al, Processes to Generate Submicron Particles of Water-Insoluble Compounds, *US Patent* 6, 177, 103 (2001).

26. Kreuter J. Nanoparticle-based drug-delivery systems. *J Control Rel.* (1991) 16, 169-176.
27. Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* (2007) 32, 762-798.
28. Anderson, J.M.; Shive, M.S. Biodegradation and biokompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1997) 28, 5-24.
29. S. Acharya, S.K. Sahoo, PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 170-183.
30. D.E. Owens III, N.A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 307 (2006) 93-102.
31. T. Betancourt, J.D. Byrne, N. Sunaryo, S.W. Crowder, M. Kadapakkam, S. Patel, S. Casciato, L. Brannon-Peppas, PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles, *J. Biomed. Mater. Res.* 91A (2009) 263-276.
32. C. Forged, B. Brodin, S. Frokjaer, A. Sundblad, Particle size and surface change affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model, *Int. J. Pharm.* 298 (2005) 315-322.
33. J.K. Vasir, V. Labhsetwar, Quantification of force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles, *Biomaterials* 29 (2008) 4244-4252.
34. C. Fonseca, S. Simoes, R. Gaspar, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity, *J. Control. Release* 83.
35. K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control. Release* 70 (2001) 1-20.
36. M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie, Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 1-9.
37. <http://www.pharmainfo.net/nanoparticles>.
38. http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Polyethylene_glycol.png.

39. <http://www.pharmainfo.net/reviews/mucosal-immunization-and-use-plga-carrier>.
40. C. Fonseca, S. Somoos, R. Gaspar, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity, *J. Control, Release* 83 (2002) 273-286.
41. K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties, *J. Control. Release* 79 (2002) 123-135.
42. A. Budhian, S.J. Siegel, K.I. Winey, Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol, *J. Microencapsul.* 22 (2005) 773-785.
43. M. Van de Weert, W.E. Hennink, W. Jiskoot, Protein instability in poly(lactic-co glycolic acid) microparticles, *Pharm. Res.* 10 (1993) 247-299.
44. S. Ribeiro, N. Hussain, A.T. Florence, Release of DNA from dendriplexes encapsulated in PLGA nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 298 (2005) 354-360.
45. I.S. Kim, S.K. Lee, Y.M. Park, Y.B. Lee, Physicochemical characterization of poly(lactic acid) and poly(lactide-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier, *Int. J. Pharm.* 298 (2005) 255-262.
46. J. Davda, V. Labhasetwar, Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells, *Int. J. Pharm.* 233 (2002) 51-59.
47. X. Niu, W. Zou, C. Liu, N. Zhang, C. Fu, Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35 (2009) 1375-1383.