

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

**Katedra farmaceutické technologie**

# **Formulace biodegradabilních nanočástic**

**Diplomová práce**

**Hradec Králové, 2006**

**Věra Čermáková**

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za poskytnuté rady a připomínky k této diplomové práci a Mgr. Evě Valentové za obětavost, trpělivost a pomoc při realizaci.

# Obsah

1	Teoretická část.....	3
1.1	Nanočástice .....	3
1.1.1	Důvody vektorizace léčiv, lékový targeting.....	3
1.1.2	Polymery používané ve výrobě nanočástic .....	4
1.1.3	Metody přípravy nanočástic a mikročástic.....	5
1.1.3.1	Polykondenzace.....	5
1.1.3.2	Sítování .....	5
1.1.3.3	Extrakce a odpařování rozpouštědla .....	5
1.1.3.4	Koacervace .....	6
1.1.3.4.1	Jednoduchá koacervace ve vodném prostředí .....	7
1.1.3.4.2	Komplexní koacervace .....	7
1.1.3.5	Extruze .....	7
1.1.3.6	Rozprašování .....	7
1.1.3.7	Mletí a mikronizace.....	8
1.1.3.8	Emulsní a suspenzní polymerizace .....	8
1.1.3.9	Molekulární inkluze .....	8
1.2	Principy měření velikosti částic .....	9
1.2.1	Dynamický světelný rozptyl.....	9
1.2.2	Korelační funkce .....	10
1.2.3	Číselná, objemová a intenzitní distribuce .....	11
1.2.4	Měření velikosti částic .....	12
1.2.5	Pohyblivé čočky .....	14
1.3	Měření a principy zeta potenciálu .....	15
1.3.1	Teorie zeta potenciálu .....	15
1.3.2	Elektroforéza .....	17
1.3.3	Měření elektroforetické pohyblivosti .....	18
1.3.4	Elektroosmotický efekt .....	19
1.3.5	Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření .....	20
1.3.6	Univerzální ponořovací kyveta .....	21
2	Experimentální část.....	23
2.1	Použité přístroje.....	23
2.2	Chemikálie .....	23
2.3	Pomůcky.....	24
2.4	Metoda přípravy nanočástic .....	25
2.4.1	Dichlormethan jako rozpouštědlo vnitřní fáze .....	26
2.4.2	Chloroform jako rozpouštědlo vnitřní fáze .....	36
2.4.3	Směs chloroformu a dichlormethanu jako rozpouštědlo vnitřní fáze.....	46
2.5	Měření zeta potenciálu .....	57
3	Diskuse .....	60
3.1	Obecné poznámky .....	60
3.2	Velikost nanočástic .....	61
3.3	Povrchový náboj nanočástic.....	62
4	Závěry.....	64
	Použitá literatura .....	65

# 1 Teoretická část

## 1.1 Nanočástice

Nanočástice jsou studovány od 80.let dvacátého století jako nová léková forma, alternativa lipozomů. Řeší problém stability po podání léku do krve a stabilitu během skladování. Nanočástice jsou tvořeny z pevného koloidního systému s velikostí částic mezi 10nm a 1 $\mu$ m.

Podle druhu přípravy a morfologie existují dva typy částic:

Mikro- a nanokapsuly, které jsou tvořeny z pevné části, obalu, uvnitř kterého je jádro, tvořené z tekuté, polotekuté, nebo tuhé látky.

*Mikro- a nanosféry*, které jsou z polymeru tvořícího tuhý roztok nebo tuhou disperzi.

V obou případech může být účinná látka rozpuštěna v polymeru, uzavřena uvnitř, adsorbována na povrchu nebo uzavřena v dutinách.

### 1.1.1 Důvody vektorizace léčiv, lékový targeting

Je mnoho důvodů proč užívat vektorizaci léčiv. Vektorizace se používá pro kontrolu distribuce, targetingu do specifických buněk, pro redukci toxicity a vedlejších účinků, pro získání nové farmakokinetiky a fyzikálně-chemických vlastností vektorů, pro zvýšení penetrace do buněk a snížení podávaných dávek. Dále se vektorizace používá pro kontrolu uvolňování léčiv z lékových forem, pro výrobu léků s postupným uvolňováním, pro ochranu nestálých léčiv proti inaktivaci. Někdy se využívá adjuvantního efektu vektorů při aktivní imunizaci.

Existují dva typy vektorů, biologické a fyzikálně-chemické:

*Biologický vektor:*

Jejich použití je limitováno velikou heterogenitou, nestandardností a náročností přípravy jak finanční tak technickou. Používají se např. erythrocyty, bakterie, viry a priony.

### *Fyzikálně-chemický vektor:*

Existují tři základní skupiny fyzikálně-chemických vektorů. Liposomy, mikročástice a nanočástice. Hlavní rozdíl mezi mikročásticemi a nanočásticemi je v jejich velikosti. Liposomy se od těchto dvou skupin liší strukturou.

Mezi hlavní důvody vektorizace patří specifická a lepší penetrace buněčnou stěnou.

Vektorizace dále poskytuje nebo zajišťuje orgánový targeting, redukuje vedlejší a nežádoucí účinky a toxicitu. Lepší penetrace buňkou způsobuje zvýšení efektivity léčby a umožňuje snížit léčebnou dávku léku. Tato cesta umožňuje používání nízkých dávek, které jsou v běžné léčbě neúčinné. Monocyto-makrofágový systém je hlavním orgánem, který využívá targeting. Zde se primárně hromadí mikroorganismy a cizorodý materiál z krve. Hlavní funkcí monocytů a makrofágů je pohlcování cizorodého materiálu a vektory patří právě mezi tyto cizí částice. Existuje mnoho způsobů vektorizace. Vektor chrání nestálá léčiva, umožňuje postupné uvolňování a aktivuje imunitní systém.

### **1.1.2 Polymery používané ve výrobě nanočástic**

Polymery používané ve výrobě nanočástic musí splňovat četné požadavky. Musí být biodegradabilní ve fyziologickém prostředí a biokompatibilní se strukturami organismu a s léčivem. Polymery přírodní i syntetické jsou rozkládány chemickými a enzymatickými reakcemi. Nesmějí být metabolizovány na toxické produkty. Kolagen, želatina a albumin jsou polymery, které se používají ke kontrole uvolňování léčiv. Je zde ale velký problém, tyto polymery vyvolávají alergické reakce.

Mezi syntetické polymery řadíme alifatické polyestery jako polylaktidy, polyglykolidy, polyanhydridy, polyaminokyseliny. Ze všech nejvíce vyniká svými vlastnostmi kyselina polymléčná a kyselina polyglykolová. Polymery a kopolymery kyselin mléčné a glykolové jsou intenzivně studovány od 70. let dvacátého století. Čas a rychlost uvolňování závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech jako je molekulová hmotnost, krystalinita, poměr mléčné a glykolové kyseliny. PLA je přijata jako zkratka pro polymer L-mléčné kyseliny. PLGA je zkratka pro kopolymer syntetizovaný z kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Poměr mezi nimi je determinován jako mol LA:mol GA.(7)

### **1.1.3 Metody přípravy nanočástic a mikročástic**

Laboratorní příprava mikro- a nanočástic zahrnuje různé postupy, obecně se jím říká mikroenkapsulace. Zahrnuje výrobu mikrosfér, mikrokapsul, lipozómů a nanočástic – termín nanoenkapsulace se nepoužívá. Enkapsulace je termín z oblasti výroby tobolek (plnění kapsul, tobolek).

Postupy přípravy :

#### **1.1.3.1 Polykondenzace**

Polykondenzace je reakce, při které se spojují monomery v řetězec polymeru za současného odštěpení nízkomolekulární látky. Mezipovrchová polykondenzace (viz. obr. 1), je reakce mezi různými monomery v nemísitelných kapalinách, je zde problém s přítomností nezreagovaných monomerů (např. vznik PA (nylon), PE, PU). Dále sem patří polymerace v tavenině (bulk polymerization), při které se tvoří blok polymeru s léčivem a dochází k rozdrobnění na částice různé velikosti a tvaru

#### **1.1.3.2 Síťování**

Připravená disperzní soustava se přidáním určité látky - síťovadla stabilizuje kovalentními vazbami, zároveň síťování činí produkt ve vodě nerozpustným, může se postupně rozkládat buď hydrolyticky nebo enzymatickou cestou. Např. mikrosféry z albuminu (albumin a rostlinný olej po zahřátí), želatiny a glutardialdehydu, alginátu sodného a chloridu vápenatého – Ca spojí 2 karboxyly v síť.

#### **1.1.3.3 Extrakce a odpařování rozpouštědla**

Je to relativně novější metoda založená na přípravě emulze většinou typu olej ve vodě, ve vnitřní fázi se nachází roztok polymeru a léčivé látky, soustava se míchá, udržuje se ve stavu emulze, je to jev dynamický, kapky vnitřní fáze jsou v neustálém pohybu, jednak se spojují a zároveň se i dispergují až do ustálení rovnováhy, kdy počet spojených a dispergovaných částic je sobě roven. Používají se rozpouštědla omezeně mísitelná s vnější (vodnou) fází. Rozpouštědlo přechází do vodné fáze odkud se postupně odpařuje ve formě plynu do okolní atmosféry. Ve vnitřní fázi zůstává polymer a částice se stávají pevnými. Rozpouštědlo má vlastnost omezeně se mísit s vnější fází (vodná fáze), emulze není úplně stabilní.

Rozpouštědlo se mírně odděluje do vnější - vodné fáze a z ní se odpařuje ze soustavy do atmosféry (možno regulovat tlakem, teplotou) a kapičky se v určité fázi stanou tuhými. Zdaleka nejčastěji se používá dichlormetan, který je toxický, má relativně nízký limit pro residuum dichlormetanu v LL (600ppm). Méně se používá ethylacetát, který je netoxický, ale není tak vhodný technologicky, vře při vyšší teplotě. Stabilizátorem pro soustavu olej ve vodě jsou různé tenzidy, polyvinylalkohol, polysorbát, lecitin... Metoda je náročná na škálování (scaling-up), tedy pro převod technologického procesu z laboratorních podmínek na výrobní.

*Postup laboratorní přípravy:*

- ✓ léčivo se rozpustí nebo disperguje v roztoku polymeru v organickém rozpouštědle s nízkou teplotou varu
- ✓ emulgace do vodné fáze s hydrofilním koloidem a/nebo tenzidem – emulze o/v
- ✓ snížením tlaku nebo zahřátím se organické rozpouštědlo odpaří a tvoří se mikročástice
- ✓ filtrace, odstředění

#### **1.1.3.4 Koacervace**

Je to první postup pro výrobu mikrokapslí, výrobu bezuhlíkatého kopírovacího papíru. Tvoří se agregáty makromolekul a probíhá fázová separace jejich desolvatací. Částice, které se vydělí jako nová fáze se musí míchat a stabilizovat (želatina se díky svému náboji stabilizuje sama). Při výrobě mikrokapsul vznikají po přidání koacervačního agens (změna polarity, nebo bez látky změnou teploty) v soustavě krystalky LL (není v soustavě rozpuštěna), vznikne emulze voda ve vodě, pak dochází k depozici částic na mezifázi, částice mají povrchovou energii a snaží se svůj náboj minimalizovat, lepí se na sebe navzájem nebo adherují na mezifázi či na povrch, tyto deponované částice se slijí navzájem, vytvoří jakousi vrstvu kolem částic vnitřní fáze. Po ustálení rovnováhy za neustáleného míchání se vzniklá soustava stabilizuje např. zahřátím (albumin), přidáním aldehydu k želatině. Nakonec se vysouší.

Např. Želatina se rozpustí ve vodě a přidává se ethanol. V určitém stádiu vznikne zákal nanočástic, ty se dají stabilizovat a separovat, pokračujeme-li v přidávání koacervačního agens, jádra rostou a koalescencí vznikají mikrosféry, které je možno separovat a stabilizovat. Pokud je v soustavě dispergovaná heterofáze, depozicí a koalescencí koacervátu vznikají mikrokapsuly.

#### **1.1.3.4.1 Jednoduchá koacervace ve vodném prostředí**

- ✓ Olej nebo tuhá látka se disperguje ve vodném roztoku želatiny zahřáté na 50°C
- ✓ Koacervace se vyvolá přidáním ethanolu nebo roztoku síranu sodného
- ✓ Teplota se sníží na 10°C, aby se tvořil gel
- ✓ Promýváním vodou se odstraní látka, která vyvolala koacervaci (ethanol, roztok síranu sodného)
- ✓ Zpevnění stěny vodným roztokem formaldehydu nebo glutaraldehydu (síťovadla)
- ✓ Promývání vodou, filtrace, sušení

#### **1.1.3.4.2 Komplexní koacervace**

- ✓ Připraví se olejová fáze (budoucí jádro) a vodná fáze (10% roztok želatiny)
- ✓ Emulgace při 35°C na emulzi o/v s kapkami žádané velikosti
- ✓ Přidá se roztok arabské klovatiny stejné teploty
- ✓ Úprava na pH 4-4,5 použitím kyseliny (neutralizací náboje se tvoří koacervát a usazuje se na kapkách oleje)
- ✓ Zpevnění stěn – metanol, glutaraldehyd, zvýšení pH na 9, zahřátí (zesítnění želatiny)
- ✓ Oddělení mikrotobolek filtrací, promísení, vysušení

Jako polymery se používají kromě želatiny a AK i jiné iontové hydrofilní koloidy (albumin, agar, algináty, kasein, pektiny, škroby). Fázová separace se vyvolává zředěním reakční směsi, změnou pH, teploty, přidávkem rozpouštědla, nebo elektrolytu.

#### **1.1.3.5 Extruze**

Extruze je metoda vytlačování roztoku nebo taveniny do kapaliny. Ze dvou zásobníků jejichž trysky vyúsťují společně (dvojitá tryska – vnitřní menší je uvnitř té vnější větší). Konec trysky je ponořen do chladící kapaliny (chlazený tekutý parafín). Takto vznikají mikrokapsule.

#### **1.1.3.6 Rozprašování**

Rozprašování probíhá zároveň se sušením a krystalizací. Rozptylování směsi léčiva a roztoku polymeru nebo taveniny do vyhřívané nebo chlazené komory. Modifikací je rozprašování do kapaliny (alginát sodný do roztoku chloridu vápenatého). Vznikají zpravidla aglomeráty mikrosfér nebo mikrokapsul .



### 1.1.3.7 Mletí a mikronizace

Mikronizace je specifický postup patřící do operace mletí

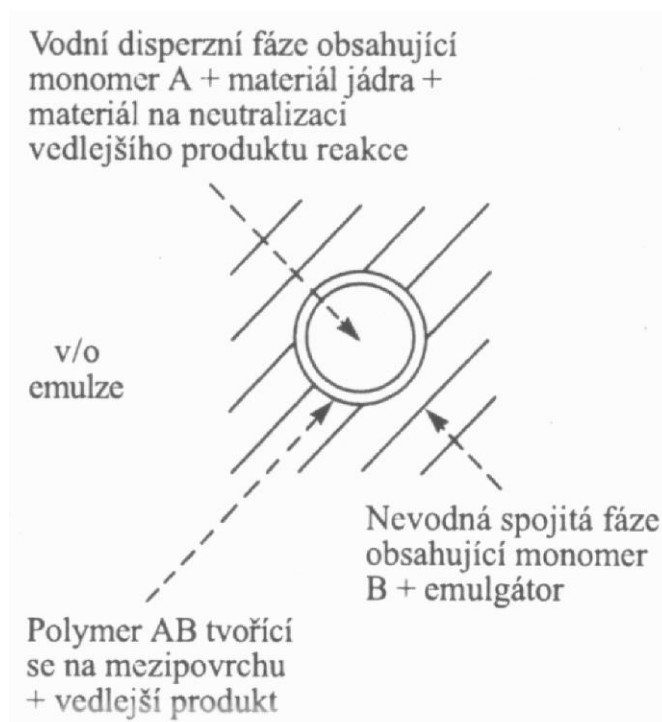
### 1.1.3.8 Emulsní a suspenzní polymerizace

Polymerizace se děje v disperzní soustavě, obsahující LL zabudovanou do struktury vektoru.

### 1.1.3.9 Molekulární inkluze

Existují především  $\beta$ -cyklodextriny se strukturou tvořenou částí řetězce amylázy, která obsahuje 7 glukosových jednotek spojených do kruhu.  $\beta$ -cyklodextrin se rozpustí spolu s léčivou látkou do nějakého rozpouštědla, pak se změní podmínky, nejlépe ochlazením a cyklodextrin velmi lehce krystalizuje. Léčivá látka je pak velmi dobře chráněna v dutině cyklodextrinu. Dají se takto velmi dobře uchovávat i silice. Existují ještě  $\alpha$ -  $\gamma$ -cyklodextriny, ale ty jsou nefrotoxické.

Obr.1: Mikroenkapsulace mezipovrchovou polykondenzací



## 1.2 Principy měření velikosti částic

### 1.2.1 Dynamický světelný rozptyl

Zetasizer provádí měření velikosti částic a jejich zeta potenciálu pomocí procesu, který se nazývá dynamický světelný rozptyl (DLS-dynamic light scattering). DLS proměřuje Brownův pohyb, jehož rychlost souvisí s velikostí částic. Částice prochází laserovým paprskem, rozptyluje záření všemi směry. Detektor umístěný v našem případě na  $173^\circ$  analyzuje dopadající záření. Kolísající intenzita rozptýleného dopadajícího záření se zobrazuje na detektoru jako soustava černobílých skvrn. Bílé skvrny jsou záznamem pro dopadající rozptýlené záření ve stejné fázi, černé skvrny jsou způsobeny vzájemným vyrušením fází, viz.obr.2. Detektor zaznamenává rychlost pohybu skvrn na stínítku v čase a přes korelační funkci a Stokes-Einsteinovu rovnici přepočítává rychlost pohybu částic na jejich velikost.

Obr.2: Skvrna zobrazující Brownův pohyb

V obou těchto případech se částice nepohybují. Částice suspendované v tekutině nejsou v praxi nikdy stacionární. Částice se pohybují Brownovým pohybem. Brownův pohyb je pohyb částic v důsledku náhodných srážek s molekulami kapaliny. Hlavní rys Brownova pohybu pro DLS je to, že se malé částice pohybují rychleji a velké částice naopak pomaleji. Vztah mezi velikostí částic a rychlostí Brownova pohybu je definován jako Stokes-Einsteinův zákon. Tak jako jsou částice konstantně v pohybu se skvrna jeví také pohybuující. Zetasizer nano systém měří poměr intenzity kolísání a počítá velikost částic.

Stokes-Einsteinův zákon:

$$r = kT / 6 \pi \eta D$$

$\eta$  ... viskozita

$kT$  ... teplota

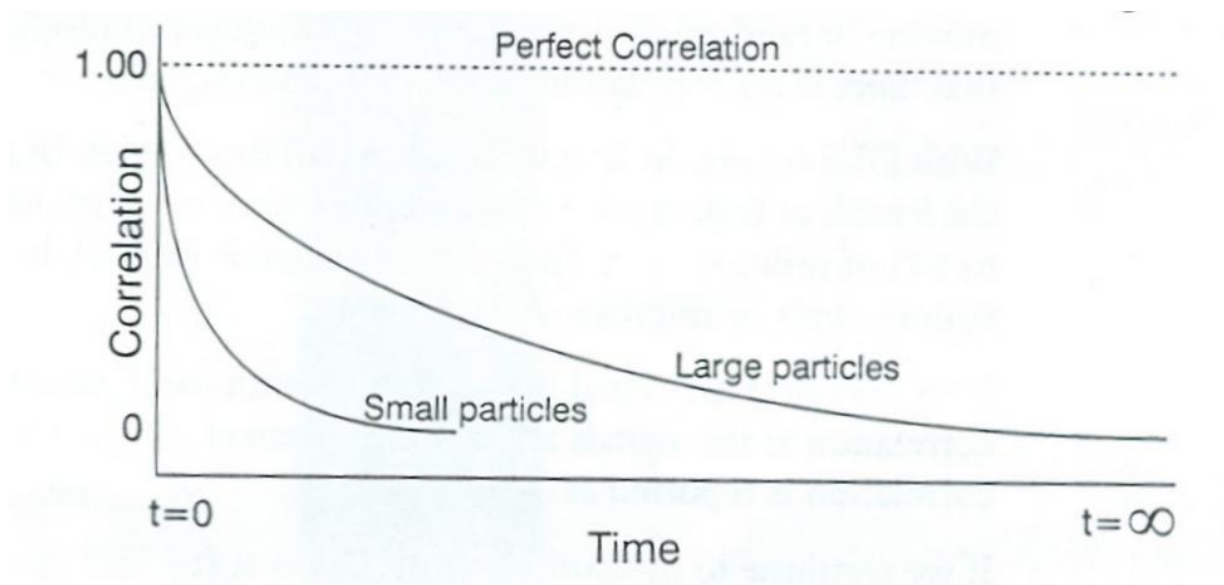
$D$  ... difúzní koeficient

Víme, že zetasizer měří intenzitu kolísání laserového paprsku a používá ji k měření velikosti částic uvnitř vzorku. Uvnitř přístroje je součást nazývaná *digitální korelátor*. Korelátor je program porovnávající kolísání intenzity světelného signálu v časovém období.

### 1.2.2 Korelační funkce

Jestliže jsou měřeny velké částice, pohybující se pomalu, intenzita porovnávací skvrny bude také kolísat pomalu. Jestliže jsou měřeny malé částice, pohybující se rychle, intenzita porovnávací skvrny bude také kolísat rychle. Graf ukazuje korelační funkci pro velké a malé částice, které mohou být viděny, viz. obr.3.

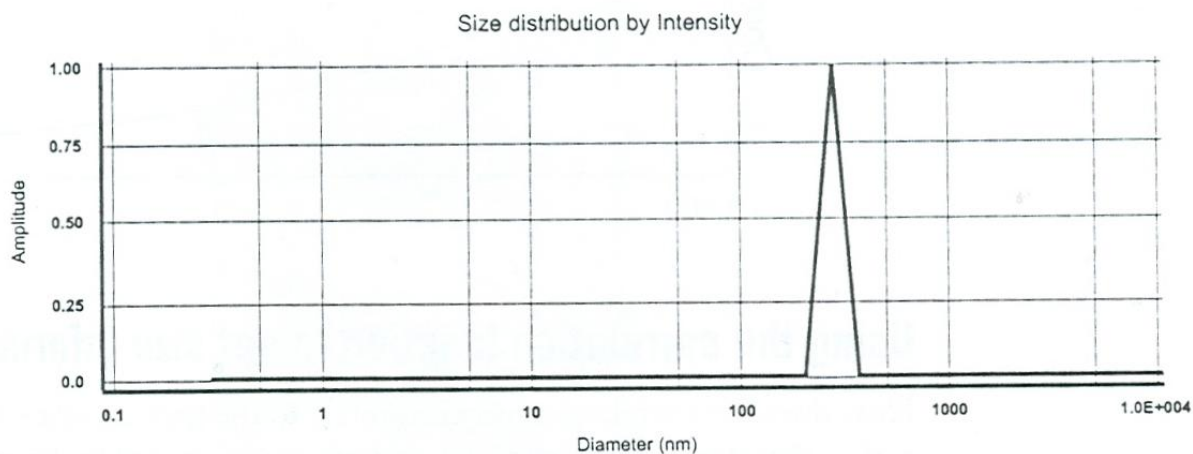
Obr.3: Graf korelační funkce



Po změření korelační funkce a uchování naměřených dat, přístroj zobrazí velikostní distribuci. Zetasizer software používá korelační funkci pro výpočet velikostní třídy. Typický graf

distribuce velikostí je ukázán na obr.4. Osa X ukazuje distribuci třídy velikostí, zatímco osa Y ukazuje relativní intenzitu rozptýleného světla.

Obr.4: Graf distribuce velikostí částic

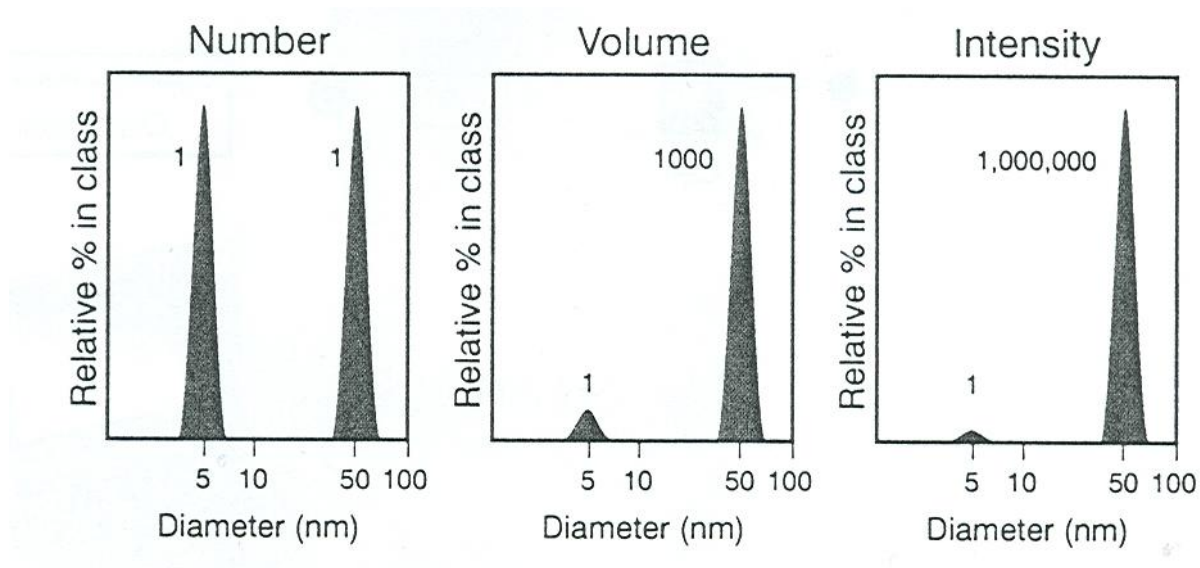


Ačkoliv základní distribuční velikost vytvořená DLS je distribuce intenzity, může být převedena na objemovou distribuci. Tato objemová distribuce může být také dále převedena na číselnou distribuci. Číselná distribuce v sobě násobí chyby z distribuce intenzity.

### 1.2.3 Číselná, objemová a intenzitní distribuce

Velice jednoduché popsání rozdílů mezi intenzitní, objemovou a číselnou distribucí. Musíme si představit vzorek obsahující pouze 2 velikosti částic (např. 5nm a 50nm), se stejným poměrným zastoupením obou velikostí, viz. obr.5. První graf ukazuje výsledky jako číselnou distribuci. Oba píky jsou stejné velikosti (1:1) jako se rovnají počty částic. Druhý graf ukazuje výsledky objemové distribuce, oblast píku pro částice velké 50nm je tisíckrát větší než pík pro částice velké 5nm. Takže objem 50nm částic je tisíckrát větší než 5nm částic, ve vzorci pro výpočet objemu je poloměr na třetí. Třetí graf ukazuje výsledky distribuce podle intenzity paprsku laseru. Oblast píku pro 50nm částice je milionkrát větší než pro 5nm částice. Je to proto, že velké částice rozptylují milionkrát víc světla než částice malé.

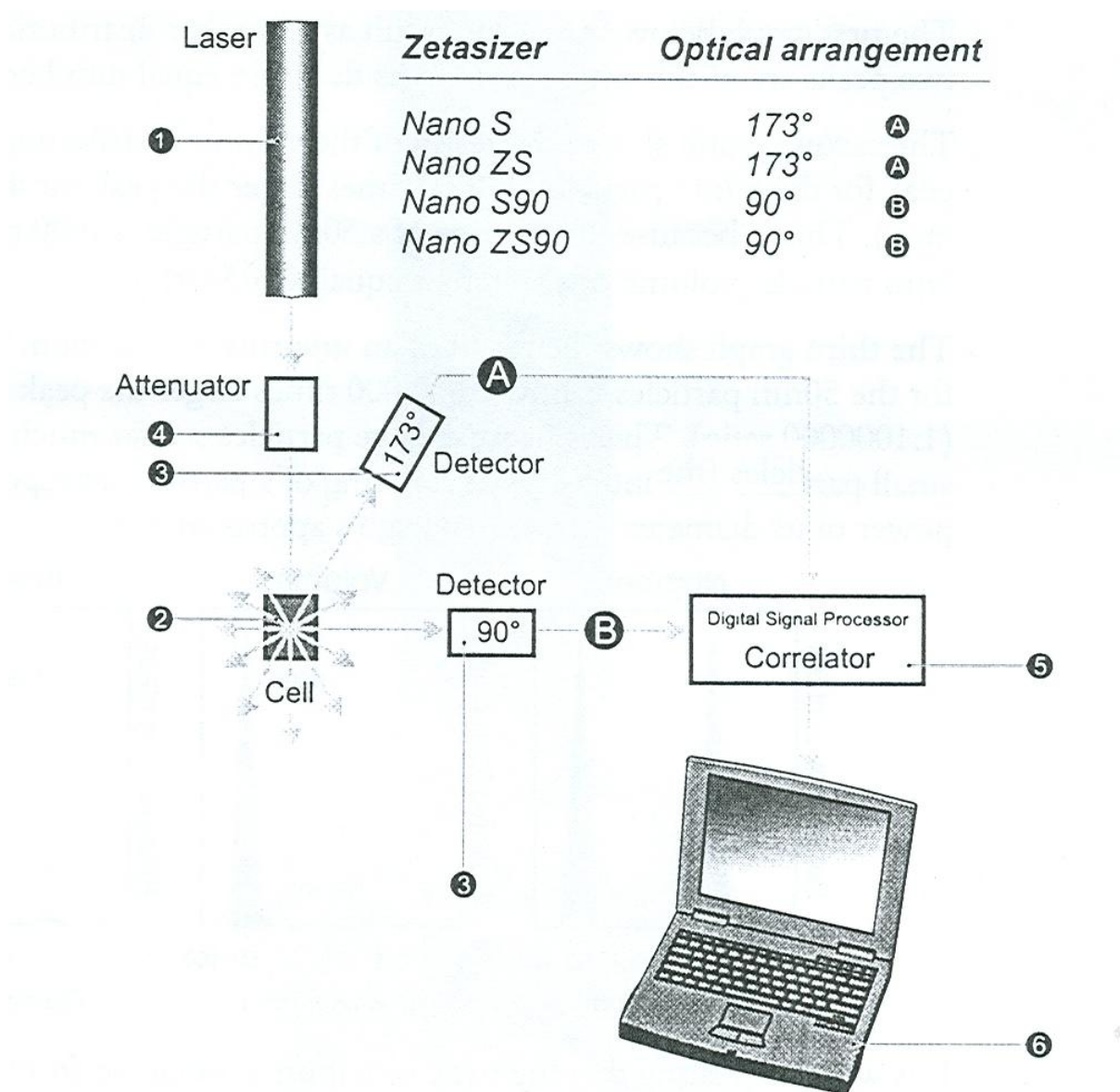
Obr.5: Graf číselné, objemové a intenzitní distribuce



#### 1.2.4 Měření velikosti částic

Typický DLS systém zahrnuje šest hlavních komponent, viz.obr.6. První je laser(1), je používán jako světelný zdroj k ozařování vzorku částic uvnitř kyvety(2). Většina světelného paprsku prochází rovněž vzorkem, část záření je rozptylována částicemi uvnitř vzorku. Další je detektor(3), používaný k měření intenzity rozptýleného světla. Částice rozptylují světlo ve všech směrech, tím je možné teoreticky umístit detektor do téměř jakékoliv polohy, v které bude detekovat rozptýlené záření.

Obr.6: DLS systém



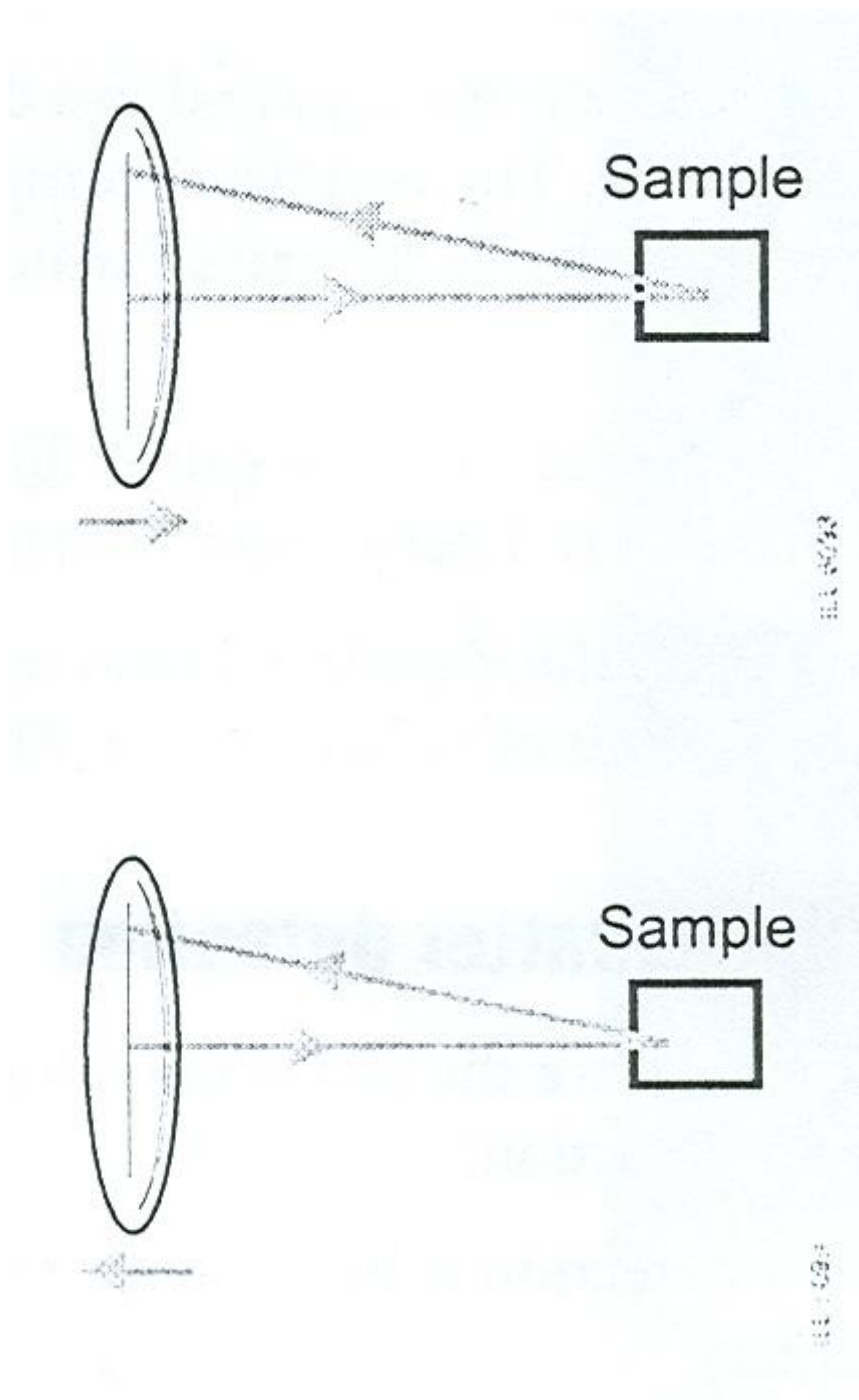
Jestliže je detekováno příliš mnoho světla, detektor se přetíží. Proti přetížení je zde tzv. zeslabovač(4), požívaný k redukci intenzity světla laseru, který redukuje sílu rozptýleného záření. U vzorků, které nerozptylují mnoho světla, jako jsou velmi malé částice nebo vzorky nízké koncentrace, musí být zvýšeno množství rozptylovaného světla. V této situaci zeslabovač dovoluje většímu množství světla projít vzorkem. Pro vzorky, které rozptylují mnoho světla, jako velké částice, nebo vzorky o vysoké koncentraci, je množství rozptylovaného světla sníženo. Zeslabovač tedy redukuje množství světla procházející vzorkem. Intenzita signálu z detektoru přechází na digitální signál v přístroji nazývaný korelátor(5), který srovnává rozptylovanou intenzitu v následujících časových intervalech

k odvozování poměru kolísající intenzity. Tyto korelační informace dále prochází přes počítač(6), kde se data analyzují a odvozuje se velikost.

### 1.2.5 Pohyblivé čočky

Uvnitř Zetasizeru jsou pohyblivé čočky, dovolující měnit ohniskovou pozici v kyvetě, viz.obr.7. Toto zvětšuje rozsah koncentrací možných pro měření.

Obr.7: Pohyblivé čočky



Pro malé částice, nebo vzorky nízké koncentrace je toto prospěšné pro maximalizování množství rozptylovaného záření vzorkem. Tak jako laserový paprsek prochází stěnou kyvety a je rozptýlen, začíná stěna kyvety „zářit“. Tato záře může zaplavit rozptylovaný signál. Usměrněním měřeného bodu ze stěny kyvety směrem do centra kyvety se odstraňuje tento efekt. Velké částice, nebo vzorek vysoké koncentrace rozptylují mnohem více světla. V této situaci měření probíhá blíže ke stěně kyvety a redukuje efekt vícenásobného rozptylu. V tomto případě bude záření ze stěny kyvety méně narážet. Žádné záření nebude poměrně redukovat signál rozptylu.(8)

### **1.3 Měření a principy zeta potenciálu**

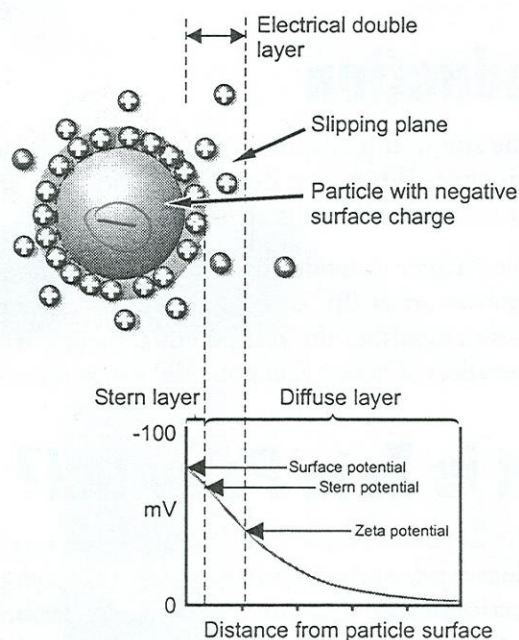
Pro pochopení zeta potenciálu je v první řadě nutné pochopit teorii *zeta-potenciálovou* a dále fyzikální děje probíhající v průběhu měření.

#### **1.3.1 Teorie zeta potenciálu**

Zetasizer měří zeta potenciál pomocí elektroforetické pohyblivosti a poté k výpočtu používá aplikaci Henryho rovnice. Okolo částic existuje tzv. *elektrická dvojvrstva*. Vrstva okolo částic existuje ve dvou částech, inertní část, nazývaná „pevná vrstva“, kde jsou ionty pevně vázány a difúzní část, kde jsou ionty připojeny méně pevně, viz. obr.8. Když se částice pohybuje, tyto ionty se pohybují spolu s ní. Potenciál nacházející se mezi pohybující se částicí a okolím se nazývá *zeta potenciál*.



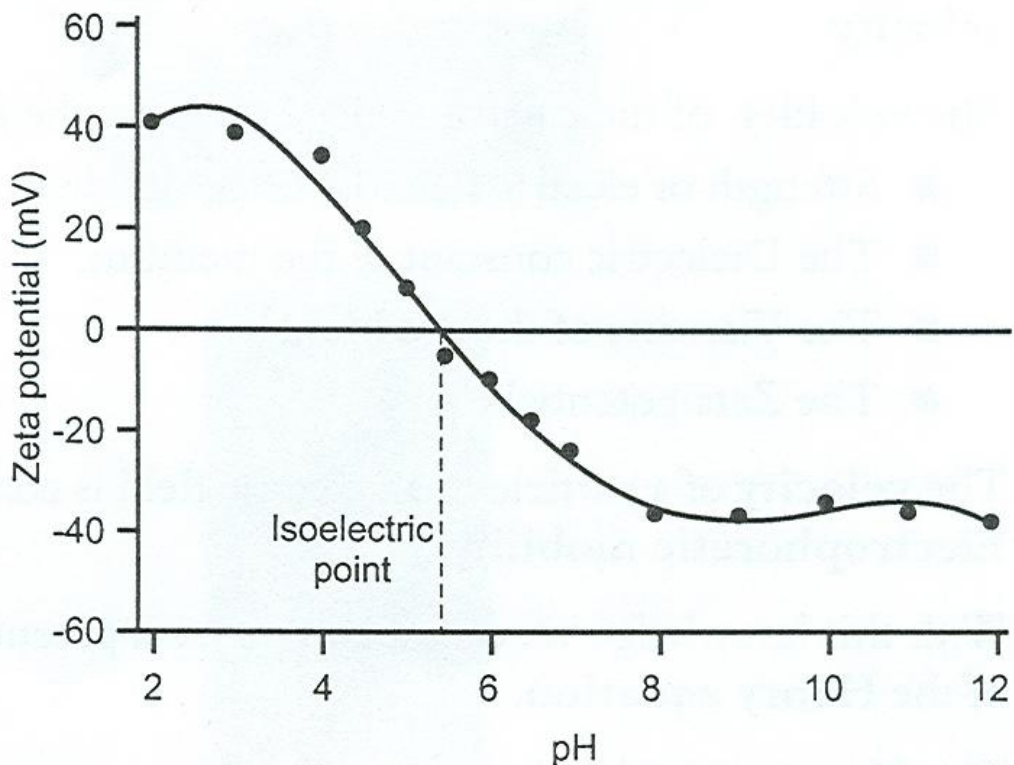
Obr.8: Zeta potenciál



Zeta potenciál je důležitý pro pochopení potenciálové stability a v teorii koloidních systémů. Koloidní a také makrodisperzní systém je definován jako soustava složená nejméně ze dvou fází, látky dispergované a disperzního media. Rozměr koloidních částic se pohybuje v rozmezí 1nm až 1 $\mu$ m. V těchto případech nás zajímají dva hlavní stavy, pevná látka dispergovaná v tekutině (suspenze) a tekutina dispergovaná v tekutině, čili emulze. Všechny částice v suspenzích mající velký negativní nebo pozitivní zeta potenciál, mají tendenci k odpuzování a není zde tendence k flokulaci. Jestliže však částice mají velmi nízký zeta potenciál a je zde nepřítomnost síly ochraňující částice, spojují se a flokulují. Hlavní dělící hranice mezi stabilními a nestabilními suspenzemi je +30mV a -30mV. Částice se zeta potenciálem vyšším než +30mV nebo nižším než -30mV jsou normálně považovány za stabilní. Velice důležitý faktor v hodnotě zeta potenciálu je pH. Když si představíme částici v suspenzi s negativním zeta potenciálem, do které přidáme alkálii, částice mají tendenci získat větší negativní náboj. Když přidáme kyselinu do této suspenze, negativní náboj bude neutralizován. Žádné další přidání kyseliny nezapříčiní vzestup pozitivního náboje. Proto zeta potenciál bude pozitivní v nízkém pH a nižší nebo negativní ve vysokém pH.

Hodnota, ve které zeta potenciál je roven nule se nazývá **isoelektrický bod**, viz.obr.9. V tomto bodě je koloidní systém nejméně stabilní.

Obr.9: Isoelektrický bod



Velice důležitá je existence elektrokinetických efektů, mezi které patří elektroforéza, elektroosmóza, potenciál proudění, potenciál sedimentace.

### 1.3.2 Elektroforéza

Jestliže v elektrolytu použijeme elektrické pole, nabitě částice suspendované v elektrolytu jsou přitahovány směrem k elektrodám opačného náboje. Viskózní síly brzdí pohyb částic. Rovnováha je dosažena mezi těmito dvěma opačnými silami, částice se pohybují se stálou rychlostí. Rychlost částic závisí na následujících faktorech: intenzita elektrického pole nebo rozložení napětí, permitivita media, viskozita media, zeta potenciál. Rychlost částic v elektrickém poli je obvykle popisována jako elektroforetická pohyblivost. Na základě těchto informací můžeme zeta potenciál částic aplikovat do Henryho zákona.

Henryho rovnice:

$$U_E = 2\varepsilon z f(Ka) / 3\eta$$

z.....zeta potenciál

$U_E$ .....elektroforetická pohyblivost

$\varepsilon$ .....dielektrická konstanta

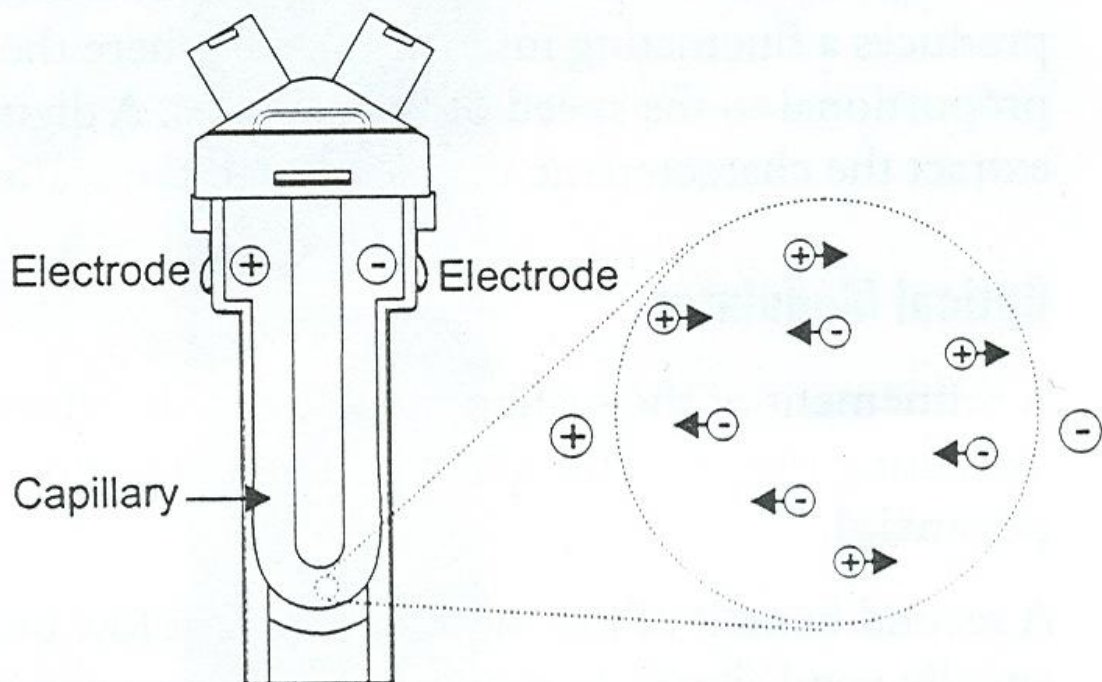
$\eta$ .....viskozita

$f(Ka)$ ...Henryho funkce

### 1.3.3 Měření elektroforetické pohyblivosti

Základ klasické mikroelektroforézy je kyveta s elektrodami, viz.obr.10. Částice se pohybují směrem k elektrodám opačného náboje, jejich rychlost je měřena a vyjádřena v jednotce silového pole jako jejich pohyblivost. Technika používaná v měření rychlosti v Malvernově zetasizeru je laserový Dopplerův rychloměr. Tento rychloměr je velmi dobře zavedená technika ve studiu proudění kapalin.

Obr.10: Kyveta s elektrodami

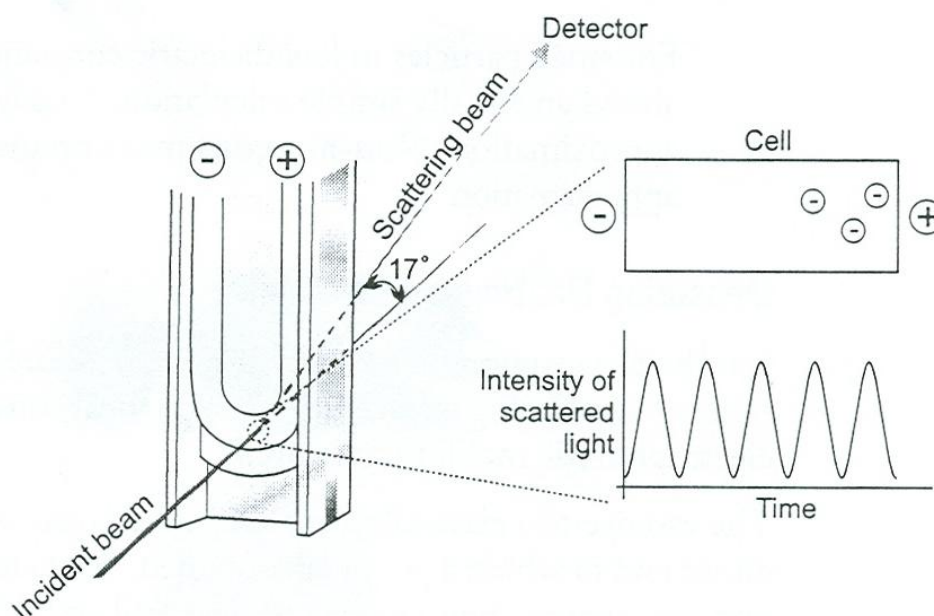


### 1.3.4 Elektroosmotický efekt

Kyveta nese povrchový náboj, takže aplikace elektrického pole sleduje elektroforetické změny kapalin vyznačující se elektroosmotickým tokem. Koloidní částice jsou podrobeny elektroosmotickému toku znásobeného jejich elektroforetickou pohyblivostí. Avšak v uzavřeném systému musí být tok podél stěn kompenzován pro obrácený tok směrem dolů v centru kapiláry. V kyvetě je také místo, kde je elektroosmotický tok nulový – 2 toky proti sobě se pohybujících tekutin se vzájemně ruší. Jestliže je měření provedeno v tomto místě, rychlost měřených částicí bude skutečná elektroforetická rychlost. Tento bod je nazýván stacionární vrstva.

Spíš než užívání Dopplerovy frekvence ukazuje příčiny pohybu částic k měření jejich rychlosti, fázová analýza světelného rozptylu. Fázová analýza měří porovnáním fáze světelného rozptylu částic s fází srovnávacího paprsku, viz.obr.11.

Obr.11: Fázová analýza světelného rozptylu

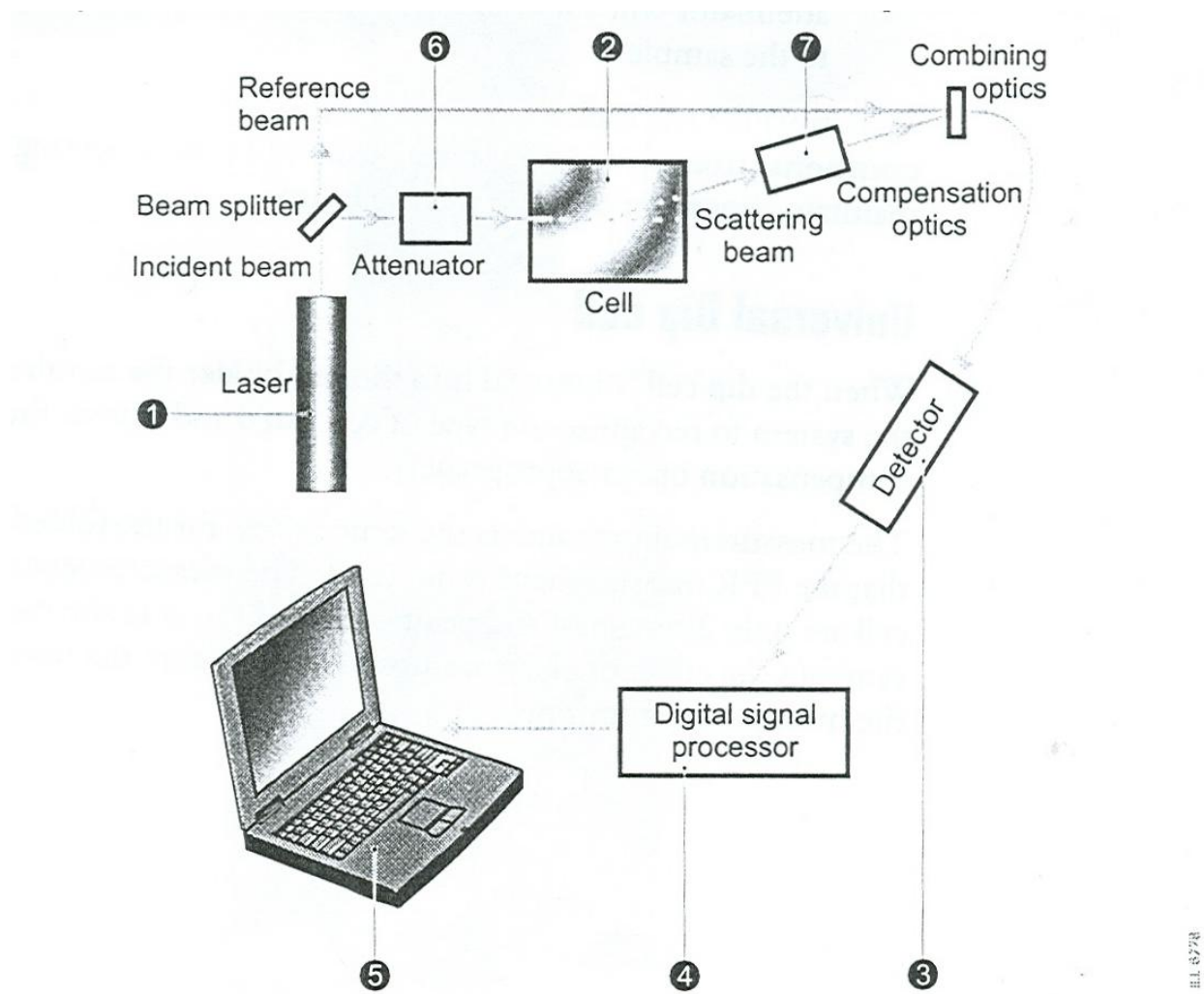


Fázová analýza signálu může být determinována přesně v přítomnosti dalších efektů, které nezpůsobují elektroforézu, např. termální unášení způsobené termálním teplem. Detekce fázové změny je více citlivá ke změně pohyblivosti než tradiční detekce frekvenčního posunu.

### **1.3.5 Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření**

Je zde používáno šest základních komponent viz obr.12, hlavní je laser(1), který zdrojem světelného záření. Během měření zeta potenciálu je zdroj světla rozštěpen k poskytnutí srovnávacího paprsku. Srovnávací paprsek je nezbytný v metodě měření zeta potenciálu. Laserový paprsek prochází středem vzorku kyvety(2). Při vložení měřící kyvety do přístroje umožněno systémem rozpoznat typ zeta potenciálu a utváří software k použití správné měřící sekvence. Další součástí je detektor(3), který posílá informace do digitálního signálního procesoru(4). Tyto informace poté prochází počítačem(5), kde je Zetasizer nano software produkující frekvenční spektrum. Poté jsou zeta potenciálové informace sčítány. Jestliže je přístojem detekováno více světla než je možné, nastává přetížení. Toto překonává tzv.zeslabovač(6), který je používán k redukci intensity laseru a proto redukuje intenzitu rozptylování. Vzorky, které nerozptylují mnoho světla, jako malé částice, nebo vzorky nízké koncentrace, pro ně používáme větší množství rozptylovaného světla. Pro vzorky, které rozptylují více světla, jako velké částice, nebo vzorky vyšší koncentrace, u nich musí být množství rozptýleného světla sníženo zeslabovačem. Zeslabovač automaticky redukuje množství světla procházejícího vzorkem. Dále je zde nainstalovaná kompenzační technika(7).

Obr.12: Princip měření zeta potenciálu



### 1.3.6 Univerzální ponořovací kyveta

Ponořovací kyvetu vkládáme do držáku na kyvetu, přístroj má možnost rozpoznat druh použité kyvety.(9)

## **CÍL PRÁCE**

Cílem předložené práce bylo osvojit si metodiku přípravy nanočástic z biodegradabilních alifatických polyesterových nosičů. Byl navržen postup vycházející z dispergaci roztoků nosičů v chlorovaných uhlovodících ve vodném médiu obsahujícím jako emulgátor tři vzorky polyvinylalkoholu s různými molekulárními parametry. Tyto tři různé emulgátory bylo zadáno použít ve dvou různých koncentracích. Některé ze vzorků měly být upraveny z hlediska povrchového náboje adsorpcí soli chitosanu.

Připravené vzorky jsem měla za úkol proměřit z hlediska jejich velikosti a z hlediska jejich zeta potenciálu pomocí zařízení Zetasizer ZS (Malvern Instruments).

## **2 Experimentální část**

### **2.1 Použité přístroje**

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

Váhy Kern 440-33N max 200g, d=0,01g

Váhy Kern 440-47 max 1200g, d=0,1g

Magnetická míchačka Heidolph MR 3001 100-1250 ot./min

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

Malver zetasizer ZS 90

Světelný mikroskop Meopta CZ, objektivy: 4X, 10X, 45X, 100X

Centrifuga Hettich Universal 16A max.3000ot./min.

Ultrazvuk Sonorex super 10P Bandelin

### **2.2 Chemikálie**

Polyvinylalkohol(PVA), Mw = 9000-10 000, stupeň hydrolýzy 80% , Sigma Aldrich

Polyvinylalkohol(PVA), Mw = 15 000, stupeň hydrolýzy 86-89%, Fluka Biochemika

Polyvinylalkohol(PVA), Mw = 13 000-23 000, stupeň hydrolýzy 87-89%, Sigma Aldrich

Kyselina poly(DL-mléčná), KFT UK FaF Hradec Králové



Dichlormethan (DCM) p.a. Lachema a.s. Neratovice,  $M=84,93\text{g/mol}$ ,  $\rho=23-24/25-36/37$

Amoniak ( $\text{NH}_3$ ), vodný roztok min.25% čistý Lachema a.s. Neratovice, bezvodý= $17,03\text{g/mol}$

Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) Lach-Ner s.r.o. Neratovice cz,  $M=119,38\text{g/mol}$ , stabilizovaný ethanolem  
1%  $\rho=2-36/37-46$

Polyethylenamin-nízkomolekulární, bezvodý,  $M=1,5240$ ,  $d=1,050$ , Aldrich

Destilovaná voda

## 2.3 Pomůcky

polystyrenové květy

mikrobiologické jednorázové nesterilní filtry  $0,5\ \mu\text{m}$

injekční stříkačky

pipety

nálevky

filtrační papíry

kádinky

lžičky

stojany s držáky

skleněné tyčinky

skleněné lahvičky s víčkem

exsikátor

alobal

## 2.4 Metoda přípravy nanočástic

Metoda využívá extrakci a odpařování rozpouštědla (viz. Teoretická část). Tato metoda je založena na principu přípravy emulze typu olej ve vodě. Ve vnitřní fázi se nachází roztok polymeru a LL. Soustava se míchá, tím jsou kapky vnitřní fáze v neustálém pohybu. Rozpouštědlo přechází do vodné fáze, odkud se postupně odpařuje. Ve vnitřní fázi zůstává polymer a částice se stávají pevnými. Jako polymer jsme používali kyselinu poly DL-mléčnou (PDLLA) v koncentraci 1%. Jako rozpouštědla jsme použili chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), dichlormethan (DCM) a směs  $\text{CHCl}_3$  s DCM. Jako emulgátor byl použit polyvinylalkohol (PVA), střední molekulové hmotnosti  $M_w$  10000 (M10), 15000 (M15), 20000 (M20). Pro každý z nich jsme použili koncentraci 1,5% a 3,0%.

### Příprava roztoku PVA (vnější fáze)

Nejprve jsme navážili na analytických vahách potřebné množství PVA (postupně všechny tři střední molekulové hmotnosti). Toto množství jsme rozpustili ve vodě, dvouminutovým zahřátím v mikrovlnné troubě jsme rozpouštění urychlili.

### Příprava roztoku PDLLA v daném rozpouštědle (vnitřní fáze)

Na analytických vahách jsme navážili potřebné množství PDLLA a umístili je na dno tmavé skleněné lahvičky s uzávěrem a přidali jsme potřebné množství rozpouštědla.

Do kádinky s roztokem PVA jsme přidali 0,5 g 1% roztoku PDLLA v příslušném rozpouštědle. Tuto směs jsme umístili na homogenizátor a 2 minuty jsme homogenizovali na stupni 6 (tzn. 26000 otáček/min). Po ukončení homogenizace jsme roztok rychle přelili do předem připravené kádinky se 150 ml vody. Kádinku jsme umístili na magnetickou míchačku na dobu 2-3 hodin (do odpaření rozpouštědla). Hotové částice jsme měřili na Zetasizeru (jejich velikost a zeta potenciál). Výsledky jsme si zaznamenávali a porovnávali jsme vlivy molekulových hmotností použitého PVA, jejich koncentrací, vliv použitého rozpouštědla na velikost částic.

## 2.4.1 Dichlormethan jako rozpouštědlo vnitřní fáze

### 1,5 % PVA M10, DCM

Roztok 1,5% PVA(vnější fáze):

PVA (M10)	.....	0,75 g
Voda	.....	49,25 g

Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 1,5% jsme použili M10.

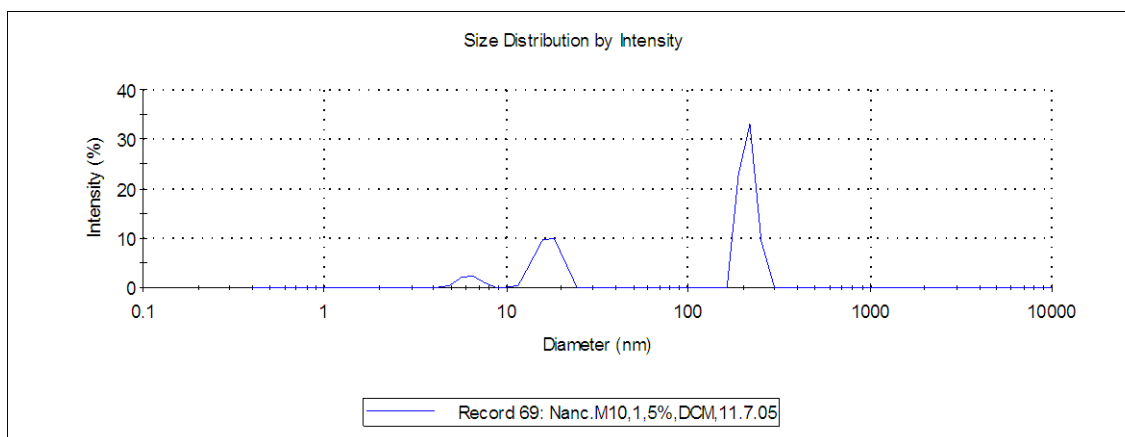
Roztok 1% PDLLA v DCM(vnitřní fáze)

PDLLA	.....	0,1 g
DCM	.....	9,9 g

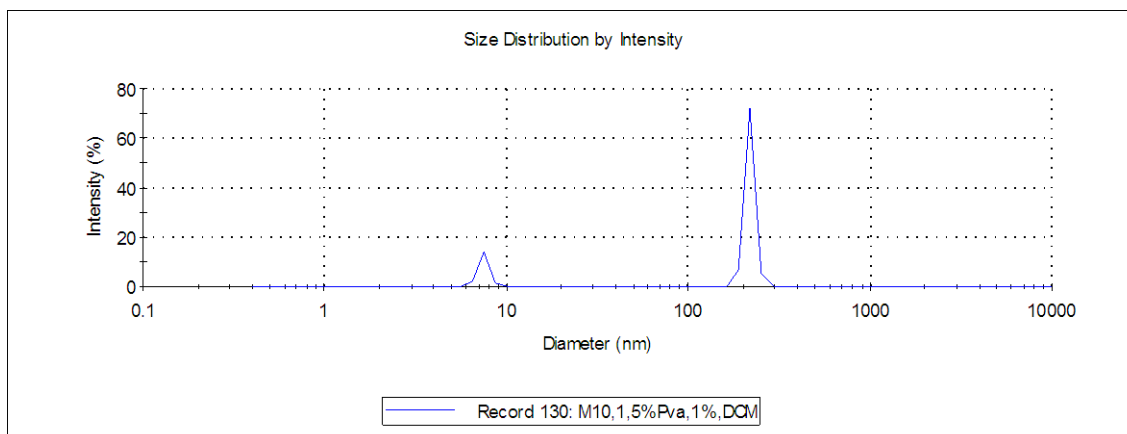
Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo DCM.

Základní distribuční velikost vytvořená DLS je distribuce intenzity. Přístroj zobrazuje velikostní distribuci. Na ose X je zobrazená distribuce třídy velikostí a na ose Y je zobrazená relativní intenzita rozptýleného světla(viz následující grafy)

Obr.13: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.14: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 214,6 nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 2 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 220,1 nm.

Tabulka 1: Velikost částic pro 1,5% PVA M10, DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	214,6	220,1	217,35	65	83	74
<b>Pík 2</b>	17,03	7,488	12,259	29	16	22,5
<b>Pík 3</b>	6,243	0	3,122	5	0	2,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 10 000 je **217,35 nm**.

### 1,5 % PVA M15, DCM

Roztok 1,5 % PVA(vnější fáze):

PVA (M15) ..... 0,75 g

Voda ..... 49,25 g

Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 1,5 % jsme použili M15.

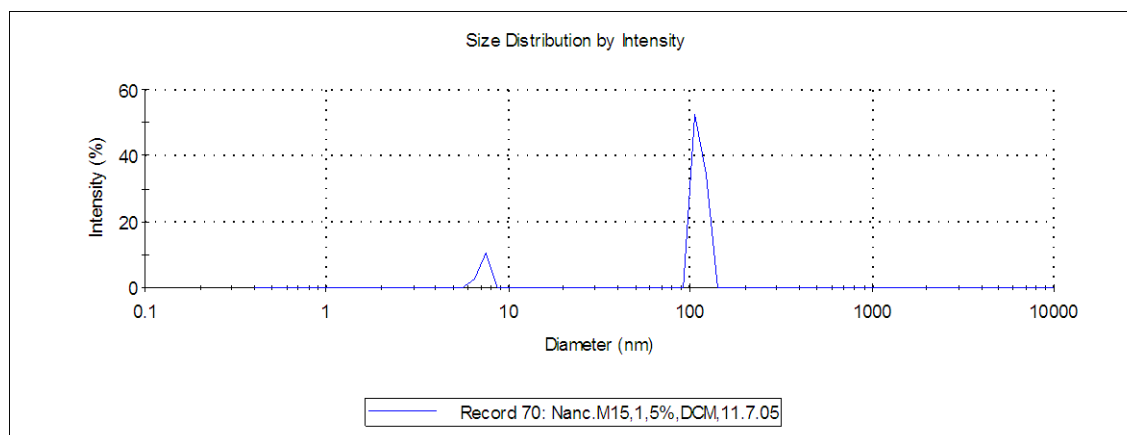
Roztok 1% PDLLA v DCM(vnitřní fáze):

PDLLA ..... 0,1 g

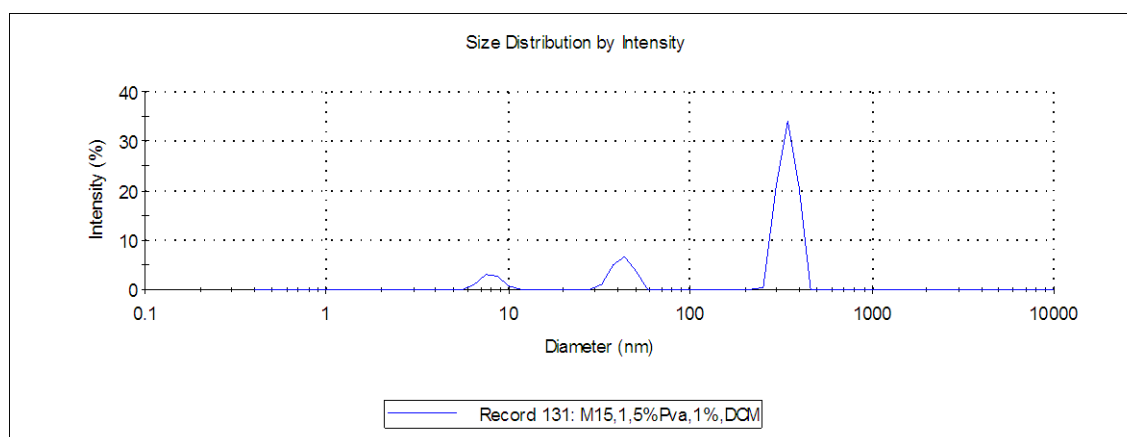
DCM ..... 9,9 g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo PDLLA.

Obr.15: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření



Obr.16: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 2 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 112,3 nm.Ve 2. měření přístroj zaznamenal 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 343,2 nm.

Tabulka 2: Velikost částic pro 1,5% PVA M15, DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	112,3	343,2	227,75	87	76	81,5
<b>Pík 2</b>	7,324	42,98	25,152	12	16	14
<b>Pík 3</b>	0	8,066	4,033	0	7	3,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 15 000 je 227,75 nm.

### 1,5 % PVA M20, DCM

Roztok 1,5% PVA(vnější fáze):

PVA (M20) ..... 0,75 g

Voda ..... 49,25 g

Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 1,5 % jsme použili M20.

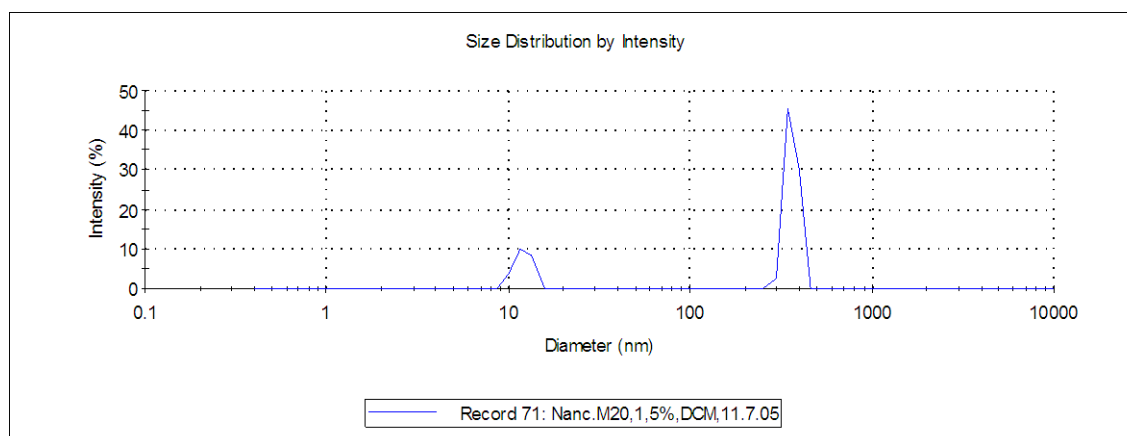
Roztok 1% PDLLA v DCM(vnitřní fáze):

PDLLA ..... 0,1 g

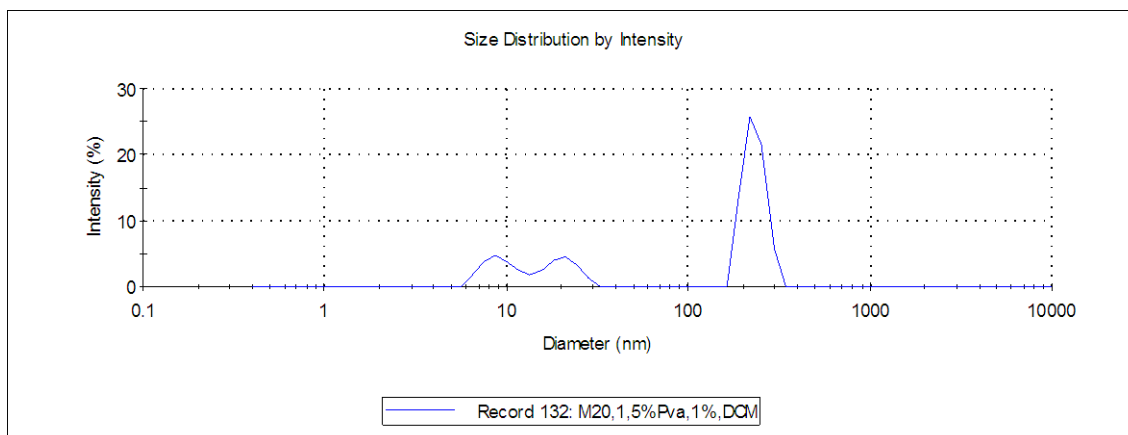
DCM ..... 9,9 g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo DCM.

Obr.17: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření



Obr.18: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 2 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 361,5 nm. Ve 2.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 231,1 nm.

Tabulka 3: Velikost částic pro 1,5% PVA M20, DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	Průměr
<b>Pík 1</b>	361,5	232,1	296,8	78	65	71,5
<b>Pík 2</b>	12,12	9,427	10,774	21	17	19
<b>Pík 3</b>	0	19,97	9,99	0	16	8

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 20 000 je 296,8 nm.

### 3% PVA M10, DCM

Roztok 3% PVA(vnější fáze):

PVA (M10) ..... 1,5 g

Voda ..... 48,5 g

Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 3 % jsme použili M10.

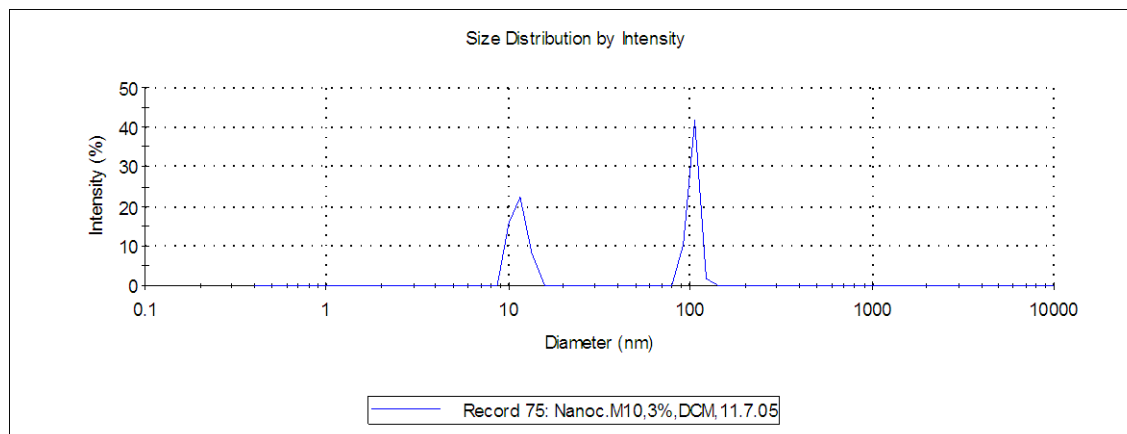
Roztok 1% PDLLA(vnitřní fáze):

PDLLA ..... 0,1 g

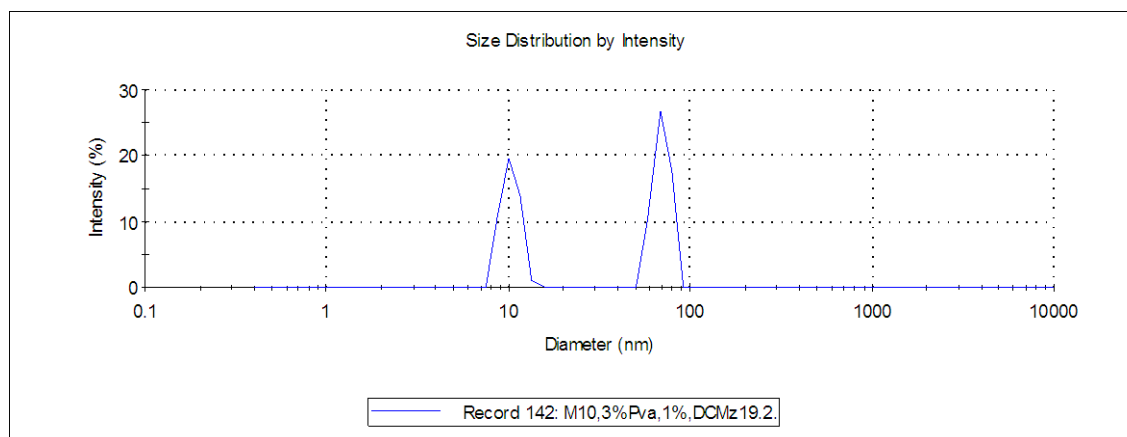
DCM ..... 9,9 g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo DCM.

Obr.19: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření



Obr.20: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 2 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházeli částice o velikosti 103,5 nm. Ve 2. měření přístroj zaznamenal 2 píky.Největší zastoupení měly částice o velikosti 69,82 nm.



Tabulka 4: Velikost částic pro 3,0% PVA M10, DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	103,5	69,82	86,66	53	54	53,5
<b>Pík 2</b>	11,48	10,34	10,91	46	45	45,5
<b>Pík 3</b>	0	0	0	0	0	0

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 10 000 je 86,66 nm.

### 3,0% PVA M15, DCM

Roztok 3,0% PVA(vnější fáze):

PVA(M15) ..... 1,5g  
 Voda ..... 48,5 g

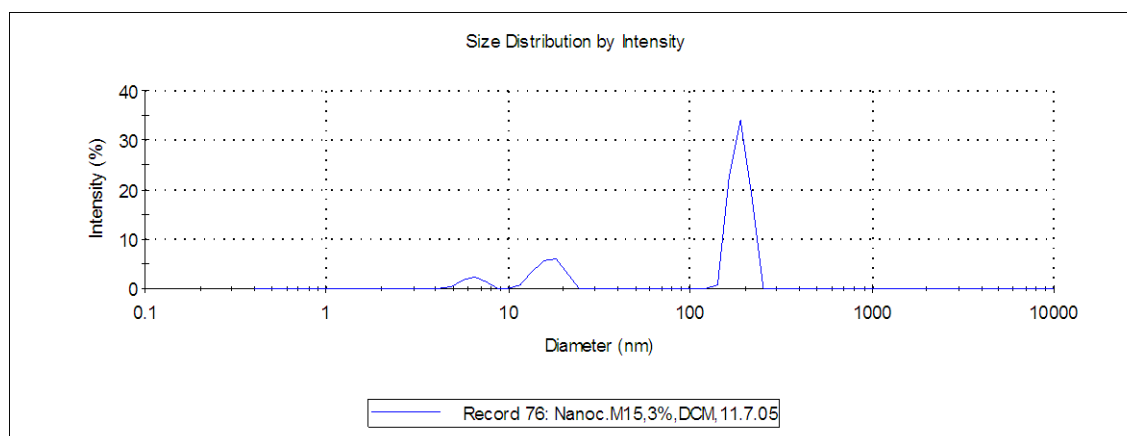
Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 3 % jsme použili M15.

Roztok 1% PDLLA(vnitřní fáze):

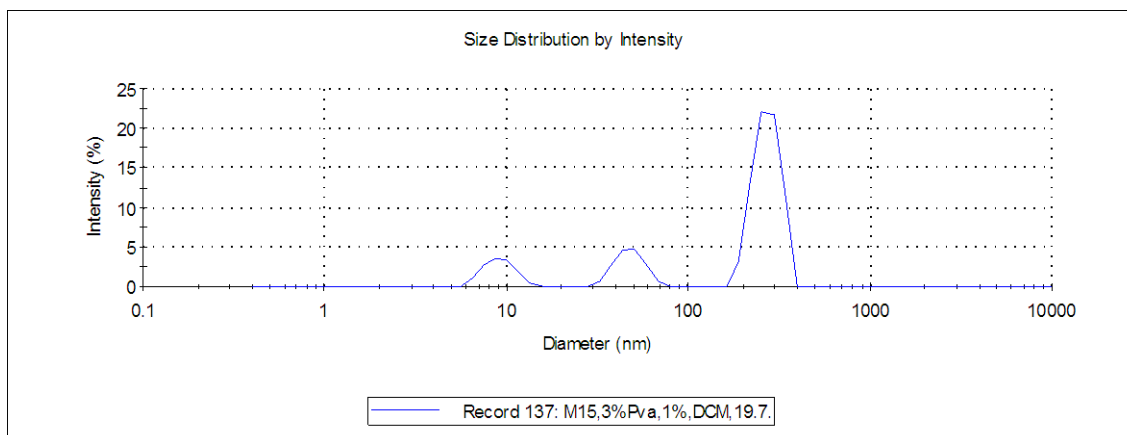
PDLLA ..... 0,1 g  
 DCM ..... 9,9 g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo DCM.

Obr.21: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření



Obr.22: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 189,4 nm. Ve 2.měření přístroj zaznamenal také 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 271,8 nm.

Tabulka 5: Velikost částic pro 3,0% PVA M15, DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	189,4	271,8	230,6	75	71	73
<b>Pík 2</b>	16,86	48,09	32,475	18	16	17
<b>Pík 3</b>	6,449	9,265	7,857	5	12	8,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 15 000 je 230,6 nm.

### 3,0% PVA (M20), DCM

Roztok 3,0% PVA(vnější fáze):

PVA (M20) ..... 1,5 g

Voda ..... 48,5 g

Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 3 % jsme použili M20.

Roztok 1% PDLLA(vnitřní fáze):

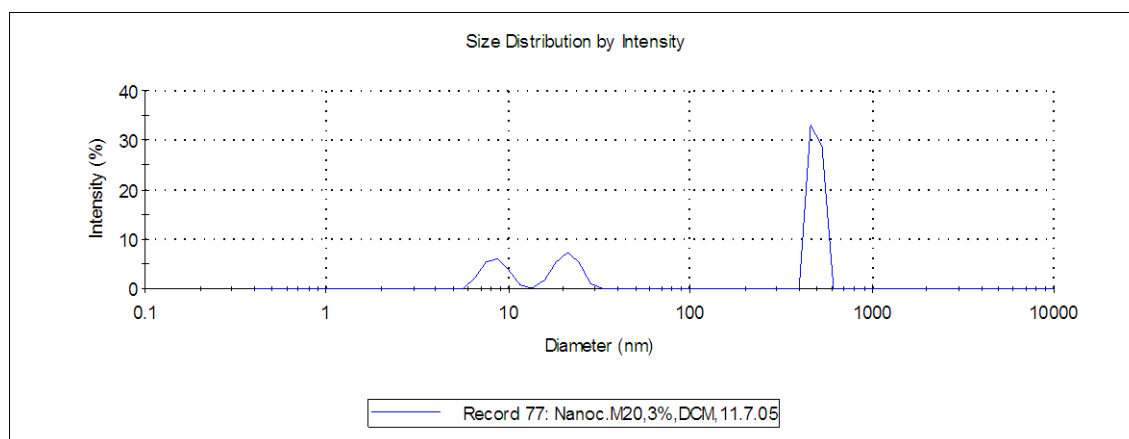
PDLLA ..... 0,1 g

DCM ..... 9,9 g

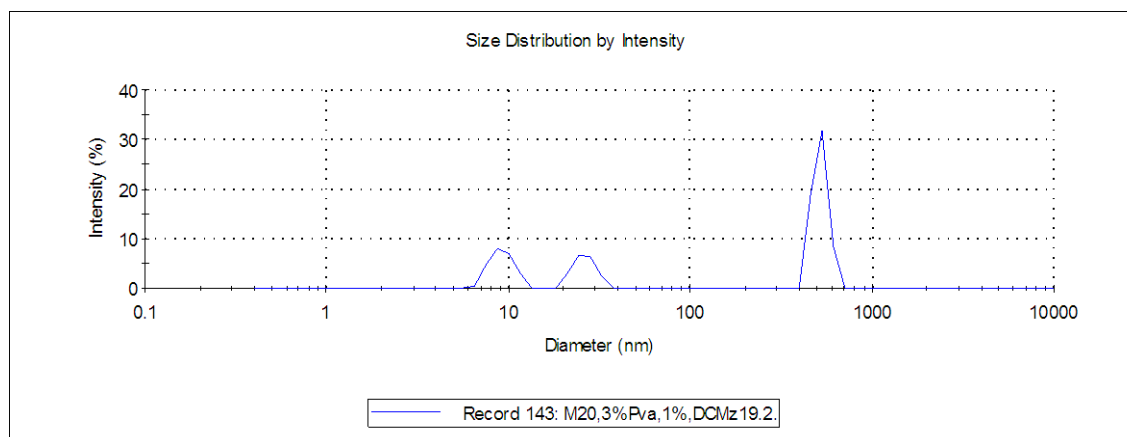
Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo DCM

.

Obr.23: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření



Obr.24: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky.Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 492,5 nm. Ve 2.měření přístroj zaznamenal 3 píky.Největší zastoupení měly částice o velikosti 520,1 nm.

Tabulka 6: Velikost částic pro 3,0% PVA M20, DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	492,5	520,1	506,3	61	58	59,5
<b>Pík 2</b>	21,1	9,236	15,168	20	23	21,5
<b>Pík 3</b>	8,51	26,18	17,345	17	18	17,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 20 000 je 506,3 nm.

**Vliv použitého PVA a jeho koncentrace na velikost částic:**

Tabulka č.7: Celková velikost částic pro použité PVA(1,5%), rozpouštědlo vnitřní fáze DCM

1,5%PVA	DCM 1.měření	DCM 2.měření	Průměr
M10	214,6	220,1	217,35
M15	112,3	343,2	227,75
M20	361,5	232,1	296,8

Tabulka č.8: Celková velikost částic pro použité PVA(3,0%), rozpouštědlo vnitřní fáze DCM

3,0%PVA	DCM 1.měření	DCM 2.měření	průměr
M10	103,5	69,82	86,66
M15	189,4	271,8	230,6
M20	492,5	520,1	506,3

V první sérii měření jsme použili jako rozpouštědlo vnitřní fáze DCM. V tabulce č.7 a č.8 je zaznamenána závislost velikosti částic na druhu a koncentraci použitého rozpouštědla. V případě PVA o koncentraci 1,5% je vidět, že velikost částic se zvyšuje se zvyšující se molekulovou hmotností. Stejná závislost je patrná také u PVA v 3,0% koncentraci, kde opět platí, že se zvyšující se molekulovou hmotností použitého PVA se zvětšuje velikost částic.

## 2.4.2 Chloroform jako rozpouštědlo vnitřní fáze

### 1,5% PVA M10, CHCl<sub>3</sub>

Roztok 1,5% PVA(vnější fáze):

PVA (M10)	.....	0,75g
Voda	.....	49,25g

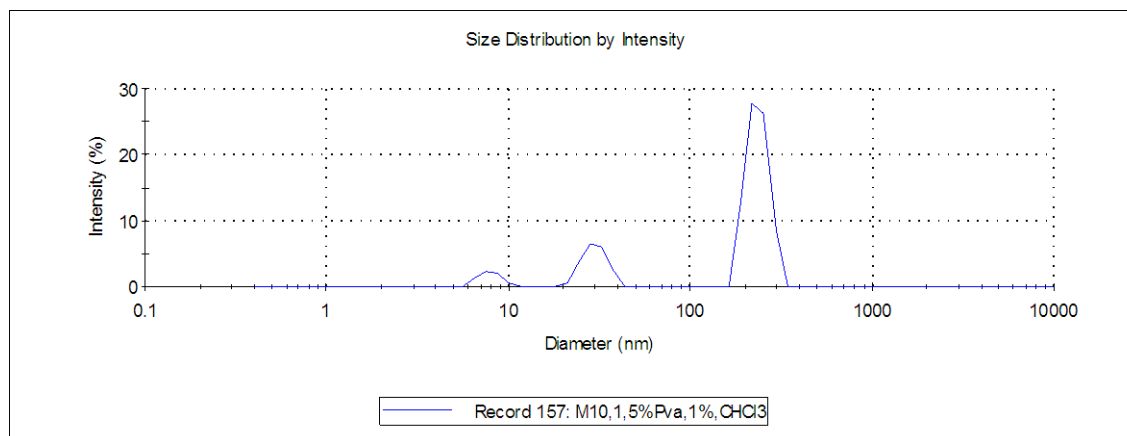
Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 1,5% jsme použili M10.

Roztok 1%PDLLA v CHCl<sub>3</sub>(vnitřní fáze):

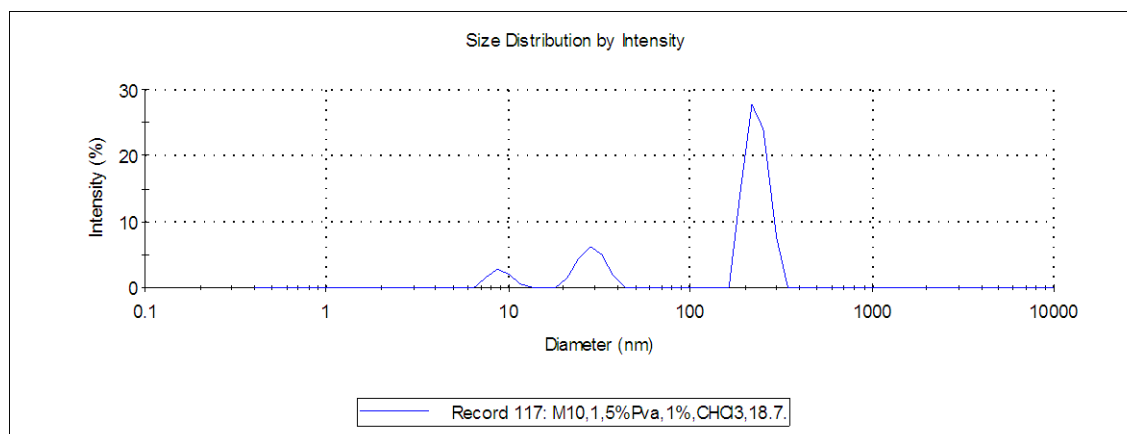
PDLLA	.....	0,1g
CHCl <sub>3</sub>	.....	9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub>.

Obr.25: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření



Obr.26: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 236 nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil také 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 233,3nm.

Tabulka 9: Velikost částic pro 1,5% PVA M10, CHCl<sub>3</sub>

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	236	233,3	234,65	74	74	74
<b>Pík 2</b>	29,92	28,76	29,34	19	18	18,5
<b>Pík 3</b>	7,933	9,007	8,47	5	6	5,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 10 000 je 234,65 nm.

### 1,5% PVA M15, CHCl<sub>3</sub>

Roztok 1,5% PVA:

PVA(M15) ..... 0,75g

Voda ..... 49,25g

Pro přípravu roztoku o koncentraci 1,5% jsme použili M15.

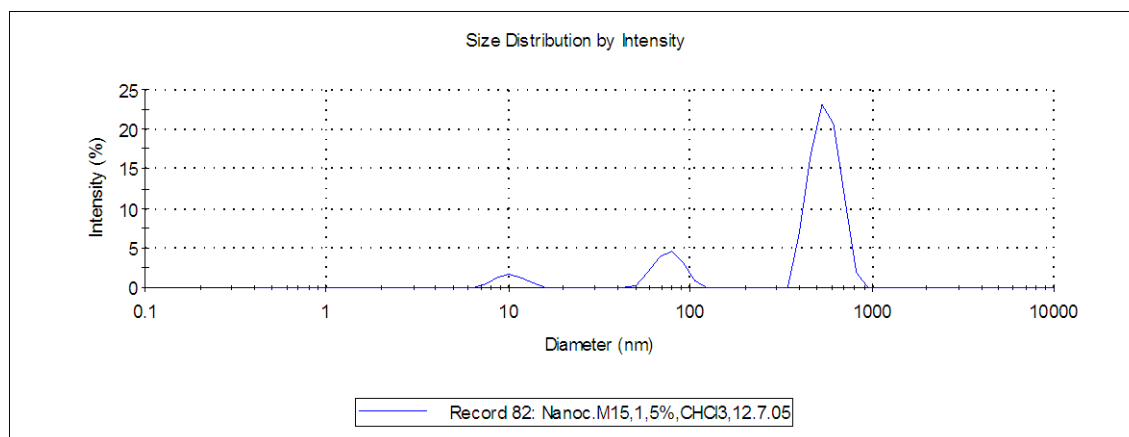
Roztok 1% PDLLA v  $\text{CHCl}_3$ :

PDLLA ..... 0,1g

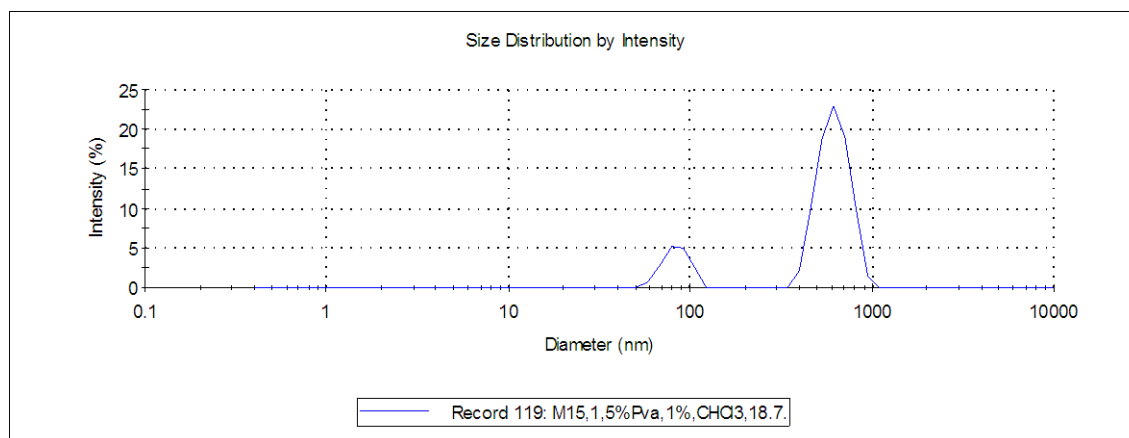
$\text{CHCl}_3$  ..... 9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo  $\text{CHCl}_3$ .

Obr.27: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření



Obr.28: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 558,3nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 2 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 624,4nm.

Tabulka 10: Velikost částic pro 1,5% PVA M15, CHCl<sub>3</sub>

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	558,3	624,4	591,35	80	83	81,5
<b>Pík 2</b>	77,2	84,27	80,735	14	16	15
<b>Pík 3</b>	10,35	0	5,175	5	0	2,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 15 000 je 591,35 nm.

### 1,5% PVA M20, CHCl<sub>3</sub>

Roztok 1,5% PVA(vnější fáze):

PVA(M20) ..... 0,75g

VODA ..... 49,25g

Pro přípravu roztoku o koncentraci 1,5% jsme použili M20.

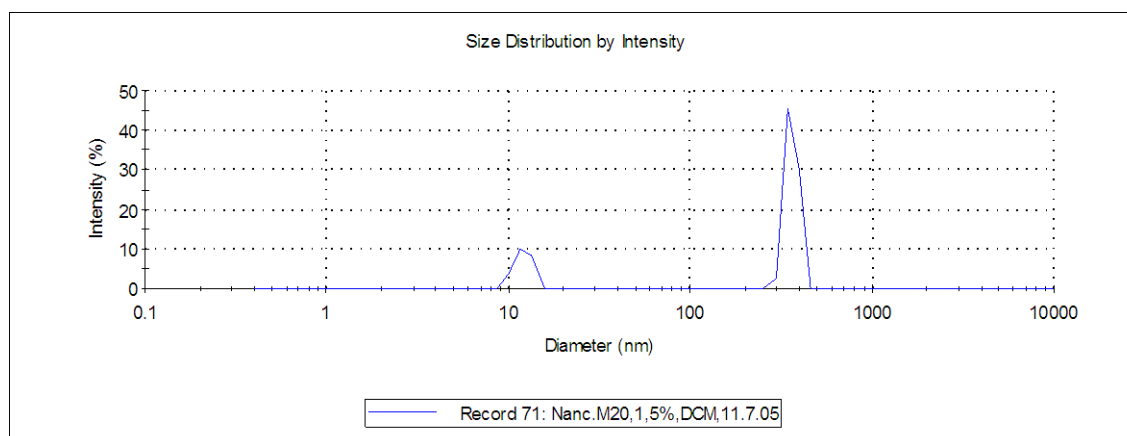
Roztok 1%PDLLA v CHCl<sub>3</sub>(vnitřní fáze):

PDLLA ..... 0,1g

CHCl<sub>3</sub> ..... 9,9g

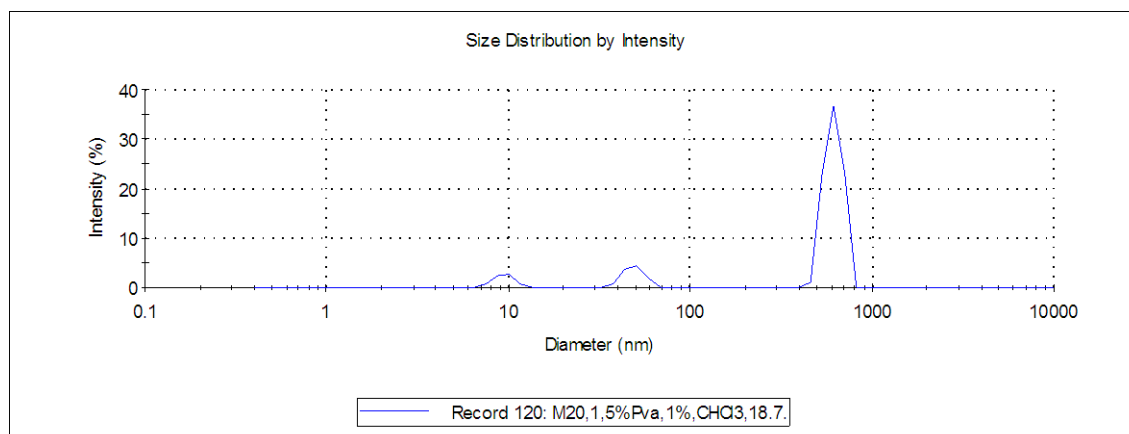
Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub>.

Obr.29: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1.měření





Obr.30: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 2 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 613nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 617,1nm.

Tabulka 11: Velikost částic pro 1,5% PVA M20, CHCl<sub>3</sub>

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	613	617,1	615,05	76	83	79,5
<b>Pík 2</b>	76,17	49,01	62,59	14	10	12
<b>Pík 3</b>	11,33	9,544	10,437	8	6	7

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 20 000 je 615,05 nm.

### 3,0% PVA M10, CHCl<sub>3</sub>

Roztok 3% PVA(vnější fáze):

PVA(M10) ..... 1,5g  
 VODA ..... 48,5g

Pro přípravu roztoku o koncentraci 3% jsme použili M10.

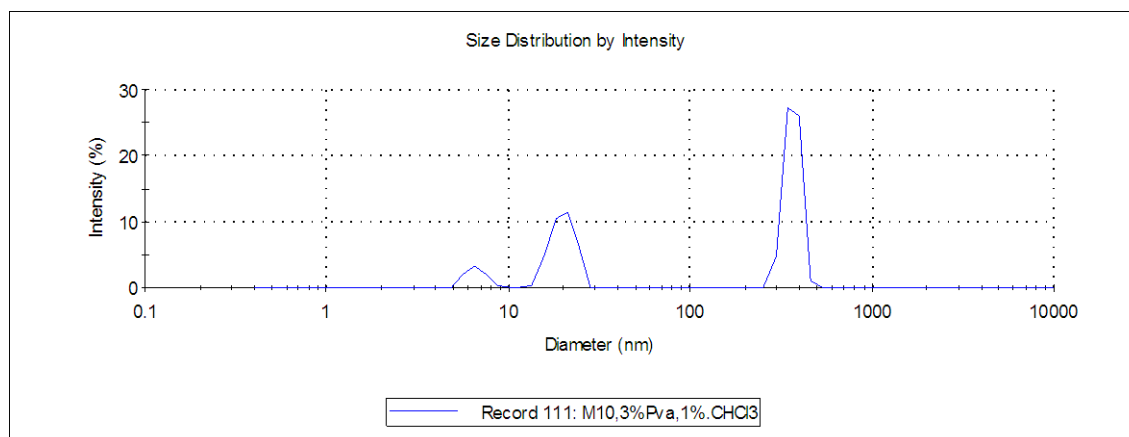
Roztok 1% PDLLA v  $\text{CHCl}_3$  (vnitřní fáze):

PDLLA ..... 0,1g

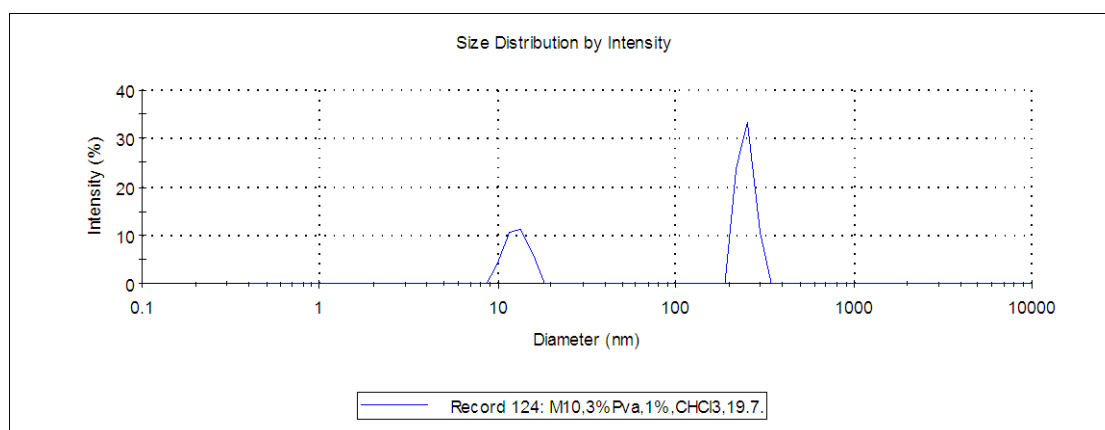
$\text{CHCl}_3$  ..... 9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo  $\text{CHCl}_3$ .

Obr.31: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1. měření



Obr.32: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2. měření



V 1. měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 364,3 nm. Ve 2. měření přístroj zobrazil 2 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 249 nm.

Tabulka 12: Velikost částic pro 3,0% PVA M10, CHCl<sub>3</sub>

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	364,3	249	306,65	58	67	62,5
<b>Pík 2</b>	19,89	12,84	16,365	33	32	32,5
<b>Pík 3</b>	6,635	0	3,3175	7	0	3,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 10 000 je 306,65 nm.

### 3,0% PVA M15, CHCl<sub>3</sub>

Roztok 3,0% PVA(vnější fáze):

PVA(M15) ..... 1,5g

VODA ..... 48,5g

Pro přípravu roztoku o koncentraci 3,0% jsme použili M15.

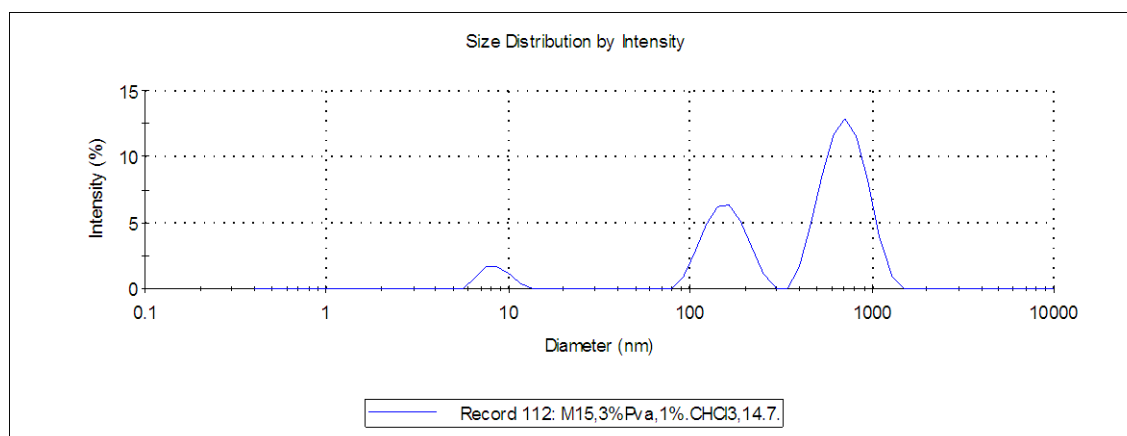
Roztok 1% PDLLA v CHCl<sub>3</sub>(vnitřní fáze):

PDLLA ..... 0,1g

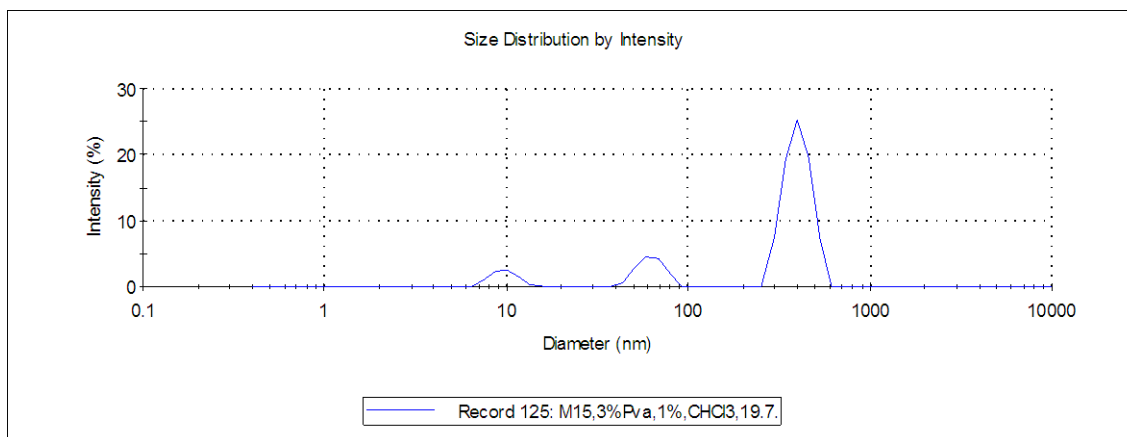
CHCl<sub>3</sub> ..... 9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub>.

Obr.33: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.34: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 727nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 401,1nm.

Tabulka 13: Velikost částic pro 3,0% PVA M15, CHCl<sub>3</sub>

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	727	401,1	564,05	64	78	71
<b>Pík 2</b>	159	62,39	110,695	30	13	21,5
<b>Pík 3</b>	8,517	9,747	9,132	5	7	6

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 15 000 je 564,05 nm.

### 3,0% PVA M20, CHCl<sub>3</sub>

Roztok 3,0% PVA(vnější fáze):

PVA(M20) ..... 1,5g

VODA ..... 48,5g

Pro přípravu roztoku o koncentraci 3,0% jsme použili M20.

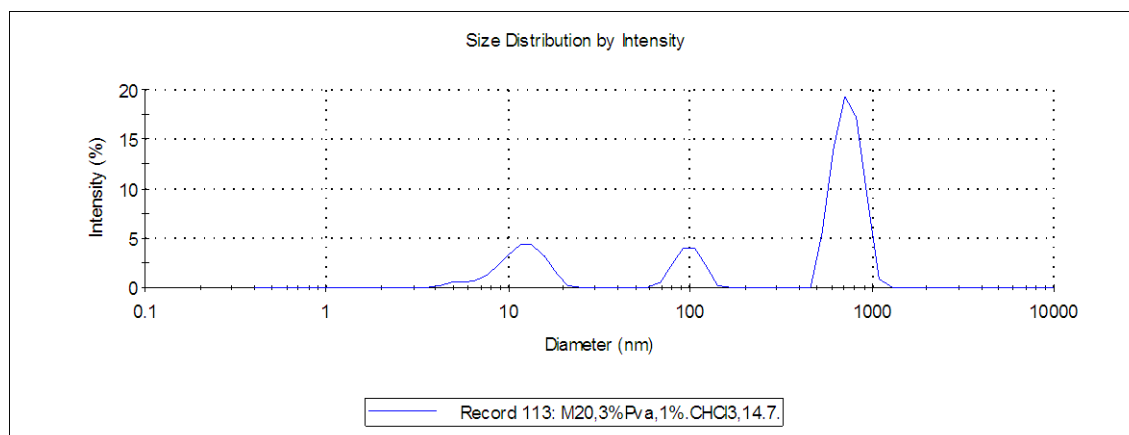
Roztok 1% PDLLA v  $\text{CHCl}_3$  (vnitřní fáze):

PDLLA ..... 0,1g

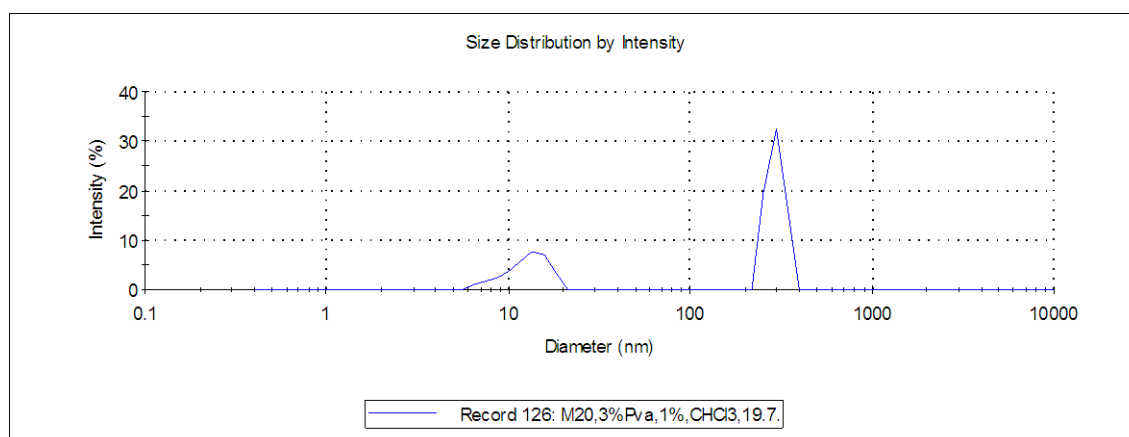
$\text{CHCl}_3$  ..... 9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo  $\text{CHCl}_3$ .

Obr.35: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 1. měření



Obr.36: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 2. měření



V 1. měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 743,6nm. Ve 2. měření přístroj zobrazil 2 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 738,5nm.

Tabulka 14: Velikost částic pro 3,0% PVA M20, CHCl<sub>3</sub>

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	743,6	738,5	741,05	65	88	76,5
<b>Pík 2</b>	11,86	19,03	15,445	21	11	16
<b>Pík 3</b>	98,32	0	49,16	12	0	6

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 20 000 je 741,05 nm.

### Vliv použitého PVA a jeho koncentrace na velikost částic

Tab.č.15: Celková velikost částic pro použité PVA (1,5%), rozpouštědlo vnitřní fáze CHCl<sub>3</sub>

1,5%PVA	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	Průměr
	1.měření	2.měření	
M10	236	233,3	234,65
M15	558,3	624,4	591,35
M20	613	617,1	615,05

Tab.č.16: Celková velikost částic pro použité PVA (3,0%), rozpouštědlo vnitřní fáze CHCl<sub>3</sub>

3%PVA	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	průměr
	1.měření	2.měření	
M10	364,3	249	306,65
M15	727	401,1	564,05
M20	743,6	738,5	741,05

Ve druhé sérii měření jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub>. V tabulce č.15 a č.16 je zaznamenána závislost velikosti částic na druhu a koncentraci použitého rozpouštědla. V případě PVA o koncentraci 1,5% je vidět, že velikost částic se zvyšuje se zvyšující se molekulovou hmotností. Ta samá závislost je patrná také u PVA v 3% koncentraci, kde opět platí, že se zvyšující se molekulovou hmotností použitého PVA se zvětšuje velikost částic.

### 2.4.3 Směs chloroformu a dichlormethanu jako rozpouštědlo vnitřní fáze

#### 1,5% PVA M10, CHCl<sub>3</sub> + DCM

Roztok 1,5% PVA(vnější fáze):

PVA (M10)	.....	0,75g
Voda	.....	49,25g

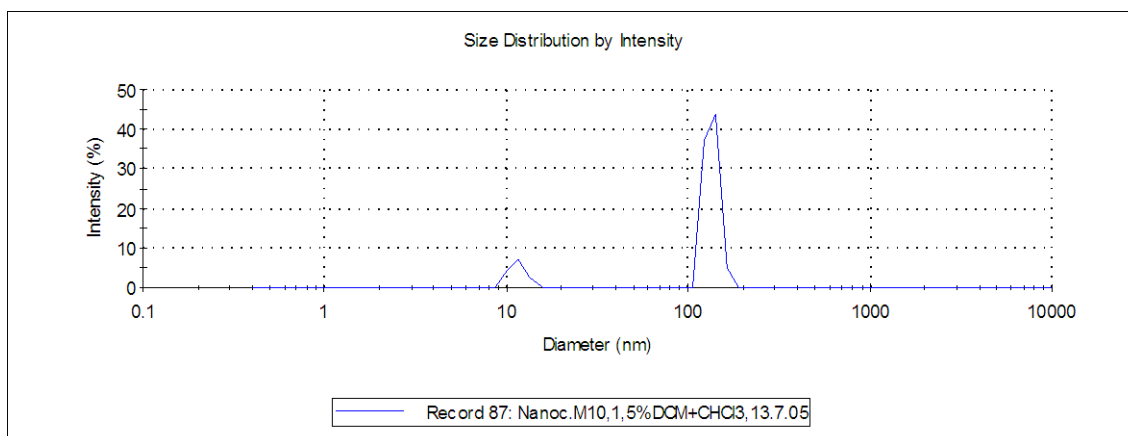
Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 1,5% jsme použili M10.

Roztok 1% PDLLA v CHCl<sub>3</sub> + DCM(vnitřní fáze):

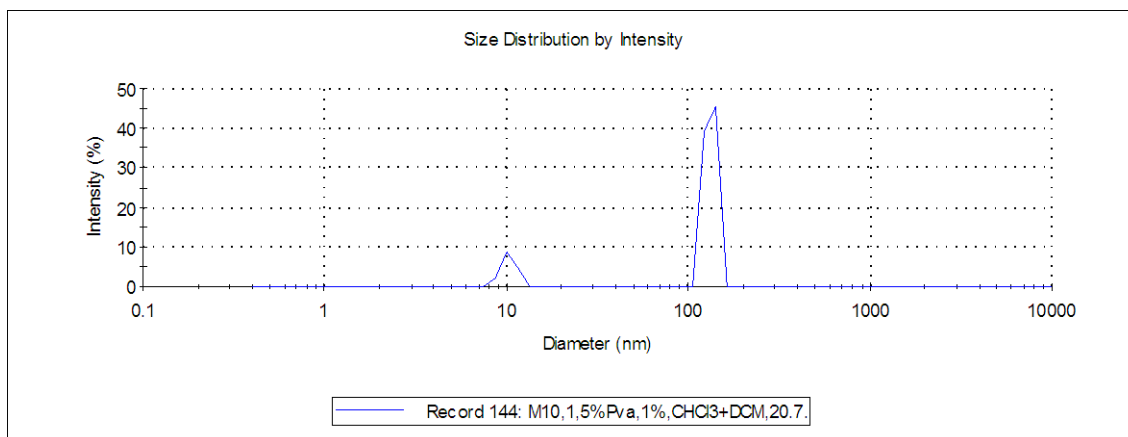
PDLLA	.....	0,1g
CHCl <sub>3</sub>	.....	9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub> + DCM.

Obr.37: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.38: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 2 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 134,7nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 2 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 132,8nm.

Tabulka 17: Velikost částic pro 1,5% PVA M10, CHCl<sub>3</sub> + DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	134,7	132,8	133,75	86	84	85
<b>Pík 2</b>	11,57	10,4	10,985	13	15	14
<b>Pík 3</b>	0	0	0	0	0	0

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 10 000 je 133,75 nm.

### 1,5% PVA M15, CHCl<sub>3</sub> + DCM

Roztok 1,5% PVA(vnější fáze):

PVA (M15) ..... 0,75g

Voda ..... 49,25g

Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 1,5% jsme použili M15.

Roztok 1%PDLLA v CHCl<sub>3</sub> + DCM(vnitřní fáze):

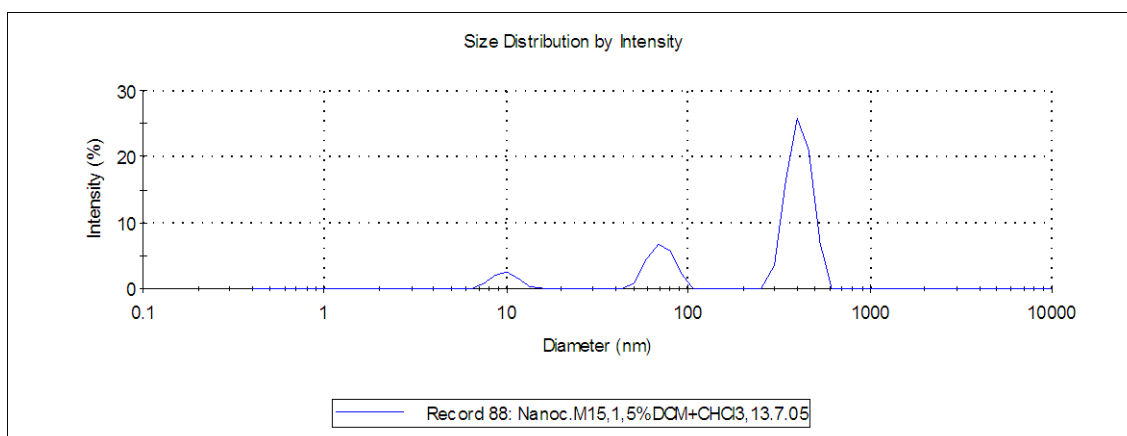
PDLLA ..... 0,1g

CHCl<sub>3</sub> ..... 9,9g

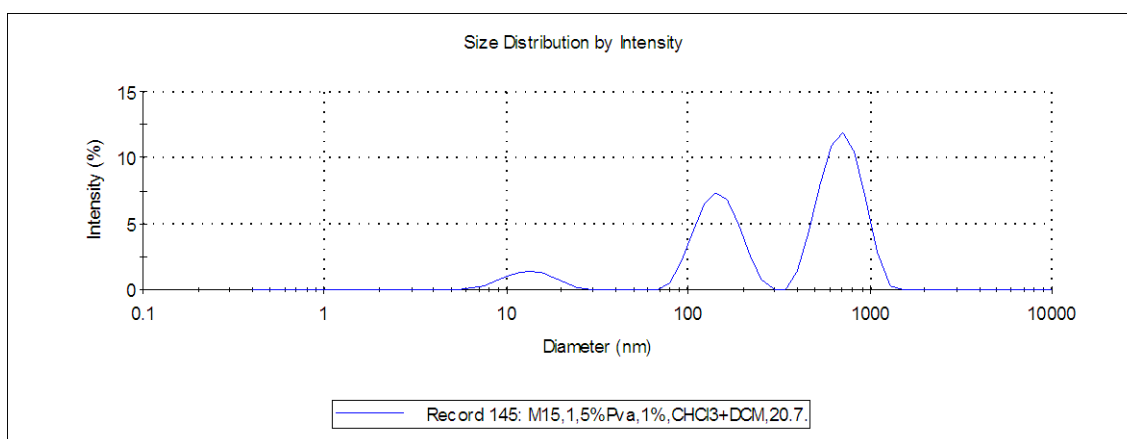
Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub> + DCM.



Obr.39: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.40: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 410,1nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 714,5nm.

Tabulka 18: Velikost částic pro 1,5% PVA M15, CHCl<sub>3</sub> + DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	410,1	714,5	562,3	73	56	64,5
<b>Pík 2</b>	71,3	149,4	110,35	19	35	27
<b>Pík 3</b>	9,873	13,57	11,7215	6	7	6,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 15 000 je 562,3 nm.

### 1,5% PVA M20, CHCl<sub>3</sub> + DCM

Roztok 1,5% PVA(vnější fáze):

PVA (M20)	.....	0,75g
Voda	.....	49,25g

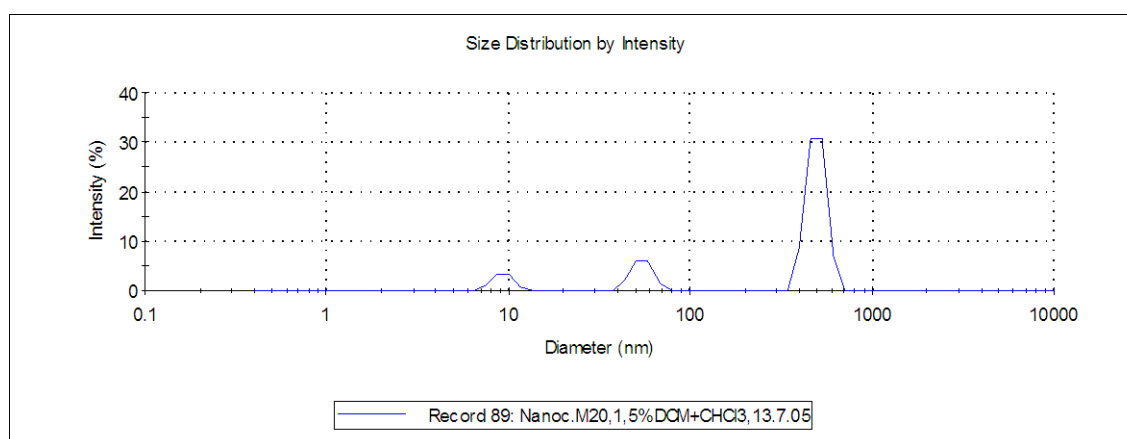
Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 1,5% jsme použili M20.

Roztok 1% PDLLA v CHCl<sub>3</sub> + DCM(vnitřní fáze):

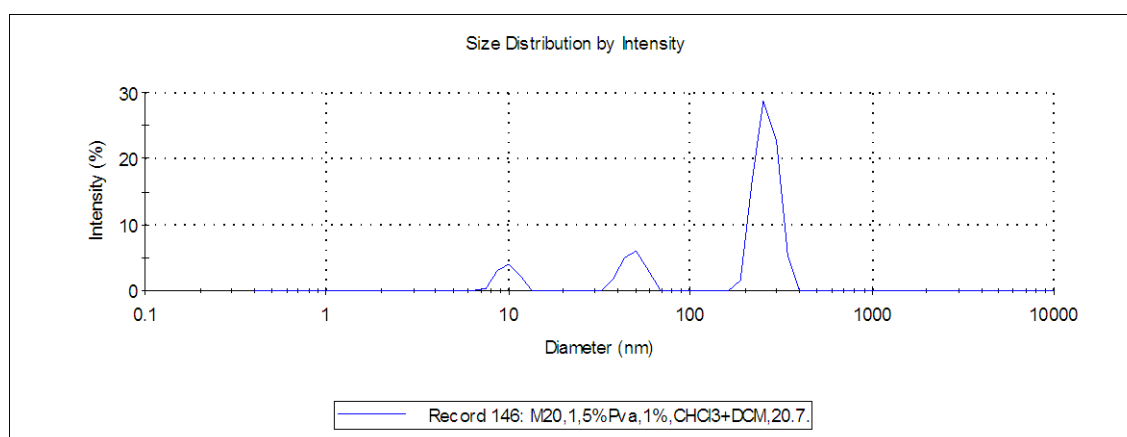
PDLLA	.....	0,1g
CHCl <sub>3</sub>	.....	9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub> + DCM.

Obr.41: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.42: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 494,7nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 264,5nm.

Tabulka 19: Velikost částic pro 1,5% PVA M20, CHCl<sub>3</sub> a DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	494,7	264,5	379,6	76	74	75
<b>Pík 2</b>	54,37	48,9	51,635	14	15	14,5
<b>Pík 3</b>	9,373	9,955	9,664	8	9	8,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 1,5% PVA Mw 20 000 je 379,6 nm.

### 3,0% PVA M10, CHCl<sub>3</sub> + DCM

Roztok 3,0% PVA(vnější fáze):

PVA (M10) ..... 1,5g  
 Voda ..... 48,5g

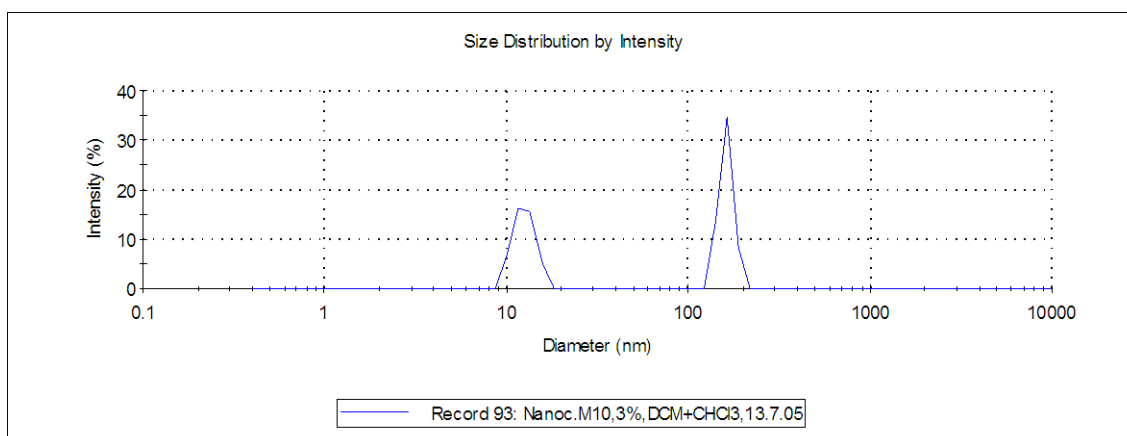
Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 3,0% jsme použili M10.

Roztok 1% PDLLA v CHCl<sub>3</sub> + DCM(vnitřní fáze):

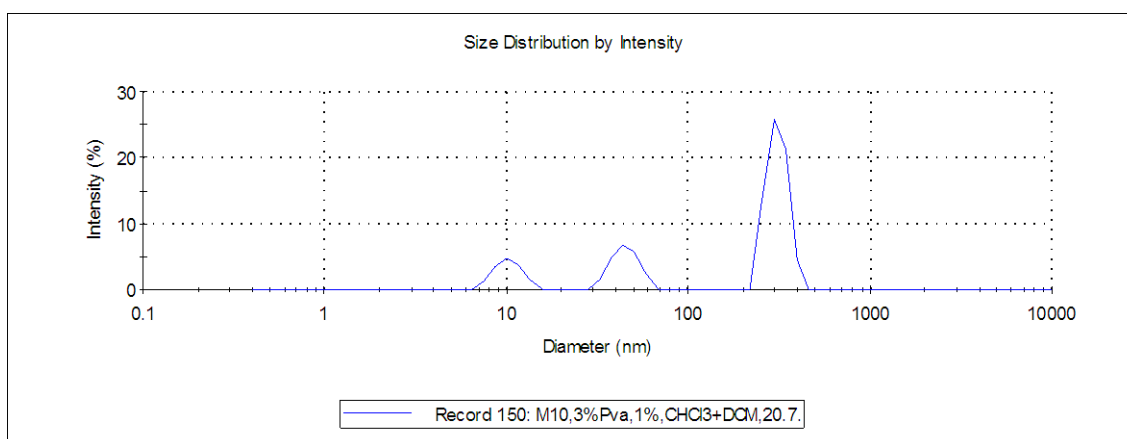
PDLLA ..... 0,1g  
 CHCl<sub>3</sub> ..... 9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub> + DCM.

Obr.43: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.44: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 2 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 162,7nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 309,6nm.

Tabulka 20: Velikost částic pro 3,0% PVA M10, CHCl<sub>3</sub> a+DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	162,7	309,6	236,15	56	64	60
<b>Pík 2</b>	12,58	45,33	28,955	43	20	31,5
<b>Pík 3</b>	0	10,34	5,17	0	14	7

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 10 000 je 236,15nm.

### 3,0% PVA M15, CHCl<sub>3</sub> + DCM

Roztok 3,0% PVA(vnější fáze):

PVA (M15)	.....	1,5g
Voda	.....	48,5g

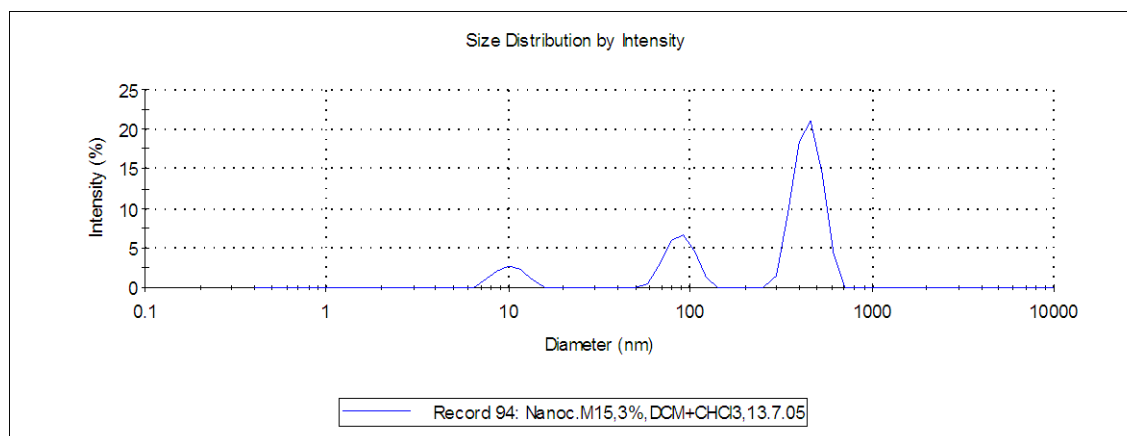
Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 3,0% jsme použili M15.

Roztok 1% PDLLA v CHCl<sub>3</sub> + DCM(vnitřní fáze):

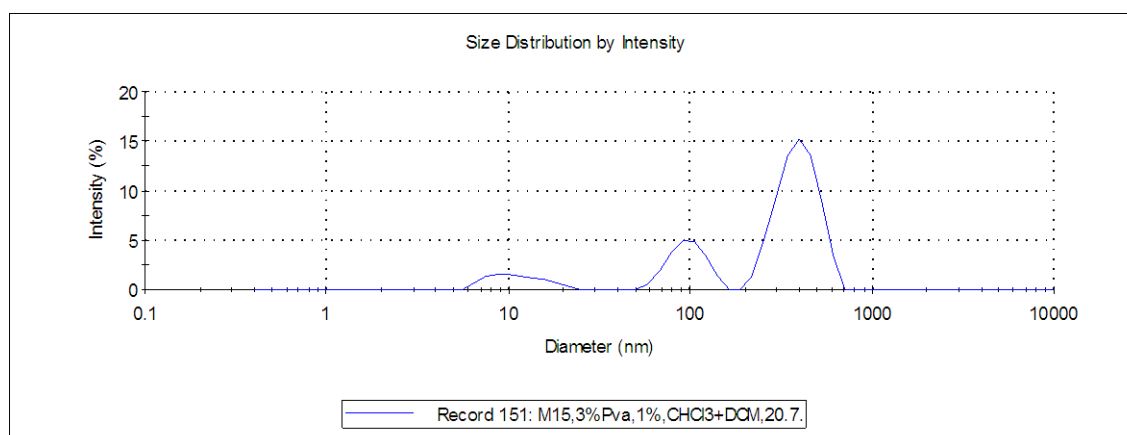
PDLLA	.....	0,1g
CHCl <sub>3</sub>	.....	9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub> + DCM.

Obr.45: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.46: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 447,8nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 3 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 398nm.

Tabulka 21: Velikost částic pro 3,0% PVA M15, CHCl<sub>3</sub> + DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	447,8	398	422,9	68	69	68,5
<b>Pík 2</b>	88,93	97,69	93,31	21	20	20,5
<b>Pík 3</b>	10,36	11,57	10,965	9	9	9

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 15 000 je 422,9 nm.

### 3,0% PVA M20, CHCl<sub>3</sub> + DCM

Roztok 3,0% PVA(vnější fáze):

PVA (M20) ..... 1,5g  
 Voda ..... 48,5g

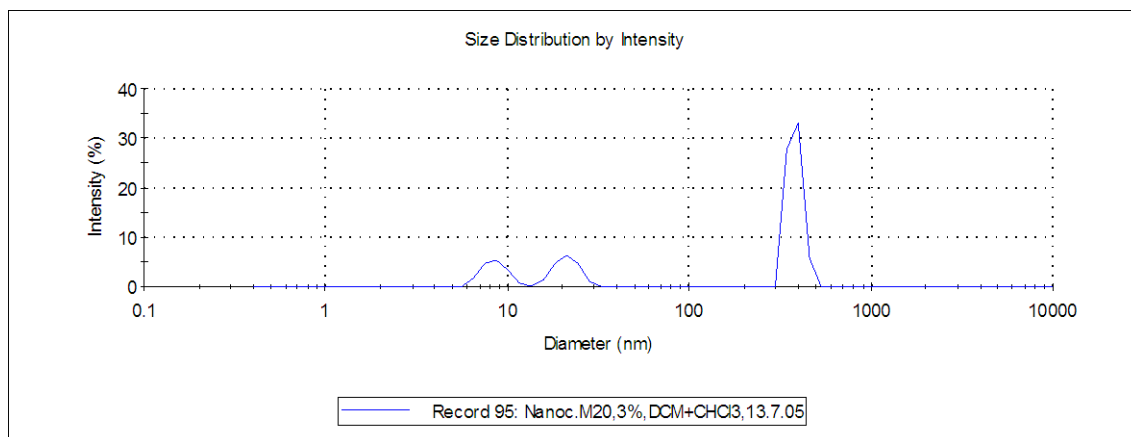
Pro přípravu roztoku PVA o koncentraci 3,0% jsme použili M20.

Roztok 1%PDLLA v CHCl<sub>3</sub> + DCM(vnitřní fáze):

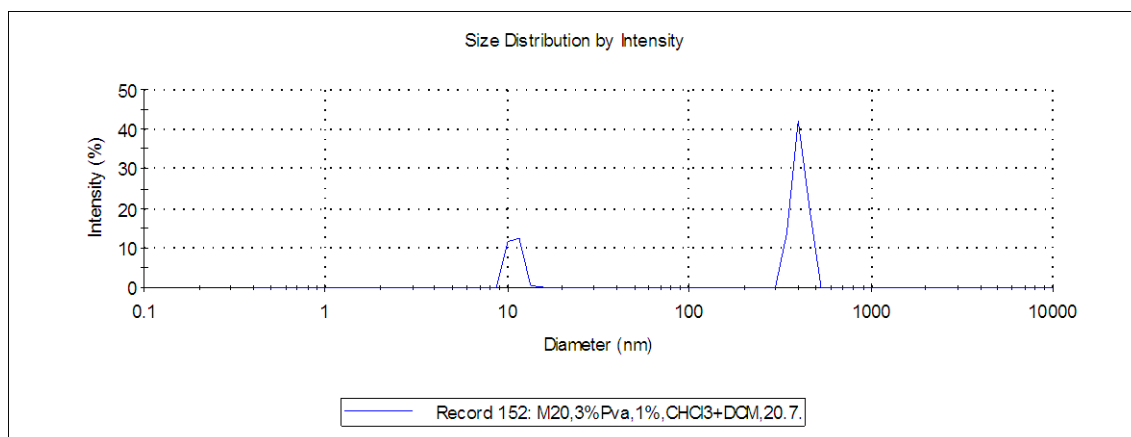
PDLLA ..... 0,1g  
 CHCl<sub>3</sub> ..... 9,9g

Pro přípravu 1% roztoku PDLLA jsme použili jako rozpouštědlo CHCl<sub>3</sub> + DCM.

Obr.47: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,1.měření



Obr.48: Distribuce velikosti částic(v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku,2.měření



V 1.měření přístroj zaznamenal 3 píky. Ve vzorku se nejvíce nacházely částice o velikosti 378,6nm. Ve 2.měření přístroj zobrazil 2 píky. Největší zastoupení měly částice o velikosti 402,9nm.

Tabulka 22: Velikost částic pro 3,0% PVA M20, CHCl<sub>3</sub> + DCM

	Velikost částic [nm]			% intenzity		
	1.měření	2.měření	průměr	1.měření	2.měření	průměr
<b>Pík 1</b>	378,6	402,9	390,75	66	75	70,5
<b>Pík 2</b>	21,23	10,96	16,95	18	24	21
<b>Pík 3</b>	8,545	0	4,2725	15	0	7,5

Průměr velikosti částic ze dvou měření pro 3,0% PVA Mw 20 000 je 390,75 nm.

**Vliv použitého PVA a jeho koncentrace na velikost částic**

Tab.č.23: Celková velikost částic pro použité PVA (1,5%), rozpouštědlo vnitřní fáze  $\text{CHCl}_3$  + DCM

1%PVA	$\text{CHCl}_3$ + DCM 1.měření	$\text{CHCl}_3$ + DCM 2.měření	Průměr
M10	134,7	132,8	133,75
M15	410,1	714,5	562,3
M20	494,7	264,5	379,6

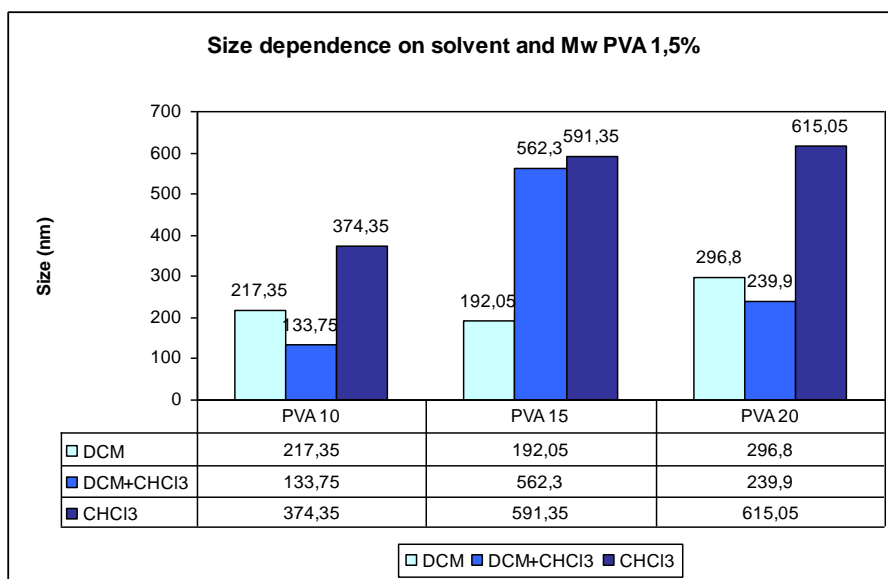
Tab.č.24: Celková velikost částic pro použité PVA (3%), rozpouštědlo vnitřní fáze  $\text{CHCl}_3$  + DCM

3%PVA	$\text{CHCl}_3$ + DCM 1.měření	$\text{CHCl}_3$ + DCM 2.měření	průměr
M10	162,7	309,6	236,15
M15	447,8	398	422,9
M20	378,6	402,9	390,75

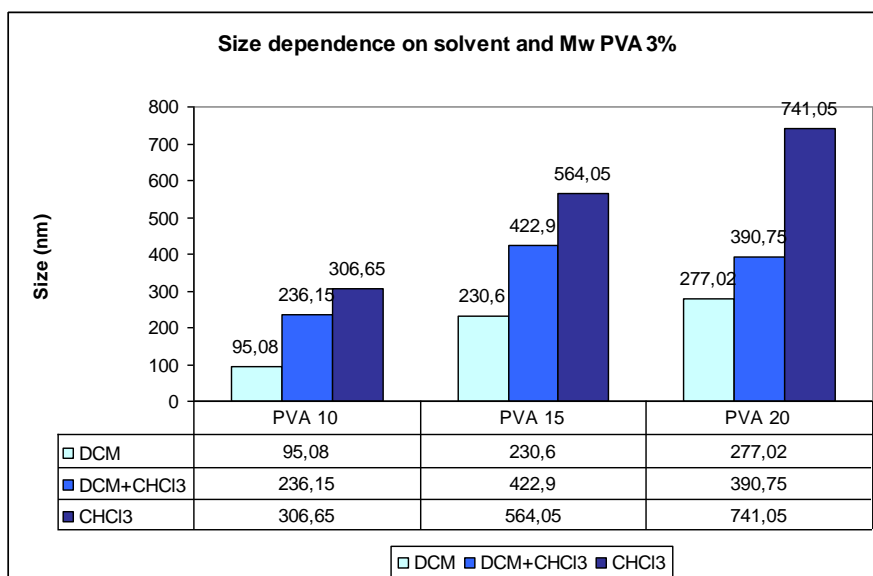
Ve třetí sérii měření jsme jako rozpouštědlo použili směs  $\text{CHCl}_3$  + DCM(v poměru 1:1). Tato směs se jeví jako nestandardní a nevhodná pro přípravu nanočástic. Jednotlivá měření se od sebe dost liší a není zde patrná závislost velikosti částic na molekulové hmotnosti emulgátoru.



Obr.49: Závislost velikosti částic na rozpouštědle, Mw PVA 1,5%



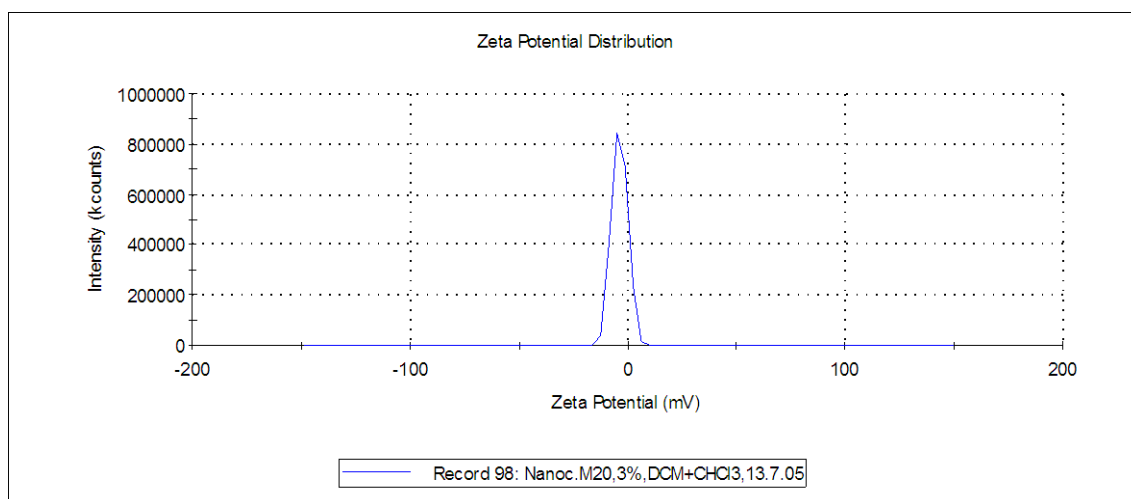
Obr.50: Závislost velikosti částic na rozpouštědle, Mw PVA 3%



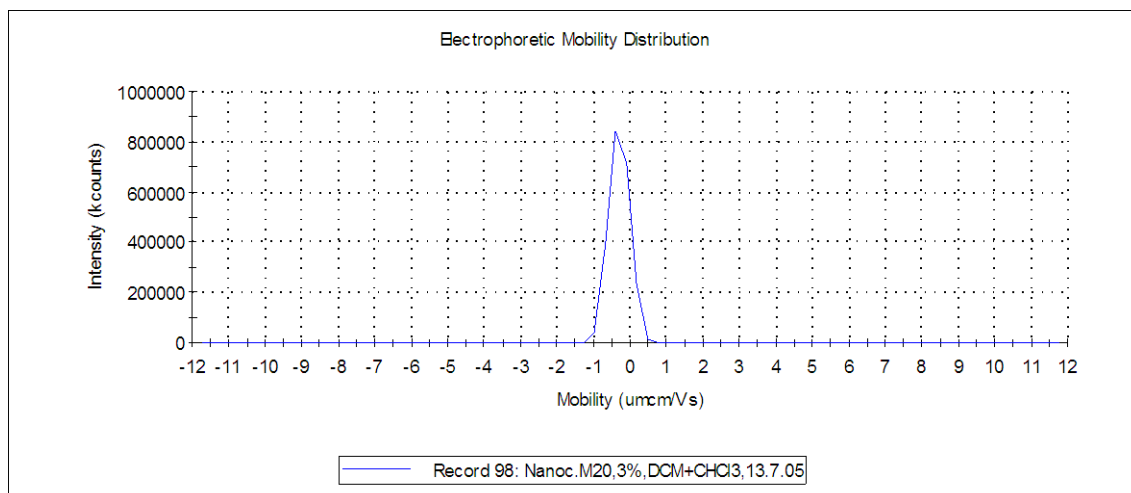
## 2.5 Měření zeta potenciálu

Zeta potenciál jsme měřili na Zetasizeru pro každý vzorek zvlášť, ze stejného vzorku jako velikost částic. Do Zetasizeru se vkládají speciální kyvety určené právě pro měření zeta potenciálu. Zetasizer zaznamenává výsledky a tyto údaje zpracovává a z výsledků sestruje zeta potenciálovou distribuci a distribuci elektroforetické mobility.

Obr.51: Ukázka grafu distribuce zeta potenciálu



Obr.52: Ukázka grafu distribuce elektroforetické mobility



V případě grafu Distribuce zeta potenciálu je na ose X zobrazen zeta potenciál v mV a na ose Y je zobrazena intenzita. V grafu Distribuce elektroforetické mobility je na ose X zobrazena mobilita, na ose Y je zobrazena intenzita.

V následujících tabulkách uvádím hodnoty pro jednotlivá měření vzorků, pro rozpouštědla vnitřní fáze DCM, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub> + DCM jako rozpouštědla a opět dvou koncentrací (1,5%, 3%) PVA tří molekulových hmotností (M10, M15, M20).

Tab.25: Hodnoty zeta potenciálu (mV), rozpouštědlo vnitřní fáze DCM

	<b>1,5% PVA</b>	<b>3% PVA</b>
PVA	- 12,41	- 8,62
<b>(M10)</b>	- 13,37	- 7,21
PVA	- 6,8	- 3,14
<b>M15</b>	- 5,795	- 3,381
PVA	- 6,797	- 3,264
<b>M20</b>	- 7,972	- 3,309

Tab.26: Hodnoty zeta potenciálu (mV), rozpouštědlo vnitřní fáze CHCl<sub>3</sub>

	<b>1,5% PVA</b>	<b>3% PVA</b>
PVA	- 12,9	- 7,493
<b>(M10)</b>	- 14,28	- 8,089
PVA	- 6,199	- 3,273
<b>M15</b>	- 6,502	- 2,959
PVA	- 6,797	- 7,493
<b>M20</b>	- 8,498	- 4,207

Tab.27: Hodnoty zeta potenciálu (mV), směs rozpouštědel CHCl<sub>3</sub> + DCM

	<b>1,5% PVA</b>	<b>3% PVA</b>
PVA	- 12,88	- 6,871
<b>(M10)</b>	- 13,56	- 11,25
PVA	- 6,56	- 2,822
<b>M15</b>	- 7,319	- 2,283
PVA	- 8,245	- 3,766
<b>M20</b>	- 8,513	- 3,416

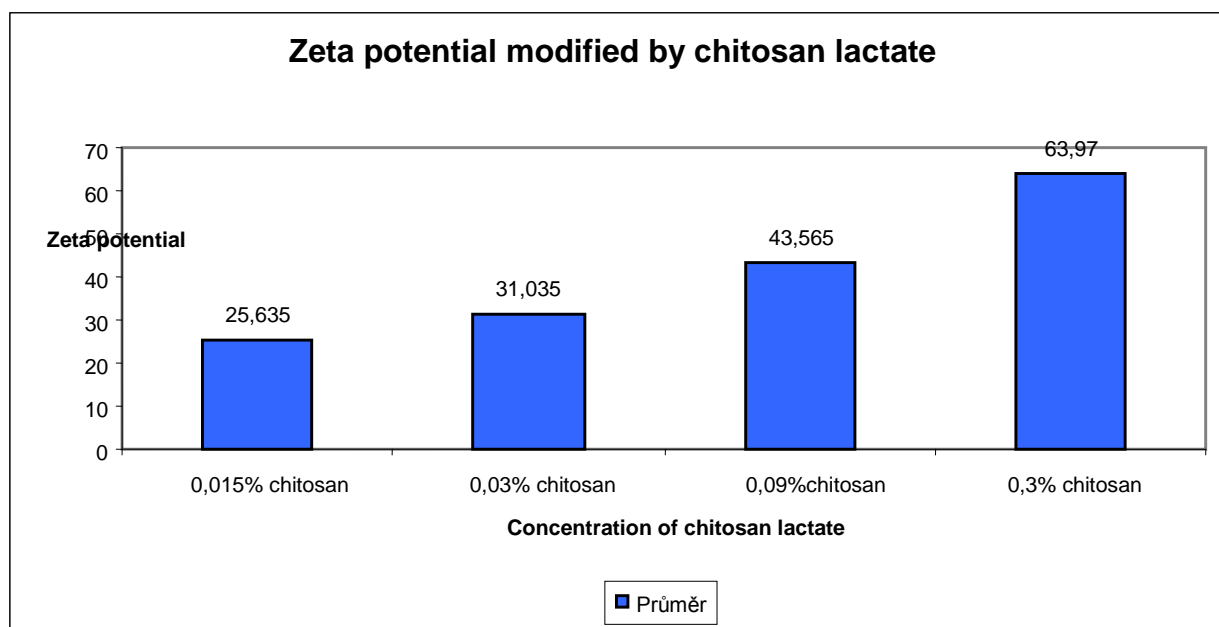
Zeta potenciál byl u všech vzorků pod hranicí stability, to znamená, že všechny roztoky, které jsme připravili nejsou stabilní. Pomocí chitosanu jsme zkoušeli ovlivnit hodnotu zeta potenciálu a tedy i stability roztoků. Na konci přípravy roztoků vzorků (viz začátek experimentální části) jsme místo 150 ml vody použili 150 ml vodného roztoku chitosanu dané koncentrace (0,015%, 0,03%, 0,09%, 0,3%). Tzn. že jsme navázili 0,75g, 1,5g, 4,5g, 15g 3% roztoku chitosan laktátu (báze chitosanu je nerozpustná) a dovážili do 150g vody. A dále jsme postupovali již známým postupem. PVA jsme používali v koncentraci 3%. Měření jsme opakovali dvakrát. V tab.č.28 jsou hodnoty zeta potenciálu s použitím soli chitosanu.

Tab.28: Vliv koncentrace soli chitosanu na hodnoty zeta potenciálu

	0,015% chitosan	0,03% chitosan	0,09% chitosan	0,3% chitosan
1.měření (nm)	29,2	35,25	41,9	62,14
2.měření (nm)	22,07	26,82	45,23	65,8

Z výsledků vyplývá, že chitosan pozitivně ovlivňuje hodnotu zeta potenciálu a tudíž zvyšuje stabilitu připravených částic.

Obr.53: Hodnoty zeta potenciálu s využitím chitosanu laktátu



## 3 Diskuse

### 3.1 Obecné poznámky

Nanočástice jsou lékovou formou budoucnosti. Jejím zavedení do praxe dosud bránilo několik důvodů vycházejících ze standardnosti výrobního procesu, standardnosti produktů, jejich stability a biodostupnosti. Prvním preparátem vyvinutým firmou American Bioscience a zavedeným nedávno do praxe (únor 2005) společností Abraxis Oncology, divizí American Pharmaceutical Partners (APPX) je Abraxane® obsahující paclitaxel. Jedná se o prášek dispergovatelný v kapalině, aplikovatelný injekčně při léčbě karcinomu mléčné žlázy. Je oznámeno zavedení přípravku obdobného obsahujícího docetaxel. O náročnosti výroby přípravku Abraxane® nepřímo svědčí jeho ochrana 19 patenty USA. Jedná se o nanočástice z lidského sérového albuminu menší než 100 nm. 30 minut po jeho aplikaci se dosáhne o 50 % vyšších hladin léčiva než v jiných přípravcích založených na solubilizaci Cremoforem ve směsi s toxickými rozpouštědly (29).

V předložené diplomové práci jsou obsaženy výsledky, které jsou prvními, které byly experimentálně na katedře farmaceutické technologie farmaceutické fakulty získány. Snahou bylo získat experimentální cestou základní obrysy formulace potenciálního biodegradabilního injekční cestou aplikovatelného přípravku metodou přípravy dispergací emulze a zadaným složením.

Byla zvolena metoda emulzní založená na distribuci rozpouštědla z vnitřní olejové fáze do vnější vodné. Uvedený postup je možno při omezené mísitelnosti rozpouštědla poměrně snadno regulovat. Pro dispergaci roztoku nosiče byl vybrán relativně výkonný desintegrátor Diax firmy Heidolph s různými dispergačními nástavci typu turbín s ozubeným věncem.

Pro formulaci nanočástic byla vybrána kyselina poly(DL-mléčná), tedy nosič, který má relativně nízký stupeň bobtnání ve vodném médiu, dostatečnou hydrolytickou stabilitu a poměrně vysokou hodnotu teploty skelného přechodu.

Pro přípravu nanočástic byly vyzkoušeny chloroform a dichlormethan, rozpouštědla v jiných pracích osvědčená, především proto, že to jsou termodynamicky dobrá rozpouštědla alifatických polyesterů. S vodou se chloroform mísí na 0,9% roztok, dichlormethan na 2,2% roztok. Obě rozpouštědla patří do 2. třídy rozpouštědel podle doporučeného třídění FDA pro farmaceutický průmysl. Třídění na 3 skupiny vychází z toxikologických parametrů.

Koncentrace roztoku kyseliny poly(DL-mléčné) byla zvolena 1%, tedy velmi nízká, aby bylo možno tuto vnitřní fázi dostatečně dispergovat. Z důvodu přehlednosti nebylo v této prvotní fázi prací použito žádné léčivo.

Vnější vodná fáze emulze měla také složení osvědčené z mnoha dříve publikovaných prací. Byl použit roztok polyvinylalkoholu ve vodě. Jeho koncentrace 1,5 % a 3,0 % byla na základě studia údajů v literatuře použita na dvou různých hladinách. Jako nově studovaný faktor byla střední molekulová hmotnost tohoto tenzidu. Stupeň jeho deacetylce nebyl brán v úvahu.

Byla měřena velikost částic a hodnota zeta potenciálu pomocí zařízení Zetasizer firmy Malvern Instruments. Kromě středního rozměru částic byl měřen jejich zeta potenciál po přípravě nebo po zpracování částic v roztoku soli chitosanu.

### **3.2 Velikost nanočástic**

Byl hodnocen vliv tří parametrů na velikost nanočástic – prvním bylo složení rozpouštědla a týkalo se vnitřní fáze emulze, druhý a třetí parametr měl souvislost s její vnější fází a byl řešen v podobě druhu emulgátoru a jeho koncentrace. Výsledky jsou ve 24 tabulkách a na 38 obrázcích.

Z autentických záznamů intenzity rozptýleného paprsku je patrné, že jednotlivé produkty se lišily nejen polydisperzitou nanočástic, ale také modalitou jejich velikostní distribuce. Po srovnání paralelně připravených vzorků prezentovaných na obr. 15 a 16 je možno dojít k názoru o unimodální distribuci v jednom případě a bimodální ve druhém. Částice prokázané ve velikostní třídě pod 10 nm (kolem 7 nm) jsou pravděpodobně micely povrchově aktivního kopolymeru polyvinylalkoholu s polyvinylacetátem.

Na obr. 18 je dokonce bimodální distribuce micel výše molekulárního PVA. Velikost micel buď nesouvisí s molekulovou hmotností emulgátoru, nebo se jedná především u větších (nad 10 nm) o extrémně malé nanočástice obklopené monovrstvou molekul PVA. Nasvědčoval by tomu poměr ploch pod píkem ve prospěch malých částic na obr. 19 a 20 při použití nízkomolekulárního emulgačně vysoce účinného PVA ve vyšší, 3% koncentraci.

Zvýšená 3% koncentrace středně molekulárního a vysoko molekulárního polyvinylalkoholu vedla k opakovaně trimodální distribuci velikosti. Dvě větší velikostní třídy jsou nanočásticemi, nejmenší pod 10 nm je pravděpodobně prázdnými micelami (obr. 21 a 22, obr. 23 a 24). Všechny výše popsané vzorky byly připraveny z dichlormethanového roztoku nosiče.

Při použití chloroformu a 1,5% polyvinylalkoholu bylo kromě zvětšení nanočástic pozorován vznik výraznějšího píku středně velkých částic velikosti od 20 nm do 80 nm. Po zvýšení koncentrace emulgátoru na 3% se u některých vzorků střední velikostní třída nanočástic posunula nad 100 nm.

Také u nanočástic připravených ze směsi dichlormethanu s chloroformem byly zjištěny částice středně velké frakce s rozměrem nad 100 nm. Zajímavá je zvýšená polydisperzita třídy největších částic získaných pomocí střemolekulárního PVA (obr. 39 a 40, obr. 45 a 46).

Vliv různých rozpouštědel kyseliny poly(DL-mléčné) při použití polyvinylalkoholu různých parametrů a různé koncentrace je možno posoudit z obr. 49 a 50.

Je možno konstatovat, že při použití emulgátorů ve vyšší (3%) koncentraci (obr. 50) byl účinek změny rozpouštědla nezávislý na volbě emulgátoru. Nejmenší nanočástice vznikaly za použití dichlormethanu, největší z chloroformových roztoků. Podle předpokladů byla získány ze směsí obou rozpouštědel nanočástice střední velikosti. Také vliv různých polyvinylalkoholů byl jednoznačný. Využitím nízkomolekulárního PVA byly připraveny nejmenší mikročástice, v roztocích PVA s nejvyšší molekulovou hmotností částice největší. Evidentní tedy je, že povrchová aktivita emulgátoru byla parametrem, který měl větší sílu než viskozita vnější fáze.

Při použití polyvinylalkoholu v nižší (1,5%) koncentraci nebyly jednotlivé vlivy natolik jednoznačné. Jedná se především o vliv kvality rozpouštědla při použití různých emulgátorů. Nevýrazně rušivě působila velikost vzorků připravených pomocí středně molekulárního PVA. Příslušné nanočástice měly mimořádně velký rozměr.

### **3.3 Povrchový náboj nanočástic**

Pro cílenou distribuci nanočástic má zásadní důležitost nejen jejich velikost, ale také jejich povrchový náboj.

V tabulkách 25, 26 a 27 je přehled hodnot zeta potenciálu nanočástic připravených z roztoků nosiče v různých rozpouštědlech. Je z nich patrné, že všechny vzorky měly záporný zeta potenciál vysvětlitelný nábojem koncových karboxylů. Vzhledem k nízkému stupni disociace byly hodnoty velmi nízké.

Vliv rozpouštědla se prakticky neprojevil. Zajímavé jsou stejné vztahy mezi vzorky připravenými z různých roztoků nosiče v roztocích různých emulgátorů. Nejvýraznější

záporné hodnoty byly prokázány v roztocích PVA s nejnižší molekulovou hmotností. Po zvýšení jeho koncentrace se hodnota zeta-potenciálu ve všech rozpouštědlech výrazně snížila. Je zde jednoznačná souvislost s tloušťkou a kompaktností adsorpční vrstvy polymeru pevně zakotvené v povrchové vrstvě nanočástic. Nejnižší zeta potenciál měly nanočástice připravené v 3% roztocích středně molekulárního PVA (-3 mV).

Chitosan je modifikovaný (polosyntetický) biopolymer, který je pokládán za zajímavý vzhledem k tomu, že patří mezi kationické polyelektrolyty. Jak je patrné z tabulky 28 a z obr. 53, tento polymer mění výrazně hodnoty zeta potenciálu do oblasti kladných hodnot. Jeho vliv je jednoznačně závislý na koncentraci. Jeho 0,09% koncentrace ve vodném roztoku je dostačující pro agregátní stabilizaci jeho disperzí. Účinek této kladně nabitě monomolekulární vrstvy na adhezi, případně na transfekci nanočástic by bylo nutno experimentálně potvrdit.



## 4 Závěry

- A. Bylo prokázáno, že za pomoci desintegrátoru Diax 900 firmy Heidolph je možno emulzní metodou připravit nanočástice z biodegradabilních polyesterů.
- B. Nanočástice mají většinou bimodální, méně často unimodální distribuci velikosti částic. Případná třetí velikostní třída nejmenších částic velikosti kolem 10 nm jsou patrně prázdné micely nebo micely se solubilizovanými velmi malými partikulami.
- C. Kyselina poly(DL-mléčná) se jako modelový nosič v iniciální fázi výzkumu osvědčila.
- D. Dichlormethan je rozpouštědlo, které poskytuje menší a méně polydisperzní nanočástice než chloroform nebo směs obou rozpouštědel.
- E. Polyvinylalkohol je emulgátor, který je dostatečně účinný při dispergaci roztoku polyesterového nosiče. Jeho účinnost je vyšší v případě nižší molekulové hmotnosti, v našem případě to byla hodnota 10 000.
- F. Ve srovnání s 3% byla jako vhodnější prokázána nižší 1,5% koncentrace polyvinylalkoholu.
- G. Nanočástice připravené v prostředí vodných roztoků polyvinylalkoholu měly velmi nízké záporné hodnoty zeta potenciálu.
- H. Sůl chitosanu se na povrch nanočástic velmi ochotně váže a výrazně mění jejich zeta potenciál. Kladné hodnoty zeta potenciálu jsou závislé na koncentraci soli chitosanu.
- I. V daném experimentálním schématu byly nalezeny jako optimální podmínky pro přípravu nanočástic z kyseliny poly(DL-mléčné): dichlormethan jako rozpouštědlo nosiče, vnější fáze vodný 1,5% roztok polyvinylalkoholu  $M_w$  10 000. Takto připravené nanočástice měly střední hodnotu průměru 218 nm.

## Použitá literatura

1. Donald E. Owens III and Nicholas A. Peppas, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int. J. of Pharm.*, Volume 307, Issue 1, 3 January 2006, 93-102
2. V. Labhasetwar, A.K. Dorle, Nanoparticles a colloidal drug delivery system for primaquine and metronidazole, *Journal of Controlled Release*, Volume 12, Issue 2, April 1990, Pages 113-119
3. V. Labhasetwar, C. Song, W. Humphrey, R. Shebuski, R.J. Levy, Arterial Uptake of biodegradable nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, Volume 54, Issue 2, 31 July 1998, Pages 201-211
4. M. Liz-Marzán and V. Kamat, *Nanoscale materials*, Kluwer Academia Publ. Boston, 2003, 136-205
5. M. Chalabala et. Al., *Technologie léků*, Galén, Praha 2001, 225-228
6. A. Lázníčková, S. Ďoubal, J. Gasparič, M. Ditrich, *Fyzikální chemie pro posluchače farmacie 2. díl*, Univerzita Karlova v Praze nakladatelství Karolinum, Praha, 2000
7. E. Valentová, *Characterization of particulate systems containing gentamicin sulfate*, University of Navarra, Pamplona, Spain, 2004, 16-18
8. *Size Theory*, firemní manuál, Zetasizer ZS, Malvern instruments
9. *Zeta potenciál Theory*, firemní manuál, Zetasizer ZS, Malvern instruments
10. N. Majeti. V. Ravi Kumar, Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices, *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2000, 234-258
11. V. Labhasetwar, C. Song, R. J. Levy, Nanoparticle drug delievry systems. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 1997, 24: 63-85
12. G.S. Kwon, T. Okano, Polymeric micelles as new drug carriers., *Adv. Drug Del. Rev.*, 1996, 21: 107-116

13. S. E. Dunn, A.G.A. Coombes, M. C. Garnett, S.S. Davis, L. J. Illum, In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanosphere surface modified poloxamer and poloxamin copolymers. *J. Controlled Release*, 1997, 44: 65-76
14. J.Vandorpe, E. Schacht, [Poly(organophosphazene)] nanoparticles surface modified with polyethylene oxide. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 52: 89-95
15. R. Gref, Y. Minamitake, Biodegradable long circulating nanospheres. *Science*, 1994, 263: 1600-1603
16. L. Brannon-Peppas, Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 1995, 116: 1-9
17. Y.S. Kim, and K.S. Kim, Particle size distribution, drug loading capacity and release profiles of solid lipid nanoparticles of phenylpropionic acids. *J. Pharm. Pharmaceut Sci.*, 2000, 3(2), 234-258
18. J. Panyam and V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 2003, 329-347
19. M.P. Murphy and R.A. Smith, Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41 (2000), 235–250
20. T. Jung, W. Kamm, A. Breitenbach, K.D. Hungerer, E. Hundt and T. Kissel, Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm. Res.* 18 (2001), 352–360
21. K. Lappalainen, I. Jaaskelainen, K. Syrjanen, A. Urtti and S. Syrjanen, Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm. Res.* 11 (1994), 1127–1131

22. C. Berklund, M. King, A. Cox, K. Kim and D.W. Pack, Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *J. Control. Release* 82 (2002), 137–147
23. R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) devices. *Biomaterials* 21 (2000), 2475–2490
24. S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha and V. Labhasetwar, Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release* 82 (2002), 105–114
25. V. Labhasetwar, C. Song, W. Humphrey, R. Shebuski and R.J. Levy, Arterial uptake of biodegradable nanoparticles: effect of surface modifications. *J. Pharm. Sci.* 87 (1998), 1229–1234
26. J.M. Anderson and M.S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28 (1997), 5–24
27. R. Jain, N.H. Shah, A.W. Malick and C.T. Rhodes, Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24 (1998), 703–727
28. M. Vert, G. Schwach, R. Engel and J. Coudane, Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers. *J. Control. Release* 53 (1998), 85–92
29. Salomone, S. [online] Nanobiotech: First nanotechnologies yield fruit in the and with the promise of more come. [http://www.bio-itwold.com/archive/030805/st\\_nano.html](http://www.bio-itwold.com/archive/030805/st_nano.html) [cit. 2006-02-07].