



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

## **Submikronové částice s terbinafinem**

Diplomová práce

Autor: Veronika Štreglová

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

Hradec Králové 2015

Děkuji Doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady a připomínky a Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. za provedení analýz vzorků při vypracování této diplomové práce.

*„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové 5. 5. 2015

# Abstrakt

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena na polymerní nanočástice, jejich vlastnosti a s tím související výhody. Jsou zde uvedeny také jednotlivé druhy organických a anorganických nanočástic a způsoby jejich přípravy. Velká pozornost je také věnována biodegradabilním polymerům, a to zejména terpolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, který byl v experimentální části použit jako nosič baze terbinafinu větvený na tripentaerythritolu. PLGA je nejvhodnějším kopolymerem, jelikož jsou dobře prozkoumány jeho fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, způsoby přípravy a faktory ovlivňující jeho degradaci.

Cílem této práce bylo najít vhodný emulgátor o vhodné koncentraci pro přípravu nanočástic obsahujících bazi terbinafinu, vhodné rozpouštědlo pro terpolymer a vhodnou koncentraci emulze, aby byl výtěžek terbinafinu co nejvyšší, pokud možno bez značných ztrát. Jako nosič byl použit již zmíněný terpolymer kyseliny mléčné, glykolové a tripentaerythritolu. Příprava nanočástic probíhala emulzní metodou za odpařování organického rozpouštědla.

Během experimentu se dospělo k závěrům, že se stoupající koncentrací emulze dochází ke snížení polydisperzity. Přidání elektrolytu do vnější fáze emulze způsobí inaktivaci emulgátoru a nevýhodnou aglomeraci částic. Jako rozpouštědlo pro nosič je vhodnější dichlormethan než ethylmethylketon. Ale po analýze některých vzorků bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací baze terbinafinu se zvyšuje jeho výtěžek, ale pouze pro částice připravené z roztoků v ethylmethylketonu. Za použití dichlormethanu byly výtěžky velmi malé z důvodu slabého poutání baze terbinafinu na nosič.

# Abstract

The theoretical part of this diploma work is focused on the polymeric nanoparticles, their properties and advantages connected with them. There are introduced also particular types of organic and inorganic nanoparticles and methods of their preparation. The great attention was directed on biodegradable polymers in particular to poly lactic-co-glycolic acid, which was used in experimental part as carrier for base of terbinafine branched to tripentaerythritol. PLGA is the most suitable copolymer for practice because of good explored its physical, chemical and biological properties, methods of preparation and factors affecting degradation.

The aim of this work was to find suitable emulsifier with suitable concentration for preparation of nanoparticles containing the base of terbinafine, suitable solvent for terpolymer and optimal concentration of emulsion to reach the highest yield of terbinafine without any exceptional loss. How it was mentioned, as carrier was used terpolymer of poly lactic-co-glycolic acid with tripentaerythritol. As technique of preparation of nanoparticles was used emulsification by evaporating of organic solvent (solvent evaporation method).

During the experimental work we found out some of conclusions, it goes to reduce of polydispersity with increasing concentration of emulsion. When we add electrolyte to outer phase of emulsion, it goes to inactivation of emulsifier and non-appropriate agglomeration of particles. The more suitable solvent for carrier of nanoparticles is dichlormethane than ethylmethylketone. After analysis of some samples we found out, that with increasing concentration of base of terbinafine, it leads to raising of its yield but only for particles prepared from solutions with ethylmethylketone. If we use dichlormethane, yields are very low because of weak bonding between base of terbinafine and carrier.

# Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
1. Úvod .....	8
2. Cíl práce .....	9
3. Teoretická část .....	10
3.1. Nanočástice a jejich obecné využití .....	10
3.2. Výhody nanočástic v terapii a diagnóze nemocí .....	11
3.3. Druhy organických a anorganických nanočástic .....	11
3.3.1. Organické nanočástice .....	12
3.3.2. Anorganické nanočástice .....	15
3.4. Biodegradabilní polymery .....	17
3.5. Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) .....	18
3.5.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti .....	19
3.5.2. Farmakokinetické vlastnosti a biodistribuce .....	20
3.5.3. Kopolymery PLGA .....	20
3.5.4. Příprava PLGA .....	21
3.5.5. Faktory ovlivňující degradaci PLGA .....	23
4. Experimentální část .....	25
4.1. Použité přístroje .....	25
4.2. Použité chemikálie .....	25
4.3. Postup přípravy a měření .....	26
4.3.1. Příprava vnější fáze .....	26
4.3.2. Příprava vnitřní fáze .....	27
4.3.3. Příprava 0,5% baze terbinafinu (BT) .....	27
4.3.4. Příprava nanočástic .....	27
4.3.5. Měření velikosti připravených částic .....	28
5. Výsledky .....	29
5.1. Vliv iontové síly na velikost částic .....	29
5.2. Vliv koncentrace emulze na velikost částic .....	32
5.3. Vliv koncentrace emulze na velikost částic po přidání 5% baze terbinafinu .....	35
5.4. Vliv koncentrace emulze na velikost částic po přidání 30% baze terbinafinu .....	36
5.5. Vliv koncentrace emulze a koncentrace baze terbinafinu na velikost částic .....	39

5.6. Vliv použitého emulgátoru a rozpouštědla DCM použitého pro přípravu 3% roztoku nosiče T3 na velikost částic.....	42
5.7. Vliv použitého emulgátoru a rozpouštědla EMK použitého pro přípravu 3% roztoku nosiče T3 na velikost částic.....	45
5.8. Vliv použitého emulgátoru, rozpouštědla, přídavku soli, změny pH a koncentrace emulze na velikost částic .....	47
5.9. Vliv použitého rozpouštědla, koncentrace emulze, emulgátoru a přídavku soli na velikost částic.....	50
5.10. Vliv použitého emulgátoru, rozpouštědla a pH na velikost částic.....	52
5.11. Výsledky analýz .....	56
6. Diskuse.....	57
6.1. K tématu a zaměření práce .....	57
6.2. K vlivu iontové síly vnější fáze na velikost částic.....	57
6.3. K vlivu koncentrace emulze na velikost částic .....	58
6.4. K vlivu koncentrace emulze na velikost částic s 5% a s 30% terbinafinem .....	58
6.5. K vlivu rozpouštědla nosiče a emulgátoru na granulometrické charakteristiky částic .....	59
6.6. K vlivu iontové síly a hodnoty pH při různé koncentraci emulze a druhu rozpouštědla nosiče .....	60
6.7. K vlivu koncentrace emulze, iontové síly a alkalizace při použití různých emulgátorů a rozpouštědel.....	60
6.8. K výtěžkům terbinafinu v částicích z různých nosičů v různých rozpouštědlech .....	61
7. Závěry .....	62
8. Seznam použitých zkratk.....	63
9. Seznam tabulek .....	64
10. Seznam obrázků.....	67
11. Seznam použité literatury .....	72



# 1. Úvod

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu nanočástic, což jsou částice o velikosti 1nm až 100nm. Tyto nanočástice mohou dosahovat různých tvarů, jako jsou drátky, trubičky nebo mohou mít sférický tvar. Výsledné připravené nanočástice obsahující léčivou látku se pak používají jako systémy s řízenou liberací a cílenou distribucí léčiva, které umožní dodání léčiva na dané místo účinku v požadovaném množství a v potřebný čas. Mohou zvýšit biodostupnost, chrání léčivo před vnějšími vlivy způsobující jeho rozklad, snižují vedlejší a nežádoucí účinky léčiv.

Nanočástice obsahující léčivo se skládají z vhodného polymeru, který slouží jako nosič léčiva. V případě této diplomové práce se jedná o léčivou látku terbinafin, kterou jsme nejprve chemickou cestou upravili na bazi. Terbinafin je antimykotikum používající se k léčbě kožních mykóz, které vyžadují dlouhodobou terapii. Lékové formy obsahující nanočástice by zjednodušily terapii. Terbinafin by se postupně z nanočástic uvolňoval, a tak by bylo docíleno méně častějšího podávání tohoto léku, což je velmi příznivé pro pacienty a zvyšuje compliance. Intenzita podávání léků hraje totiž v compliance významnou roli. Příprava nanočástic neboli nanotechnologie není pouze oborem ve zdravotnictví a farmacii, kde se používá k léčbě některých nemocí (zejména některých druhů rakoviny), ale i diagnóze a prevenci některých onemocnění.

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo připravit vzorky částic s velikostí v blízkosti 1  $\mu\text{m}$  z větveného terpolymeru kyseliny mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu. Dále bylo zadáno použít dichlormethan a ethylmethylnketon jako rozpouštědla polymeru. Do vnitřní fáze bylo zadáno použít bazi terbinafinu v koncentracích od 5% do 30%. V rozmezí od 5% do 20% bylo uloženo formulovat koncentraci emulze. Ve vnější fázi ve funkci emulgátoru byl doporučen hydrobromid cetyltrimethylamonia, případně i vhodný anionický a neionický emulgátor. Kromě emulgátorů bylo zadáno vyzkoušet vliv vhodných elektrolytů s ohledem na enkapsulační účinnost terbinafinu. Pro stanovení enkapsulační účinnosti bylo doporučeno spolupracovat s odborníkem v analytické chemii.

## 3. Teoretická část

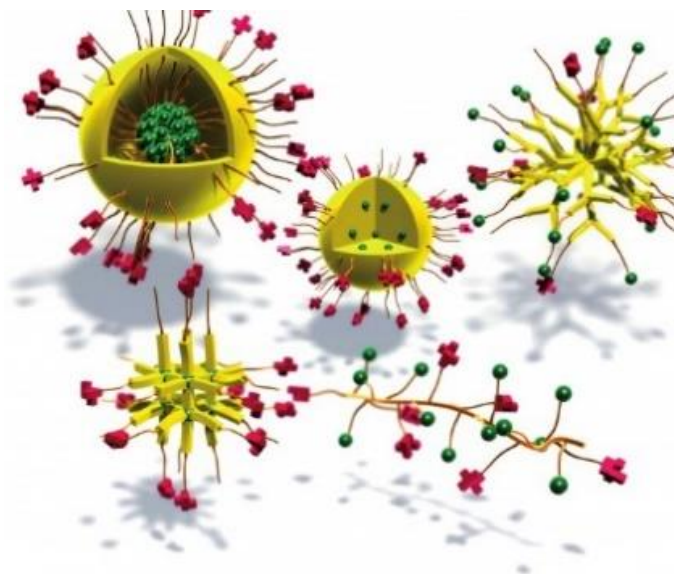
### 3.1. Nanočástice a jejich obecné využití

Nanočástice, které jsou také nazývány farmaceutickými nosiči léčivých látek, mají široké využití v léčbě určitých onemocnění. Současný výzkum se zabývá jejich používáním při léčbě některých typů rakoviny, k přípravě vakcín aktivujících imunitní systém a také k diagnóze některých nemocí. Pokrok v nanotechnologii je mocným nástrojem současné, ale i budoucí vědy. [1]

V současnosti nanočástice zaujímají ohromný zájem farmaceutických firem k přípravě nosičů některých léčiv. Jejich použití má spoustu výhod. Mezi hlavní výhody patří možnost řízeného uvolňování léčiv s vhodnou cestou podání, snižuje výskyt nežádoucích i vedlejších účinků, protože působí v dané tkáni. [2] Zejména v léčbě rakoviny by to byl obrovský přínos, protože současná chemoterapeutika poškozují i zdravé buňky a tkáně, ve formě nanočástic by zdravé buňky mohla tato léčiva ovlivňovat minimálně. Za použití vhodného nosiče, který je biodegradovatelný, tzn., že je rozkládán běžnými přirozenými mechanismy lidského těla, nezatěžuje tělo ve formě nějakých odpadních látek, které mohou organismus poškodit.

Obrázek 3-1-1: Polymerní nanočástice (zdroj:

[http://vtm.e15.cz/files/imagecache/dust\\_filerenderer\\_normal/upload/story\\_press/379/044\\_000\\_jpg\\_4992b22b39.jpg](http://vtm.e15.cz/files/imagecache/dust_filerenderer_normal/upload/story_press/379/044_000_jpg_4992b22b39.jpg))



## 3.2. Výhody nanočástic v terapii a diagnóze nemocí

Jednou z prvních výhod nanočástic je, že jako nosiče léčiv jsou stabilní a *in vivo* účinné. Mohou mít různou cestu podání, která vede ke zvýšenému a efektivnímu dodání léku na požadované místo účinku. [3]

Nanočástice jsou velmi malé, což je další významná výhoda, která umožňuje průchod přes buněčnou membránu s navázaným léčivem, čehož běžnými metodami dosáhnout nelze.

Protože mají nanočástice malou velikost, mají velký specifický povrch, který způsobuje, že nanočástice mohou být nositeli velkého množství účinných látek, poskytují tak větší šanci k dosažení cílového místa účinku v požadované koncentraci a následného efektivního účinku léčivé látky. [4]

Nanočástice umožňují také řízenou a cílenou distribuci léčiva na místo účinku. Oproti běžným cestám podání, kde koncentrace léčivé látky stoupne v plazmě velmi rychle a ihned je podrobena rozkladu během metabolismu, nanočástice postupně uvolňují léčivou látku. Řízené uvolňování zlepšuje účinnost terapie a snižuje tak riziko předávkování, tak poddávkování. [5]

Současný výzkum se také snaží vytvořit tzv. víceúčelové neboli vícefunkční nanočástice, které by umožnily „spolu-dodávání“ terapeutických agens, např. léčivo v kombinaci s proteiny, geny aj. [6] Při léčbě rakoviny tyto víceúčelové nanočástice mohou prostoupit buněčnou bariérou rakovinotvorných buněk a zůstávají zadrženy uvnitř cílových buněk, v kombinaci s diagnostickým agens může nanočástice sloužit k diagnóze nemoci a současně k terapii. [7]

## 3.3. Druhy organických a anorganických nanočástic

Obecně dělíme nanočástice na organické (polymerní) a anorganické. Polymerní nanočástice jsou více flexibilní ohledně chemického chování a struktury oproti anorganickým materiálům. Organické nanočástice jsou složeny z amfifilních kopolymerů, které jsou biokompatibilní. Nevyžadují tak následné chirurgické vyjmutí díky schopnosti biodegradace.

### 3.3.1. Organické nanočástice

Organické neboli polymerní nanočástice jsou široce využívány k přípravě nosičů léčiv, mají obrovský potenciál do budoucna v léčbě určitých onemocnění. Dělíme je na liposomy, polymerní nanogely, dendrimery a micely. [8]

Biodegradabilní polymerní nanočástice jsou nejčastěji připravovány z amfifilních kopolymerů jako je kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) v různém procentuálním zastoupení, nebo polyanhydridů. Mají velký potenciál v biomedicínských aplikacích jako nosiče léčiv kvůli jejich mnohostranným výhodným chemickým vlastnostem, biokompatibilitě a vysoké stabilitě díky obsaženým aktivním látkám. Polyanhydridové nanočástice se využívají jako přísada vakcín. Do lidského těla se dostávají prostřednictvím endocytózy. [9] Příprava polymerních nanočástic může probíhat několika způsoby – metodou odpařování rozpouštědla, emulzní metodou, metodou vysolování a nanoprecipitace. Vhodnou modifikací povrchu nanočástic prostřednictvím funkčních skupin se pak obsažené léčivé látky dostanou na požadované místo účinku.

#### 3.3.1.1. Micely

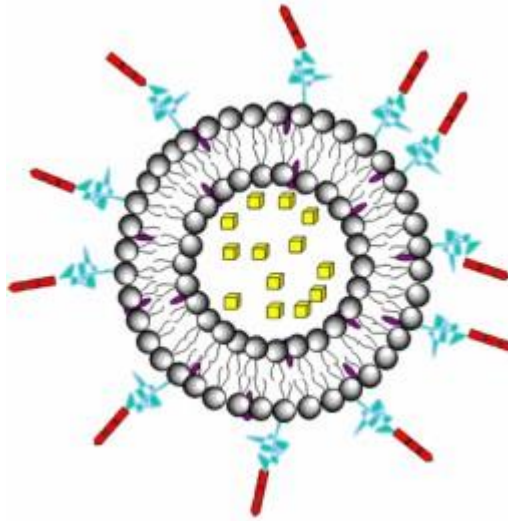
Polymerní micely se skládají z vysokomolekulárních kopolymerů složených z amfifilních bloků, které pak vytvářejí micely s jádrem ve formě nanostruktury ve vodném roztoku.

Hydrofobní bloky se shlukují a vytvářejí vnitřní vrstvu, která obklopuje vnější vrstvu tvořenou hydrofilními částmi. Mají různou délku na základě počtu bloků. Kopolymery mají velmi rozmanitou micelární strukturu. Velmi často používanou látkou s výhodnými vlastnostmi ke tvorbě polymerních micel je polyethylenglykol (PEG), který je biokompatibilní a má výrazně nízkou buněčnou toxicitu.

Pro zlepšení biokompatibility a transkutánní permeace se může použít polyvinylpyrrolidon nebo polyvinylalkohol. Hydrofobní bloky jsou obvykle tvořeny propylenoxidem, L-lysinem, kyselinou DL-mléčnou, sperminem a dalšími sloučeninami. Důležitými a sledovanými parametry pro uvolnění léčiva z micel je vhodná teplota, světlo a pH. [10]

### Obrázek 3-3-1: Polymerní nanomicela

(zdroj: <http://www.imc.cas.cz/umch/sites/Image/nosic.jpg>)



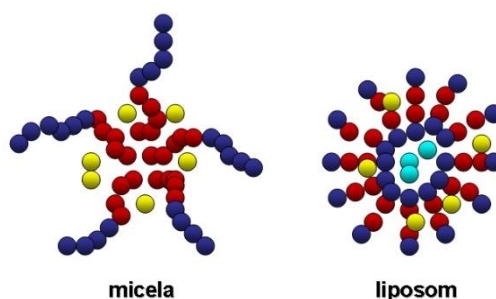
#### 3.3.1.2. Liposomy

Polymerní liposomy jsou tvořeny sférickými strukturami uzavřenými v amfifilní dvojvrstvě tvořené kopolymery jako jsou fosfolipidy a cholesterol. Uvnitř liposomu jsou umístěny hydrofilní sloučeniny, které liposom přenáší na místo účinku. Přes buňku se dostávají také endocytózou – přilnutím a splynutím s dvojvrstvou buněčné membrány.

Liposomy mají charakteristické mírně kyselé prostředí a prostřednictvím změn pH uvolní obsaženou léčivou látku. I do struktury liposomu se může připojit polyethylenglykol (PEG), který prodlužuje dobu, po kterou léčivá látka cirkuluje v těle.

Jsou možné i další chemické obměny a modifikace jako například připojení sloučenin obsahující lipidy často konjugované s polyethylenglykolem. [11] Zlepšují řízené uvolňování léčiv díky jejich biodegradaci a biokompatibilitě. Některé ze sloučenin založených na liposomech jsou zkoušeny v klinických studiích v USA. [12]

Obrázek 3-3-2: Polymerní liposom a polymerní micela – srovnání  
(zdroj: [http://www.imc.cas.cz/umch/sites/Image/micel\\_lipos14.jpg](http://www.imc.cas.cz/umch/sites/Image/micel_lipos14.jpg))



### 3.3.1.3. Polymerní nanogely

Polymerní nanogely se skládají z vysoce porézních sítí tvořených řetězci, které jsou spojeny kovalentními vazbami. Léčivo se dovnitř póru může dostat pouze ve struktuře gelu. Na rozdíl od micel a liposomů mají obrovský povrch pro navázání léčivé látky a tím také umožňují delší pohyb léčiva a jeho postupné řízené uvolňování. Pro jejich přípravu je důležité použít vhodný vnější povrch, který chrání nanočástice. Pokud je navíc dostatečně odolný, prodlužuje zároveň cirkulaci a tím zlepšuje terapeutickou účinnost. [13]

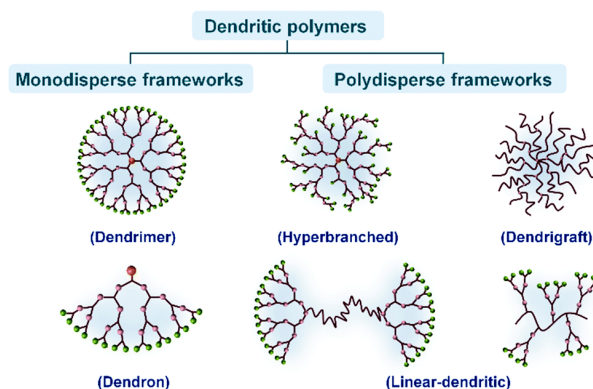
### 3.3.1.4. Dendritické polymery

Dendritické polymery se od ostatních organických nanočástic liší svými jedinečnými vlastnostmi. Patří mezi ně nízká polydisperzita, nízká viskozita, vysoká rozpustnost a biokompatibilita.

Jejich syntéza probíhá tak, že se skládá z monomerních jednotek s větvemi, které jsou přidávány v jednotlivých krocích, dokud nevznikne trojrozměrná struktura. [14]

Obrázek 3-3-3: Rozdělení dendritických polymerů (zdroj:

[http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2015/PY/c4py01208a/c4py01208a-f1\\_hi-res.gif](http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2015/PY/c4py01208a/c4py01208a-f1_hi-res.gif))



### 3.3.2. Anorganické nanočástice

Nanočástice vytvořené z anorganických sloučenin jsou složeny z velmi mechanicky odolných materiálů. Obsahují uvnitř jádro, ve kterém je uložena daná léčivá látka. Mají spoustu odlišných vlastností od organických nanočástic, mezi které patří magnetické vlastnosti, fototermální vlastnosti, které běžně nejsou pozorovány u nanočástic založených na lipidech nebo polymerech.

Mezi anorganické nanočástice řadíme magnetické nanočástice, mesoporézní nanočástice z oxidu křemičitého, kvantové tečky a nanočástice ze zlata a jiných kovů. [15]

#### 3.3.2.1. Magnetické nanočástice

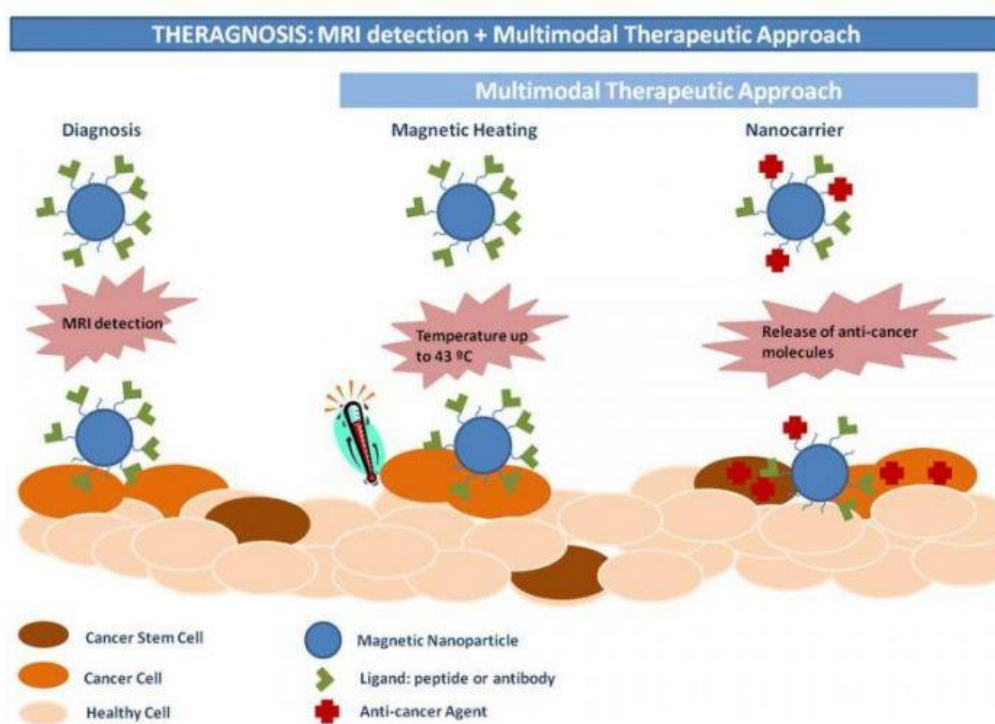
Tyto nanočástice se používají k diagnostické i terapeutické aplikaci. Léčivo se váže s magnetickými nanočásticemi jako jsou oxidy železa – tzv. IONPs neboli iron oxide nanoparticles. Oxidy železa jsou biokompatibilní a biodegradabilní, v lidském těle se shromažďují v játrech, slezině a kostní dřeni, kde jsou pak přeměněny na ferritin nebo hemosiderin.



Jejich hlavními výhodami jsou dostatečně kontrolovatelná velikost (od 10 do 100nm), mohou být ovládány vnější magnetickou silou na větší vzdálenost. To patří mezi jednu z vynikajících vlastností pro terapeutickou aplikaci. Pro své magnetické vlastnosti se používá i jako kontrastní látka při magnetické rezonanci. [16]

Obrázek 3-3-4: Využití magnetických nanočástic při magnetické rezonanci a terapii nádorů (zdroj:

[http://www.fzu.cz/sites/default/files/imagecache/pres\\_celou\\_stranu/images/gallery/multifun\\_obrazek.jpg](http://www.fzu.cz/sites/default/files/imagecache/pres_celou_stranu/images/gallery/multifun_obrazek.jpg))



### 3.3.2.2. Mesoporézní nanočástice z oxidu křemičitého

Tyto nanočástice připravené z mesoporézního oxidu křemičitého představují novou generaci anorganických nanočástic. Díky jejich velkému povrchu umožňují přichycení léčiva a umožňují měnit tvar a velikost dle potřeby. Musí být biokompatibilní, protože se v současnosti používají jako aditiva potravin a v kosmetice. Jsou prováděny i klinické studie, kde tyto částice představují sondu, která by měla umožnit správně diagnostikovat rakovinu. [17]

### 3.3.2.3. Nanočástice ze zlata

Pro přípravu nanočástic má zlato ze všech kovů určité specifické výhody. Má výhodné optické a elektrické vlastnosti, dobrou biokompatibilitu, nízkou toxicitu, vysokou afinitu k thiolovým skupinám, kontrolovatelnou velikost. Jsou vhodné jako nosiče léčiv, k terapii i diagnostickým metodám. Kromě zlata se využívají nanočástice z jiných kovů, např. mědi a stříbra. [18]

### 3.3.2.4. Kvantové tečky

Kvantové tečky neboli Quantum dots (QDs) jsou koloidní polovodičové nanočástice s jedinečnými optickými a fluorescenčními vlastnostmi. Vyskytují se ve formě krystalů o velikosti 2 až 10nm. Pro jejich malou velikost se používají pro značkování biologických makromolekul. Pro zvýšení stability a rozpustnosti ve vodě mohou být různě povrchově modifikovány, typickým příkladem je polyethylenglykol (PEG). [19]

## 3.4. Biodegradabilní polymery

Biodegradabilní polymery mohou být přírodního nebo syntetického původu. V lidském těle jsou degradovány přirozenými mechanismy buď enzymaticky nebo jiným způsobem. Nezatěžují tělo žádnými odpadními produkty. Jsou nosiči léčiv, proteinů a jiných makromolekul, které jsou biokompatibilní, bezpečné a eliminují se běžnými metabolickými cestami.

Biodegradabilní polymery dělíme na syntetické a přírodní.

Mezi syntetické biodegradabilní polymery patří hydrofobní materiály, příkladem mohou být alfa hydroxy kyseliny (kyselina mléčná, kyselina glykolová), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové a polyanhydridy.

Mezi přírodní biodegradabilní polymery se řadí komplexy cukrů – hyaluronan, chitosan a anorganické látky – hydroxyapatit. Mají velmi odlišné chemické složení a fyzikální vlastnosti, proto lze jejich chování v organismu těžko odhadnout, a to je důvodem, proč jsou méně používané.

Nárůst používaných nových syntetických polymerů je ovlivněn variabilitou a nárůstem nových nemocí, rozsahem dávkování a speciálními požadavky na léčbu. Biokompatibilita je velmi důležitá, ale není charakteristickou vnitřní vlastností daného materiálu, závisí na biologickém prostředí a vzájemných interakcích mezi léčivou látkou a polymerem. [20]

### 3.5. Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA)

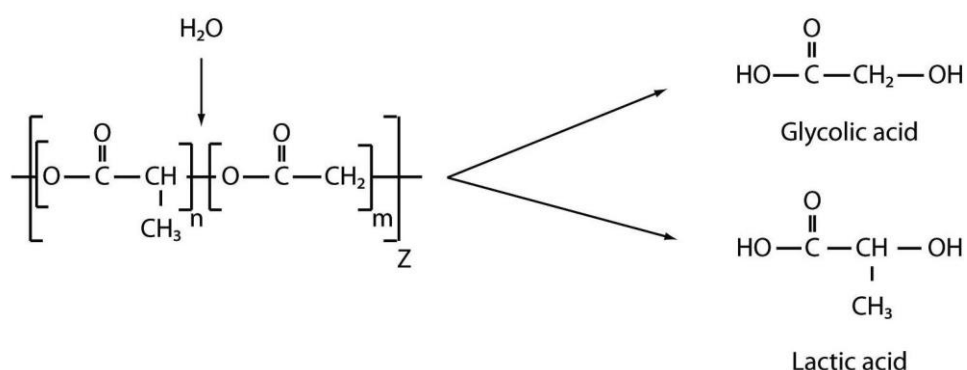
PLGA patří mezi nejlépe prozkoumané biomateriály umožňující dodávání léčiv a zároveň je to biodegradabilní polymer schválený FDA. Z chemického hlediska se jedná o kopolymer kyseliny mléčné (PLA) a kyseliny glykolové (PGA). PLGA je biokompatibilní.

Tento polymer je výrazně zkoumán jako nosič některých léčiv, proteinů a dalších makromolekul (DNA, RNA, peptidy). Je bezpečný z hlediska dlouhodobých klinických zkušeností a vhodné degradace, patří mezi syntetické biodegradabilní polymery.

Fyzikální vlastnosti se dají snadno ovlivnit prostřednictvím molekulové hmotnosti, poměru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové a také koncentrací léčiva. Existuje zde však i možnost potenciální toxicity kvůli výkyvům dávek, nekonstantnímu uvolňování a interakcím mezi léčivem a polymerem. [21]

Obrázek 3-5-1: Hydrolyza PLGA (zdroj:

[http://www.controlledreleasesociety.org/publications/intrack/PublishingImages/12-2\\_HydrolysisofPLGA.jpg](http://www.controlledreleasesociety.org/publications/intrack/PublishingImages/12-2_HydrolysisofPLGA.jpg))

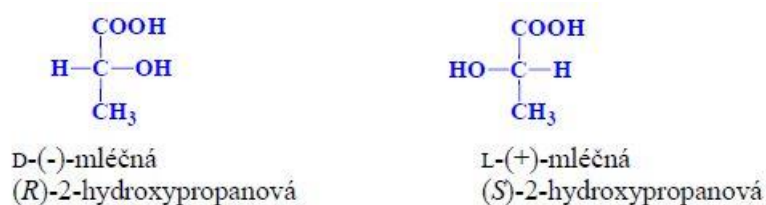


### 3.5.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti

Pro přípravu nanočástic z PLGA je nutné dobře znát její fyzikální, chemické a také biologické vlastnosti. Obě enantiomerní formy kyseliny, jak kyseliny poly D-mléčné (PDLA), tak poly L-mléčné (PLLA) jsou opticky aktivní. Kyselina mléčná se může vyskytovat v krystalické formě (PLLA) nebo v amorfní formě (PDLA), důvodem jsou nepravidelné polymerní řetězce.

Obrázek 3-5-2: Enantiomerní formy kyseliny mléčné

(zdroj: <http://www.wikiskripta.eu/images/b/b0/MI%C3%A9%C4%8Dn%C3%A1-k.jpg>)



Kyselina polyglykolová neobsahuje postranní methylové skupiny a díky tomu tvoří semikrystalickou strukturu. Deriváty PLGA mohou mít různou konstituci dle počtu řetězců jednotlivých kyselin a umožňuje do sebe vmezeřit molekuly různých velikostí.

Rozpouští se v mnoha běžných rozpouštědlech, mezi které patří chlorovaná rozpouštědla, tetrahydrofuran, aceton a ethylacetát. Kyselina mléčná je více hydrofobní než kyselina glykolová kvůli postranním methylovým skupinám. Proto je PLGA více bohatý na kyselinu mléčnou méně hydrofilní, méně absorbuje vodu a rozpadá se podstatně pomaleji.

Fyzikální vlastnosti PLGA jsou ovlivněny řadou faktorů zahrnujících molekulovou hmotnost, poměr kyseliny mléčné (LA) a glykolové (GA), celkovou velikost, přítomnost vody, vliv teploty. Mechanická síla PLGA závisí na fyzikálních vlastnostech a to zejména na molekulové hmotnosti a polydisperzitě. Tyto vlastnosti také ovlivňují formování léčiva do tohoto systému, degradaci a hydrolýzu. Nedávná studie také ukázala, že typ léčiva má vliv na stupeň uvolňování.

Stupeň krystalinity ovlivňuje bobtnání, mechanickou sílu, hydrolýzu a také biodegradaci polymeru. Krystalinita závisí na typu a molárním zastoupením jednotlivých monomerů v kopolymerním řetězci. PGA se vyskytuje v krystalické formě, když vytvoří kopolymer s PLA, sníží tak stupeň krystalinity vytvořeného kopolymeru PLGA. [22]

### 3.5.2. Farmakokinetické vlastnosti a biodistribuce

PLGA jako nosič léčiv musí mít vhodné farmakokinetické parametry, tzn. vhodnou dobu podávání léčiva, biodistribuci a koncentraci pro požadovaný terapeutický efekt. Biodistribuce a farmakokinetika má nelineární a na dávce nezávislý průběh. Uvolnění z krve a vychytávání mononukleárním fagocytárním systémem (MPS) závisí na dávce a kompozici PLGA. Nanočástice tvořené PLGA se akumulují v játrech, kostní dřeni, mízních uzlinách a slezině. Degradace PLGA je velmi rychlá v prvním stupni a nezatěžuje organismus. [23]

### 3.5.3. Kopolymery PLGA

Pro zlepšení některých vlastností, inkorporaci různých léčiv a způsobu podání jsou vyvíjeny různé typy bloků kopolymerů ve formě polyesterů s polyethylenglykolem (PEG). Ve formě dibloků PLGA-PEG nebo tribloků PLGA-PEG-PLGA nebo PEG-PLGA-PEG.

V řetězcích dibloků jsou řetězce PEG orientovány k vnější vodné fázi v micelách obklopujících inkorporované částice. PEG vytváří povrch, který je zároveň bariérou a brání interakcím s ostatními cizími molekulami, které by mohly narušit dodání léčiva na místo účinku, případně léčivo rozštěpit.

Triblokové kopolymery vytváří při tělesné teplotě gel. PLGA vytváří hydrofobní část a PEG hydrofilní. Při nižší teplotě převažují vodíkové vazby mezi hydrofilními PEG a jsou ve formě roztoku. Pokud teplota vzroste, vodíkové vazby zeslábnu, převažují naopak hydrofobní síly v PLGA, což vede k přeměně na gel. Léčivá látka nebo protein se z triblokových kopolymerů uvolňuje dvěma mechanismy. Prvním je difuze z hydrogelu v první fázi a druhým je uvolnění léčivé látky erozí hmoty hydrogelu v konečné fázi. [24]

### 3.5.4. Příprava PLGA

Léčiva a proteiny se dnes hojně používají k terapii. Proto je nutné, aby byly relativně bezpečné bez značné toxicity, měly specifický účinek v daném místě organismu bez vedlejších a nežádoucích účinků, které by mohly ohrozit pacienta. Je výhodné, aby se nosiče léčiv vyskytovaly v pevném stavu. Důvodem je, aby léčiva a peptidy dosáhly požadovaného účinku bez hydrolytického štěpení, které by tomu zabránilo. Někdy je však nutné parenterální podání, aby se zabránilo štěpení v gastrointestinálním traktu a first-pass metabolismu.

Objevení PLGA jako vhodného nosiče léčiv a peptidů zabrání používání velkých implantátů a nahradí je mikrosféry, nanosféry, které jsou biodegradabilní, biokompatibilní a umožňují řízené uvolňování. Pro přípravu nosičů z PLGA existuje mnoho metod. [25]

#### 3.5.4.1. Metoda odpařování rozpouštědla

Existují dva typy této metody. První je jednoduchá emulzní metoda. Tento způsob je založen na přípravě emulze typu olej ve vodě (o/v). Polymer je nejprve rozpuštěn v příslušném množství ve vodě nemísitelném těkavém organickém rozpouštědle. Příkladem je dichlormethan. V dalším kroku je přidána léčivá látka o velikosti 20-30 $\mu$ m a vytvoří disperzi v daném roztoku. Polymer rozpuštěný v disperzi pak v přítomnosti emulgátoru vytvoří emulzi při dané teplotě za určité intenzity míchání. Organické rozpouštědlo se pak postupně odpařuje nebo vytvoří olejové kapičky a roztok se zkalí. Zpočátku je emulze získávána za sníženého nebo atmosférického tlaku, kde se kontroluje stupeň míchání, aby se rozpouštědlo mohlo odpařovat. V pozdější fázi je emulze převedena do velkého objemu vody nebo vhodného média, které umožní difuzi rozpouštědla a vznik olejových kapiček. Výsledné pevné nanosféry jsou promyty a sušeny za vhodných podmínek pro přípravu finálních nanosfér podávaných injekčně. Tato metoda je vhodná pro přípravu nosičů léčiv pro ve vodě nerozpustná léčiva, např. steroidy. [26]

Druhým typem je dvojitý emulzní proces (násobný). Tato emulzní metoda je nejvhodnějším způsobem enkapsulace ve vodě rozpustných látek jako jsou peptidy, proteiny a vakcíny. Jedná se o emulzi typu voda v oleji ve vodě (v/o/v). Nejprve je požadované množství léčiva rozpuštěno ve vodném prostředí (deionizovaná voda).

Po té je tento roztok léčiva přidán k organické fázi za řízeného míchání. Organická fáze je složena z PLGA nebo PLA roztoku v dichlormethanu (DCM) nebo chloroformu. Vznikne tak emulze voda v oleji (v/o). V dalším kroku je tato emulze přidána do roztoku polyvinylalkoholu a pod tlakem smíchána. Organické rozpouštědlo se pak může vypařovat nebo extrahovat jako v běžné emulzi typu olej ve vodě (o/v). Výsledná velikost a účinnost enkapsulace je ovlivněna stupněm míchání a výběrem vhodného rozpouštědla. [27]

#### 3.5.4.2. Koacervace (fázová separace)

Koacervace je metoda založena na přípravě biodegradabilních polymerů umožňující enkapsulaci prostřednictvím separace dvou kapalných fází. Léčivo, které je rozpuštěno nebo dispergováno v roztoku polymeru je obaleno koacervátem. Koacervace probíhá ve třech stupních, mezi které patří fázová separace, adsorpce koacervátu kolem částí léčiva a vytvoření nanosfér. Roztoky se připravují smísením polymeru a roztoku v požadovaném poměru. Hydrofilní léčiva jako peptidy a proteiny jsou rozpuštěny ve vodě a dispergovány v roztoku polymeru. Vzniká tak emulze typu voda v oleji (v/o). Hydrofobní léčiva, jako jsou steroidy, se rozpouští nebo jsou rozptýleny v roztoku polymeru, vzniká tak naopak emulze olej ve vodě (o/v). Postupným přidáváním organické fáze k dané emulzi za stálého míchání dochází k oddělení polymeru za vzniku koacervátu obsahující kapky. Velikost takto vzniklých kapek závisí na stupni míchání a teplotě. Takto vzniklá soustava je pak rychle namočena do média, které není rozpustné ve vodném ani organickém prostředí, což vede ke vzniku kapek. Následuje promytí, prosévání, filtrace, centrifugace a mrazové sušení. [28]

#### 3.5.4.3. Precipitace

Polymer a léčivo jsou rozpuštěny v acetonu a přidány do vodného roztoku obsahujícího Pluronic F68. Aceton se vypařuje při dané teplotě. [29]

#### 3.5.4.4. Metoda vysolování

Při této metodě se nejprve připraví emulze typu voda v oleji (v/o) obsahující polymer, rozpouštědlo, které je rozpustné ve vodě, sůl a stabilizátor. Voda je přidána do roztoku v dostačujícím množství. Voda s emulgátorem se dostane do organické fáze a dochází k emulgaci. Rozpouštědlo, nejčastěji aceton, difunduje do vodné fáze. U polymeru s léčivou látkou dochází k precipitaci a vytvoření příslušných nanočástic. Při této metodě je nutné použít sloučeninu, která oddělí s vodou nemísitelné rozpouštědlo. Nejčastěji se používá chlorid vápenatý a sacharóza. [30]

#### 3.5.4.5. Metoda sprejového sušení

Sprejové sušení patří mezi rychlé a výhodné metody. Léčivo, protein nebo peptid, které jsou součástí nanosfér, jsou připravovány sprejováním disperze pevné látky v oleji nebo emulze typu voda v oleji (v/o) za proudu horkého vzduchu. Výběr vhodného rozpouštědla závisí na druhu léčiva a jeho hydrofilitě či hydrofobitě. Morfologie nanosfér závisí na povaze použitého rozpouštědla, teplotě odpařování rozpouštědla a na stupni sprejování. Sprejové sušení má i jednu nevýhodu, během tohoto procesu dochází k přilnutí nanočástic na vnitřní vrstvu sprejové sušárny. [31]

### 3.5.5. Faktory ovlivňující degradaci PLGA

#### 3.5.5.1. Složení

Složení, tzn. poměr PLA a PGA určuje hydrofilitu a stupeň degradace. S rostoucím procentuálním zastoupením PGA v PLGA se urychluje degradace díky její hydrofilitě. [32]

#### 3.5.5.2. Krystalinita

Teplota skelného přechodu a krystalinita mají nepřímý efekt na míru degradace. Krystalinita kyseliny mléčné urychluje degradaci kvůli přítomnosti polymeru tvořeného polokrystalem, který zvyšuje hydrofilitu a tím i degradaci. [32]



### 3.5.5.3. Molekulová hmotnost

Polymery s vyšší molekulovou hmotností mají obecně pomalejší degradaci. Molekulová hmotnost má přímý vztah k velikosti řetězce polymeru. Tzn., že polymery s vyšší molekulovou hmotností mají delší polymerní řetězec a je potřeba mnohem delší čas na rozštěpení na řetězce menší. Opačný účinek je u kyseliny mléčné, protože s rostoucí molekulovou hmotností klesá krystalinita a degradace se urychluje. [33]

### 3.5.5.4. Typ léčiva

Degradace a parametry související s uvolňováním léčiva z nosiče závisí na typu léčiva. Závisí na chemických vlastnostech dané léčivé látky, jejím poměru OH skupin a tím dané hydrofilitě. Záleží také na kompatibilitě s polymerem. [34]

### 3.5.5.5. Velikost a tvar matrice

Poměr plochy k celkovému objemu je důležitým faktorem pro degradaci celého nosiče s léčivou látkou. Větší plocha vede k rychlejší degradaci matrice. Celobjemová degradace je rychlejší než povrchová degradace PLGA. [35]

### 3.5.5.6. pH

Během *in vitro* hydrolýzy bylo prokázáno, že jak alkalické, tak kyselé prostředí urychluje degradaci polymeru. Rozdíl mezi slabě kyselým a neutrálním prostředím není tak zřetelný kvůli autokatalýze koncových karboxylových skupin. [36]

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité přístroje

Váhy KERN KB 220-4

Váhy KERN KB max. 1210g

Váhy KERN KB 1200-2N

Homogenizátor DiAx 900 Heildolph MR, 8000-26000 otáček/min, 6 pásem

Magnetická míchačka IKA-WERKE RT, DDHM 17427, 100-1000 otáček/min

Magnetická míchačka MANEK, DDHM 17188, 100-1250 otáček/min

Zetasizer ZS, Malvern Instruments, UK Zetasizer ZS 90

Centrifuga UNIVERSAL 16A

Sušárna BINDER

Digitální stopky DS 35 ZPA PRAGOTRON

### 4.2. Použité chemikálie

Terpolymer kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu (T3), Katedra farmaceutické technologie, FaF UK

Kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové (PLGA), Katedra farmaceutické technologie, FaF UK

Kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové větvený na 2% kyselině polyakrylové (A2), Katedra farmaceutické technologie, FaF UK

Ethylmethylketon (EMK), Lachema a.s., Neratovice

Dichlormethan (DCM), Lachema a.s., Neratovice

Aceton, Lachema a.s., Neratovice

Aqua purificata, FaF UK – reverzní osmózou

Amoniak, vodný roztok min. 25% - Lachema a.s., Neratovice

LECITHIN, Merck s.r.o., Praha

PEG-40-STEARÁT, Merck s.r.o., Praha

PEG-12-DIMETICON, Merck s.r.o., Praha

POLYSORBÁT 20, Merck s.r.o., Praha

CETRIMID HBr, Merck s.r.o., Praha

Baze terbinafinu, Katedra farmaceutické technologie, FaF UK

Chlorid sodný, Lachema s.r.o., Neratovice

Síran hořečnatý, Lachema s.r.o., Neratovice

Síran sodný, Lachema s.r.o., Neratovice

### 4.3. Postup přípravy a měření

Pro přípravu nanočástic byla použita emulzní metoda, ve které dochází k odpařování rozpouštědla. Vzniká tak emulze typu olej ve vodě. Vnitřní fáze byla tvořena roztokem z terpolymeru kyseliny DL-mléčné, glykolové a tripentaerythritolu (T3) v organických rozpouštědlech, kterými byly ethylmethylketon (EMK) nebo dichlormethan (DCM). Vnější fáze byla tvořena vodou s emulgátorem, kterým byl 0,2% CETRIMID HBr (cetyltrimethyl amonium bromid), 1% PEG-12-DIMETICON, 1% PEG-40-STEARÁT, 0,2% LECITHIN + PS 20, 0,5% LECITHIN + PS 20 nebo 1% LECITHIN + PS 20. Promíchání těchto dvou fází bylo zajištěno pomocí homogenizátoru při nejvyšším stupni otáček po dobu 30 sekund.

#### 4.3.1. Příprava vnější fáze

Na analytických váhách se navázilo příslušné množství emulgátoru, které se pak předalo do kádinky, kde se rozpustilo v potřebném množství vody, aby vznikla příslušná koncentrace. K vnější fázi se také k daným vzorkům přidávala sůl nebo amoniak.

Tabulka 4-3-1: Složení vnější fáze.

Emulgátor	Požadovaná koncentrace	Množství emulgátoru	Množství vody
CETRIMID HBr	0,2%	2g	998g
PEG-12-DIMETICON	1%	10g	990g
PEG-40-STEARÁT	1%	10g	990g
PEG-40-STEARÁT	0,2%	2g	998g
LECITHIN+PS 20	1%	10g	990g
LECITHIN+PS 20	0,5%	5g	995g
LECITHIN+PS 20	0,2%	2g	998g

#### 4.3.2. Příprava vnitřní fáze

Na analytických váhách se navážilo do stojatky 4,5g terpolymeru kyseliny DL-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu (T3) a doplnilo stanoveným množstvím rozpouštědla (EMK nebo DCM) do 150g, aby vznikla příslušná 3% koncentrace roztoku T3. Rozpuštění se podpořilo intenzivním třepáním.

#### 4.3.3. Příprava 0,5% baze terbinafinu (BT)

Na analytických váhách se navážilo do kádinky 15g čistého terbinafinu, ke kterému se přidaly 3l destilované vody. Roztok byl zahříván pro usnadnění rozpouštění. Po rozpuštění byl přidáván roztok amoniaku, aby vznikl roztok o pH 8-9 a mohla se vysrážet báze terbinafinu. pH bylo zkontrolováno pomocí indikátorových papírků. Během míchání pak došlo k vysrážení baze terbinafinu.

#### 4.3.4. Příprava nanočástic

Kádinka s vnější vodnou fází se s rozpuštěným emulgátorem umístila pod homogenizátor. Hrot turbíny homogenizátoru byl umístěn 1cm ode dna kádinky. Homogenizátor se zapnul na nejmenší počet otáček. Po té se přidávala fáze vnitřní tvořená polymerem T3 spolu se stanoveným množstvím BT. Množství vnější a vnitřní fáze bylo dáno typem emulzní soustavy. Celkové množství bylo 60g.

Po přidání vnitřní organické fáze se homogenizátor nastavil na nejvyšší stupeň otáček – 6, což je 26 000 otáček/min na dobu 30s. Míchání se ukončilo snižováním otáček až do zastavení. Pak se vzorek v kádince umístil na magnetickou míchačku na 2h, aby došlo k odpaření rozpouštědla a vznikly tak požadované nanočástice.

Tabulka 4-3-4: Typy emulzních soustav a požadovaná množství emulgátoru, T3 a BT dle typu emulze.

Emulzní soustava	Množství T3	Množství BT (5%, 30%)	Množství emulgátoru
5%	3g	4,74mg, 38,57mg	57g
10%	6g	9,48mg, 77,14mg	54g
15%	9g	14,21mg, 115,71mg	51g
20%	12g	18,95mg, 154,28mg	48g

#### 4.3.5. Měření velikosti připravených částic

Pro měření připravených částic byl použit přístroj Zetasizer ZS 90. Vzorek bylo nutné umístit do speciálních kyvet pro měření parametrů velikosti částic. Kyvety byly vždy naplněny do stanovené výšky, umístily se do přístroje a provedlo se měření. Vyhodnocení jednotlivých vzorků pak bylo zjištěno na počítači připojeném k Zetasizeru.

## 5. Výsledky

Výsledky měření jsou znázorněny v následujících tabulkách a na jejich základě vytvořených grafech.

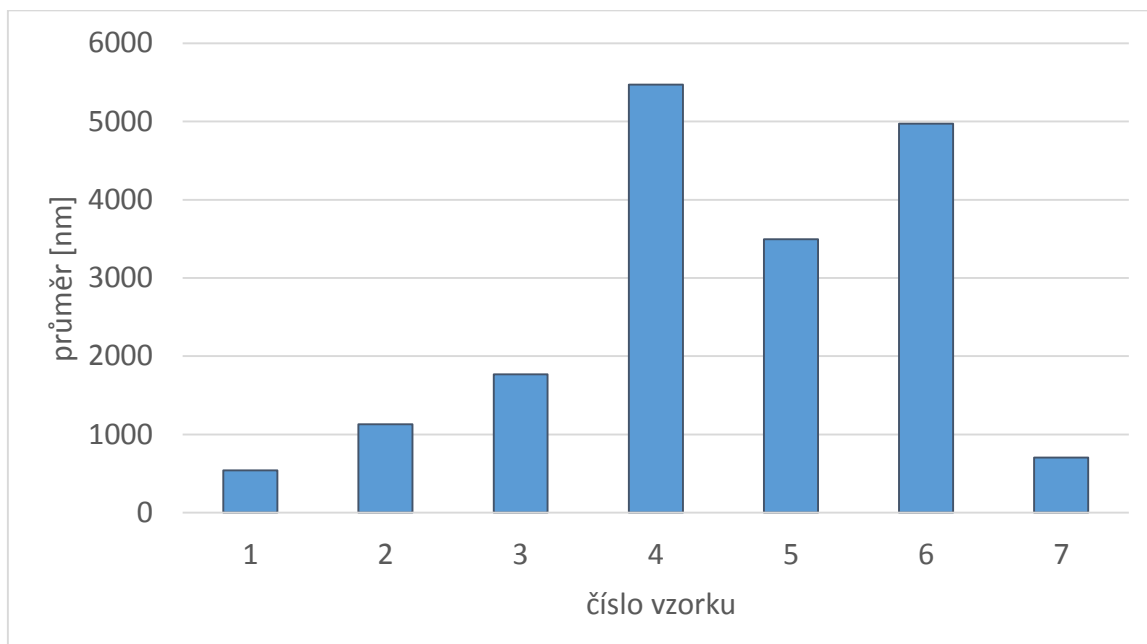
### 5.1. Vliv iontové síly na velikost částic

V této části jsou popsány výsledky měření, kdy pro přípravu nanočástic byl použit jako vnější fáze 0,2% CETRIMID HBr (cetyltrimethyl amonium bromid). U CETRIMID HBr byl také vyzkoušen vliv malého přídavku soli – 0,5%, 1% NaCl a 0,5%, 1% MgSO<sub>4</sub>. Jako vnitřní fáze se použil 3% roztok polymeru T3 v EMK. Po zhomogenizování a následném dvouhodinovém mícháním bylo prováděno měření velikosti nanočástic.

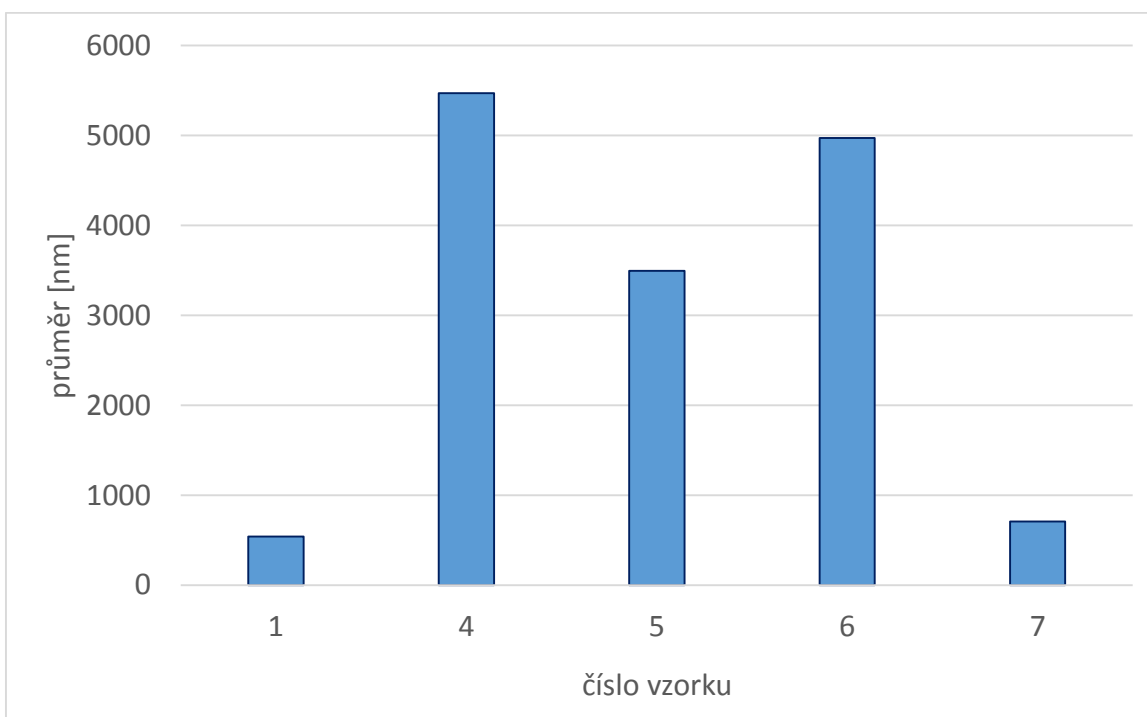
Tabulka 5-1: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v EMK, jako emulgátor byl použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv přísady solí.

Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)	Sůl
1	538	0,146	541	100	0	0	-
2	596	0,356	1131	65	318	35	-
3	1018	0,434	1768	83	287	17	-
4	5304	0,146	5470	76	252	24	0,5% NaCl
5	7223	0,608	3494	100	0	0	1% NaCl
6	3806	0,514	4972	100	0	0	0,5% MgSO <sub>4</sub>
7	2214	0,973	706	100	0	0	1% MgSO <sub>4</sub>

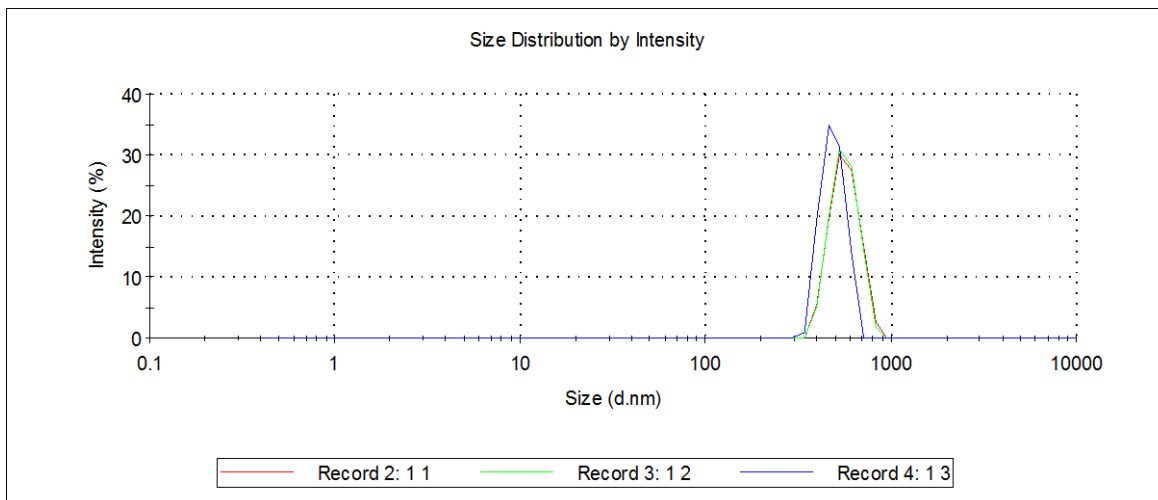
Obrázek 5-1-1: Vliv přísady solí na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci. Popis vzorků je v tabulce 5-1.



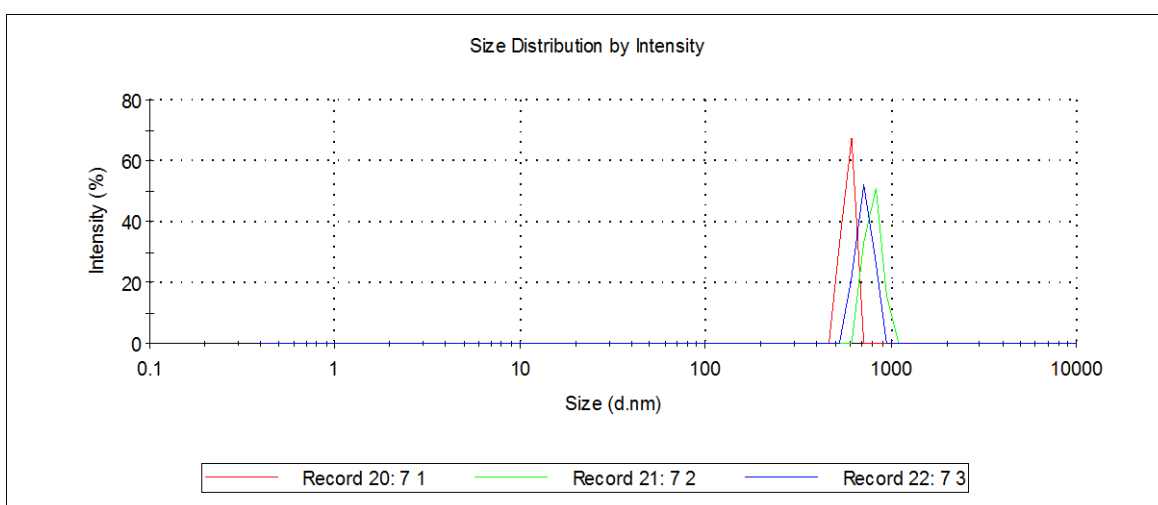
Obrázek 5-1-2: Vliv přísady solí na frakci nejmenších částic v nejvyšší intenzitní koncentraci. Popis vzorků je v tabulce 5-1.



Obrázek 5-1-3: Autentický záznam přístroje. Vzorek č. 1 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



Obrázek 5-1-4: Autentický záznam přístroje. Vzorek č. 7 – intenzitní průměr nanočástic po přidavku 1% MgSO<sub>4</sub>. Frekvenční křivka.





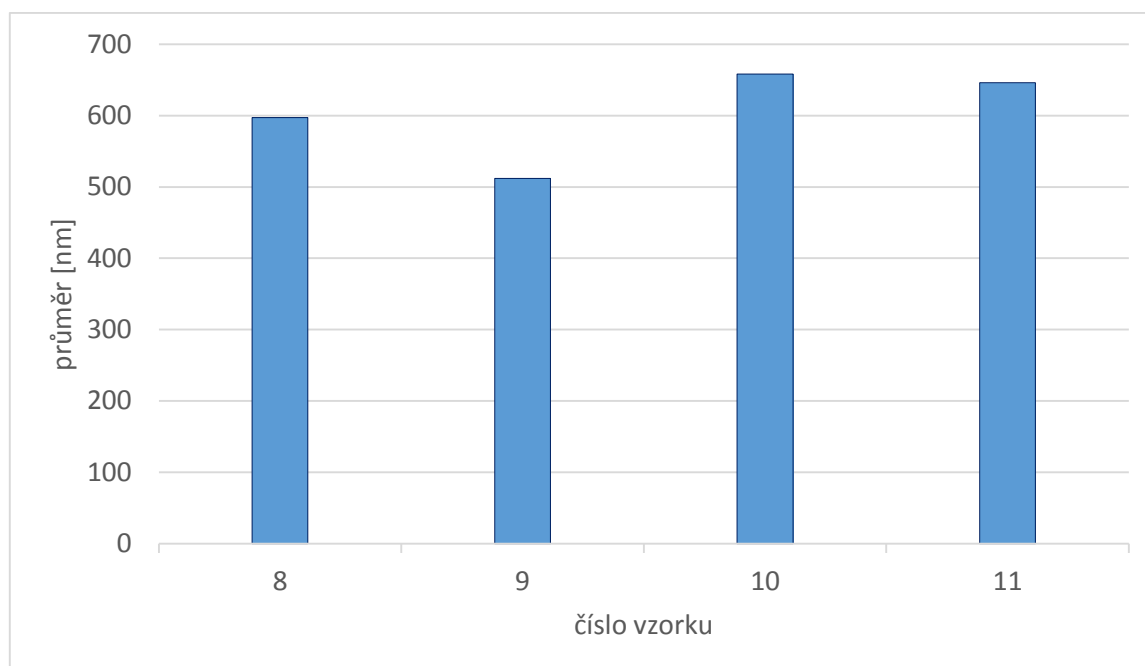
## 5.2. Vliv koncentrace emulze na velikost částic

V této kapitole jsou popsány výsledky měření, kde byl zkoumán vliv koncentrace emulze. Jako rozpouštědlo pro přípravu 3% T3 byl použit dichlormethan, jako vnější fáze 0,2% CETRIMID HBr. Připravily se 5%, 10%, 15% a 20% emulze. Postup přípravy a měření nebyl změněn.

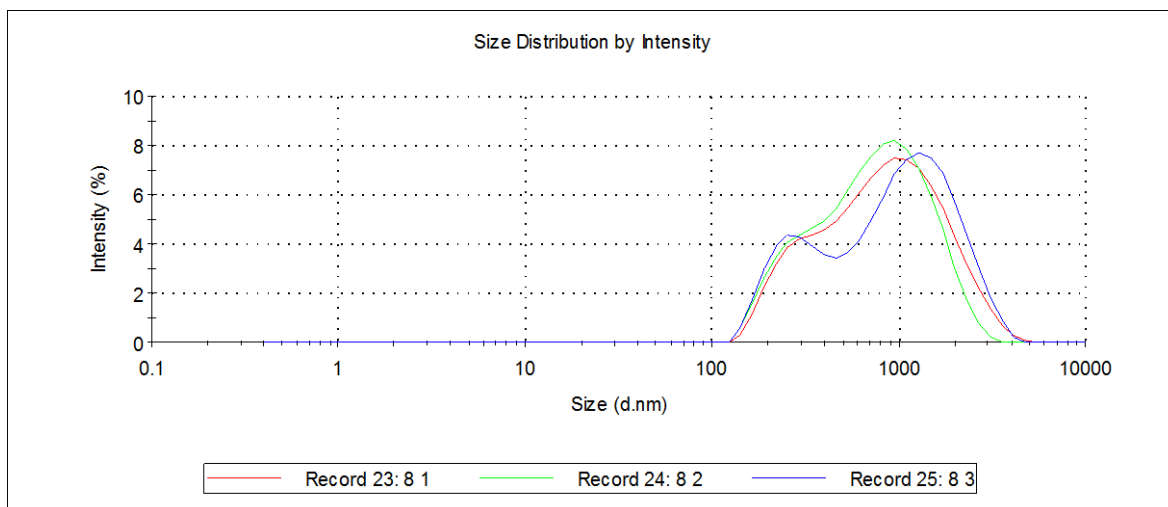
Tabulka 5-2: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5%, 10%, 15% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze.

Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)	Emulze
8	597	0,360	1068	100	0	0	5%
9	512	0,406	896	85	206	15	10%
10	658	0,342	1037	87	188	13	15%
11	646	0,184	789	100	0	0	20%

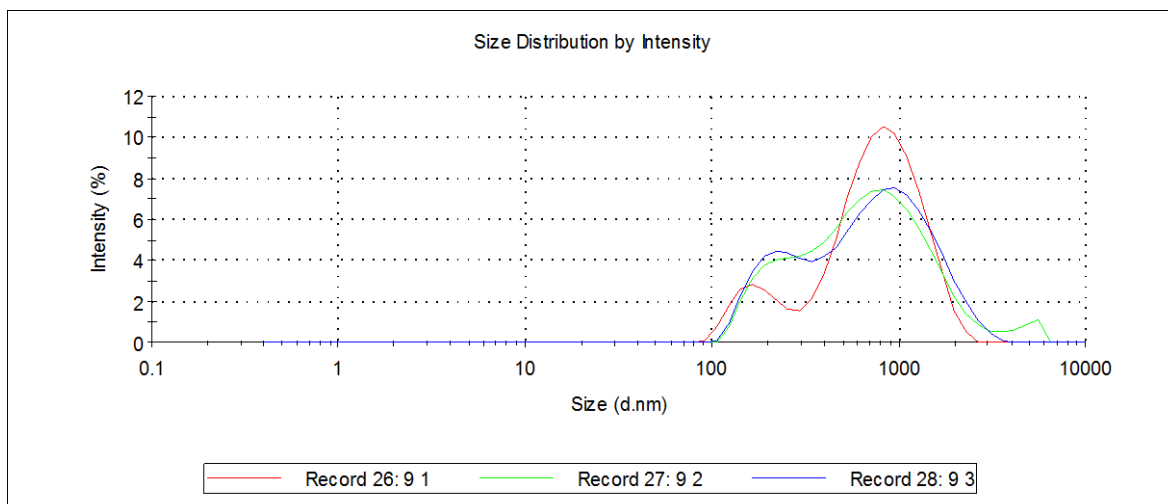
Obrázek 5-2-1: Vliv koncentrace emulze na frakci částic. Popis vzorků je v tabulce 5-2.



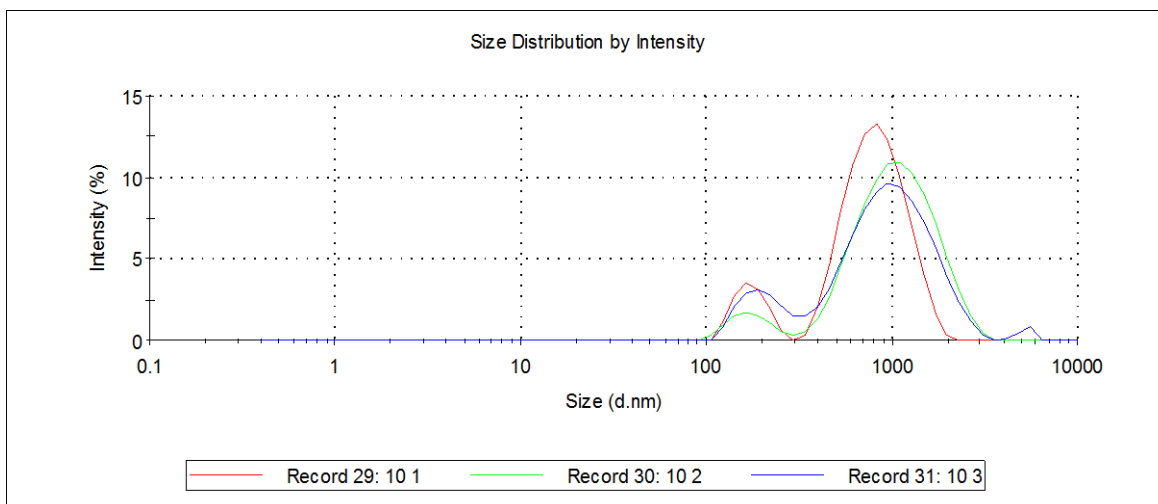
Obrázek 5-2-2: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 5% emulze. Vzorek č. 8 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



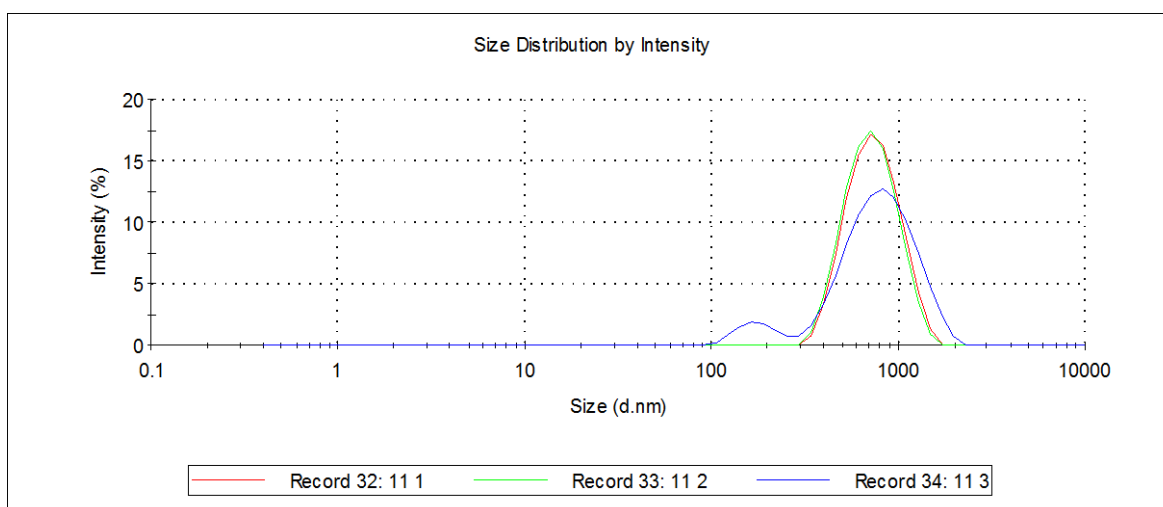
Obrázek 5-2-3: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 10% emulze. Vzorek č. 9 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



Obrázek 5-2-4: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 15% emulze. Vzorek č. 10 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



Obrázek 5-2-5: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze. Vzorek č. 11 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



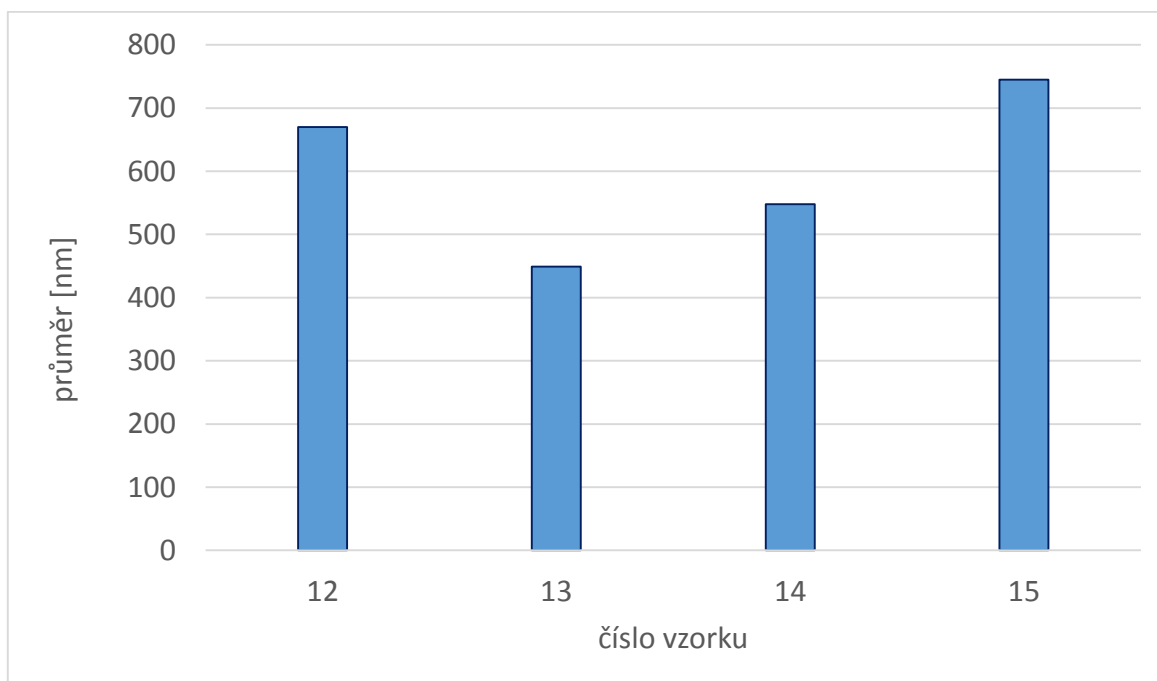
### 5.3. Vliv koncentrace emulze na velikost částic po přidání 5% baze terbinafinu

V této části se zkoumal vliv koncentrace emulze na velikost částic po přidání zkoušené účinné látky. Baze terbinafinu se přidávala k vnitřní fázi, ve které se rozpustila. Postup i veškeré podmínky jsou stejné jako u předchozího případu.

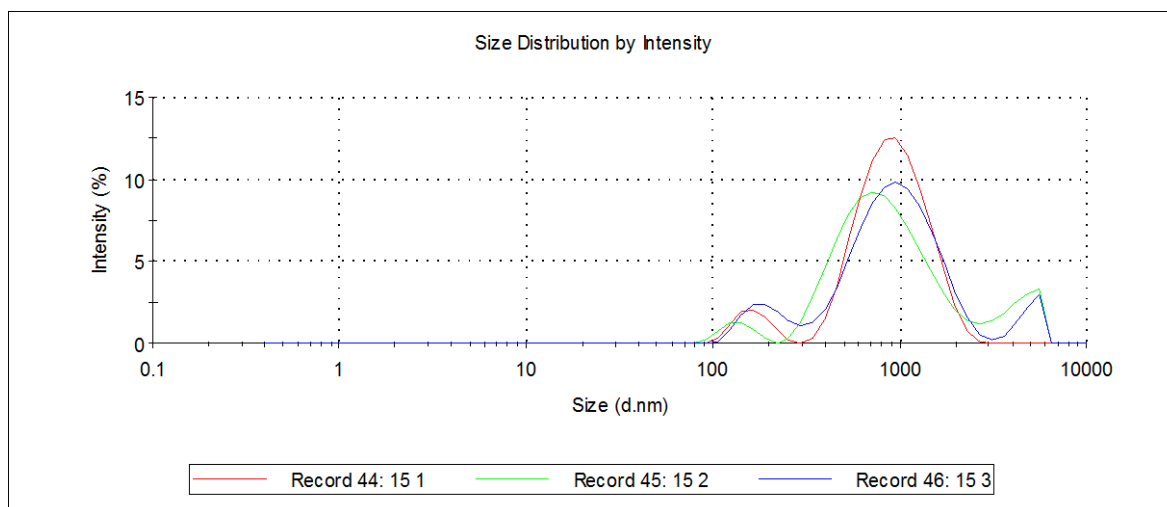
Tabulka 5-3: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5%, 10%, 15% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze po přidání 5% BT.

Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)	Emulze
12	670	0,478	1449	82	300	18	5%
13	449	0,340	651	90	4885	10	10%
14	548	0,375	1041	79	222	21	15%
15	745	0,374	967	85	179	15	20%

Obrázek 5-3-1: Vliv koncentrace emulze na frakci částic po přidání 5% BT. Popis vzorků je v tabulce 5-3.



Obrázek 5-3-2: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze. Vzorek č. 15 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.

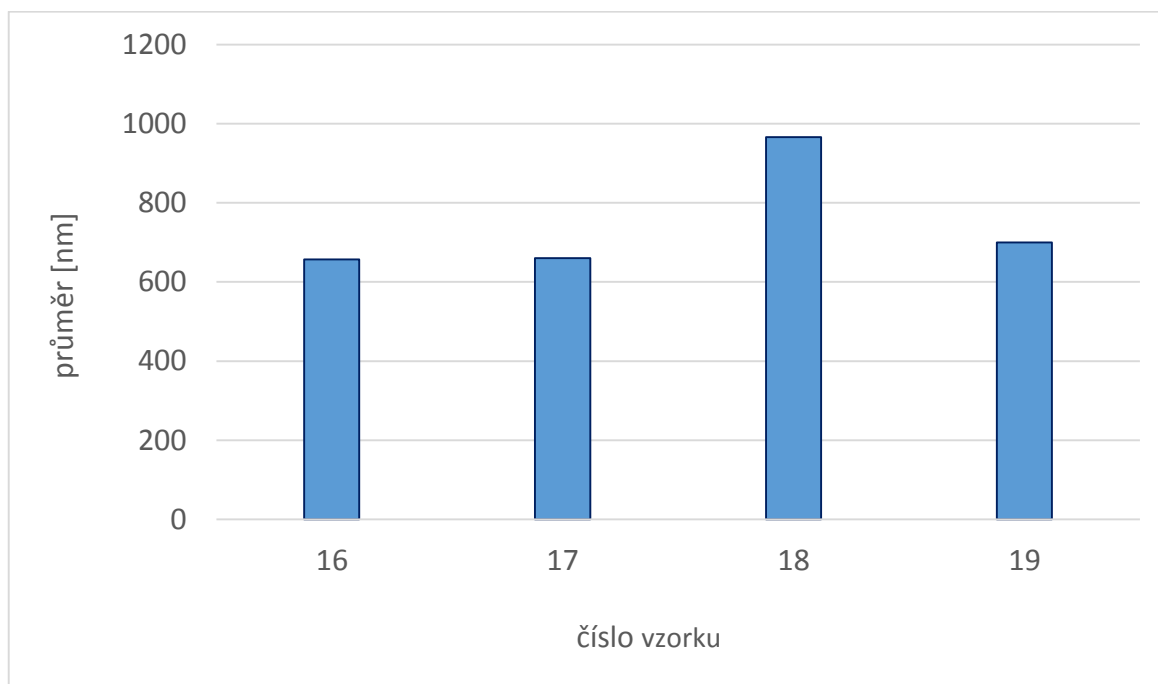


#### 5.4. Vliv koncentrace emulze na velikost částic po přidání 30% baze terbinafinu

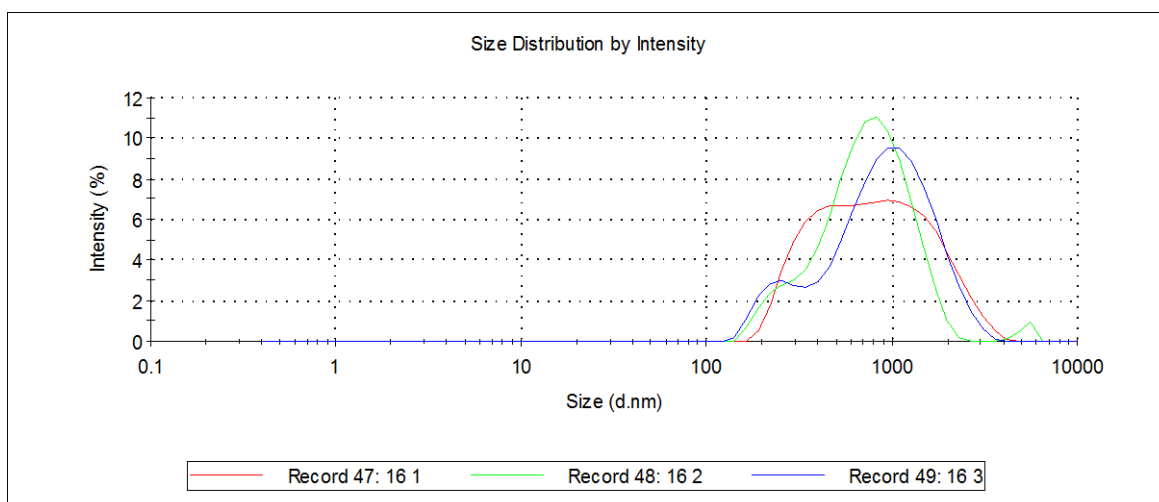
Tabulka 5-4: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5%, 10%, 15% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze po přidání 30% BT.

Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)	Emulze
16	657	0,274	1064	81	337	19	5%
17	660	0,367	824	83	321	17	10%
18	966	0,436	1158	87	5092	13	15%
19	700	0,369	609	100	0	0	20%

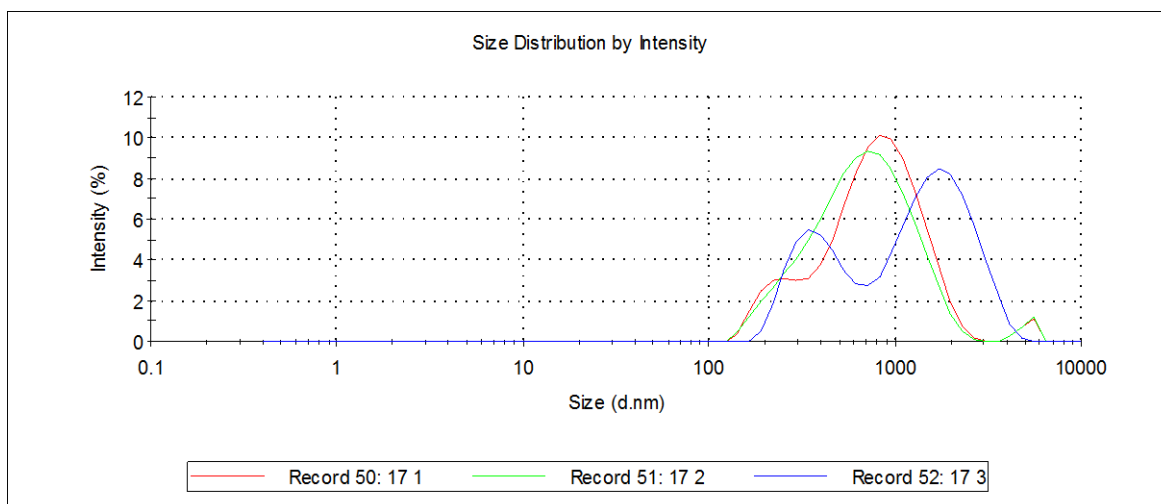
Obrázek 5-4-1: Vliv koncentrace emulze na frakci částic po přidání 30% BT. Popis vzorků je v tabulce 5-4.



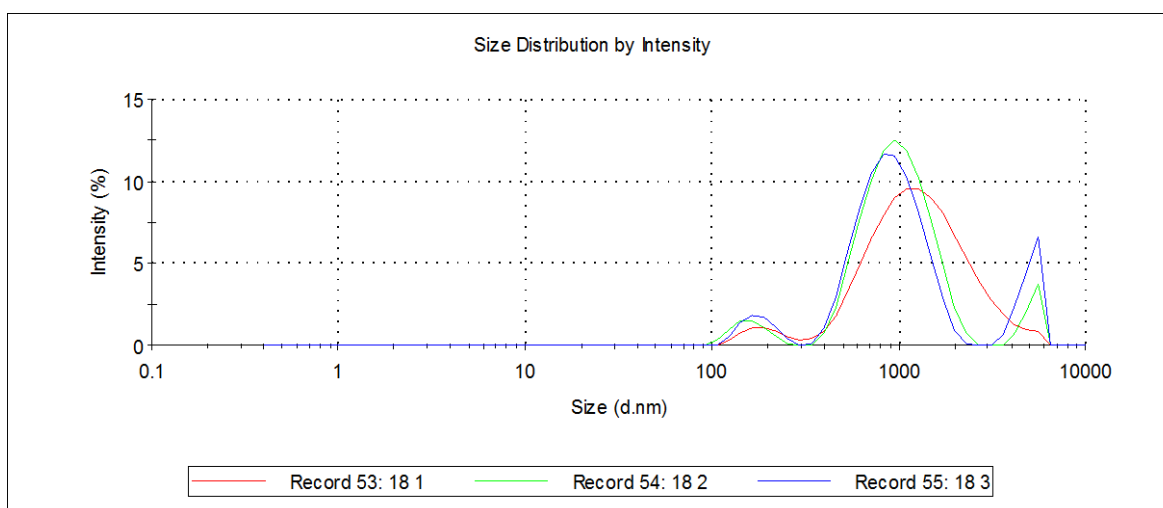
Obrázek 5-4-2: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 5% emulze. Vzorek č. 16 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



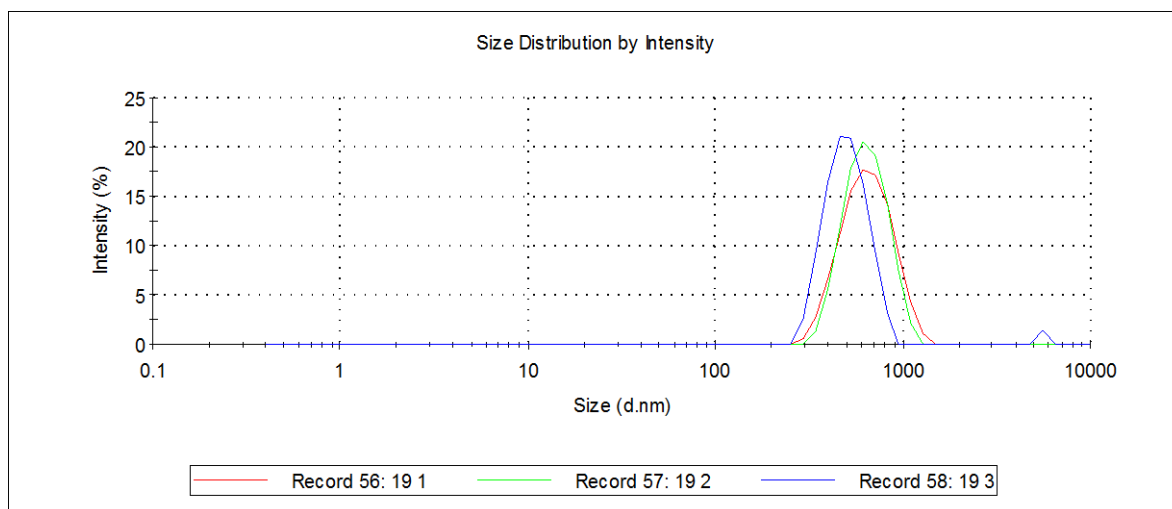
Obrázek 5-4-3: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 10% emulze. Vzorek č. 17 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



Obrázek 5-4-4: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 15% emulze. Vzorek č. 18 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



Obrázek 5-4-5: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 20% emulze. Vzorek č. 19 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



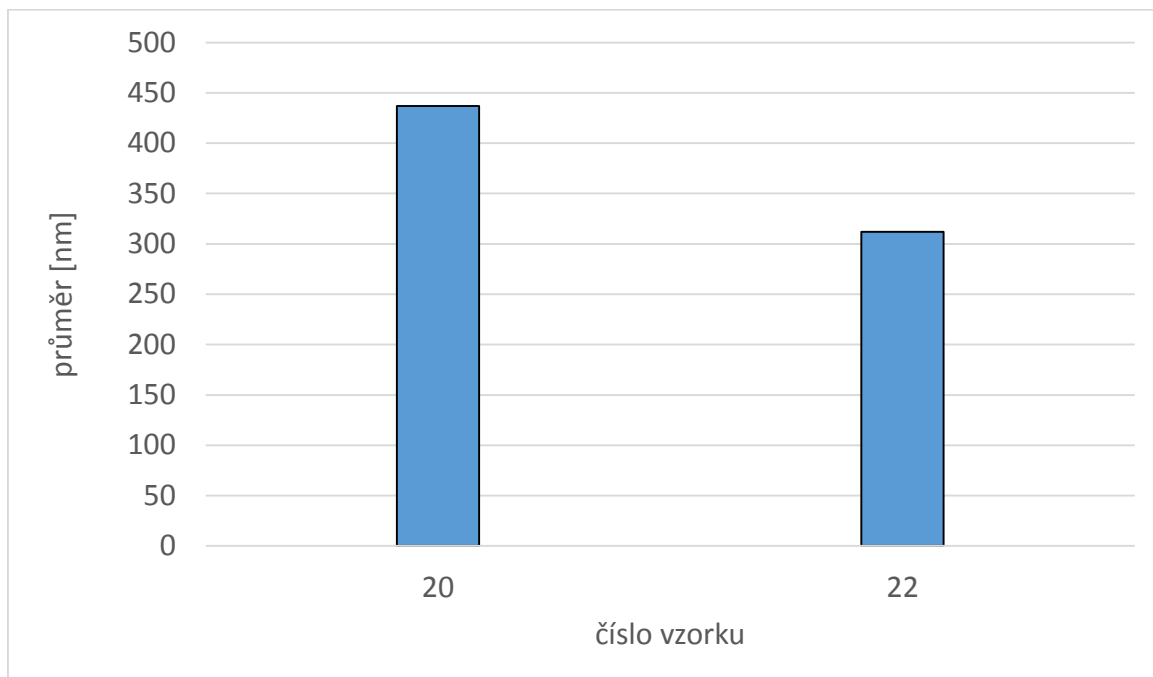
## 5.5. Vliv koncentrace emulze a koncentrace baze terbinafinu na velikost částic

Tabulka 5-5: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze a vliv 5% a 30% koncentrace baze terbinafinu na velikost částic.

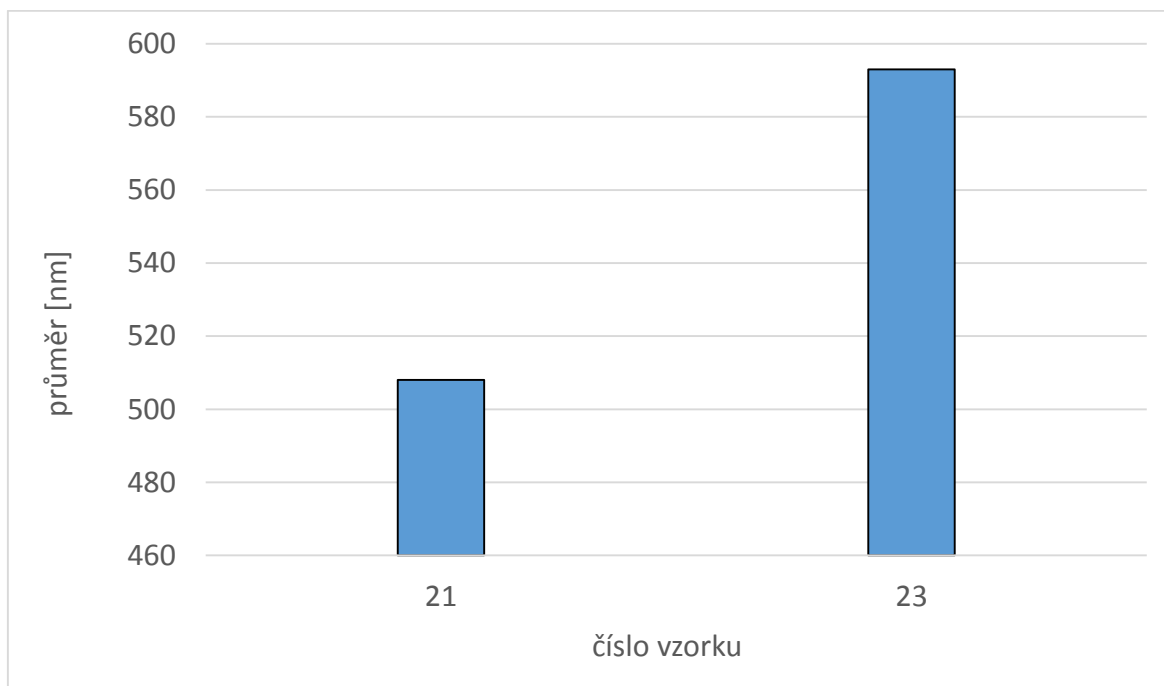
Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)	Emulze	BT
20	437	0,276	612	100	0	0	5%	5%
21	508	0,259	677	100	0	0	5%	30%
22	312	0,247	389	98	4857	2	20%	5%
23	593	0,567	571	72	154	28	20%	30%



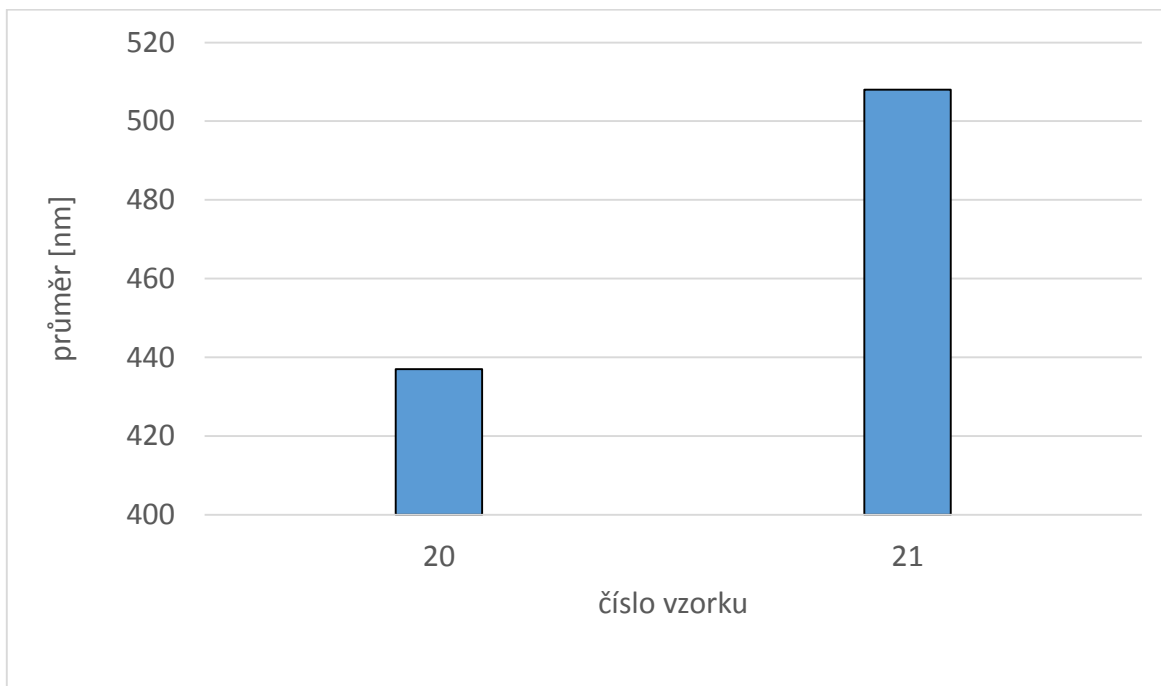
Obrázek 5-5-1: Vliv 5% a 20% emulze na frakci částic po přidání 5% BT. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-5.



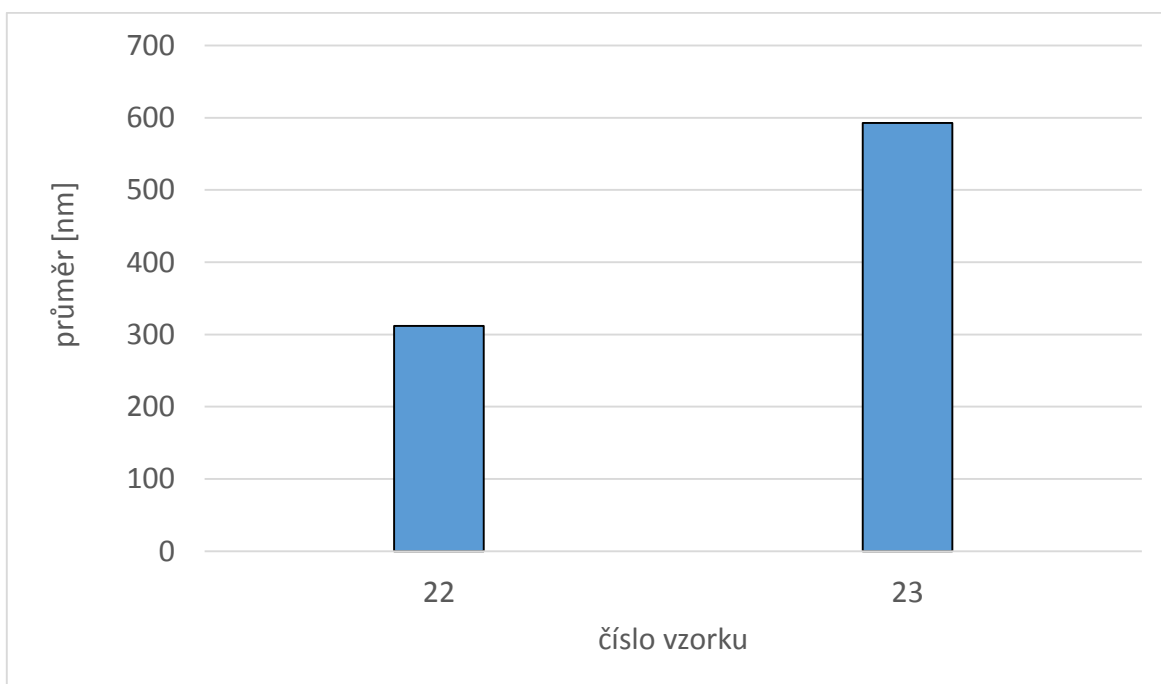
Obrázek 5-5-2: Vliv 5% a 20% emulze na frakci částic po přidání 30% BT. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-5.



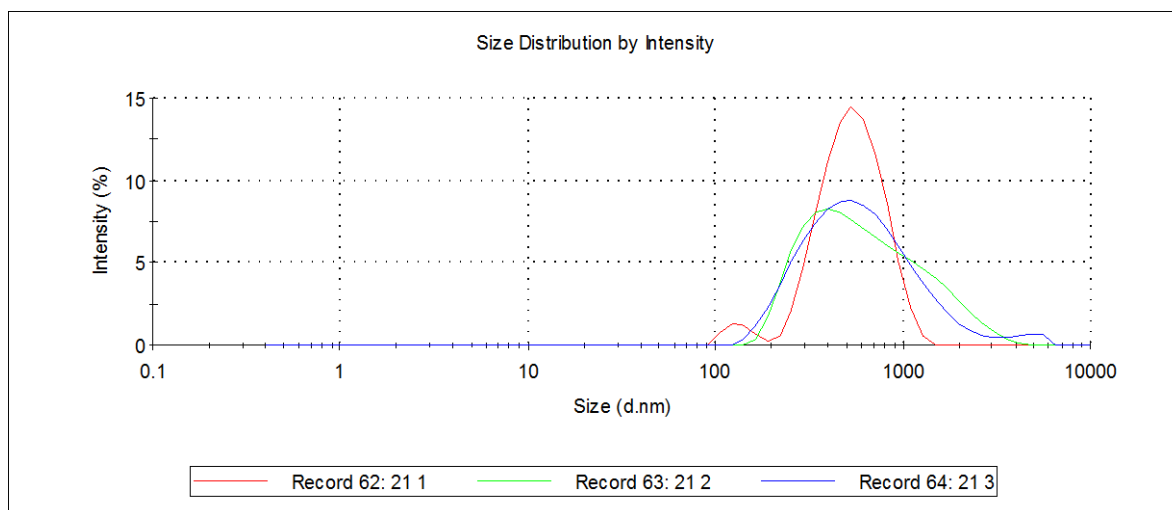
Obrázek 5-5-3: Vliv 5% emulze na frakci částic po přidání 5% a 30% BT. Popis vzorků je v tabulce 5-5.



Obrázek 5-5-4: Vliv 20% emulze na frakci částic po přidání 5% a 30% BT. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-5.



Obrázek 5-5-5: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 5% emulze a 30% BT. Vzorek č. 21 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



## 5.6. Vliv použitého emulgátoru a rozpouštědla DCM použitého pro přípravu 3% roztoku nosiče T3 na velikost částic

Tabulka 5-6A: Typ použitého emulgátoru a přídavek soli u jednotlivých vzorků (24-29).

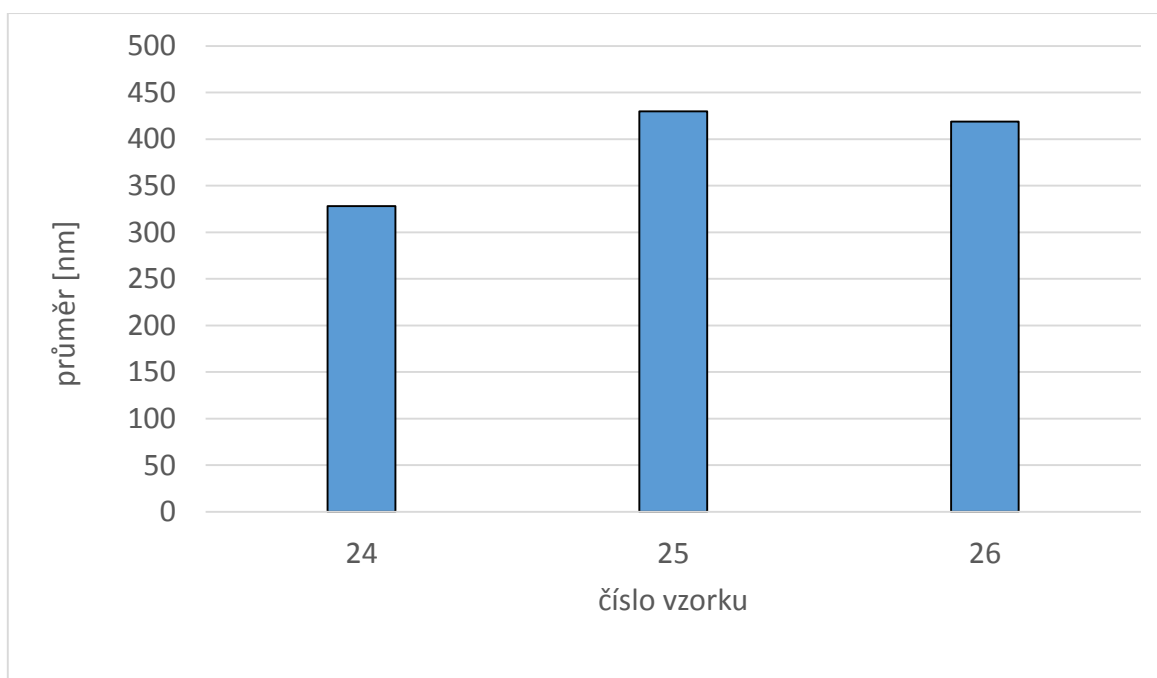
Vzorek č.	Emulgátor	Sůl
24	1% PEG-12-DIMETICON	-
25	1% PEG-40-STEARÁT	-
26	1% LECITHIN + PS 20	-
27	1% PEG-12-DIMETICON	1%NaCl
28	1% PEG-40-STEARÁT	1%NaCl
29	1% LECITHIN + PS 20	1%NaCl

Tabulka 5-6B: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor byly použity 1% PEG-12-DIMETICON, 1% PEG-40-STEARÁT, 1% LECITHIN s PS 20. Dále byl zkoumán i vliv přísady soli 1% NaCl spolu s emulgátory. Byla použita 30% koncentrace base terbinafinu.

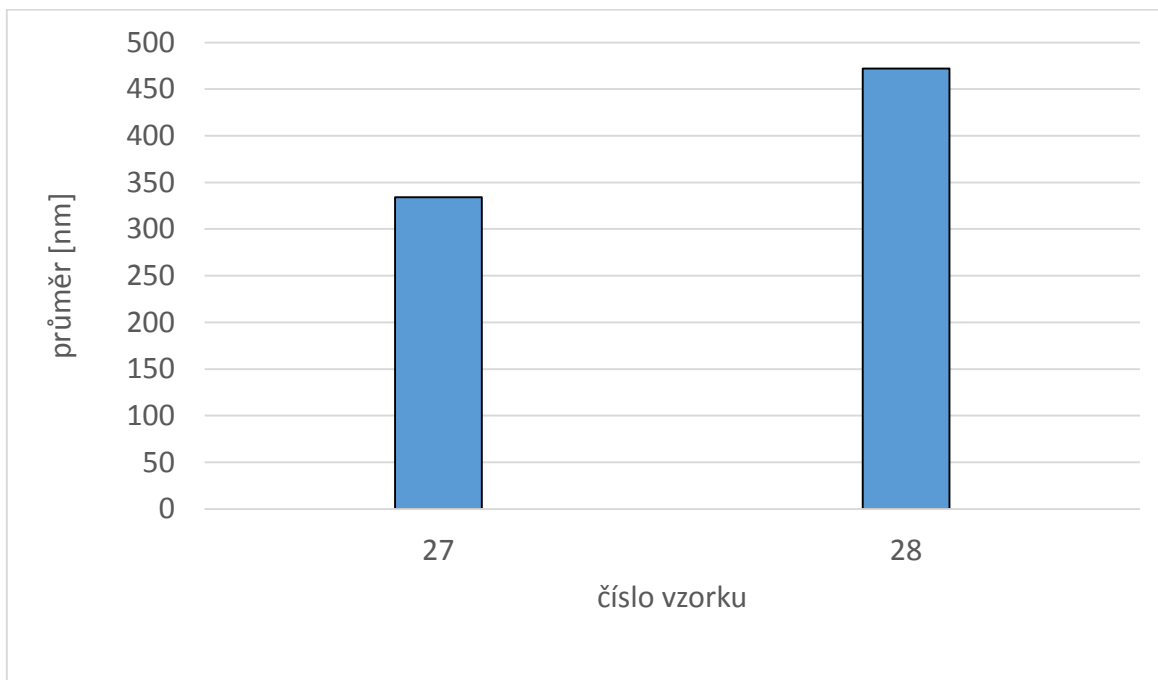
Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)
24	328	0,796	189	100	0	0
25	430	0,651	168	64	705	36
26	419	0,331	425	96	5270	4
27	334	0,563	387	75	85	25
28	472	0,382	377	100	0	0
29	0	0	0	0	0	0

Vzorek č. 29 byl neměřitelný z důvodu vzniklé sraženiny.

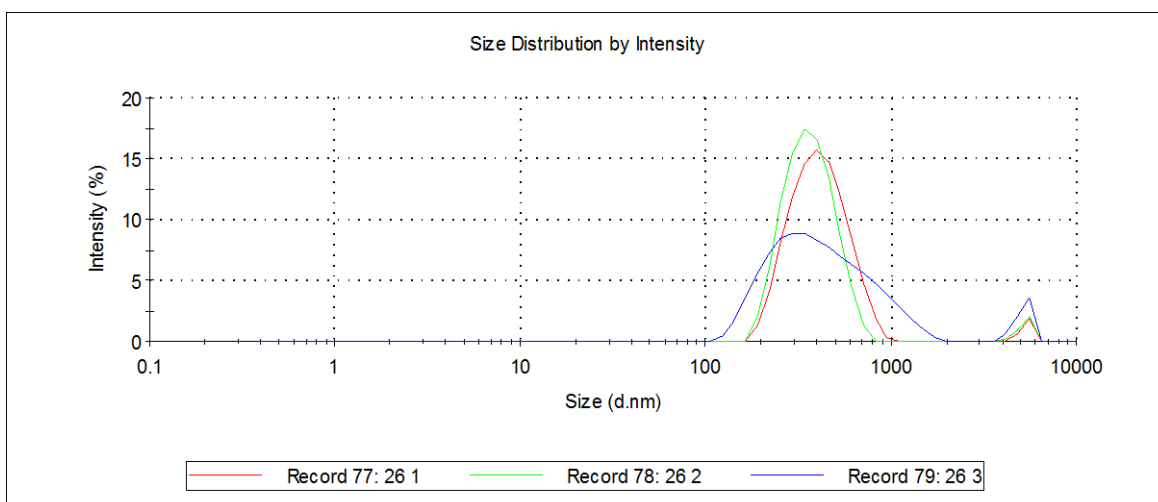
Obrázek 5-6-1: Vliv použitých emulgátorů na frakci částic za použití 20% emulze a 30% BT. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-6A a 5-6B.



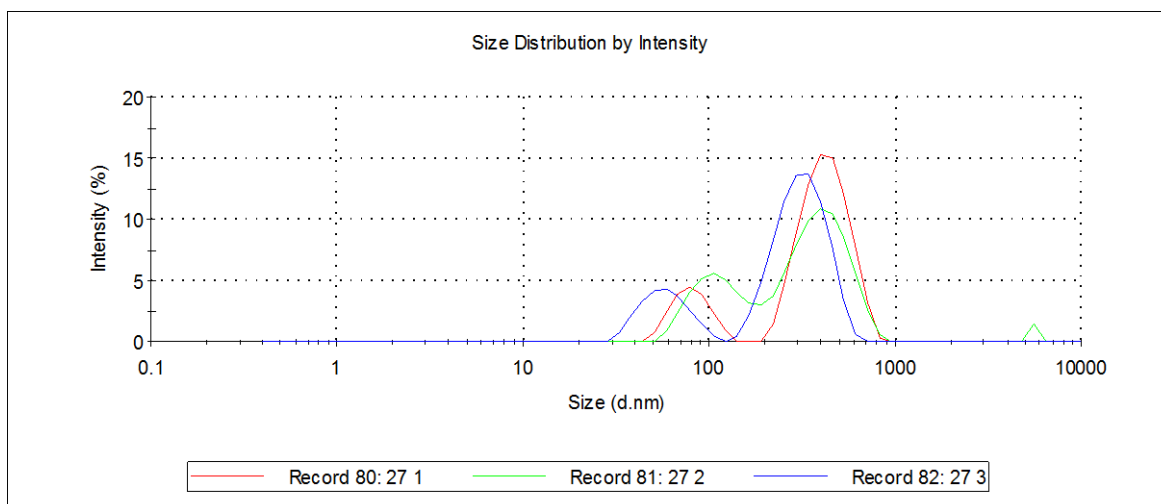
Obrázek 5-6-2: Vliv použitých emulgátorů s přídavkem 1% NaCl na frakci částic za použití 20% emulze a 30% BT. Popis vzorků je v tabulce 5-6A a 5-6B.



Obrázek 5-6-3: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze a 30% BT za použití emulgátoru 1% LECITHINU + PS 20. Vzorek č. 26 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



Obrázek 5-6-4: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze a 30% BT za použití emulgátoru 1% PEG-12-DIMETICONU. Vzorek č. 27 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



## 5.7. Vliv použitého emulgátoru a rozpouštědla EMK použitého pro přípravu 3% roztoku nosiče T3 na velikost částic

Tabulka 5-7A: Typ použitého emulgátoru a přídavek soli u jednotlivých vzorků (30-35).

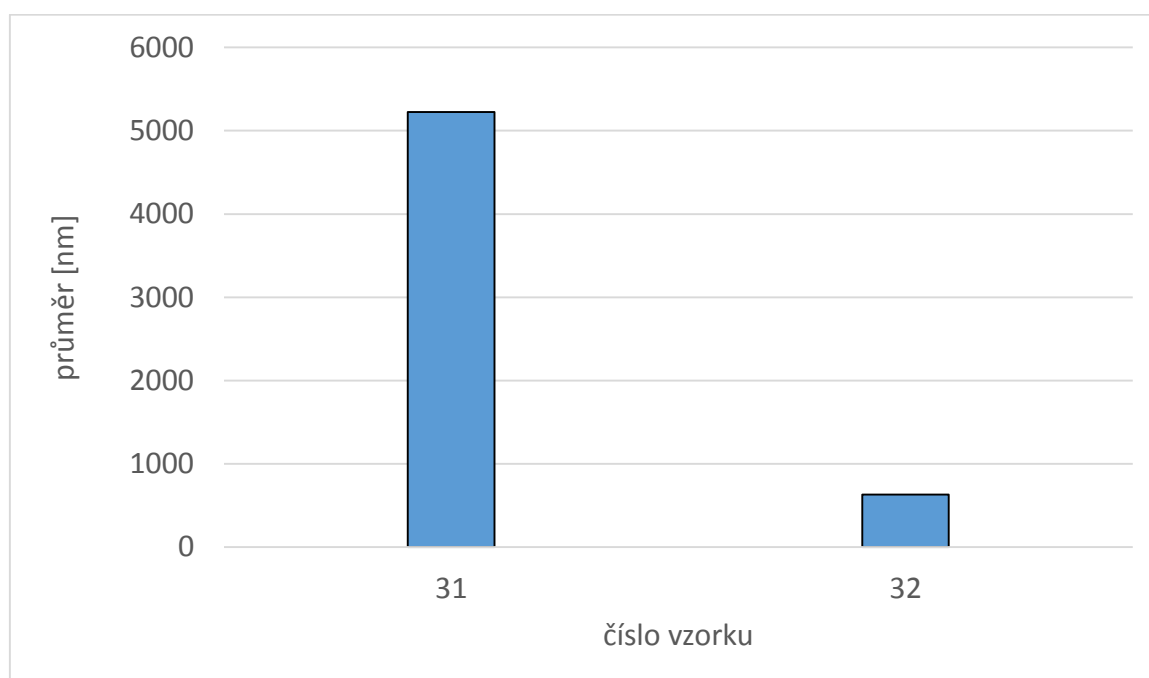
Vzorek č.	Emulgátor	Sůl
30	1% PEG-12-DIMETICON	-
31	1% PEG-40-STEARÁT	-
32	1% LECITHIN + PS 20	-
33	1% PEG-12-DIMETICON	1%NaCl
34	1% PEG-40-STEARÁT	1%NaCl
35	1% LECITHIN + PS 20	1%NaCl

Tabulka 5-7B: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v EMK, jako emulgátor byly použity 1% PEG-12-DIMETICON, 1% PEG-40-STEARÁT, 1% LECITHIN s PS 20. Dále byl zkoumán i vliv přísady soli 1% NaCl spolu s emulgátory. Byla použita 30% koncentrace baze terbinafinu.

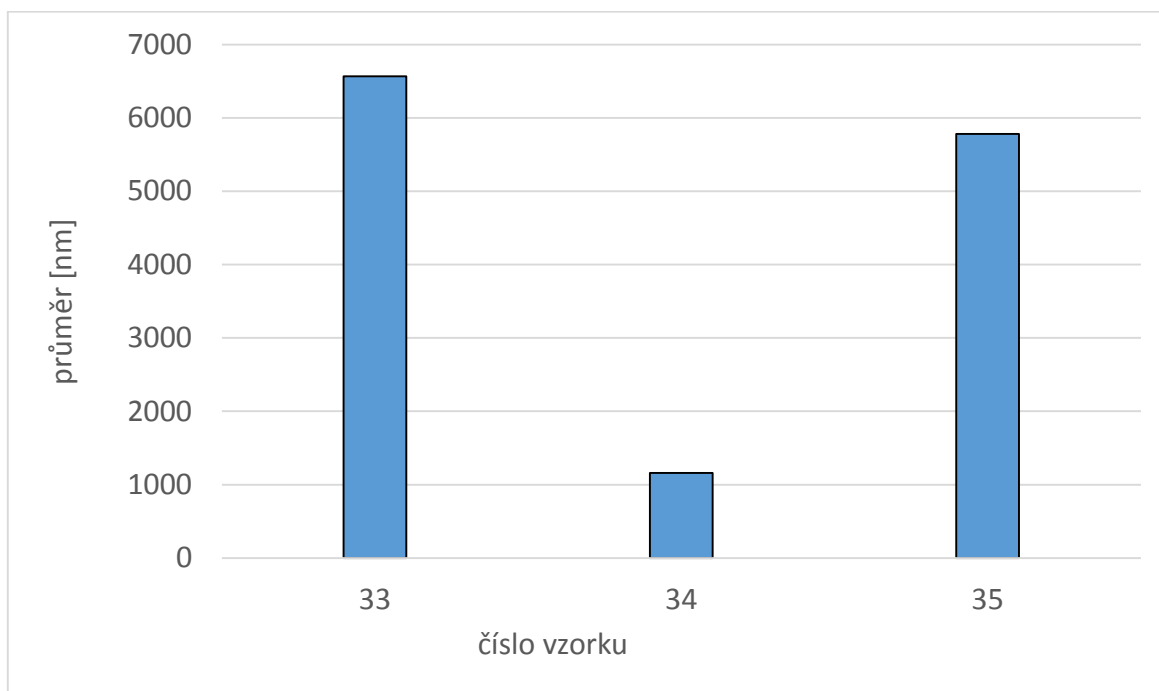
Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)
31	6734	0,372	5224	100	0	0
32	518	0,375	630	89	4428	11
33	6565	0,600	5560	100	0	0
34	1161	0,598	2287	86	366	14
35	5780	0,878	146	89	5560	11

Vzorek č. 30 nebyl přístrojem změřen. Důvod nebyl zjištěn.

Obrázek 5-7-1: Vliv použitých emulgátorů na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 20% emulze a 30% BT. Popis vzorků je v tabulce 5-7A a 5-7B.



Obrázek 5-7-2: Vliv použitých emulgátorů s přidavkem 1% NaCl na frakci částic za použití 20% emulze a 30% BT. Popis vzorků je tabulce 5-7A a 5-7B.



## 5.8. Vliv použitého emulgátoru, rozpouštědla, přidavku soli, změny pH a koncentrace emulze na velikost částic

Tabulka 5-8A: Charakteristiky jednotlivých vzorků (36-41).

Vzorek č.	Emulgátor	Emulze	Rozp.
36	0,5% LECITHIN + PS 20	10%	EMK
37	0,5% LECITHIN + PS 20, kapka NH <sub>3</sub>	10%	EMK
38	1% PEG-40-STEARÁT + 1% NaCl	10%	EMK
39	1% PEG-40-STEARÁT + 1% MgSO <sub>4</sub>	10%	EMK
40	0,2% CETRIMID HBr	5%	DCM
41	0,2% CETRIMID HBr, kapka NH <sub>3</sub>	5%	DCM

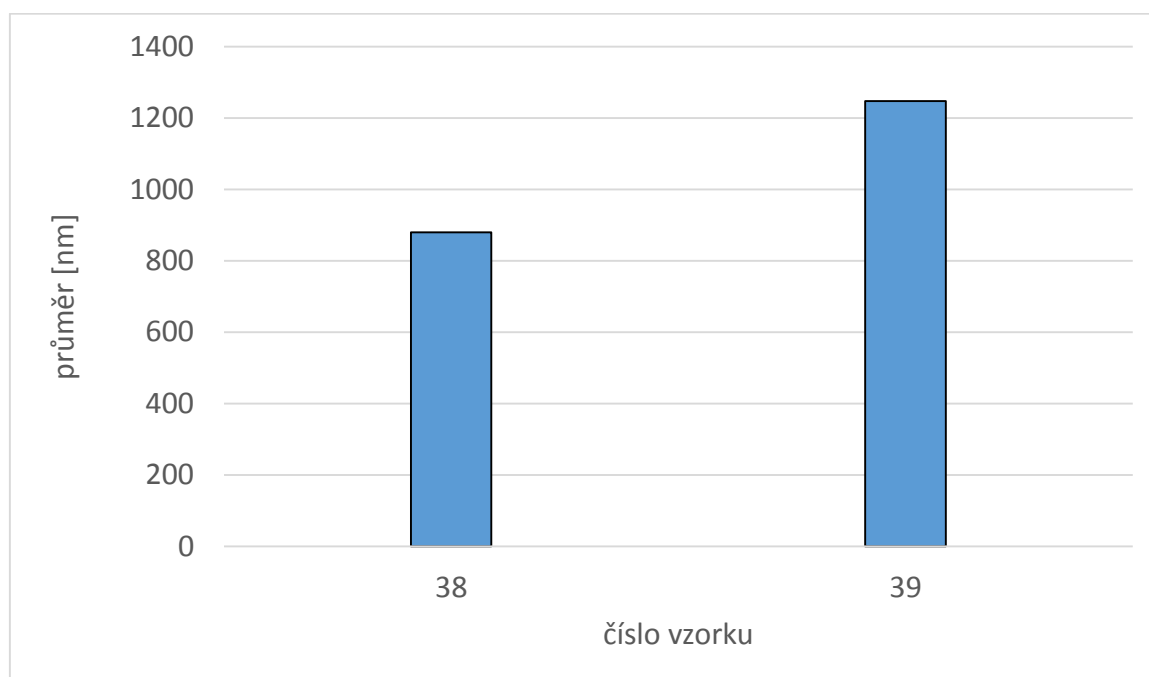


Tabulka 5-8B: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5% a 10% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v EMK a DCM, jako emulgátor byly použity 0,2% CETRIMID HBr, 1% PEG-40-STEARÁT, 1% LECITHIN s PS 20. Dále byl zkoumán i vliv přísady soli 1% NaCl spolu s emulgátory a změna pH přidavkem  $\text{NH}_3$ . Byla použita 30% koncentrace baze terbinafinu.

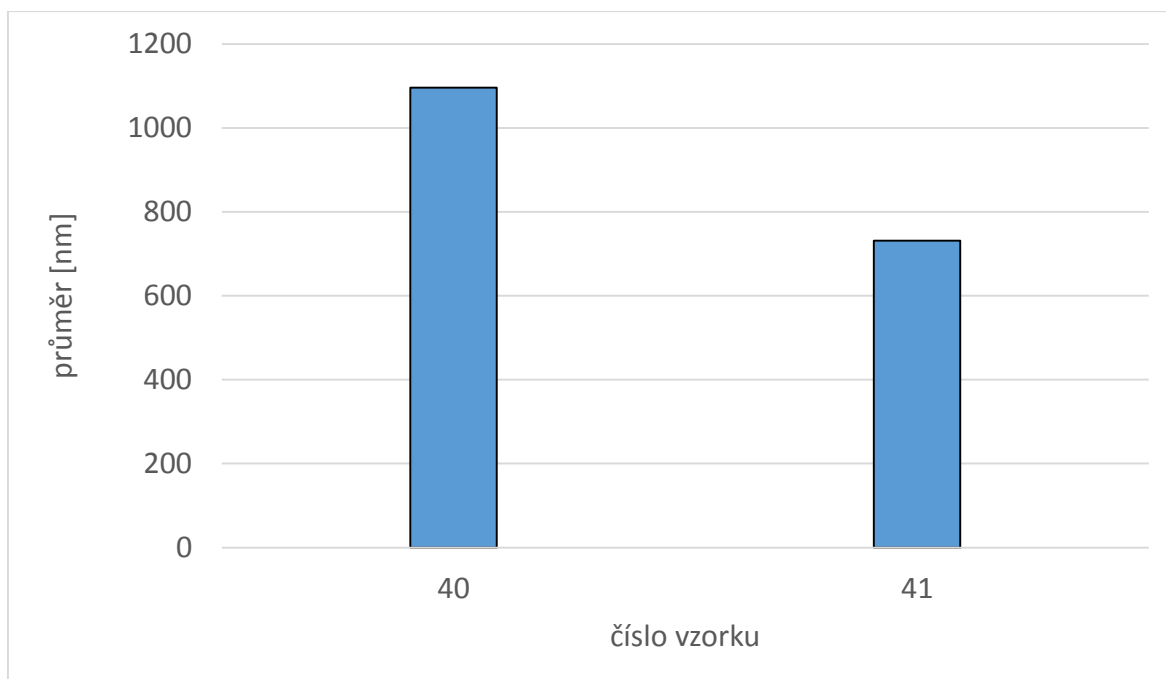
Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)
37	1441	1	520	53	113	47
38	5964	0,482	880	88	5560	12
39	5352	0,470	1248	100	0	0
40	708	0,332	1096	100	0	0
41	595	0,219	731	100	0	0

Vzorek č. 36 byl neměřitelný z důvodu vzniklé sraženiny.

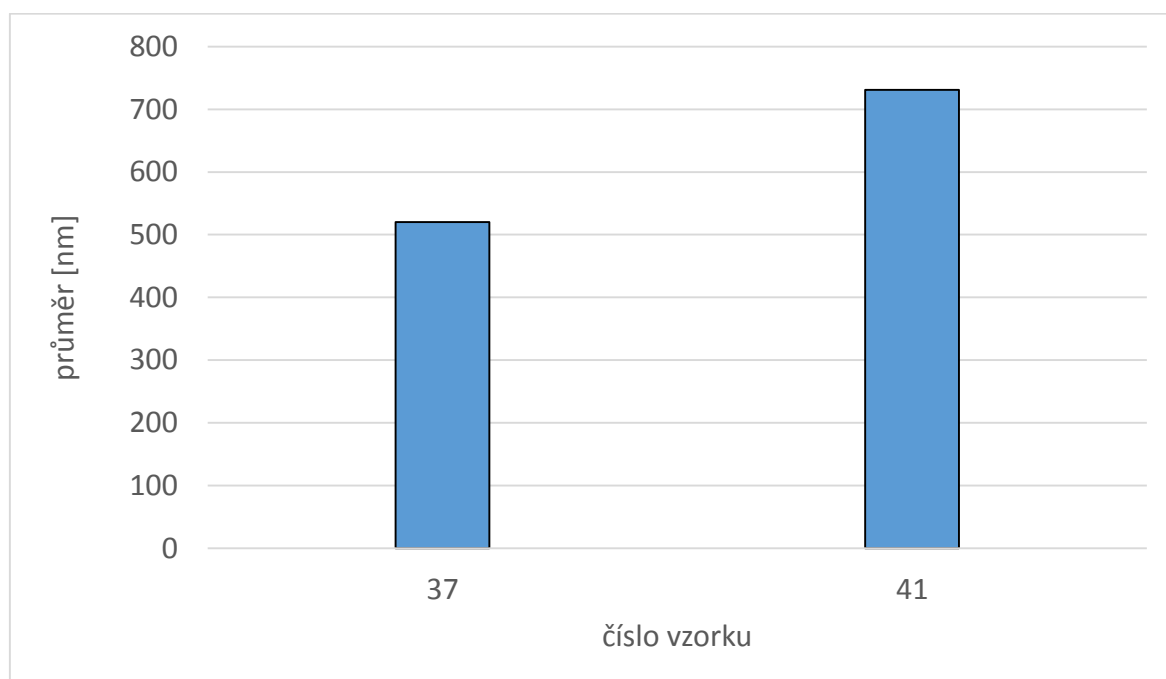
Obrázek 5-8-1: Vliv přidavku různé soli na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 1% PEG-40-STEARÁTU jako emulgátoru. V obou případech se jedná o 10% emulzi a rozpouštědlem byl EMK. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-8A a 5-8B.



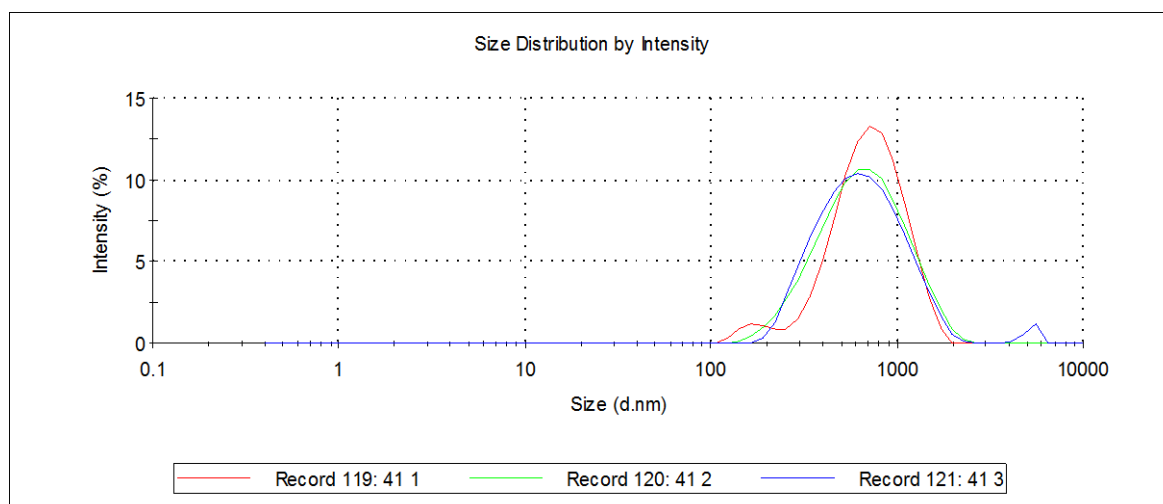
Obrázek 5-8-2: Vliv přidavku amoniaku na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% CETRIMIDU HBr jako emulgátoru. V obou případech se jedná o 5% emulzi a rozpouštědlem byl DCM. Popis vzorků je v tabulce 5-8A a 5-8B.



Obrázek 5-8-3: Vliv přidavku amoniaku u různých emulgátorů – 0,5% LECITHIN+PS 20, 0,2% CETRIMID HBr na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci. Odlišná koncentrace emulze i rozpouštědlo. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-8A a 5-8B.



Obrázek 5-8-4: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 5% emulze a 30% BT, rozpouštědlem byl DCM a emulgátorem 0,2% CETRIMID HBr s přídavkem amoniaku. Vzorek č. 41 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



## 5.9. Vliv použitého rozpouštědla, koncentrace emulze, emulgátoru a přídavku soli na velikost částic

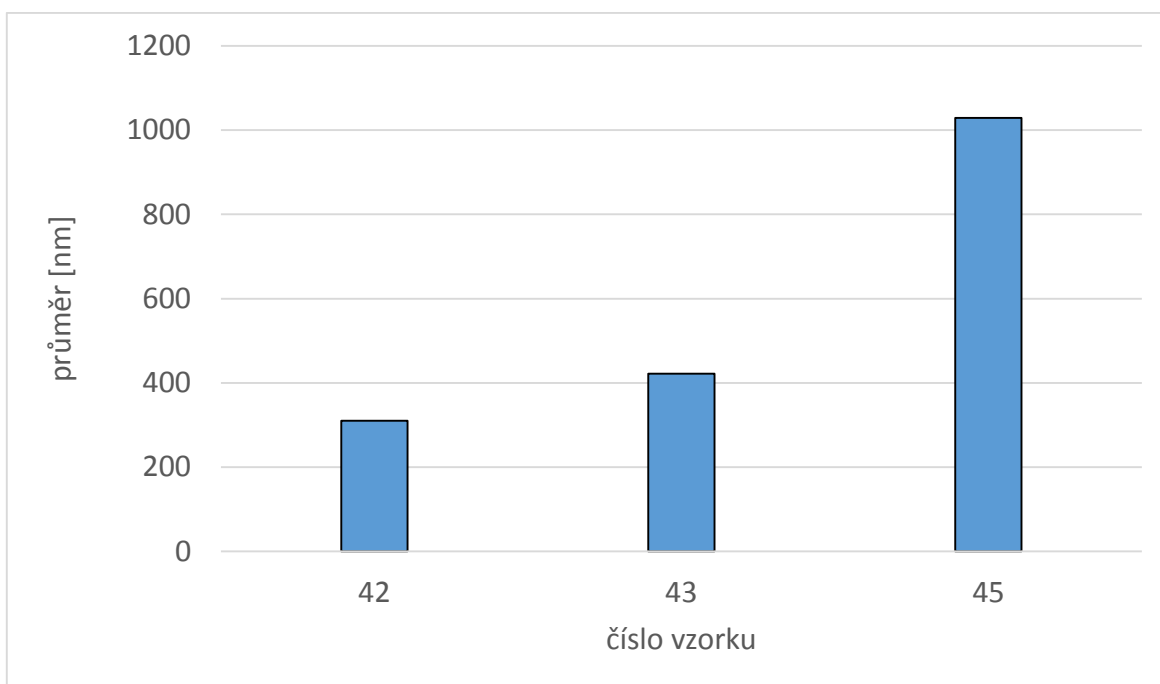
Tabulka 5-9A: Charakteristiky jednotlivých vzorků (42-45).

Vzorek č.	Emulze	Rozp.	Emulgátor
42	5	DCM	0,2% LECITHIN + PS 20
43	10	DCM	0,2% LECITHIN + PS 20
44	20	EMK	0,2% PEG-40-STEARÁT + 1% NaCl
45	20	EMK	0,2% LECITHIN + PS 20

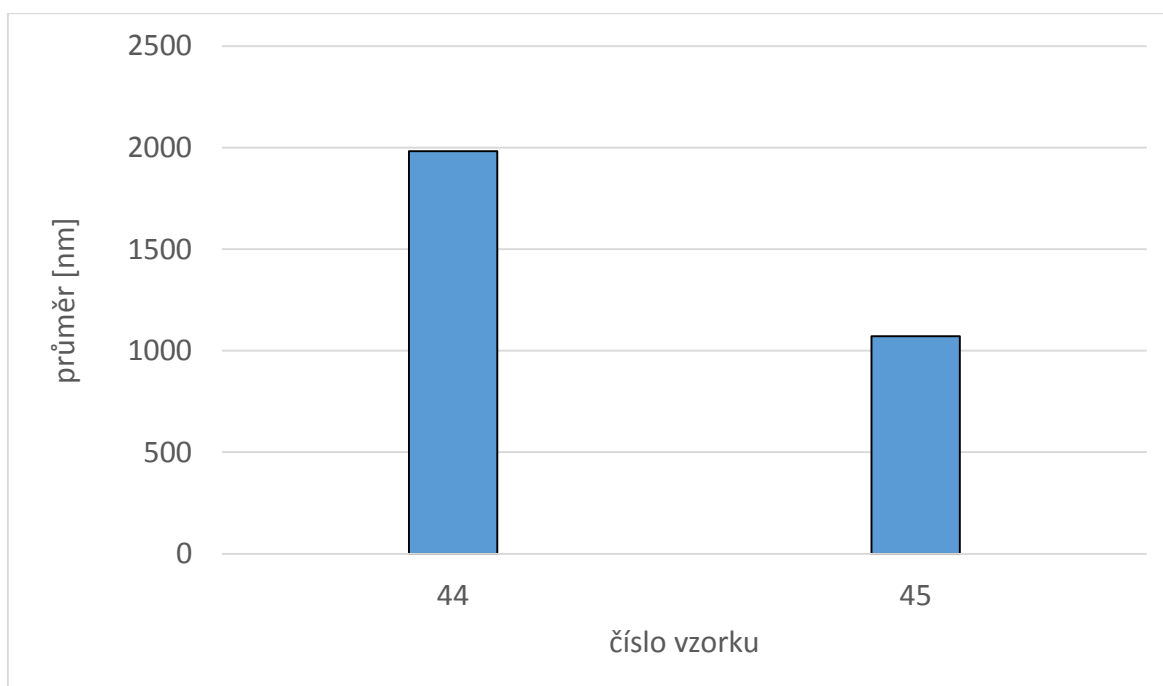
Tabulka 5-9B: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5%, 10% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v EMK a DCM, jako emulgátor byly použity 0,2% PEG-40-STEARÁT, 0,2% LECITHIN s PS 20. Dále byl zkoumán i vliv přísady soli 1% NaCl spolu s 0,2% PEG-40-STEARÁT. Byla použita 30% BT.

Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)
42	310	0,266	325	92	4292	8
43	422	0,478	294	57	2254	43
44	7508	0,488	1983	100	0	0
45	1029	0,316	1072	93	5008	7

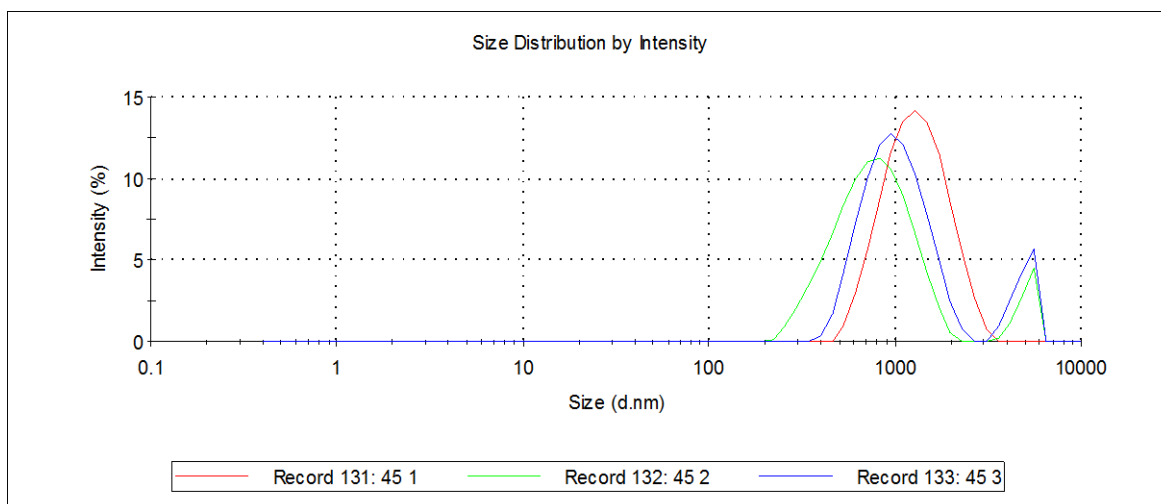
Obrázek 5-9-1: Vliv koncentrace emulze a rozpouštědla na frakci částic za použití emulgátoru 0,2% LECITHIN + PS 20. Popis vzorků je v tabulce 5-9A a 5-9B.



Obrázek 5-9-2: Vliv použitého emulgátoru na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití EMK jako rozpouštědla. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-9A a 5-9B.



Obrázek 5-9-3: Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze, rozpouštědlem byl EMK a emulgátorem 0,2% LECITHIN s PS 20. Vzorek č. 45 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka.



## 5.10. Vliv použitého emulgátoru, rozpouštědla a pH na velikost částic

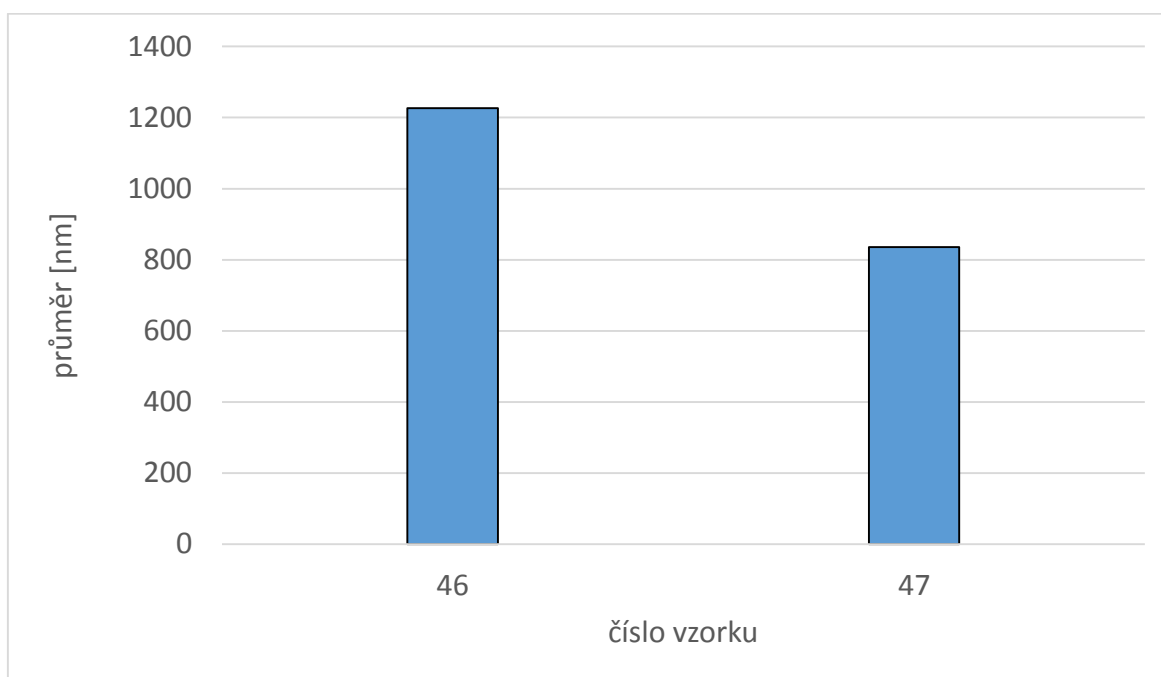
Tabulka 5-10A: Charakteristiky jednotlivých vzorků (46-51).

Vzorek č.	Rozpouštědlo	Emulgátor
46	EMK	0,2% CETRIMID HBr
47	EMK	0,2% CETRIMID HBr + amoniak
48	EMK	0,2% LECITHIN + PS 20
49	EMK	0,2% LECITHIN + PS 20 + amoniak
50	DCM	0,2% LECITHIN + PS 20
51	DCM	0,2% LECITHIN + PS 20 + amoniak

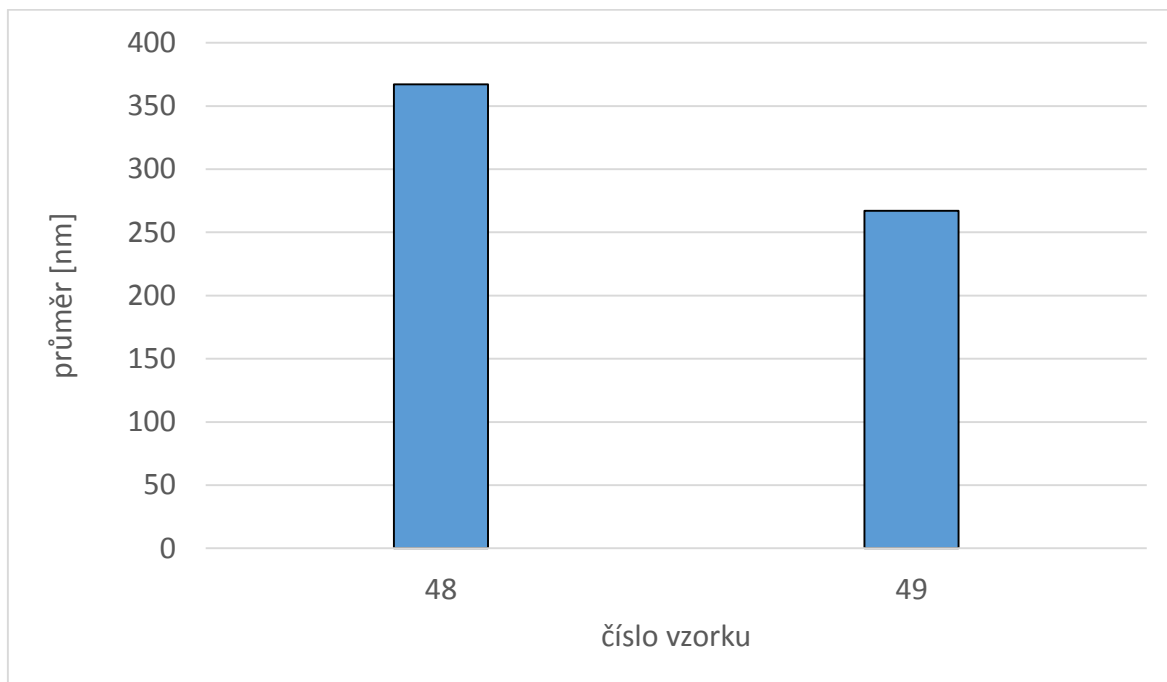
Tabulka 5-10B: Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v EMK a DCM, jako emulgátor byly použity 0,2% LECITHIN s PS 20 a 0,2% CETRIMID HBr. Dále byl zkoumán i vliv změny pH přidavkem NH<sub>3</sub>. Byla použita 30% BT.

Vzorek č.	Průměr (nm)	Polydisperzita	P1 (nm)	Plocha píku (%)	P2 (nm)	Plocha píku (%)
46	4997	0,567	1227	100	0	0
47	1797	0,573	836	100	0	0
48	447	0,654	367	77	110	23
49	6012	0,772	267	89	59	11
50	323	0,400	419	93	4556	7
51	379	0,850	276	50	4461	50

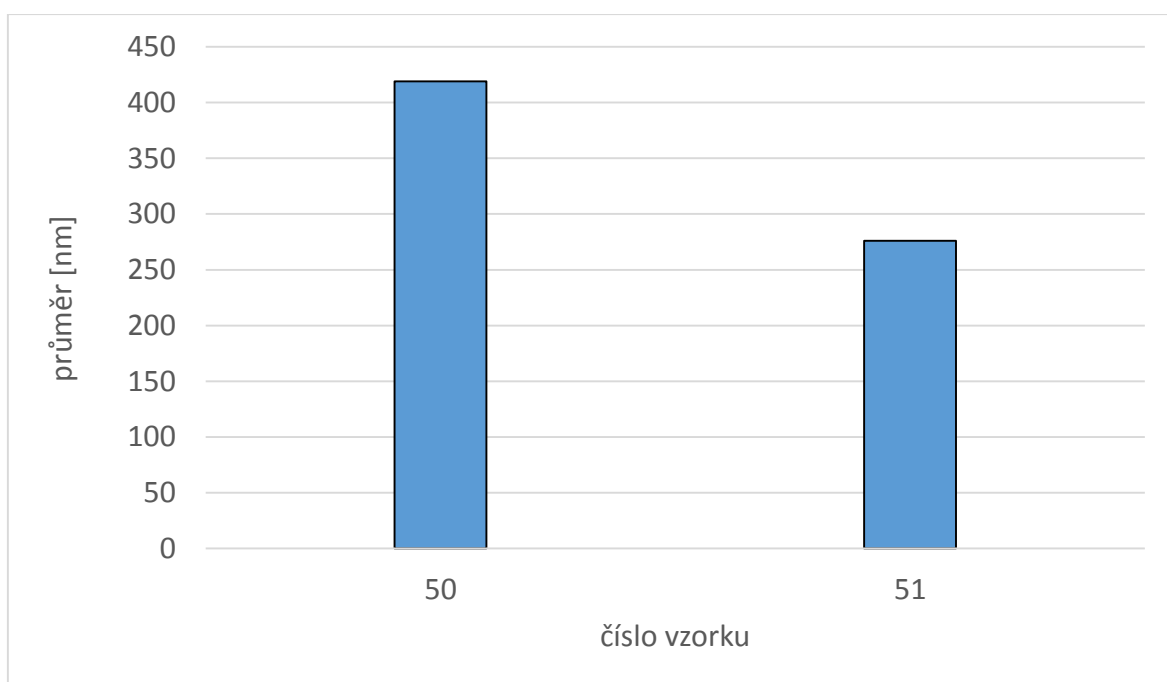
Obrázek 5-10-1: Vliv změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% CETRIMIDU HBr jako emulgátoru. Popis vzorků je v tabulce 5-10A a 5-10B.



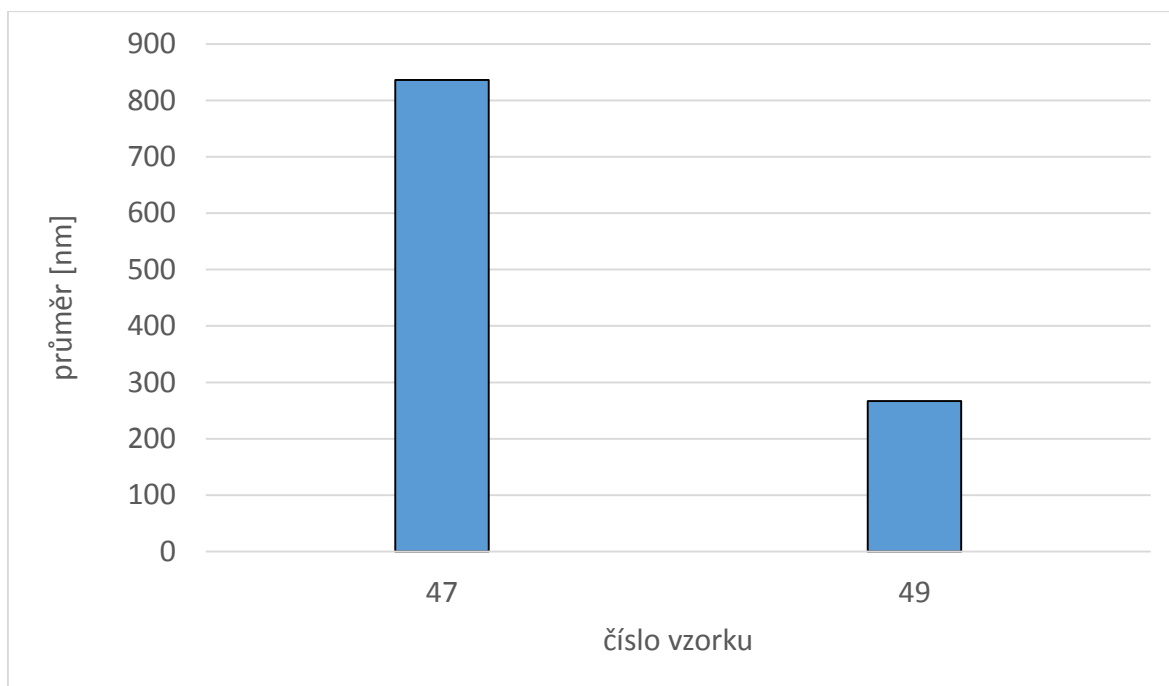
Obrázek 5-10-2: Vliv změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru. Popis vzorků je v tabulce 5-10A a 5-10B.



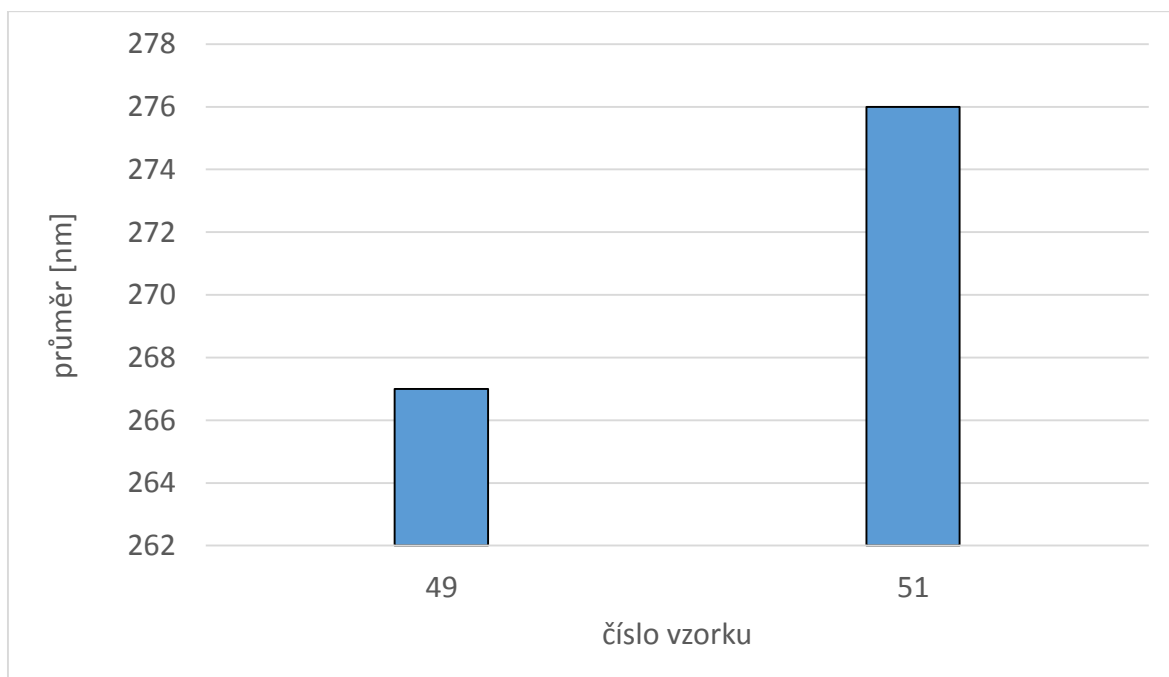
Obrázek 5-10-3: Vliv rozpouštědla DCM a změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru. Popis vzorků je v tabulce 5-10A a 5-10B.



Obrázek 5-10-4: Vliv rozpouštědla EMK a změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% CETRIMIDU HBr a 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-10A a 5-10B.



Obrázek 5-10-5: Vliv změny rozpouštědla a pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru. Popis vzorků je uveden v tabulce 5-10A a 5-10B.





## 5.11. Výsledky analýz

K provedení analýzy byly připraveny roztoky o 3% koncentraci. Jako emulgátor byl použit 0,2% CETRIMID HBr, připravená emulze byla ve všech vzorcích 20%. Rozpouštědlem byl EMK nebo DCM. Jako nosiče byly použity PLGA, A2 a T3. Byl zkoumán vliv přísady amoniaku a síranu sodného. Připravené vzorky byly podrobeny homogenizaci na homogenizátoru Diax po dobu 60s, po té byly umístěny na magnetickou míchačku na 2-3h. Po změření velikosti částic přístrojem Zetasizer mohly být vzorky umístěny do centrifugy 4500 RPM na 1h a po té sušeny ve vakuu při 23-25°C.

Tabulka 5-11: Distribuce baze terbinafinu do vnější fáze při přípravě částic emulzní metodou (emulze o/v).

Vzorek č.	Rozp.	Popis vzorku Nosič/Aditivum	BT vstup [%]	BT v částicích [%]	Výtěžek BT [%]	V supernatantu (g/l)
1	EMK	PLGA/-	10	3,3	30	0,393
2	EMK	PLGA/-	20	10,1	50	0,486
3	EMK	PLGA/-	30	19,9	65	0,511
4	EMK	A2/-	10	1,6	16	12,21
5	EMK	A2/-	20	9,4	47	2,13
6	EMK	A2/-	30	18,6	62	0,90
7	EMK	T3/-	10	3,3	33	0,12
8	EMK	T3/-	20	11,5	57	1,13
9	EMK	T3/-	30	16,1	54	4,69
10	EMK	T3/NH <sub>4</sub> OH, pH 7,7	20	3,8	sraž.	0,75
11	EMK	T3/Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%	20	10,9	55	3,22
12	EMK	T3/NH <sub>4</sub> OH, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	14,1	70	10,39
13	DCM	T3/-	0	1,9	0	0
14	DCM	T3/-	10	10,8	22	0,09
15	DCM	T3/-	20	6,1	33	0,25
16	DCM	T3/-	30	8,3	37	0,18

## 6. Diskuse

### 6.1. K tématu a zaměření práce

Téma předložené práce bylo zadáno se záměrem upřesnit některé dosavadní poznatky o vlivu některých formulačních parametrů na velikost a distribuci velikosti submikronových a větších částic z alifatických polyesterů s větvenou konstitucí molekuly. Částicové systémy byly připraveny emulzní metodou za rozdělování rozpouštědla. Byla vyzkoušena dvě rozpouštědla, jednak ve výrobní praxi nejvíce používaný dichlormethan, a také v mnoha experimentech osvědčený ethylmethylketon. Ve všech případech u všech vzorků byla využita 3% koncentrace polyesteru ekvimolárního poměru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) větveného na tripentaerythritolu s potenciálním maximálním počtem 8 větví. Součástí vnitřní fáze byl v některých případech terbinafin ve formě baze obsažený ve vnitřní fázi emulze v koncentracích 5% až 30%. Byly formulovány emulze s různou iniciální koncentrací vnější fáze v rozmezí od 5% do 20%.

Pozornost při realizaci experimentů byla zaměřena na složení vnější fáze. Hlavní složkou byla voda, jako emulgátor byl použit u většiny připravených vzorků hydrobromid cetyltrimethylamonia. Dále byly použity pegylovaný hydrofilní dimeticon, pegylovaná kyselina stearová a směs stejných dílů polysorbátu 20 s lecithinem v jednotné 0,2% koncentraci. Nově byl použit chlorid sodný a síran hořečnatý. Účelem bylo zvýšení polaritý vnější fáze. Od tohoto opatření bylo očekáváno případné snížení úniku baze terbinafinu z nově vznikajících částic do vnější fáze. Dalším opatřením v zájmu zvýšení enkapsulační účinnosti byla slabá alkalizace vnější fáze malým množstvím amoniaku na základě snížené rozpustnosti terbinafinu ve vnější fázi.

### 6.2. K vlivu iontové síly vnější fáze na velikost částic

Ve vnější vodné fázi byly rozpuštěny dvě soli, chlorid sodný a síran hořečnatý v 0,5% a v 1% koncentraci. Z tabulky 5-1 je patrné, že přísada solí vede k jejich většímu rozměru, který přesahuje teoretický rozsah měřitelnosti. Jako překvapivý fakt je možno hodnotit větší rozměr částic připravených v přítomnosti chloridu sodného než síranu hořečnatého, který by mohl teoreticky síťovat nosič solnými můstky.

Tvar autentických záznamů na obr. 5-1-4 zpochybňuje validitu výsledků u vzorků připravených v přítomnosti solí. Důvodem je velká frakce z hlediska měřitelnosti velikostně nadlimitních částic. Z výše uvedeného vyplývá, že změna iontové síly a polaritý vnější fáze za použití CETRIMIDU HBr nevede k účinné dispergaci. Dochází patrně k inaktivaci emulgátoru snížením jeho afinity k mezifázi.

### 6.3. K vlivu koncentrace emulze na velikost částic

Byla připravena řada vzorků částic z polymeru rozpuštěného v dichlormethanu. Dichlormethan má vysokou hustotu, proto nebyl ani při jeho 20% hmotnostní koncentraci problém s přípravou. V tabulce 5.2 jsou shrnuta nejdůležitější data. Je z nich patrná relativně velká polydisperzita vedoucí u dvou vzorků k vyhodnocení ve formě dvou píků. Jak je však patrné z autentických záznamů na obr. 5-2-2 až 5-2-4, tendence ke dvěma odlišným frakcím byla u obou vzorků. Jako překvapivou skutečnost je možno hodnotit markantní tendenci k unimodální distribuci se zvyšováním koncentrace emulze. Je možno konstatovat, že vliv koncentrace emulze na velikost částic nebyl prokázán, z hlediska polydisperzity se jeví jako výhodnější částice připravené z emulzí s vyšší koncentrací vnitřní fáze.

### 6.4. K vlivu koncentrace emulze na velikost částic s 5% a s 30% terbinafinem

Experimentální schéma v této části práce bylo stejné jako v kapitole 6.3. Z tabulek 5-2 a 5-3 je patrné, že přítomnost baze terbinafinu v 5% koncentraci nevede k podstatné změně granulometrických parametrů. Největší frakce nejmenších částic z hlediska intenzitní charakteristiky byla prokázána u 10% emulze. V tomto případě však byly v nezanedbatelném podílu mikročástice v blízkosti nebo v přesahu měřitelnosti. Další ze vzorků měly většinu částic větších rozměrů. Na obrázku 5-3-2 je záznam přístroje z měření 20% emulze. Jsou patrné tři velikostní frakce. Největší podíl má rozměr těsně pod 1000 nm, nezanedbatelný 15% podíl představuje nanočástice pod 100 nm a záznam končí přerušenu křivkou směřující do nadlimitní velikostní třídy.

V tabulce 5.4 jsou údaje, které se týkají částic, které obsahují ve vnitřní fázi 30% bazi terbinafinu. Byly o poznání větší, než tomu bylo u částic bez terbinafinu nebo s jeho 5% koncentrací.

Jako pozitivní skutečnost je možno hodnotit tendenci k méně polydisperzní distribuci velikosti částic s koncentrací emulze. Také v případě 20% emulze jsme prokázali distribuci v jedné velikostní třídě. Jsou v ní zastoupené částice od 120 nm do 1000 nm.

Srovnání velikosti částic popsaných v tomto oddílu z hlediska vlivu stoupající koncentrace baze terbinafinu od 5% do 30% je zpracováno v tabulce 5-5 a na příslušných obrázcích 5-5-1 až 5-5-5. Zvláště srovnáním obrázků 5-5-1 a 5-5-2 je možno konstatovat opačný vliv stoupající koncentrace baze terbinafinu na velikost částic. Nepříznivý výsledek u vzorku připraveného s nejvyšší koncentrací baze terbinafinu u emulze s nejvyšší koncentrací vnitřní fáze je ovlivněný celkovou polydisperzitou. Ve skutečnosti rozborem autentických záznamů z přístroje (např. obr. 5-5-5) je možno konstatovat velmi příznivé parametry tohoto vzorku. Z hlediska výtěžnosti výroby je velmi důležité, že při zvýšení koncentrace emulze z 5% při 5% koncentraci baze terbinafinu ve vnitřní fázi na 20% emulzi obsahující 30% bazi terbinafinu se teoreticky získají ze stejného objemu výrobní šarže částice v množství 36násobném.

## 6.5. K vlivu rozpouštědla nosiče a emulgátoru na granulometrické charakteristiky částic

Bylo připraveno 6 vzorků, jak je patrné z tabulky 5-6A které se lišily použitým emulgátorem a 0% nebo 1% koncentrací chloridu sodného. Kromě pegylovaného dimeticonu a pegylované kyseliny stearové byla použita směs stejných dílů LECITHINU s POLYSORBÁTEM 20. Emulgátory byly v 1% koncentraci. Rozpouštědlem nosiče byl dichlormethan. V tabulce 5-6B jsou základní naměřené údaje. Průměrné hodnoty byly velmi příznivé. Nejmenší částice byly připraveny pomocí pegylovaného dimeticonu. Po přidání soli došlo ke vzniku dvou velikostních tříd při téměř stejné průměrné hodnotě. K vysvětlení by bylo nutné připravit další vzorky. Částice připravené z pegylované kyseliny stearové byly větší a po přidání soli došlo k opačnému jevu, tedy snížení polydisperzity. Bylo prokázáno, že v případě použití směsi LECITHINU s POLYSORBÁTEM 20 docházelo k aglomeraci částic, jev byl velmi výrazný v přítomnosti 1% chloridu sodného ve vnější fázi.

Částice, které byly připraveny za analogických podmínek lišících se pouze použitím ethylmethylketonu, byly značně větší, jak je patrné z tabulky 5-7B. Částice ve stádiu jejich vzniku výrazně a nevratně aglomerovaly.

Nejslabší byl tento jev za použití směsi LECITHINU s POLYSORBÁTEM 20. Z výše uvedeného vyplývá, že při přípravě částic emulzní metodou má volba vhodného emulgátoru a rozpouštědla značný vliv nejen na velikost částic, ale i na proveditelnost dispergace.

## 6.6. K vlivu iontové síly a hodnoty pH při různé koncentraci emulze a druhu rozpouštědla nosiče

V tomto úseku se jedná o srovnání dvou odlišných základních podmínek přípravy, jednak o 10% emulzi za použití ethylmethylketonu jako rozpouštědla s různými emulgátory, jednak o 5% emulzi obsahující dichlormethan a CETRIMID HBr. Do vnější fáze byly použity chlorid sodný, síran hořečnatý, nebo amoniak. Výsledky granulometrických měření jsou v tabulce 5-8B. Je patrný rozdíl ve velikosti částic připravených z ethylmethylketonových roztoků a dichlormethanových roztoků. Částice připravené z dichlormethanových roztoků byly výrazně menší a s menší polydisperzitou. Alkalizace vedla ke zlepšení parametrů vzorku. Další pozoruhodnou skutečností je snížení aglomerace po alkalizaci soustavy stabilizované směsí LECITHINU a POLYSORBÁTU 20. Přidání 1% soli nevedlo ke zlepšení procesu přípravy částic.

Bylo prokázáno, že CETRIMID HBr je vhodným emulgátorem i při alkalickém pH (obr. 5-8-4) a alkalizace může vést ke zvýšení účinku LECITHINU s POLYSORBÁTEM 20. Potvrdilo se, že přidání elektrolytu do vnější fáze vede k aglomeraci vnitřní fáze emulze.

## 6.7. K vlivu koncentrace emulze, iontové síly a alkalizace při použití různých emulgátorů a rozpouštědel

V tabulkách 5-9 jsou uvedené výsledky měření čtyř vzorků. Z výsledků je možno jednoznačně dojít k závěru o dichlormethanu jako vhodnějším rozpouštědlem polymeru při použití směsi LECITHINU a POLYSORBÁTU 20 jako emulgátoru. Aglomerace částic v průběhu jejich přípravy byla menší v 5% emulzi než v 10%. Pokud byl použit ethylmethylketon a směs LECITHINU s POLYSORBÁTEM 20, došlo k výrazné aglomeraci částic, jak je patrné z obr. 5-9-3. Také pegylovaná kyselina stearová s chloridem sodným se neprojevila jako vhodný emulgátor v přítomnosti ethylmethylketonového roztoku nosiče.

Relace mezi rozpouštědlem, emulgátorem a alkalizací jsou prezentovány ve výsledkové části 5.10. V tabulkách 5-10 A a B je zřejmé, že přidání malého množství amoniaku při použití ethylmethylketonu a CETRIMIDU HBr vede k menším částicím. Totéž platí i o stejné soustavě lišící se pouze směsí LECITHINU a POLYSORBÁTU 20 jako emulgátoru. Při použití dichlormethanu a směsi emulgátorů byl prokázán opak, tedy vysoký podíl aglomerátů způsobený větší aglomerací částic (obr. 5-10-5).

## 6.8. K výtěžkům terbinafinu v částicích z různých nosičů v různých rozpouštědlech

K přípravě částic byly použity tři velmi odlišné nosiče rozpuštěné ve dvou rozpouštědlech v 3% koncentraci a obsažené v různých podílech ve vnitřní fázi. Výsledky analýz metodou HPLC realizovaných Ing. Martinem Drastíkem, Ph.D. na katedře fyzikální chemie jsou uvedeny v tabulce 5.11.

Bylo prokázáno, že se zvyšující se počáteční koncentrací terbinafinu se zvyšuje jeho výtěžek. Souvislost je výraznější u částic připravených z roztoků v ethylmethylketonu. Tento trend je možno konstatovat pouze v případě nosiče T3, který byl větvený na molekule tripentaerythritolu. Přibližně stejné výtěžky byly prokázány u lineárního oligomeru PLGA. U polymeru označeného jako A2 bylo větvení realizováno na kyselině polyakrylové. I když tento nosič obsahoval vysokou koncentraci karboxylů, neprojevovalo se u něj poutání kationických aminoskupin patrně v důsledku malé polarizace vnitřní fáze emulze. Nejmenší výtěžky terbinafinu v částicích připravených z dichlormethanových roztoků pokládáme za překvapivé. Vysvětlujeme si je jednak malým poutáním terbinafinu na nosič. Vysvětlení snížením polarizace vnější fáze neodpovídají koncentraci terbinafinu nalezené ve vnější fázi.

## 7. Závěry

- a) Se stoupající koncentrací emulze od 5% do 20% nedochází k výrazným změnám ve velikosti částic. Zároveň dochází k překvapivému snížení jejich polydisperzity.
- b) Přísada baze terbinafinu ve vzrůstající koncentraci od 5% do 30% do částic z větveného terpolymeru kyseliny mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerythritolu nemá podstatný vliv na velikost částic. Pro případný vliv na polydisperzitu není dostatečné množství informací.
- c) Zvýšením koncentrace emulze a koncentrace léčivé látky z minimálních vyzkoušených parametrů (5%) na maximální (20% u emulze, 30% u BT) se získá šestinásobné množství částic s šestinásobnou koncentrací, tedy produkt s teoreticky 36násobnou účinností.
- d) Přísada solí do vnější fáze vede u emulgátorů k jejich inaktivaci a k aglomeraci částic.
- e) Kombinovaný emulgátor z LECITHINU a POLYSORBÁTU 20 je velmi citlivý k přítomnosti elektrolytu.
- f) Alkalizace vnější fáze amoniakem zvyšuje emulgační účinnost CETRIMIDU HBr a kombinace LECITHINU s POLYSORBÁTEM 20.
- g) Dichlormethan jako rozpouštědlo nosiče je z hlediska aglomerace v přítomnosti soli ve vnější fázi vhodnější než ethylmethyleketon.
- h) Se zvyšující se koncentrací baze terbinafinu v částicích se zvyšuje enkapsulační účinnost procesu. Vhodnou koncentraci baze terbinafinu bude nutno odvodit od disolučních profilů.

## 8. Seznam použitých zkratek

PLGA	kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové
PEG	polyethylenglykol
IONPs	iron oxide nanoparticles
QDs	quantum dots
FDA	Food and Drug Administration
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
PDLA	kyselina poly D-mléčná
PLLA	kyselina poly L-mléčná
PLA	kyselina polymléčná
PGA	kyselina polyglykolová
MPES	mononukleární fagocytární systém
DCM	dichlormethan
T3	terpolymer kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu
EMK	ethylmethylketon
PS 20	polysorbát 20
BT	baze terbinafinu
P1, P2	intenzita píku
HPLC	high performance liquid chromatography
A2	kopolymer kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové větvený na 2% kyselině polyakrylové



## 9. Seznam tabulek

Tabulka 4-3-1	Složení vnější fáze .....	27
Tabulka 4-3-4	Typy emulzních soustav a požadovaná množství emulgátoru, T3 a BT dle typu emulze .....	28
Tabulka 5-1	Granulometrické charakteristiky částic připravených z 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v EMK, jako emulgátor byl použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv přísady solí .....	29
Tabulka 5-2	Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5%, 10%, 15% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze .....	32
Tabulka 5-3	Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5%, 10%, 15% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze po přidání 5% BT .....	35
Tabulka 5-4	Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5%, 10%, 15% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, jako emulgátor použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze po přidání 30% BT .....	36
Tabulka 5-5	Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5% a 20% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v DCM, Jako emulgátor byl použit 0,2% CETRIMID HBr. Vliv koncentrace emulze a vliv 5% a 30% koncentrace baze terbinafinu na velikost částic .....	39
Tabulka 5-6A	Typ použitého emulgátoru a přídavek soli u jednotlivých vzorků (24-29) .....	42



Tabulka 5-10B	Granulometrické charakteristiky částic připravených z 5% emulze, 3% roztoku nosiče T3 v EMK a DCM, jako emulgátor byly použity 0,2% LECITHIN s PS 20 a 0,2% CETRIMID HBr. Dále byl zkoumán i vliv změny pH přidavkem NH <sub>3</sub> . Byla použita 30% BT ..... 53
Tabulka 5-11	Distribuce baze terbinafinu do vnější fáze při přípravě částic emulzní metodou (emulze o/v) ..... 56

## 10. Seznam obrázků

Obrázek 3-1-1	Polymerní nanočástice .....	10
Obrázek 3-3-1	Polymerní nanomicela .....	13
Obrázek 3-3-2	Polymerní liposom a polymerní micela – srovnání .....	14
Obrázek 3-3-3	Rozdělení dendritických polymerů .....	15
Obrázek 3-3-4	Využití magnetických nanočástic při magnetické rezonanci a terapii nádorů .....	16
Obrázek 3-5-1	Hydrolyza PLGA .....	18
Obrázek 3-5-2	Enantiomerní formy kyseliny mléčné .....	19
Obrázek 5-1-1	Vliv přísady solí na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci. Popis vzorků je v tabulce 5-1 .....	30
Obrázek 5-1-2	Vliv přísady solí na frakci nejmenších částic v nejvyšší intenzitní koncentraci. Popis vzorků je v tabulce 5-1 .....	30
Obrázek 5-1-3	Autentický záznam přístroje. Vzorek č. 1. - intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	31
Obrázek 5-1-4	Autentický záznam přístroje. Vzorek č. 7 – intenzitní průměr nanočástic po přidavku 1% MgSO <sub>4</sub> . Frekvenční křivka .....	31
Obrázek 5-2-1	Vliv koncentrace emulze na frakci částic .....	32
Obrázek 5-2-2	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 5% emulze. Vzorek č. 8 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	33
Obrázek 5-2-3	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 10% emulze. Vzorek č. 9 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	33
Obrázek 5-2-4	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 15% emulze. Vzorek č. 10 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	34

Obrázek 5-2-5	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze. Vzorek č. 11 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	34
Obrázek 5-3-1	Vliv koncentrace emulze na frakci částic po přidání 5% BT. Popis vzorků je v tabulce 5-3 .....	35
Obrázek 5-3-2	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze. Vzorek č. 15 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	36
Obrázek 5-4-1	Vliv koncentrace emulze na frakci částic po přidání 30% BT .....	37
Obrázek 5-4-2	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 5% emulze. Vzorek č. 16 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	37
Obrázek 5-4-3	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 10% emulze. Vzorek č. 17 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	38
Obrázek 5-4-4	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 15% emulze. Vzorek č. 18 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	38
Obrázek 5-4-5	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic s 30% bazí terbinafinu připravených z 20% emulze. Vzorek č. 19 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	39
Obrázek 5-5-1	Vliv 5% a 20% emulze na frakci částic po přidání 5% BT .....	40

Obrázek 5-5-2	Vliv 5% a 20% emulze na frakci částic po přidání 30% BT .....	40
Obrázek 5-5-3	Vliv 5% emulze na frakci částic po přidání 5% a 30% BT .....	41
Obrázek 5-5-4	Vliv 20% emulze na frakci částic po přidání 5% a 30% BT .....	41
Obrázek 5-5-5	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 5% emulze a 30% BT. Vzorek č. 21 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	42
Obrázek 5-6-1	Vliv použitých emulgátorů na frakci částic za použití 20% emulze a 30% BT .....	43
Obrázek 5-6-2	Vliv použitých emulgátorů s přídatkem 1% NaCl na frakci částic za použití 20% emulze a 30% BT .....	44
Obrázek 5-6-3	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze a 30% BT za použití emulgátoru 1% LECITHINU + PS 20. Vzorek č. 26 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	44
Obrázek 5-6-4	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze a 30% BT za použití emulgátoru 1% PEG-12-DIMETICONU. Vzorek č. 27 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka .....	45
Obrázek 5-7-1	Vliv použitých emulgátorů na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 20% emulze a 30% BT .....	46
Obrázek 5-7-2	Vliv použitých emulgátorů s přídatkem 1% NaCl na frakci částic za použití 20% emulze a 30% BT .....	47

Obrázek 5-8-1	Vliv přídavku různé soli na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 1% PEG-40-STEARÁTU jako emulgátoru. V obou případech se jedná o 10% emulzi a rozpouštědlem byl EMK ..... 48
Obrázek 5-8-2	Vliv přídavku amoniaku na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% CETRIMIDU HBr jako emulgátoru. V obou případech se jedná o 5% emulzi a rozpouštědlem byl DCM ..... 49
Obrázek 5-8-3	Vliv přídavku amoniaku u různých emulgátorů – 0,5% LECITHIN+PS 20, 0,2% CETRIMID na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci. Odlišná koncentrace emulze i rozpouštědlo ..... 49
Obrázek 5-8-4	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 5% emulze a 30% BT, rozpouštědlem byl DCM a emulgátorem 0,2% CETRIMID HBr s přídavkem amoniaku. Vzorek č. 41 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka ..... 50
Obrázek 5-9-1	Vliv koncentrace emulze a rozpouštědla na frakci částic za použití emulgátoru 0,2% LECITHIN + PS 20 ..... 51
Obrázek 5-9-2	Vliv použitého emulgátoru na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití EMK jako rozpouštědla ..... 51
Obrázek 5-9-3	Autentický záznam přístroje. Granulometrické parametry částic připravených z 20% emulze, rozpouštědlem byl EMK a emulgátorem 0,2% LECITHIN s PS 20. Vzorek č. 45 – intenzitní průměr nanočástic. Frekvenční křivka ..... 52
Obrázek 5-10-1	Vliv změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% CETRIMID HBr jako emulgátoru ..... 53

Obrázek 5-10-2	Vliv změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru .....	54
Obrázek 5-10-3	Vliv rozpouštědla DCM a změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru .....	54
Obrázek 5-10-4	Vliv rozpouštědla EMK a změny pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% CETRIMID HBr a 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru .....	55
Obrázek 5-10-5	Vliv změny rozpouštědla a pH na frakci částic v nejvyšší intenzitní koncentraci za použití 0,2% LECITHINU + PS 20 jako emulgátoru .....	55



## 11. Seznam použité literatury

- [1] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC: Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; **75**: 1-18.
- [2] Diab R, Jaafar-Malej C, Fessi H, Maincent P: Engineered nanoparticulate drug delivery systems: the next frontier for oral administration? *AAPS J* 2012; **14**: 688-702.
- [3] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC: Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001; **53**.
- [4] Li SD, Huang L: Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm* 2008; **5**: 496-504.
- [5] Allen TM, Cullis PR: Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science* 2004; **303**: 1818-1822.
- [6] Cao Y, Wang B, Lou D, Wang Y, Hao S, Zhang L: Nanoscale delivery systems for multiple drug combinations in cancer. *Future Oncol* 2011; **7**.
- [7] Maeda H: Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the epr effect: background and future prospects. *Bioconjung Chem* 2010; **21**: 797-802.
- [8] Elsabahy M, Wooley KL: Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications, *Chem Soc Rev* 2012; **41**: 2545-2561.
- [9] Wang Q, Wang LM, Detamore MS, Berkland C: Biodegradable colloidal gels as moldable tissue engineering scaffolds. *Adv Mater* 2008; **20**: 236-+.
- [10] Torchilin VP: Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* 2007; **24**: 1-16.
- [11] Lian T, Ho RJY: Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J Pharm Sci* 2001; **90**: 667-680.
- [12] Al-Jamal WT, Kostarelos K: Liposomes: from a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine. *Acc Chem Res* 2011; **44**: 1094-1104.

- [13] Chacko RT, Ventura J, Zhuang JM, Thayumanavan S: Polymer nanogels: a versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; **64**: 836-851.
- [14] Khandare J, Calderon M, Dagia NM, Haag R: Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. *Chem Soc Rev* 2012; **41**: 2824-2848.
- [15] Qi L, Gao X: Emerging application of quantum dots for drug delivery and therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2008; **5**: 263-267.
- [16] Hao R, Xing R, Xu Z, Hou Y, Gao S, Sun S: Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Adv Mater* 2010; **22**: 2729-2742.
- [17] Mai WX, Meng H: Mesoporous silica nanoparticles: a multifunctional nano therapeutic system. *Integr Biol* 2013; **5**: 19-28.
- [18] Kim D, Jon S: Gold nanoparticles in image-guided cancer therapy. *Inorg Chim Acta* 2012; **393**: 154-164.
- [19] Zrazhevskiy P, Sena M, Gao X: Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. *Chem Soc Rev* 2010; **39**: 4326-4354.
- [20] Nair LS, Laurencin CT: Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007; **32**: 762-798.
- [21] Mohamed F, van der Walle CF: Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *J Pharm Sci* 2008; **97**: 71-87. [PubMed: 17722085]
- [22] Houchin ML, Topp EM: Physical properties of PLGA films during polymer degradation. *J Appl Polym Sci* 2009; **114**: 2848-2854.
- [23] Panagi Z, Beletsi A, Evangelatos G, Livaniou E, Ithakissios DS, Avgoustakis K: Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* 2001; **221**: 143-152. [PubMed: 11397575]

- [24] Pai SS, Tilton RD, Przybycien TM: Poly(ethylene glycol)-modified proteins: Implications for poly(lactide-co-glycolide)-based microsphere delivery. *AAPS J* 2009; **11**: 88-98. [PubMed: 19199044]
- [25] Houchin ML, Topp EM: Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: A review of reactions and mechanisms. *J Pharm Sci* 2008; **97**: 2395-2404. [PubMed: 17828756]
- [26] Arshady R: Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polylactides and related polyesters. *J Control Release* 1991; **17**: 1-21.
- [27] Rosca ID, Watari F, Uo M: Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release* 2004; **99**: 271-280. [PubMed: 15380636]
- [28] Thomasin C, Nam-Trân H, Merkle HP, Gander B: Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 1. Overview and theoretical considerations. *J Pharm Sci* 1998; **87**: 259-268. [PubMed: 9523976]
- [29] Hans ML, Lowman AM: Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2002; **6**: 319-327.
- [30] Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y: Preparation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int J Pharm* 1999; **187**: 143-152. [PubMed: 10502620]
- [31] Wagenaar B, Muller B: Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. *Biomaterials* 1994; **15**: 49-54. [PubMed: 8161657]
- [32] Lu L, Garcia CA, Mikos AG: *In vitro* degradation of thin poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) films. *J Biomed Mater Res* 1999; **46**: 236-244. [PubMed: 10380002]
- [33] Park TG: Degradation of poly (D,L-lactic acid) microspheres: Effect of molecular weight. *J Control Release* 1994; **30**: 161-173.
- [34] Frank A, Rath SK, Venkatraman SS: Controlled release from bioerodible polymers: Effect of drug type and polymer composition. *J Control Release* 2005; **102**: 333-344. [PubMed: 15653155]

- [35] Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M: Hydrolytic degradation of devices based on poly (D,L-lactid acid) size-dependence. *Biomaterials* 1995; **16**: 305-311. [PubMed: 7772670]
- [36] Zolnik BS, Burgess DJ: Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J Control Release* 2007; **122**: 338-344. [PubMed: 17644208]