

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

**Katedra farmaceutické technologie**

**Formulace biodegradabilních nanočástic s  
terbinafinem**

**Rigorózní práce**

**Hradec Králové, 2006**

**Věra Čermáková**

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

## Obsah

1	Teoretická část.....	4
1.1	Nanočástice.....	4
1.1.1	Důvody vektorizace léčiv .....	4
1.1.2	Polymery používané v přípravě nanočástic .....	5
1.1.3	Metody přípravy nanočástic .....	6
1.2	Terbinafin hydrochloridum .....	6
1.2.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	6
1.2.2	Mechanismus účinku .....	7
1.2.3	Charakterizace .....	7
1.2.4	Farmakokinetika .....	8
1.2.5	Nežádoucí účinky .....	8
1.3	Principy měření velikosti částic.....	8
1.3.1	Dynamický světelný rozptyl.....	8
1.3.2	Korelační funkce.....	10
1.3.3	Početní, objemová a intenzitní distribuce.....	11
1.3.4	Měření velikosti částic.....	11
1.3.5	Pohyblivé čočky .....	12
1.4	Měření a principy zeta potenciálu .....	12
1.4.1	Teorie zeta potenciálu.....	13
1.4.2	Elektroforéza .....	15
1.4.3	Měření elektroforetické pohyblivosti .....	15
1.4.4	Elektroosmotický efekt.....	16
1.4.5	Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření.....	16
1.4.6	Univerzální ponořovací kyveta.....	17
1.5	Sprejové sušení .....	17
1.5.1	Princip sprejového sušení .....	17
1.5.2	Výhody sprejového sušení.....	18
1.5.3	Nevýhody sprejového sušení .....	19
1.6	Mikroskopie.....	19
1.6.1	Obrazové zpracování .....	19
1.6.2	Samotná analýza.....	20
2	Experimentální část .....	22
2.1	Použité přístroje.....	22
2.2	Chemikálie.....	22
2.3	Pomůcky .....	23
2.4	Metody.....	24
2.4.1	Příprava nanočástic extrakcí a odpařením rozpouštědla .....	24
2.4.2	Koncentrování vzorků pomocí dialyzační trubice zasypané polyakryl-polyalkoholem .....	25
2.4.3	Využití hydrolyzátu želatiny v přípravě nanočástic .....	25
2.4.4	Sprejové sušení s mannitolem .....	25
2.4.5	Mikroskopie.....	26
3	Výsledky.....	27
3.1	Grafy velikosti nanočástic .....	27

3.1.1	Velikost nanočástic, čas 0 hod.....	27
3.1.2	Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po koncentrování s PAPA.....	28
3.1.3	Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, s využitím hydrolyzátu želatiny.....	29
3.1.4	Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po vysušení s mannitem a opětovném rozpuštění.....	30
3.1.5	Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, odebrání v časových intervalech....	32
3.1.6	Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po koncentrování s PAPA (po 6hod na noc přerušeno), v časových intervalech.....	36
3.1.7	Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po koncentrování s PAPA, odebrání v časových intervalech.....	39
3.2	Sušení z vodného roztoku mannitolu .....	43
3.2.1	Koncentrace mannitolu 2,5% .....	43
3.2.2	Koncentrace mannitolu 5% .....	44
3.2.3	Koncentrace mannitolu 7,5% .....	45
3.2.4	Koncentrace mannitolu 10% .....	46
3.2.5	Koncentrace mannitolu 12,5% .....	47
3.2.6	Koncentrace mannitolu 15% .....	48
3.3	Mikroskopická analýza obrazu počítačového programu analySIS® FIVE.....	49
3.3.1	Koncentrace mannitolu 2,5% .....	49
3.3.2	Koncentrace mannitolu 5% .....	50
3.3.3	Koncentrace mannitolu 7,5% .....	51
3.3.4	Koncentrace mannitolu 10% .....	52
3.3.5	Koncentrace mannitolu 12,5% .....	53
3.3.6	Koncentrace mannitolu 15% .....	54
4	CÍL PRÁCE .....	55
5	DISKUSE .....	56
5.1	K metodice práce .....	56
5.2	K vlivu přítomnosti terbinafinu, zahušťování a doby uchovávání koncentráту na velikost nanočástic.....	57
5.3	K vlivu přítomnosti hydrolyzátu želatiny na velikost nanočástic.....	58
5.4	K vlivu koncentrace mannitolu při sušení na velikost redispergovaných nanočástic	58
5.5	Ke stabilitě disperze nanočástic po jejich přípravě .....	59
5.6	Ke stabilitě disperze zahuštěných nanočástic .....	59
5.7	K velikosti sprejově sušených mannitolových mikročástic.....	60
6	ZÁVĚRY .....	61

# 1 Teoretická část

## 1.1 Nanočástice

Nanočástice jsou strukturované částicové systémy, které jsou tvořeny směsí léčiva a pomocné látky. 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.{1}

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.{2}

### 1.1.1 Důvody vektorizace léčiv

Vektorizace se používá pro kontrolu distribuce, pro redukci toxicity a vedlejších účinků, pro cílenou distribuci aktivních látek (targeting), pro získání nové farmakokinetiky a fyzikálně-chemických vlastností vektorů, pro zvýšení penetrace do buněk a snížení podávaných dávek.{3} Dále se vektorizace používá pro kontrolu uvolňování léčiv z lékových forem, pro výrobu léků s postupným uvolňováním, pro ochranu nestálých léčiv proti inaktivaci, pro maskování nepříjemné chuti a vůně. Někdy se využívá adjuvantního efektu vektorů při aktivní imunizaci.{4}

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.erytrocyty, bakterie, viry a priony.{5}

*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. {6}

Mezi hlavní důvody vektorizace patří specifická a lepší penetrace buněčnou stěnou. {7}

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. {8} Tato cesta umožňuje používání nízkých dávek, které jsou v běžné léčbě neúčinné. Monocyto-makrofágový systém je hlavním orgánem, který využívá targeting. {9} Zde se primárně hromadí mikroorganismy a cizorodý materiál z krve. Hlavní funkcí monocytů a makrofágů je pohlcování cizorodého materiálu. Vektory patří právě mezi tyto cizí částice. Existuje mnoho způsobů vektorizace. Vektor chrání nestálá léčiva, umožňuje postupné uvolňování a aktivuje imunitní systém. {10}

### **1.1.2 Polymery používané v přípravě 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 přírodní polymery vyvolávají alergické reakce. {11}

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. {12} 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. {13}

### 1.1.3 Metody přípravy nanočástic

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 :

Polykondenzace

Sítování

Extrakce a odpařování rozpouštědla

Koacervace

Extruze

Rozprašování

Mletí a mikronizace

Emulsní a suspenzní polymerizace

Molekulární inkluze{ 14 }

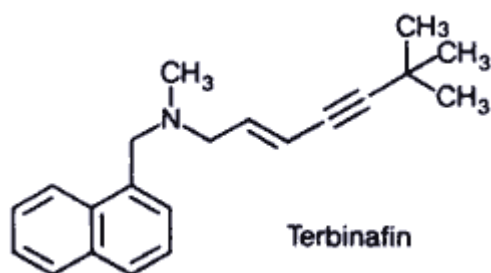
## 1.2 Terbinafin hydrochloridum

### 1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Terbinafin hydrochloridum je syntetické allylaminové antimykotikum. (E)-N-(6,6-dimethyl-2-hepten-4-ynyl)-N-methyl-1-naph-methylamin hydrochloridum, viz. obr.1.

$C_{21}H_{26}ClN$  Mr=327,9, je to bílý jemný prášek, krystalický snadno rozpustný v etanolu a rozpustný ve vodě v koncentraci 1%.

Obr.1: Terbinafin



### 1.2.2 Mechanismus účinku

Terbinafin je allylaminové antimykotikum, analog naftifinu. Blokuje biosyntézu ergosterolu inhibicí aktivity enzymu skvalen-epoxidázy. Na rozdíl od azolových antimykotik neinhibuje procesy závislé na cytochromu P450, a nesnižuje tedy koncentrace steroidních hormonů. Primárně fungicidní účinek je způsoben inhibicí enzymatické aktivity a intracelulární akumulací skvalenů, vlastní nedostatek ergosterolu pro stavbu buněčné stěny se na antimykotickém účinku podílí fungistaticky. Z jiných účinků, až o 40% snižuje mitogenní odpověď fibroblastů, hladké svaloviny cév na stimulační účinek plazmatického růstového faktoru(PDGF), a tím neointimální proliferaci.

### 1.2.3 Charakterizace

Antimikrobní spektrum zahrnuje dermatofyty (*Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, *Epidermophyton floccosum*), kvasinky (*Candida spp.*, *Pityrosporum spp.*, *Scopulariopsis brevicaulis*), plísň (*Aspergillus spp.*), dimorfní houby (*Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*) a Dematiaceae (*Hendersonula toruloidea*) a parazity (epimastigoty i amastigoty *Trypanosoma cruzi*). Podobně jako azolové deriváty je účinnější na vláknité formy hub, které jsou vůči inhibici syntézy buněčné membrány citlivější než kvasinky.



#### **1.2.4 Farmakokinetika**

Farmakokinetika terbinafinu je lineární: terbinafin se po perorálním podání dobře vstřebává, potrava resorpci zásadně neovlivní, maximální koncentrace v plazmě se dosáhne za 2 hodiny. Vazba na plazmatické bílkoviny je až 99%. Terbinafin je vysoce lipofilní a keratofilní a postupně se koncentruje v tukové tkáni, v kůži (ve stratum corneum již 2. den po podání dosahuje 10krát vyšších koncentrací než v plazmě) a jejich adnexech (vlasovém folikulu, vlasu), v nehtech a sěbu, nikoliv v potu. Podléhá extenzivní oxidativní biotransformaci v játrech, metabolity jsou vylučovány převážně močí, méně stolicí. Při významné poruše funkcí jater nebo ledvin může proto dojít k akumulaci terbinafinu.

#### **1.2.5 Nežádoucí účinky**

Asi u 3% pacientů se uvádějí nezávažné dyspeptické obtíže (nevolnost, nechutenství, mírná bolest břicha, průjem), u 1% alergický kožní exantém. Po 4-8 týdnech léčby se může objevit ztráta chuti, nejprve na slané, později na sladké vjemy. Na podkladě interakce vykazuje terbinafin synergický účinek s ketokonazolem (až 30-násobné zvýšení) při infekcích způsobených *Trypanosoma cruzi*, potencuje účinek triazolových antimykotik. Klinicky nevýznamně mění účinnost léků podléhajících jaterní biotransformaci cytochromem P450 (cyklosporin, tolbutamid, cimetidin, rifampicin). {15}

### **1.3 Principy měření velikosti částic**

#### **1.3.1 Dynamický světelný rozptyl**

Zetasizer ZS (Malvern Instruments, UK) provádí měření velikosti částic a jejich zeta potenciálu pomocí procesu, který se nazývá dynamický rozptyl světla (DLS-dynamic light scattering). DLS proměřuje Brownův pohyb, jehož rychlost souvisí s velikostí částic. Částice procházející laserovým paprskem, rozptyluje záření všemi směry. Detektor umístěný v našem případě na 173° 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

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 v pohybu se skvrna jeví také jako pohybující se. Zetasizer nano systém měří poměr intensity kolísání a počítá velikost částic.

Stokes-Einsteinův zákon:

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

$\eta$  ... viskozita

$T$  ... teplota

$D$  ... difúzní koeficient

$r$  ... poloměr

$k$  ... boltzmanova konstanta

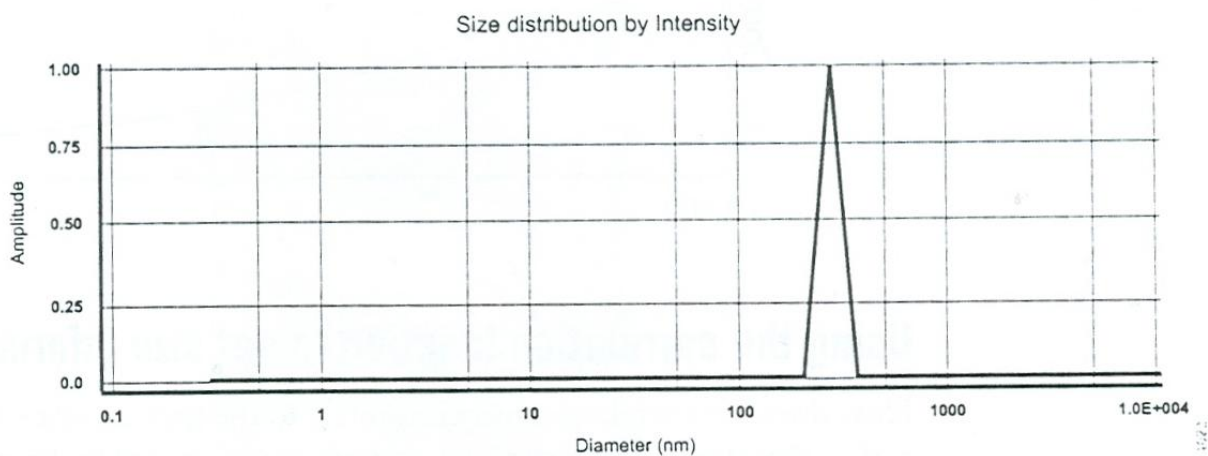
Víme, že zetasizer měří intenzitu kolísání laserového paprsku a používá ji k měření velikosti průměru částic uvnitř vzorku. Uvnitř přístroje je součást nazývaná *digitální korelátor*. Korelátor je program porovnávající kolísání intenzity světelného signálu v časovém období.

### 1.3.2 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 záření porovnávací skvrny bude také kolísat rychle.

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.3. Osa X ukazuje distribuci třídy velikostí, zatímco osa Y ukazuje relativní intenzitu rozptýleného světla.

Obr.3: Graf distribuce velikostí částic

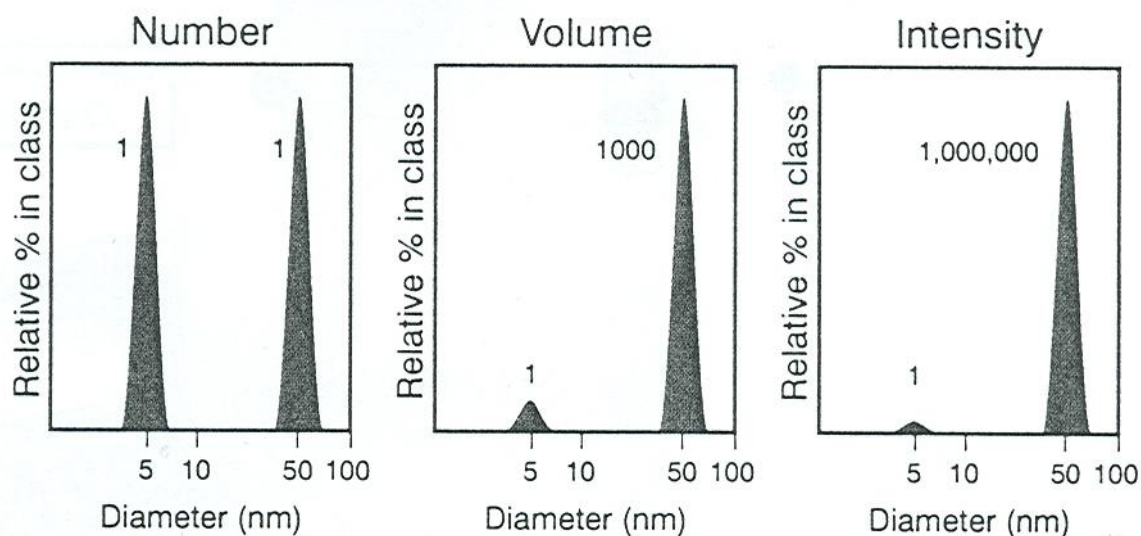


Ačkoliv základní distribuční velikost vytvořená DLS je distribuce intenzity, může být převedena na objemovou distribuci. Tato objemová distribuce může být také dále převedena na číselnou distribuci. Číselná distribuce v sobě násobí chyby z distribuce intenzity.

### 1.3.3 Početní, objemová a intenzitní distribuce

Velice jednoduché je popsání rozdílů mezi intenzitní, objemovou a početní distribucí, musíme si představit vzorek obsahující pouze 2 velikosti částic (např. 5nm a 50nm), se stejným poměrným zastoupením obou velikostí, viz. obr.4. První graf ukazuje výsledky jako početní distribuci. Oba píky jsou stejné velikosti (1:1). 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 třetí mocnina poloměru. 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.4: Graf početní, objemové a intenzitní distribuce



### 1.3.4 Měření velikosti částic

Typický DLS systém zahrnuje šest hlavních komponent. Laser, je používán jako světelný zdroj k ozařování vzorku částic uvnitř kyvety. Většina světelného paprsku prochází rovně vzorkem, část záření je rozptylována částicemi uvnitř vzorku. Další je detektor, používaný

k měření intenzity rozptýleného světla. Částice rozptylují světlo ve všech směrech, je možné teoreticky umístit detektor do téměř jakékoliv polohy, v které bude detekovat rozptýlené záření. Jestliže je detekováno příliš mnoho světla, detektor se přetíží. Proti přetížení je zde tzv. zeslabovač, používaný 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, který srovnává rozptylovanou intenzitu v následujících časových intervalech k odvozování poměru kolísající intenzity. Tyto korelační informace dále prochází přes počítač, kde se data analyzují a odvozuje se velikost.

### **1.3.5 Pohyblivé čočky**

Uvnitř přístroje zetasizeru ZS( Malvern Instruments,UK) jsou pohyblivé čočky, dovolující měnit ohniskovou pozici v kyvetě. Toto zvětšuje rozsah koncentrací možných pro měření. 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 rušit 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 rušit. Žádné záření nebude redukovat signál rozptylu. { 16 }

## **1.4 Měření a principy zeta potenciálu**

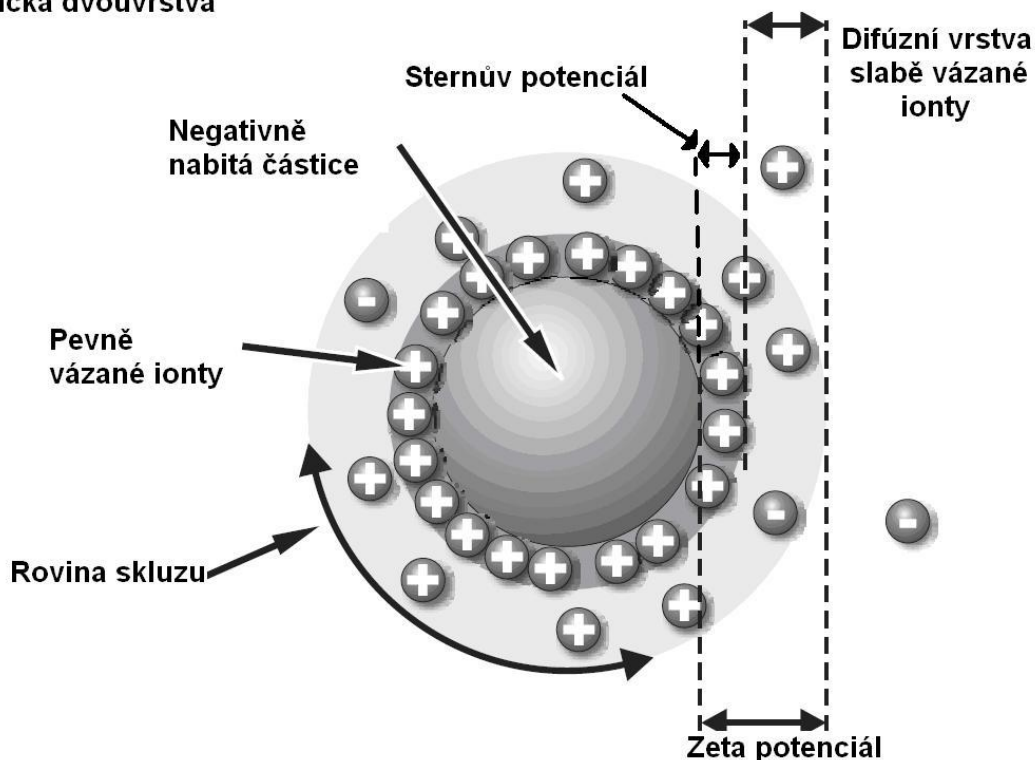
Pro pochopení měření zeta potenciálu je v první řadě nutné pochopit teorii *zeta-potenciálovou* a dále fyzikální děje probíhající v průběhu měření.

### 1.4.1 Teorie zeta potenciálu

Zetasizer měří zeta potenciál pomocí elektroforetické pohyblivosti a poté k výpočtu používá aplikace Henryho rovnice. Okolo částic existuje tzv. *elektrická dvojevrstva*. 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.5. 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.5: Zeta potenciál

#### Elektrická dvojevrstva

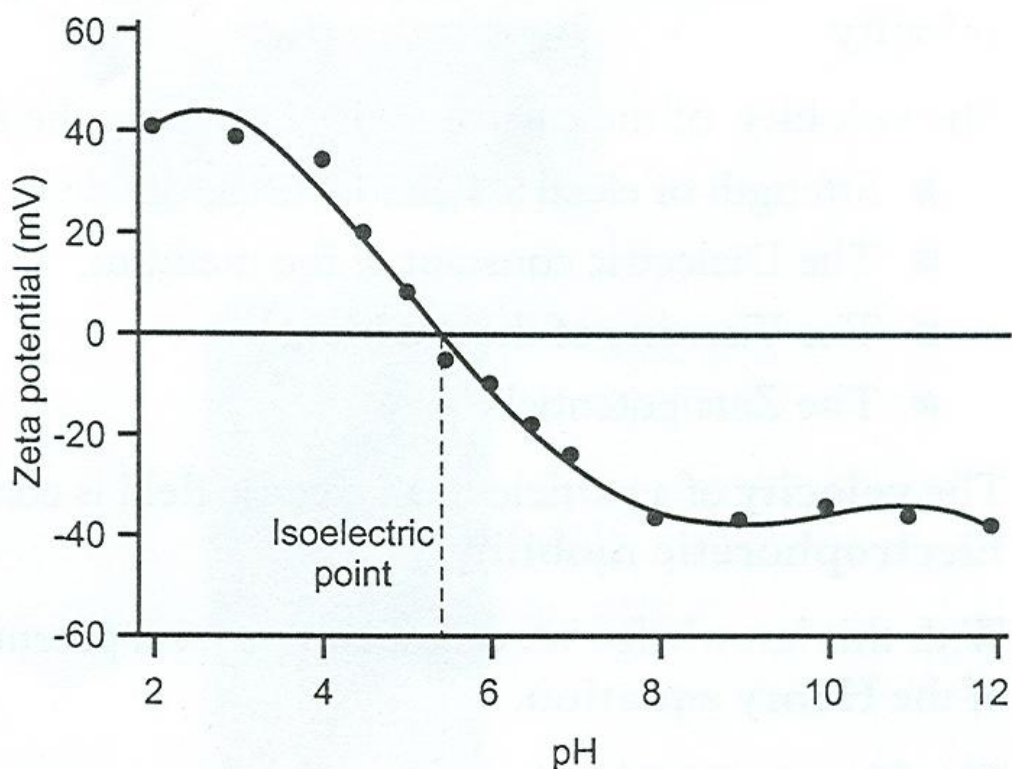


Zeta potenciál je důležitý pro pochopení potenciálové stability a v teorii koloidních systémů. Koloidní a také makrodisperzní systém je definován jako soustava složená nejméně ze dvou fází, látky dispergované a disperzního media. Rozměr koloidních částic se pohybuje v rozmezí 1nm až 1 $\mu$ m. V těchto 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 dělicí 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.6. V tomto bodě je koloidní systém nejméně stabilní.

Obr.6: Isoelektrický bod



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

### 1.4.2 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 dosažená 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

### 1.4.3 Měření elektroforetické pohyblivosti

Základ klasické mikroelektroforézy je kyveta s elektrodami. 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.



#### 1.4.4 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.

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

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.

#### 1.4.5 Zetasizer, nano a zeta-potenciálové měření

Je zde používáno šest základních komponent, hlavní je laser, který je 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. Při vložení měřicí kyvety do přístroje je umožněno systémem rozpoznat typ zeta potenciálu a vytvořit software k použití správné měřicí sekvence. Další součástí je detektor, který posílá informace do digitálního signálního procesoru. Tyto informace poté prochází počítačem, kde je Zetasizer nano software produkující frekvenční spektrum. Poté jsou zeta potenciálové informace sčítány. Jestliže je přístrojem detekováno více světla než je možné, nastává přetížení. Toto překonává tzv. zeslabovač, 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 rozptýleného 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.

#### **1.4.6 Univerzální ponořovací kyveta**

Ponořovací kyvetu vkládáme do držáku na kyvetu, přístroj má možnost rozpoznat druh použité kyvety. {17}

### **1.5 Sprejové sušení**

Sprejové sušení patří mezi mechanické metody mikroenkapsulace, je vhodné pro kontinuální produkci suchých pevných látek ve formě prášku, granulátu nebo aglomerátu z tekutých roztoků, emulzí, případně i suspenzí. Produktem sprejového sušení je prášek malých mikrokapsul o rozměrech 1 – 150 mikrometrů. Tento prášek může být dále využit k přípravě suspenzí nebo pelet nebo k lisování tablet. Výsledný produkt vyhovuje přísným požadavkům na kvalitu, jako je distribuce velikosti částic, zbytkový obsah vlhkosti, objemová hustota a tvar částic. {18}

#### **1.5.1 Princip sprejového sušení**

Sprejová sušárna se skládá z napájecí pumpy, atomizéru, ohřívače vzduchu, vzduchové trysky, sušící komory a zařízení pro vyfukování a čištění vzduchu. Atomizér utváří sprej s požadovanou distribucí velikostí částic.

V průmyslu se používají 3 typy atomizérů:

- a) rotační atomizér – rozprašování energií centrifugy
- b) tlaková tryska – rozprašování tlakovou energií
- c) dvou Proudová tryska – rozprašování kinetickou energií {19}

Sprejové sušení se skládá ze tří kroků:

- a) příprava emulze nebo jiné disperze či roztoku
- b) homogenizace disperze či roztoku
- c) rozprášení v sušící komoře {20}

Rychlost vypařování a teplota produktu v sušárně jsou ovlivněny prvním kontaktem mezi kapkami roztoku/disperze a sušícím vzduchem.

Existují tři typy sušení:

- a) sušení v souproudu, kdy se sušící vzduch a částice pohybují sušící komorou stejným směrem
- b) sušení v protiproudu, sušící vzduch a částice se pohybují v sušící komoře proti sobě
- c) smíšený tok, pohyb částic sušící komorou zahrnuje souproude i protiproude fáze {21}

Jednoduchý operační systém s jednoduchým ovládním umožňuje rychlé přizpůsobení podmínek (např. nastavení teploty) přesně podle požadavků na produkt. Sprejové sušárny bývají navrženy tak, aby produkt dosáhl požadovaných vlastností: velikosti částic, objemové hustoty, obsahu vlhkosti nebo rozpustnosti. Produkce mikrokapsul probíhá v jednom kroku a může probíhat kontinuálně. Jednoduchost metody umožňuje vyhnout se organickým rozpouštědlům. {22}

### **1.5.2 Výhody sprejového sušení**

Hlavní výhodou sprejového sušení je to, že se může používat i pro termolabilní látky, protože látka jádra bývá zahřátá na poměrně nízkou teplotu. Čistota produktu zůstává velmi vysoká, protože částice látek jádra nepřicházejí do kontaktu se stěnami sušárny dříve, než jsou vysušeny, což minimalizuje problém lepení a koroze. {23}

### 1.5.3 Nevýhody sprejového sušení

Nevýhodou sprejového sušení je to, že látka jádra může být i na povrchu mikrokapsuly, což může způsobit její oxidaci a případné chuťové změny. Dalším problémem jsou skladovací podmínky produktů, které mohou mít vliv na aktivitu vody a tím i na stabilitu mikrokapsuly a udržení prchavých příměsí uvnitř. Mohou se vyskytnout i poruchy soudržnosti, zvláště při špatných podmínkách sušení. Při snižování teploty se mikrokapsuly mohou nafukovat a na povrchu mohou vzniknout praskliny. Tyto všechny změny vedou ke snížení kvality výsledného produktu. {23}

## 1.6 Mikroskopie

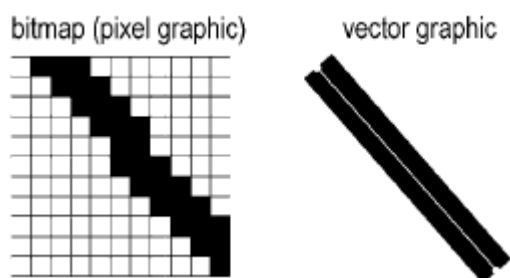
Tato metoda umožňuje přímé měření požadovaných částic. Protože se zkoumá relativně málo částic, narůstá nebezpečí nereprezentativnosti vzorku. Pokud se měří distribuce hmotnosti, výsledky mohou být přehnané. Vynechání jedné 10  $\mu\text{m}$  částice má u měření objemu stejný efekt jako vynechání tisíce 1  $\mu\text{m}$  částic ( $10^3 = 1000$ ). Americký *Národní úřad pro standardy* doporučuje proměření minimálně 10.000 obrazů (ne částic !) pro zachování statistické správnosti.

Pro hodnocení obrazu získaného mikroskopem se často používá kamera s elektronickým hodnocením zobrazení (*image analysis, analýza obrazu*). {24}

### 1.6.1 Obrazové zpracování

Grafiku můžeme ukládat a upravovat různými způsoby - jako bitmapy nebo jako vektorovou grafiku. Bitmapa je množina obrazových bodů (pixelů), vektorová grafika je soubor matematicky popsaných křivek (čára je ve vektorové grafice určena počátečním a koncovým bodem).

Obr.7 : Čára tvořená obrazovými body a vektorová čára (obojí při velkém zvětšení)



Důležitým pojmem je také gama korekce. Gama korekce znamená selektivní zvýšení nebo snížení kontrastu obrazu podle hodnot intenzity:  $I(R) = I(O)^{1/\gamma}$ .  $I(R)$  je hodnota intenzity výsledného obrazu,  $I(O)$  je hodnota intenzity původního obrazu. Hodnota  $\gamma < 1$  obraz celkově ztmaví. Zvýší se kontrast světlých oblastí. Hodnota  $\gamma > 1$  obraz celkově zjasní. Zvýší se kontrast tmavých oblastí. Hodnota  $\gamma = 1$  obraz nijak nemění.

Obraz lze také upravovat pomocí operací s kontrastem. Obrazy v šedé škále mají pevně daný maximální počet jasových úrovní. U řady obrazů se hodnoty jasu obrazových bodů pohybují jen v úzkém rozmezí, tj. rozsah využitých hodnot šedé škály je menší než celý rozsah šedé škály. V takových případech se špatně rozlišují struktury, protože obraz má jen minimální kontrast. Optimalizace obrazu před prohlížením zajistí roztažení hodnot šedé škály na maximální šířku, čímž se zvýší kontrast obrazu.

Histogram je graf  $x/y$ , který zachycuje počty obrazových bodů, které mají konkrétní hodnotu šedé. Zachycuje, které hodnoty šedé škály se v obrazu vyskytují, a jejich rozložení. Špičky označují hodnoty šedé škály, které se vyskytují často. {24}

## 1.6.2 Samotná analýza

Používá se analýza fáze nebo detekce částic.

Analýza fáze je kvantitativní hodnocení plochy s ohledem na jednotlivé hodnoty šedé škály nebo barevné složky.

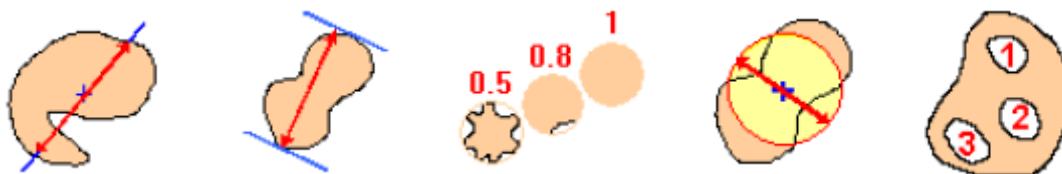
Detekce částic je hodnocení šedé škály. Částice je souvislá množina obrazových bodů, které spadají do definovaného rozmezí hodnot šedé škály.

Aby detekce částic fungovala, musí částice jasně kontrastovat s pozadím. Popsané částice se poté podle nastavených parametrů třídí do jednotlivých tříd klasifikačního schématu.

Pro popis částic se používají různé parametry :

- a) ID - jedinečné identifikační číslo částice
- b) Plocha (Area) - plocha částice v jednotkách aktuální kalibrace obrazu. Plocha je vypočtena vynásobením počtu obrazových bodu kalibračními faktory os X a Y
- c) Obvod (Perimeter) - součet vzdáleností po uzavřené křivce obvodu
- d) Maximální vnější průměr (Diameter Outer Max) - největší vzdálenost okrajů částice měřená po úsečce procházející středem
- e) Maximální Feretův průměr (Feret Max) - největší vzdálenost rovnoběžných tečen procházejících protilehlými okraji částice
- f) Tvarový faktor (Shape Factor) - vyjadřuje kulatost částice
- g) Průměr ekvivalentní kružnice (Equivalent Circle Diameter, ECD) - hodnota ECD je průměr kružnice, která má stejnou plochu jako částice
- h) Počet děr (Hole Count) - počet děr v částici{24}

Obr.8 : Parametry používané při analýze obrazu (maximální vnější průměr, maximální Feretův průměr, tvarový faktor, průměr ekvivalentní kružnice, počet děr)



## **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

Zetasizer ZS, Malvern Instruments UK

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

Ultrazvuk Sonorex super 10P Bandelin

sprejová sušárna Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švýcarsko)

mikroskop Olympus BX 51

PC s programem analySIS<sup>®</sup> FIVE (Soft Imaging System GmbH, Münster, Německo)

### **2.2 Chemikálie**

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

Dichlormethan (DCM) p.a. Lachema a.s. Neratovice, M=84,93g/mol, ρ=23-24/25-36/37

L- $\alpha$  lecitin – typ II S, sojový, P-5638, Sigma Aldrich

Polysorbát 80 – Lachema a.s., CZ

Mannitol p.a. – Lachema a.s., CZ

Destilovaná voda

## **2.3 Pomůcky**

polystyrenové kyvety

injekční stříkačky

pipety

nálevky

filtrační papíry

kádinky

lžičky

stojany s držáky

skleněné tyčinky

skleněné lahvičky s víčkem

exsikátor

alobal



## 2.4 Metody

### 2.4.1 Příprava nanočástic extrakcí a odpařením rozpouštědla

Metoda využívá extrakci a odpařování rozpouštědla. 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 rozpouštědlo jsme použili dichlormethan (DCM). Jako emulgátor byl použit lecitin a polysorbát-80, oba v koncentraci 0,5%.

#### Příprava roztoku lecitinu a polysorbátu(vnější fáze)

Nejprve jsme navážili na analytických vahách 0,25g lecitinu a 0,25g polysorbátu. Toto množství jsme rozpustili ve 49,5g vody, minutovým zahřátím v mikrovlnné troubě a krátkým ponořením do ultrazvuku jsme rozpouštění urychlili.

#### Příprava roztoku 10% terbinafinu a 1% PDLLA v daném rozpouštědle(vnitřní fáze)

Na analytických vahách jsme navážili 0,1g PDLLA a 0,01g terbinafinu a umístili je na dno tmavé skleněné lahvičky s uzávěrem a přidali jsme 9,89g DCM.

Do kádinky s roztokem lecitinu a polysorbátu jsme přidali 1g směsi 1% roztoku PDLLA a 0,1% roztoku terbinafinu (10% roztok vůči koncentraci polymeru). 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 100ml vody. Kádinku jsme umístili na magnetickou míchačku na dobu 2 hodin (do odpaření rozpouštědla).

#### **2.4.2 Koncentrování vzorků pomocí dialyzační trubice zasypané polyakryl-polyalkoholem**

Do trubice jsme nasypali 2g PAPA a pečlivě zavázanou dialyzační trubici jsme umístili do roztoku vzorku. V daných časových intervalech jsme vzorek odebrali a měřili jsme velikost nanočástic s terbinafinem a jejich zeta potenciál na přístroji Zetasizer.

#### **2.4.3 Využití hydrolyzátu želatiny v přípravě nanočástic**

Tato metoda vychází z předešlého postupu. Hydrolyzát želatiny jsme použili v koncentraci 1% a 2% a ve dvou různých fázích přípravy nanočástic. V prvním vzorku jsme zabudovali 1% hydrolyzát želatiny do posledního kroku přípravy nanočástic, tzn. do kádinky se 100ml vody (použili jsme 1g hydrolyzátu želatiny a 99g vody). V druhém vzorku jsme použili 2% hydrolyzát želatiny (2g hydrolyzátu želatiny a 98g vody). U třetího vzorku jsme hydrolyzát želatiny použili v koncentraci 1%, přidali jsme ho do roztoku vnější fáze (do 50g roztoku 0,5% lecitinu a 0,5% polysorbátu).

#### **2.4.4 Sprejové sušení s mannitolem**

V této části jsme vycházeli z předešlého postupu přípravy nanočástic. Připravili jsme sedmkrát stejný vzorek nanočástic s 10% terbinafinu (0,5% lecitin, 0,5% polysorbát, 1% PDLLA). V každém jsme rozpustili mannitol.

Vzorek č.1: 2,5% mannitolu

Vzorek č.2: 5% mannitolu

Vzorek č.3: 7,5% mannitolu

Vzorek č.4: 10% mannitolu

Vzorek č.5: 12,5% mannitolu

Vzorek č.6: 15% mannitolu

Vzorek č.7: 20% mannitolu

## 2.4.5 Mikroskopie

Preparáty jsme připravovali v pupalkovém oleji.

Analýza obrazu pomocí softwaru analySIS<sup>®</sup> FIVE probíhala za těchto parametrů:

- Nastavení prahů (Set Tresholds) v rozmezí 146 až 155 (podle ostrosti obrazu)
- Pravidla detekce (Define Detection):
  - Filtr pro velikost částic: minimálně 30 obrazových bodů  
(Particle Filter: Minimum 30 Pixel)
  - Zahrnuto diagonální spojení obrazových bodů (Include Diagonals)
  - Z hodnocení vyřazeny částice dotýkající se hran snímaného obrazu (Exclude Border particles)
- Pravidla měření (Define Measurements):
  - Limit pro detekci plochy (Area - Lower Limit) 3,05
  - Limit pro tvarový faktor (Shape Factor - Lower Limit) 0,55

Hodnocení mikročástic bylo provedeno měřením jejich velikosti, a to za použití parametru středního průměru. Další měřené parametry byly plocha mikročástic, jejich tvar a Feretův průměr.

Detekce částic probíhá v následujících krocích:

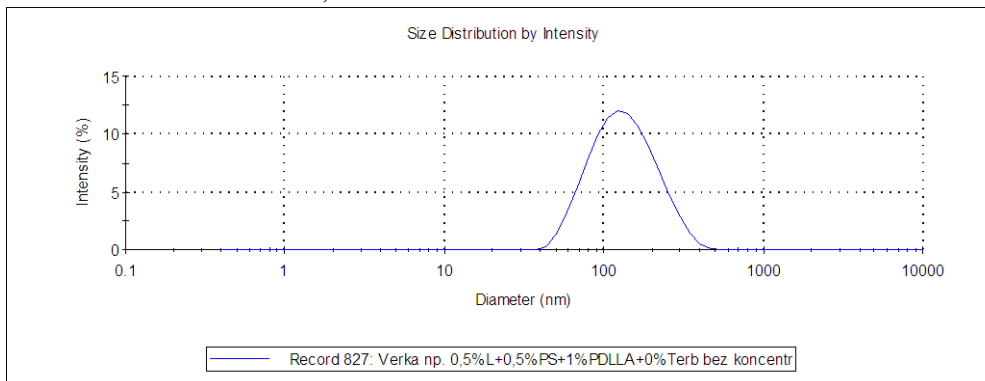
- Nastavení prahové hodnoty
- Definování parametrů detekce a provedení předběžné detekce
- Výběr parametrů hodnocených částic
- Definování schémat klasifikace
- Klasifikace částic
- Výběr parametrů pro měření částic
- Export výsledků

### 3 Výsledky

#### 3.1 Grafy velikosti nanočástic

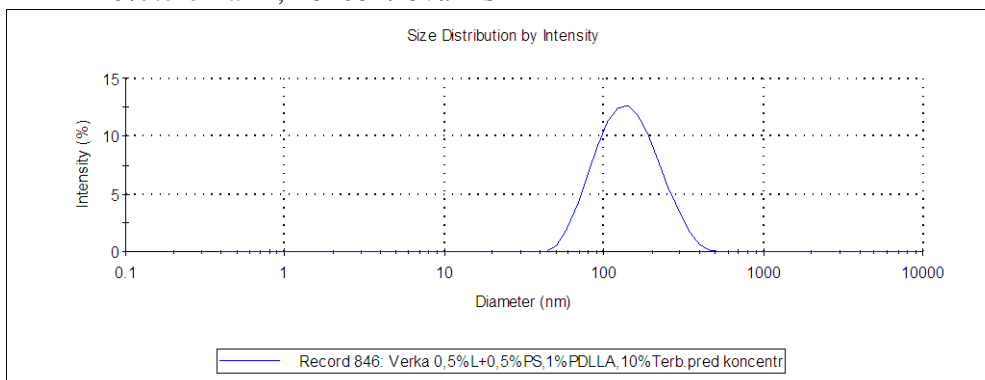
##### 3.1.1 Velikost nanočástic, čas 0 hod

Obr.9: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, NČ 0% terbinafin, koncentrování s PAPA



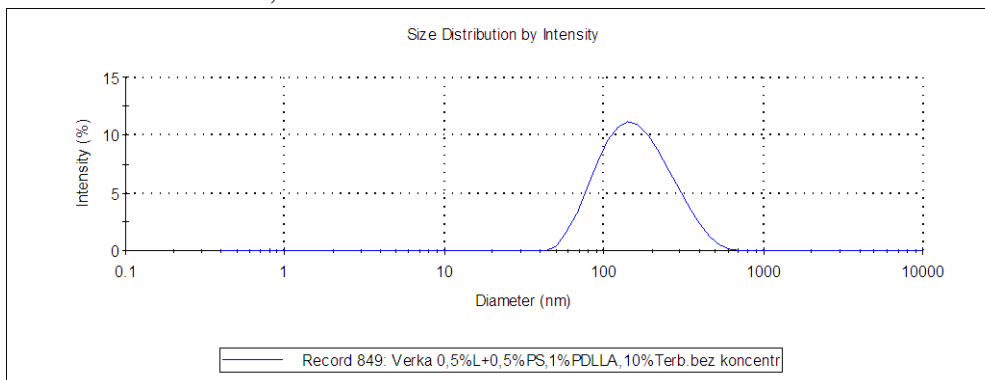
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 144,60nm.

Obr.10: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 10%terbinafin, koncentrování s PAPA



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 152,00nm.

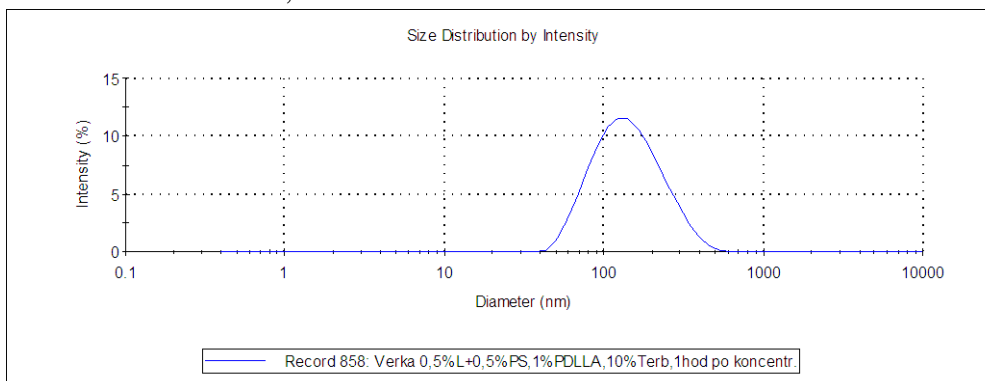
Obr11: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku, 10%terbinafin, bez koncentrování s PAPA



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 174,90nm.

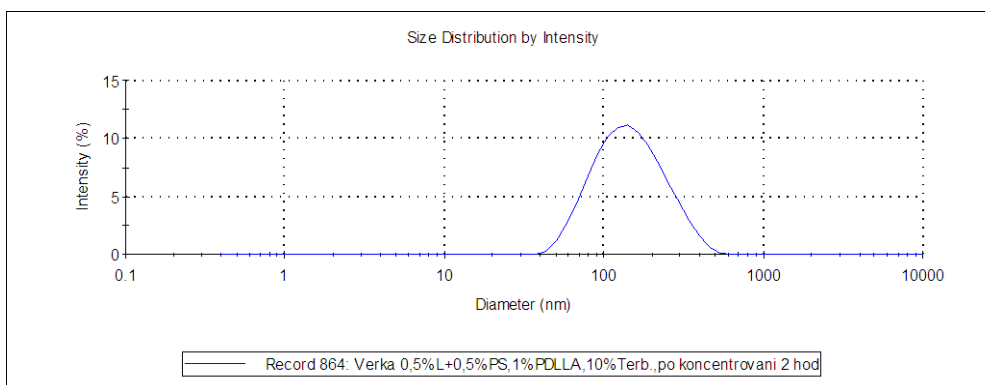
### 3.1.2 Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po koncentrování s PAPA

Obr.12: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 1 hod koncentrování



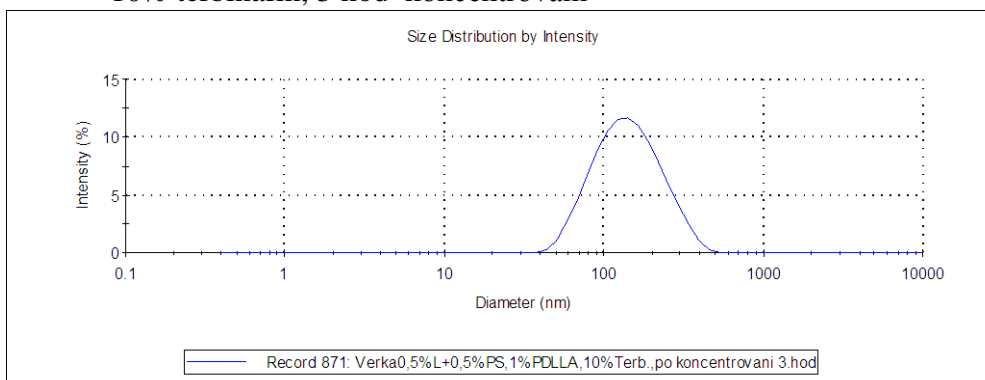
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 154,80nm.

Obr.13: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 2 hod koncentrování



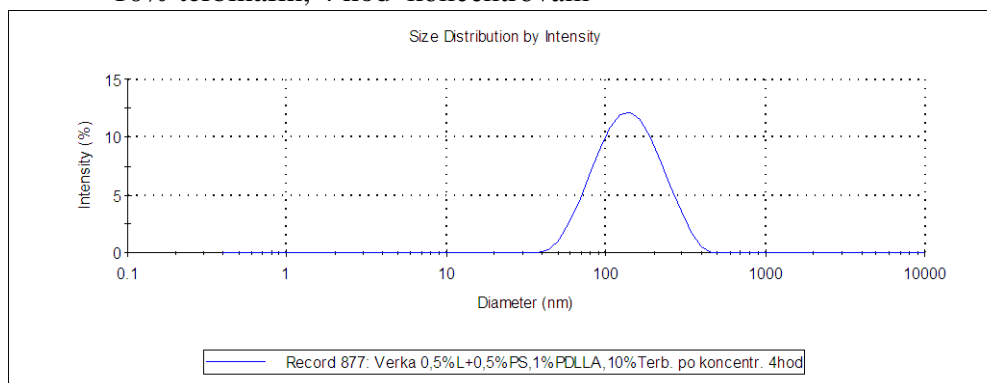
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 159,80nm.

Obr.14: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 3 hod koncentrování



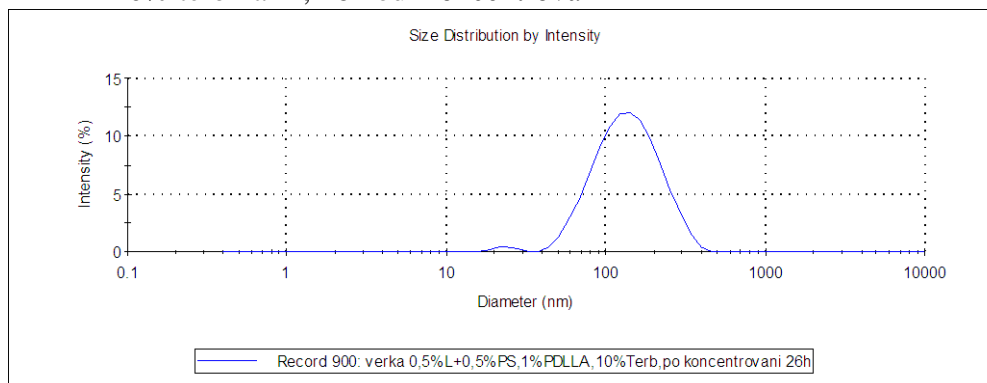
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 154,80nm.

Obr.15: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 4 hod koncentrování



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 151,8nm.

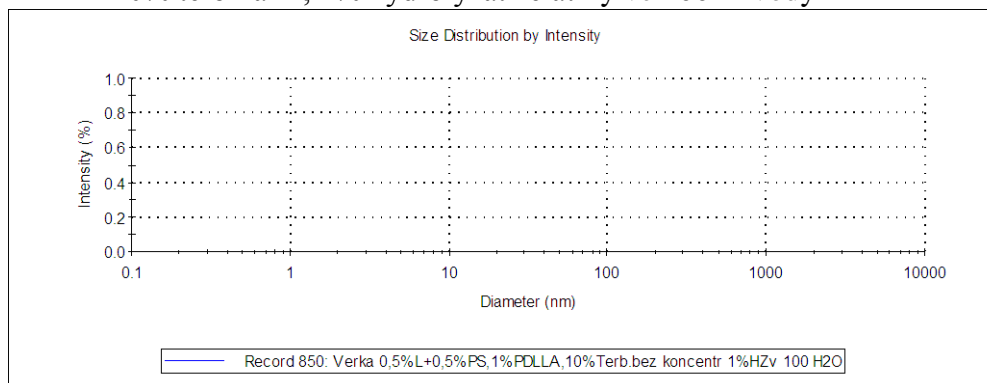
Obr.16: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 26 hod koncentrování



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost nm.

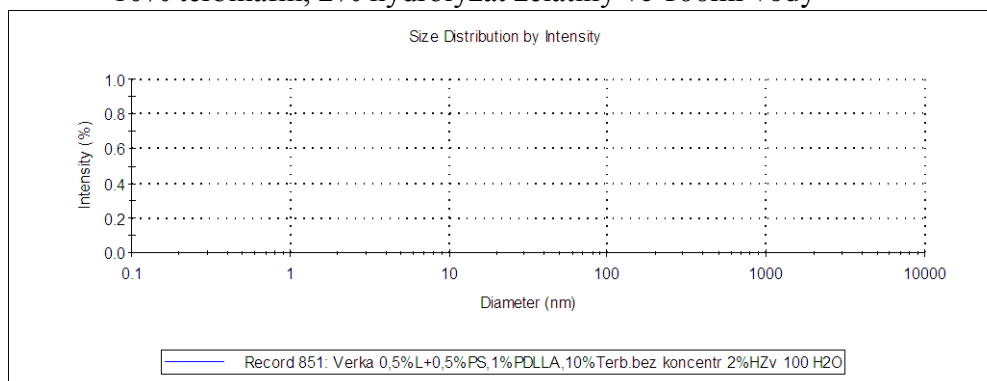
### 3.1.3 Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, s využitím hydrolyzátu želatiny

Obr.17: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 1% hydrolyzát želatiny ve 100ml vody



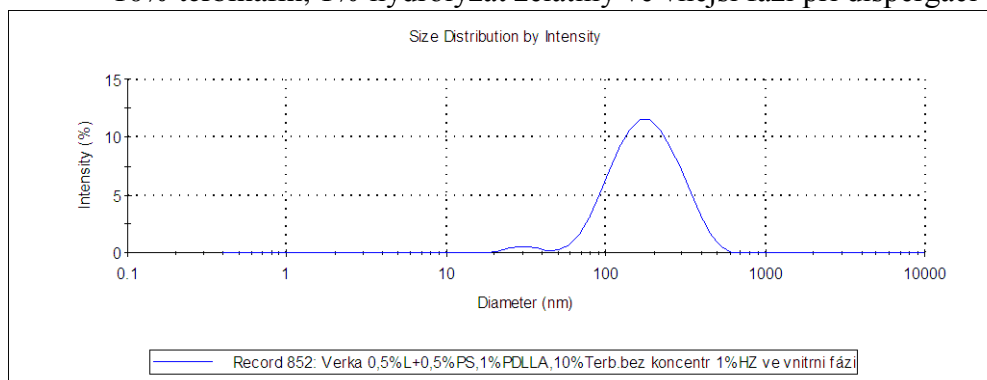
Přístroj nezaznamenal žádný pík, částice měly velikost větší než je rozsah měřených velikostí přístrojem Zetasizer ZS tj. větší než 3 μm. Po přidání nanosuspenze do roztoku hydrolyzátu želatiny vznikla sraženina.

Obr.18: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 2% hydrolyzát želatiny ve 100ml vody



Přístroj nezaznamenal žádný pík, částice měly velikost větší než je rozsah měřených velikostí přístrojem Zetasizer ZS tj. větší než 3  $\mu\text{m}$ . Po přidání nanosuspence do roztoku hydrolyzátu želatiny vznikla sraženina.

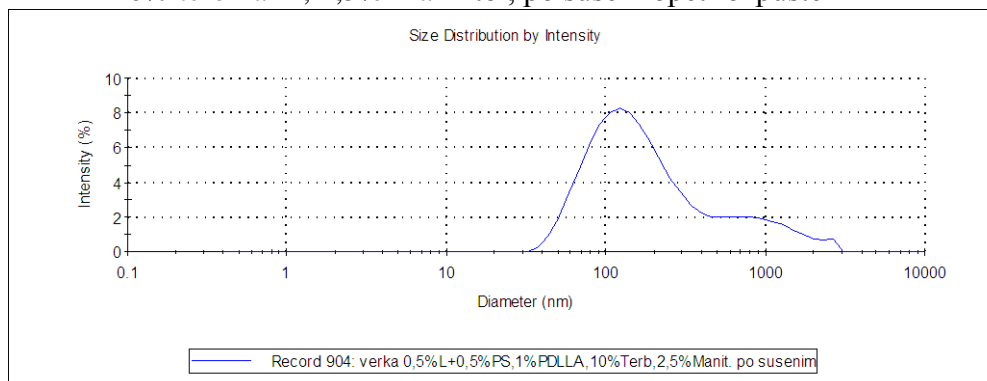
Obr.19: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 1% hydrolyzát želatiny ve vnější fázi při dispergaci



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 194,60 nm.

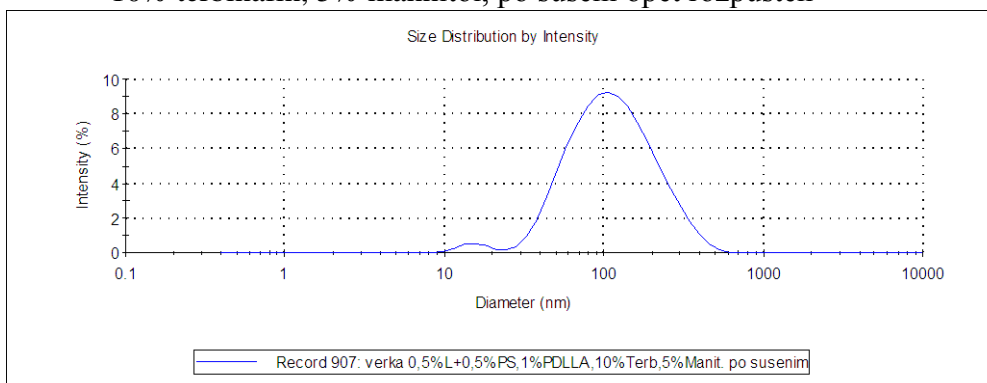
### 3.1.4 Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po vysušení s mannitem a opětovném rozpuštění

Obr.20: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 2,5% mannitol, po sušení opět rozpuštěn



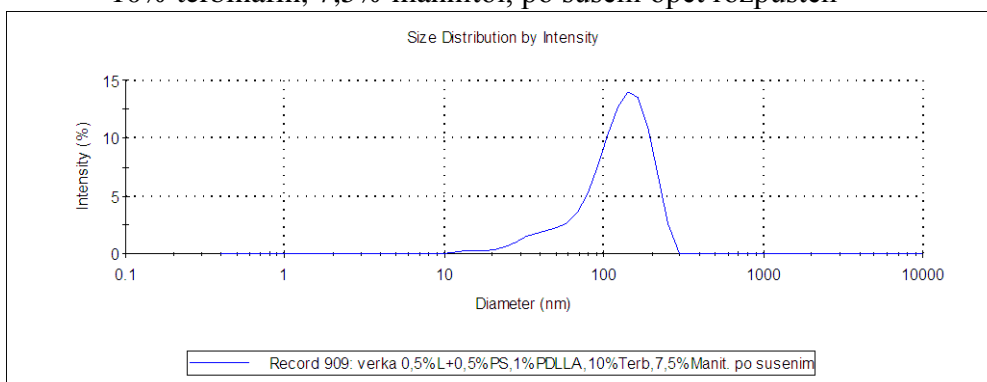
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 168,60 nm.

Obr.21: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 5% mannitol, po sušení opět rozpuštěn



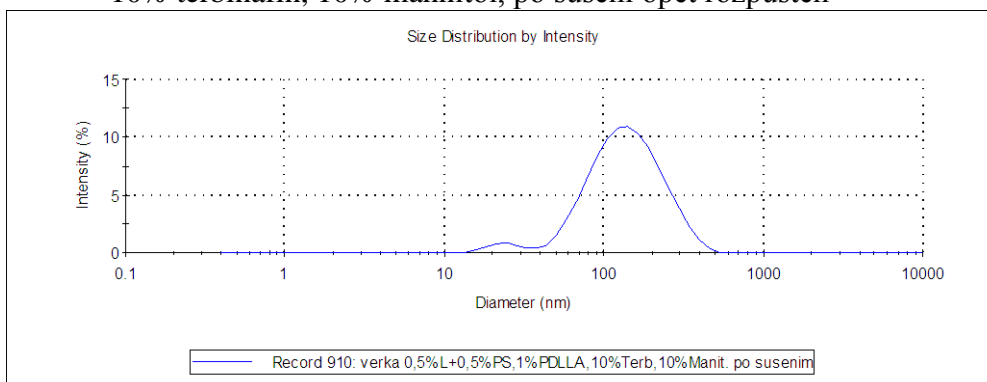
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 132,10 nm.

Obr.22: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 7,5% mannitol, po sušení opět rozpuštěn



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 129,30 nm.

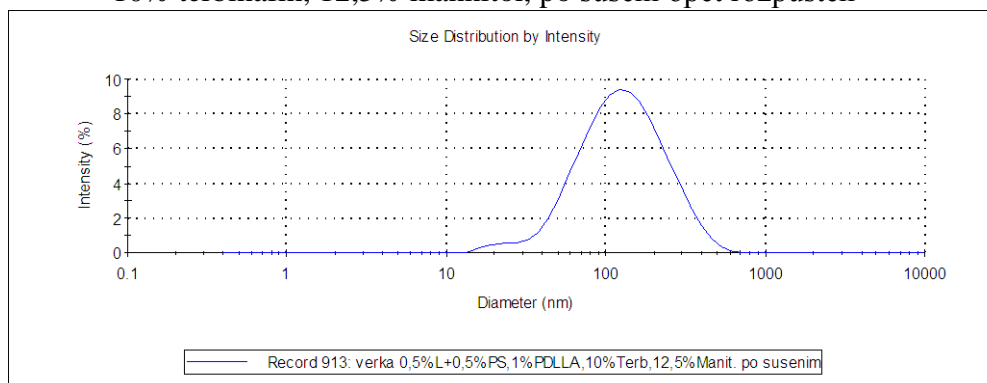
Obr.23: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 10% mannitol, po sušení opět rozpuštěn



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 153,2 nm.

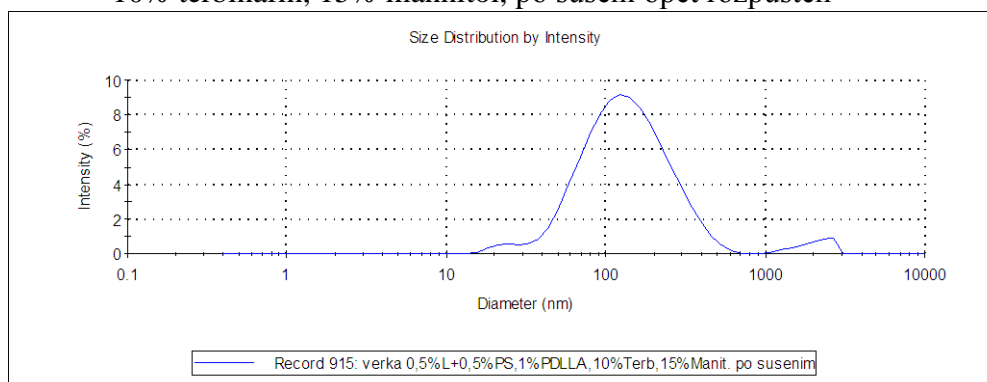


Obr.24: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 12,5% mannitol, po sušení opět rozpuštěn



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 146,00 nm.

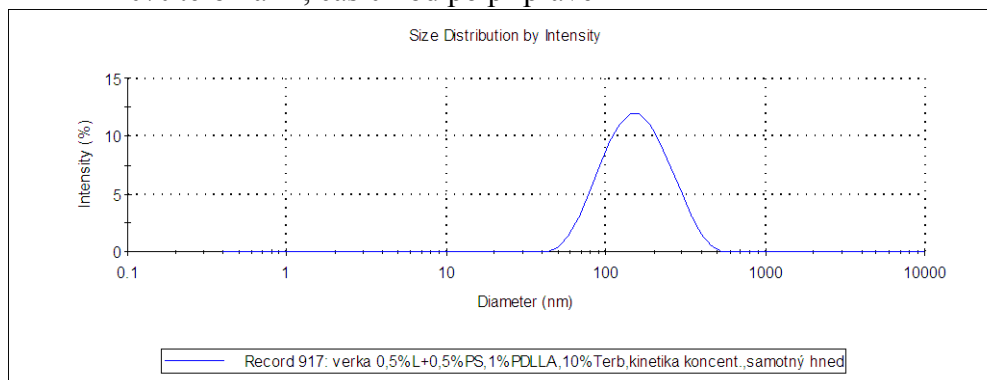
Obr.25: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, 15% mannitol, po sušení opět rozpuštěn



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 154,3 nm.

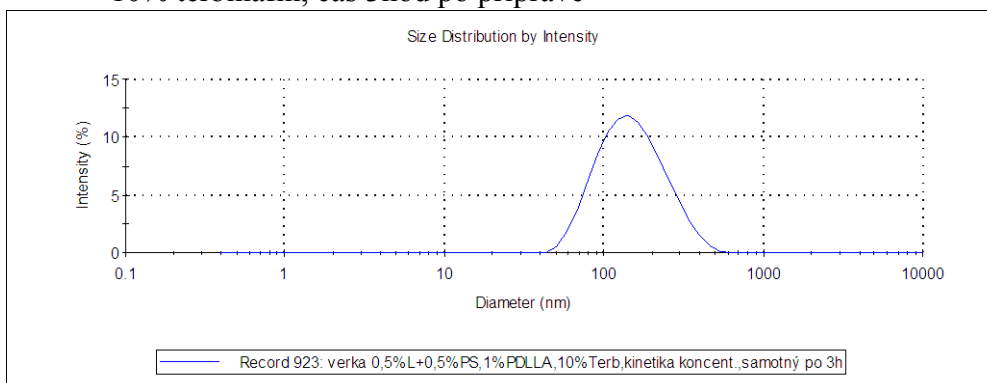
### 3.1.5 Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, odebrání v časových intervalech

Obr.26: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, čas 0 hod po přípravě



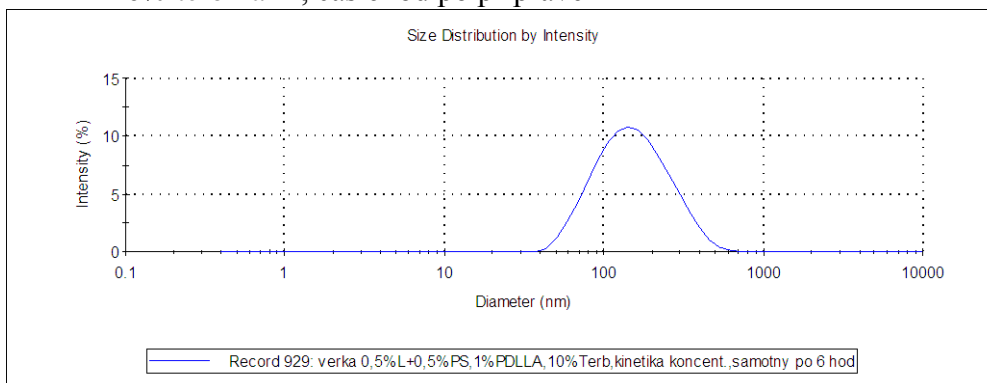
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 168,80 nm.

Obr.27: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, čas 3hod po přípravě



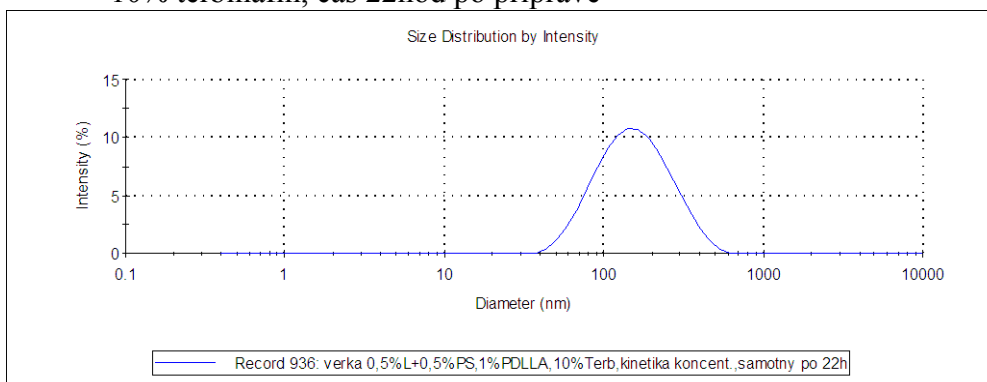
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 162,50 nm.

Obr.28: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, čas 6hod po přípravě



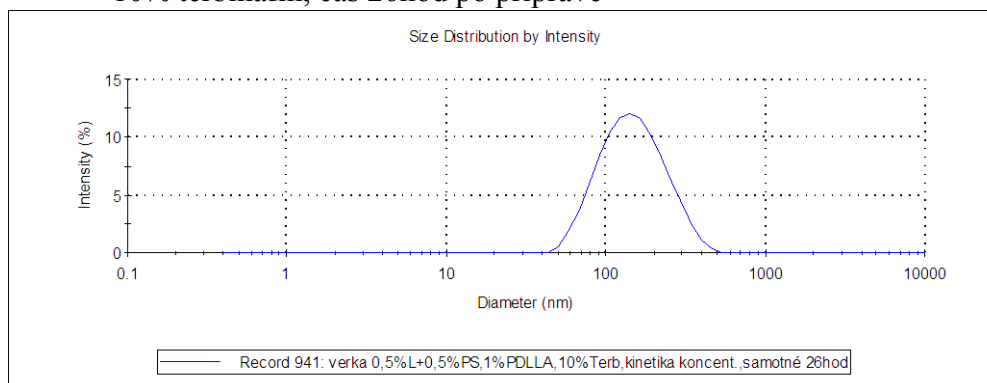
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 168,60 nm.

Obr.29: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, čas 22hod po přípravě



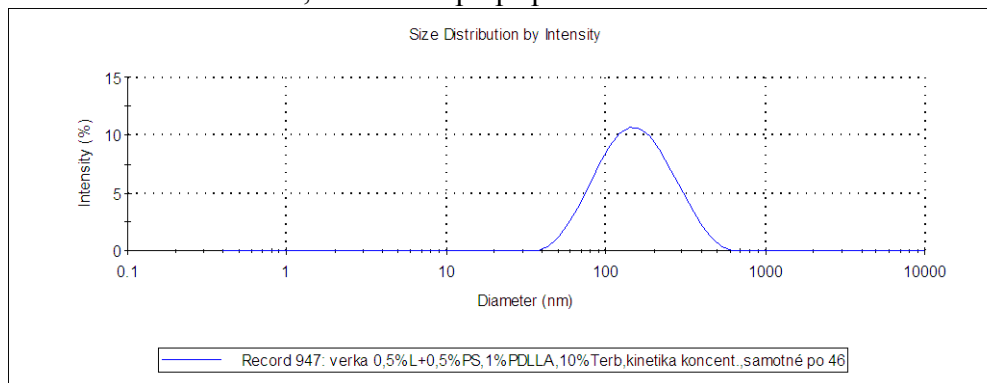
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 171,40 nm.

Obr.30: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, čas 26hod po přípravě



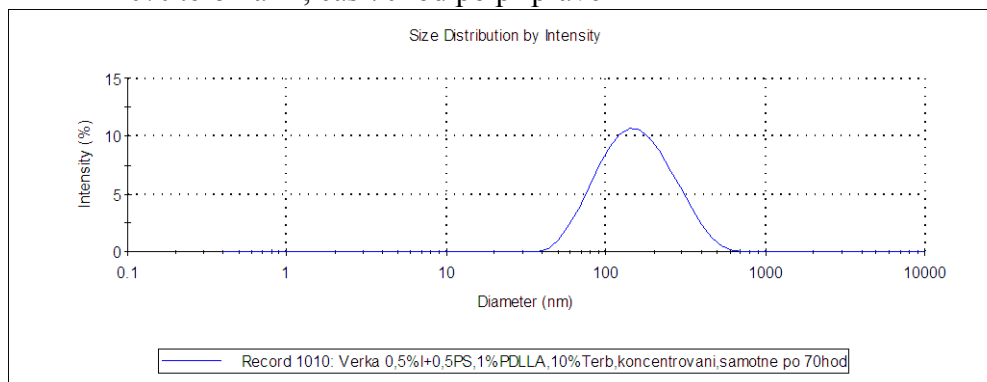
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 159,90 nm.

Obr.31: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, čas 46hod po přípravě



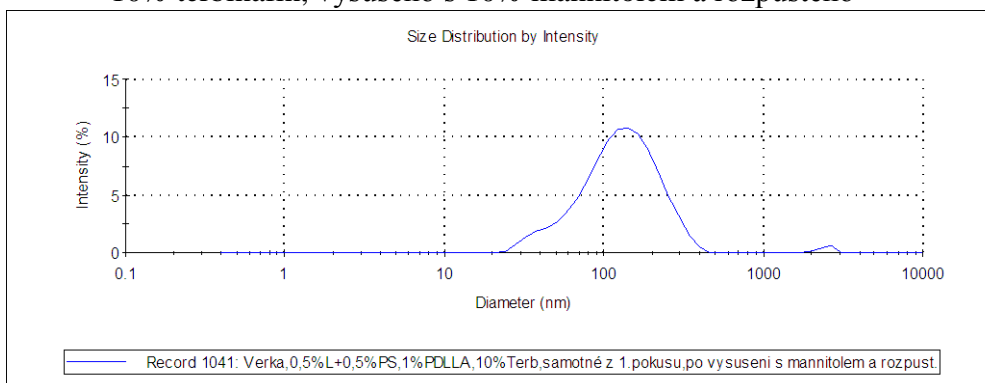
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 171,10 nm.

Obr.32: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, čas 70hod po přípravě



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 174,20 nm.

Obr.33: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, vysušeno s 10% mannitem a rozpuštěno

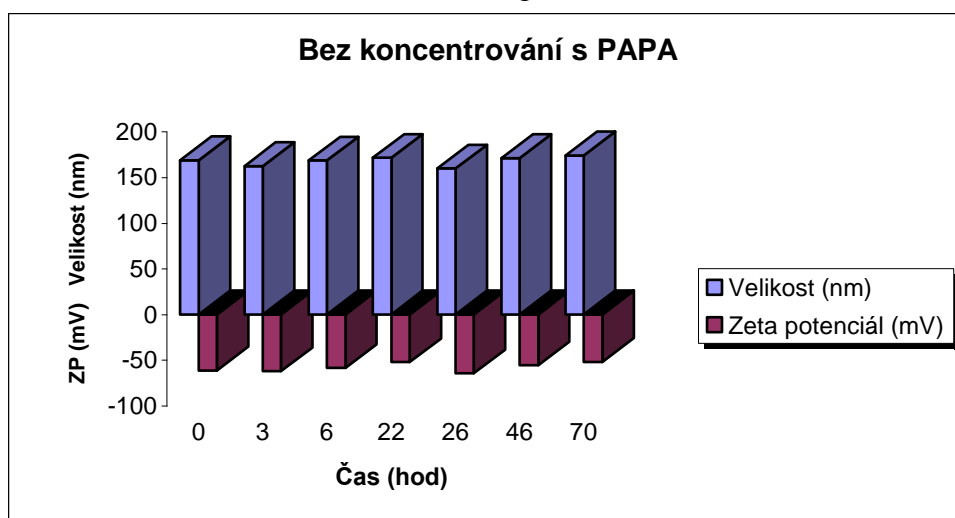


Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 140,10 nm.

Tab.1: 10% terbinafin bez koncentrování

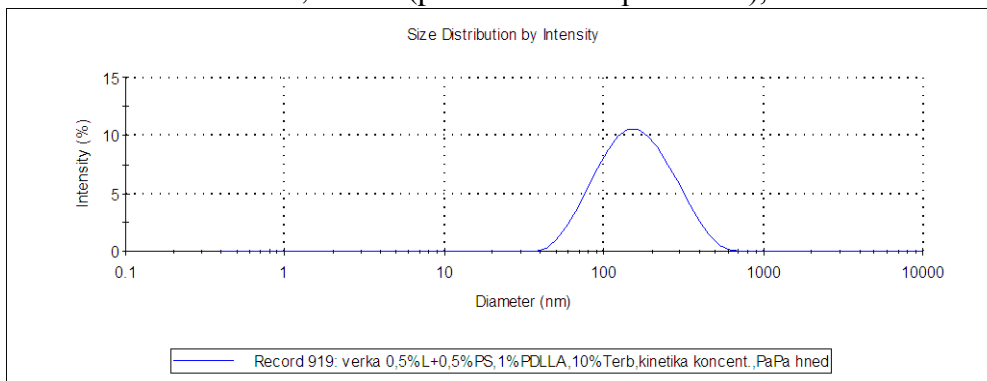
Čas(hod)	Velikost(nm)	Zeta potenciál
0	168,8	-61,31
3	162,5	-62,03
6	168,6	-58,63
22	171,4	-52,1
26	159,9	-64,65
46	171,1	-55,7
70	174,2	-51,9

Obr.34 : Graf závislosti velikosti a zeta potenciálu NČ na čase



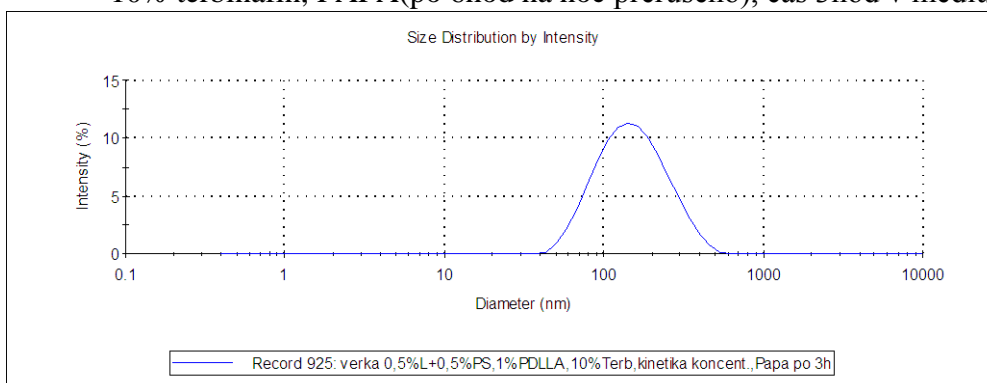
### 3.1.6 Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po koncentrování s PAPA (po 6hod na noc přerušeno), v časových intervalech

Obr.35: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA (po 6hod na noc přerušeno), čas 0 v médiu



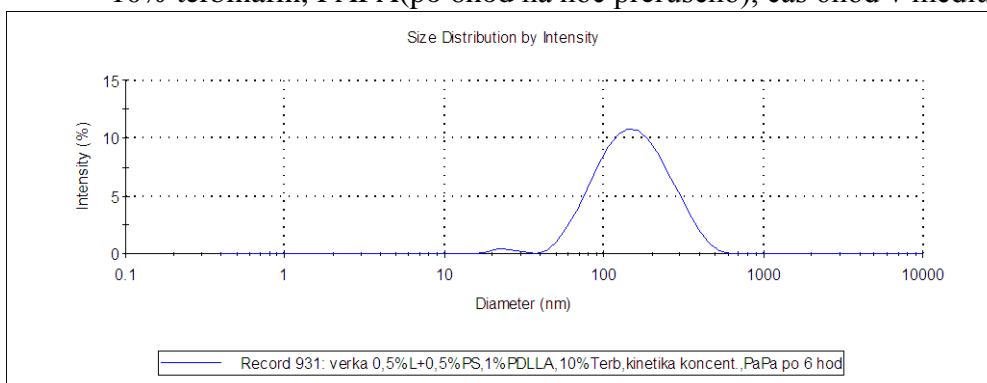
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 176,80 nm.

Obr.36: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA(po 6hod na noc přerušeno), čas 3hod v médiu



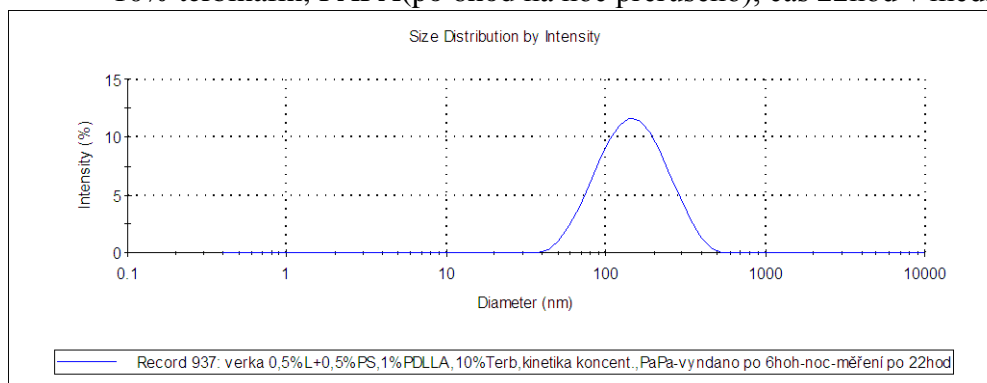
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 165,00 nm.

Obr.37: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA(po 6hod na noc přerušeno), čas 6hod v médiu



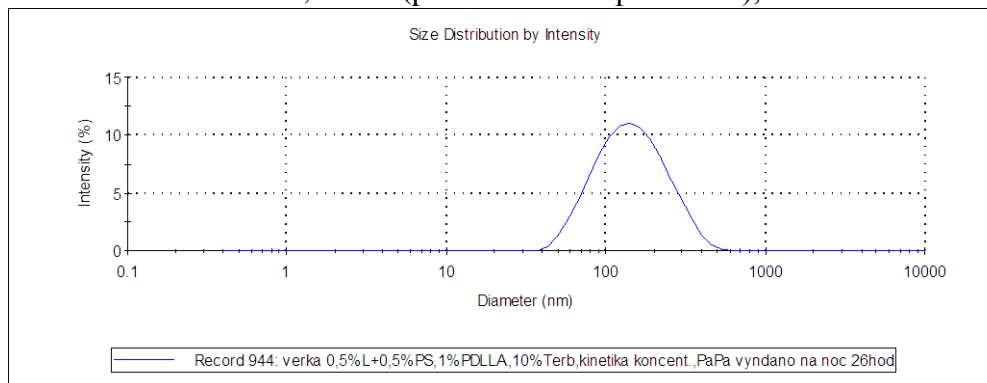
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 169,40 nm.

Obr.38: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA(po 6hod na noc přerušeno), čas 22hod v médiu



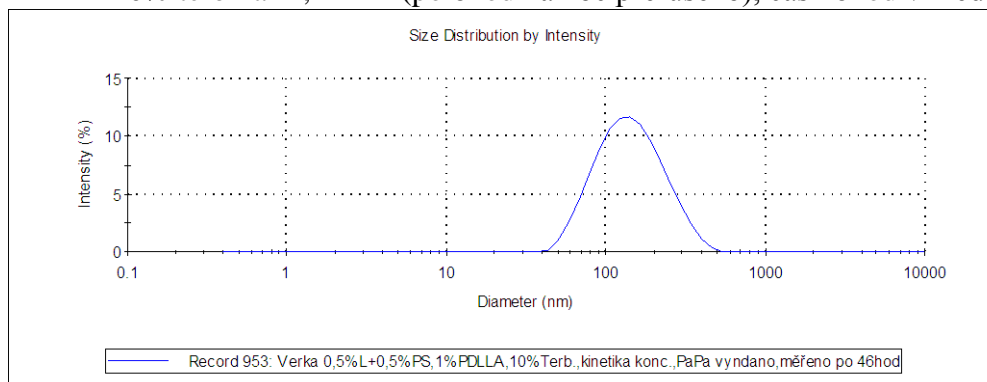
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 161,10 nm.

Obr.39: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA(po 6hod na noc přerušeno), čas 26hod v médiu



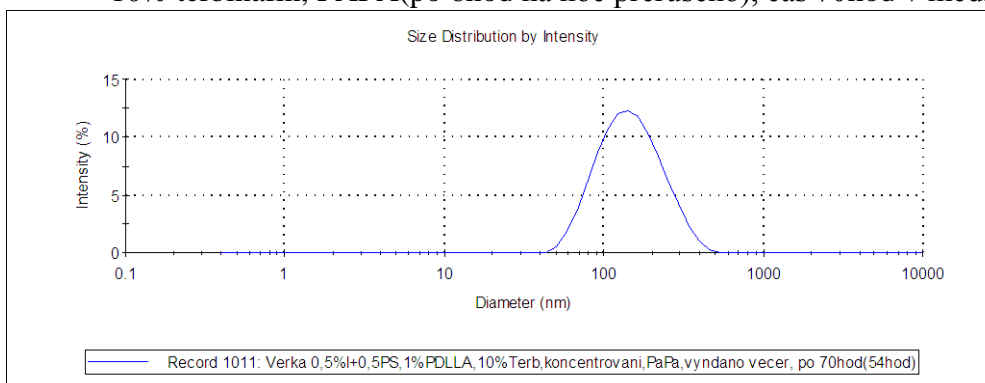
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 159,20 nm.

Obr.40: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA(po 6hod na noc přerušeno), čas 46hod v médiu



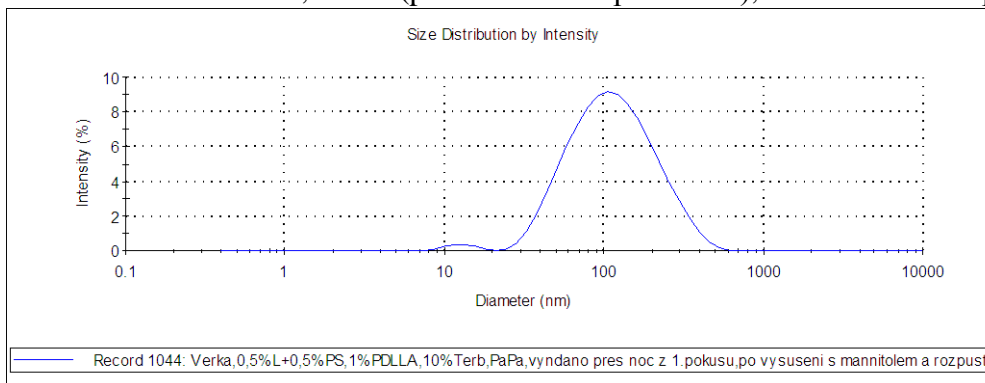
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 155,20 nm.

Obr.41: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA(po 6hod na noc přerušeno), čas 70hod v médiu



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 157,80 nm.

Obr.42: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA(po 6hod na noc přerušeno), sušeno s M a rozpuštěno

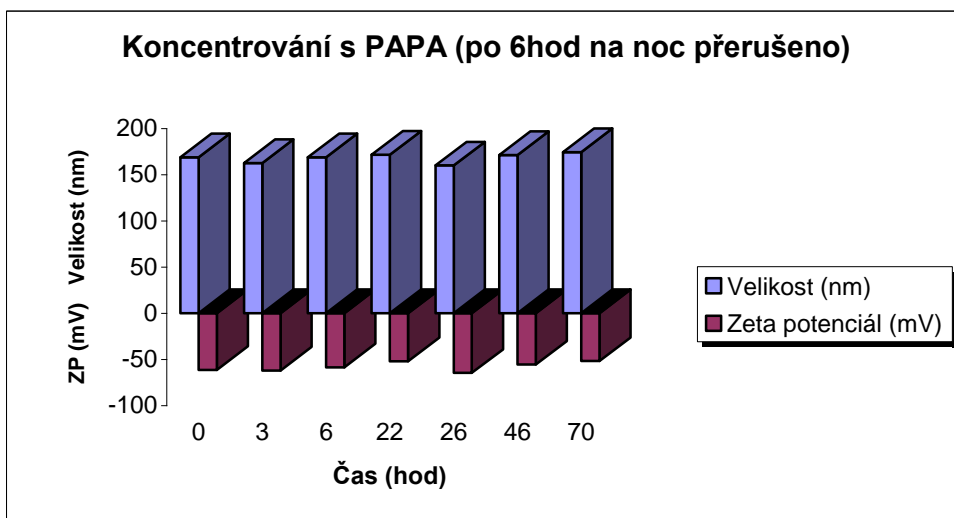


Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 132,40 nm.

Tab.2: 10% terbinafin, koncentrování s PAPA, po 6hod na noc přerušeno

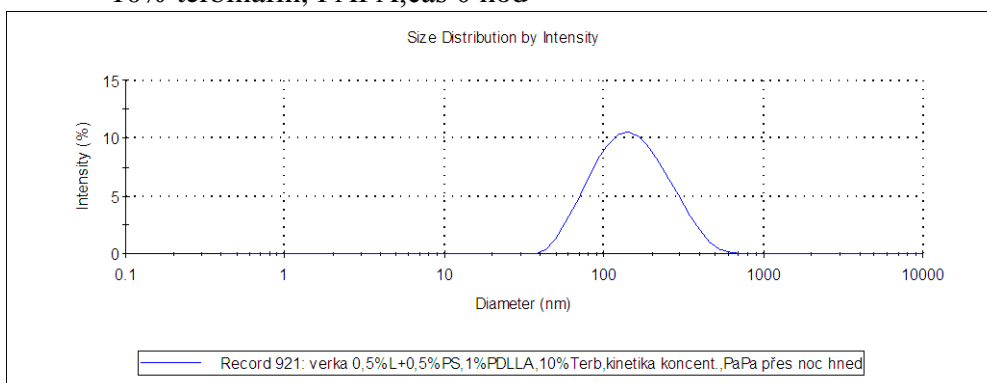
Čas(hod)	Velikost(nm)	Zeta potenciál
0	176,8	-62,34
3	165	-63,14
6	169,4	-74,02
22	161,1	-68,36
26	159,2	-68,87
46	155,2	-62,69
70	157,8	-55,28

Obr.43 : Graf závislosti velikosti a zeta potenciálu NČ na čase odebrání



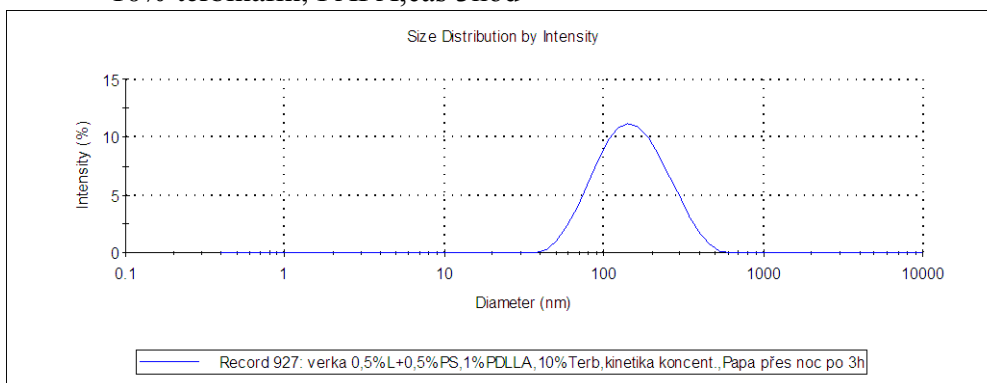
### 3.1.7 Velikost nanočástic s 10% terbinafinem, po koncentrování s PAPA, odebrání v časových intervalech

Obr.44: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA,čas 0 hod



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 166,00 nm.

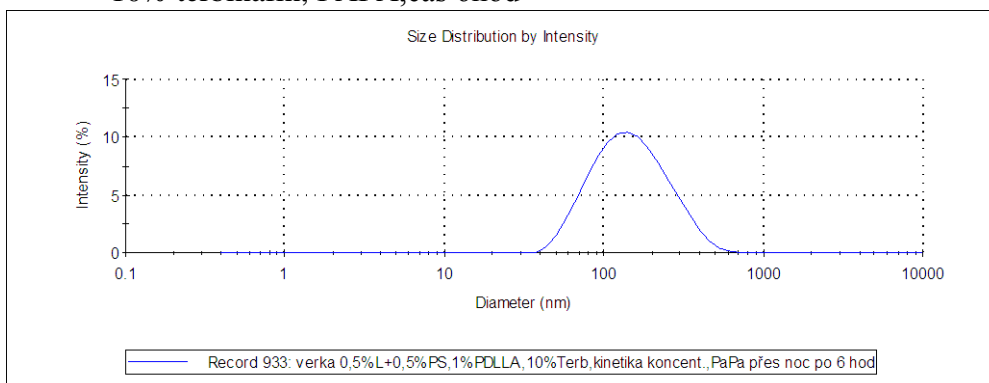
Obr.45: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA,čas 3hod



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 165,20 nm.

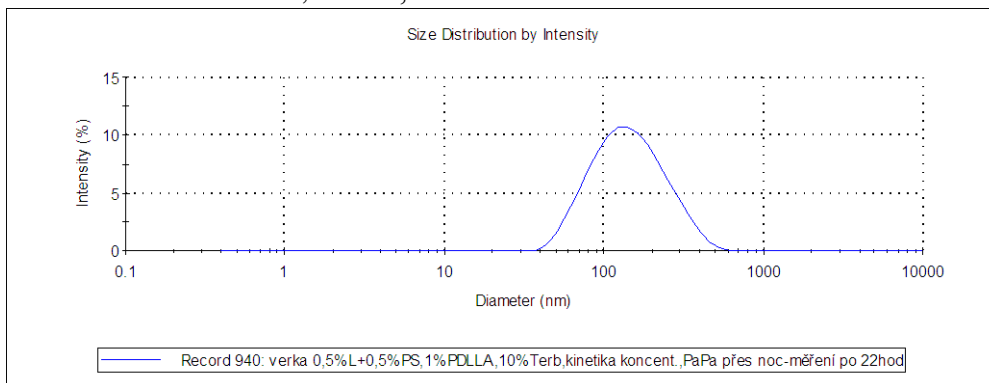


Obr.46: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA, čas 6hod



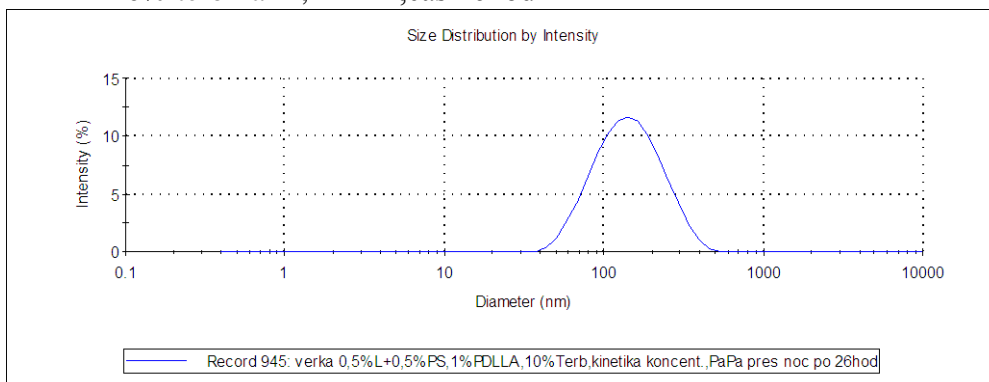
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 164,20 nm.

Obr.47: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA, čas 22hod



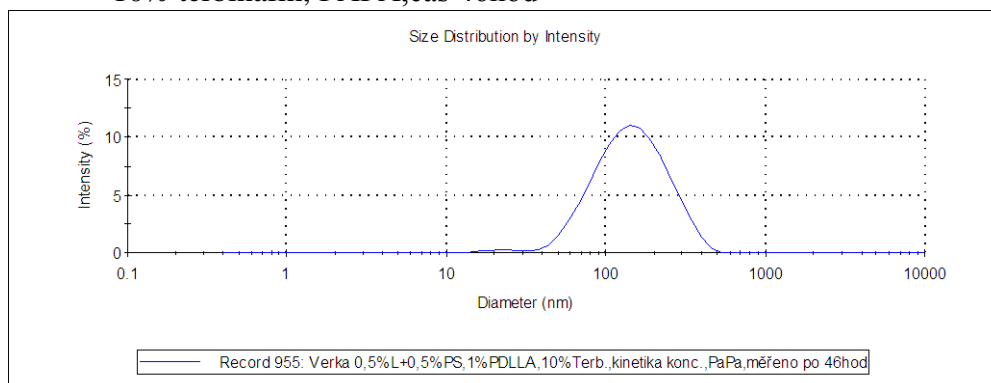
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 159,50 nm.

Obr.48: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA, čas 26hod



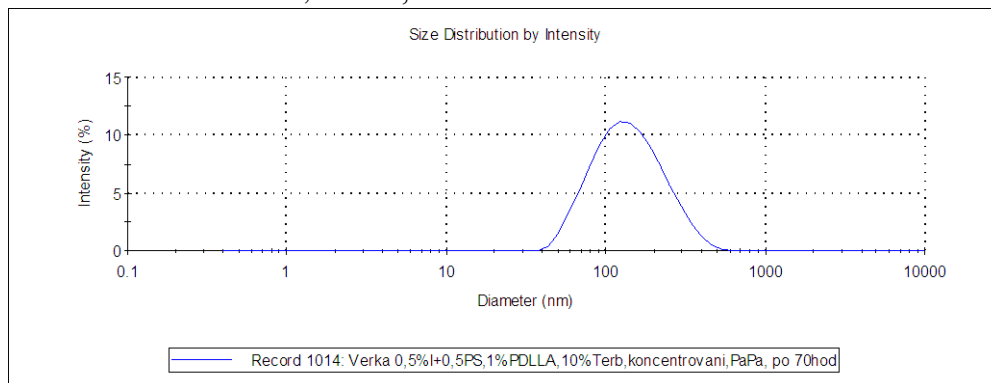
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 155,70 nm.

Obr.49: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA,čas 46hod



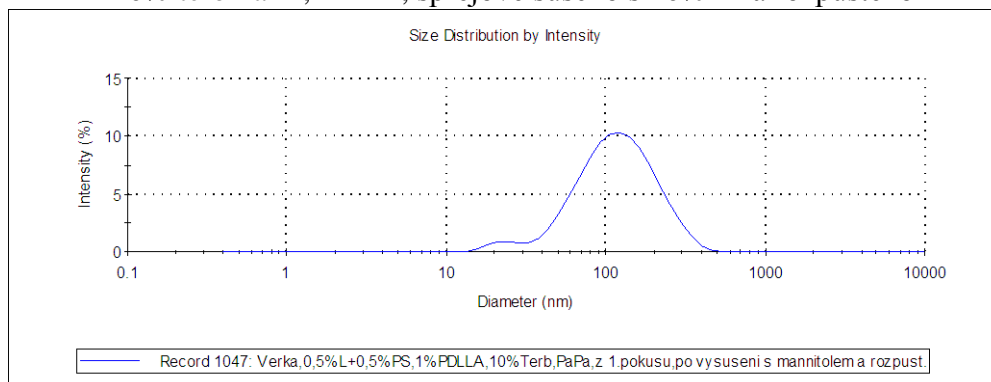
Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 159,60 nm.

Obr.50: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA,čas 70hod



Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 152,60 nm.

Obr.51: Distribuce velikosti částic (v nm) podle intenzity rozptýleného paprsku 10% terbinafin, PAPA, sprejově sušeno s 10% M a rozpuštěno

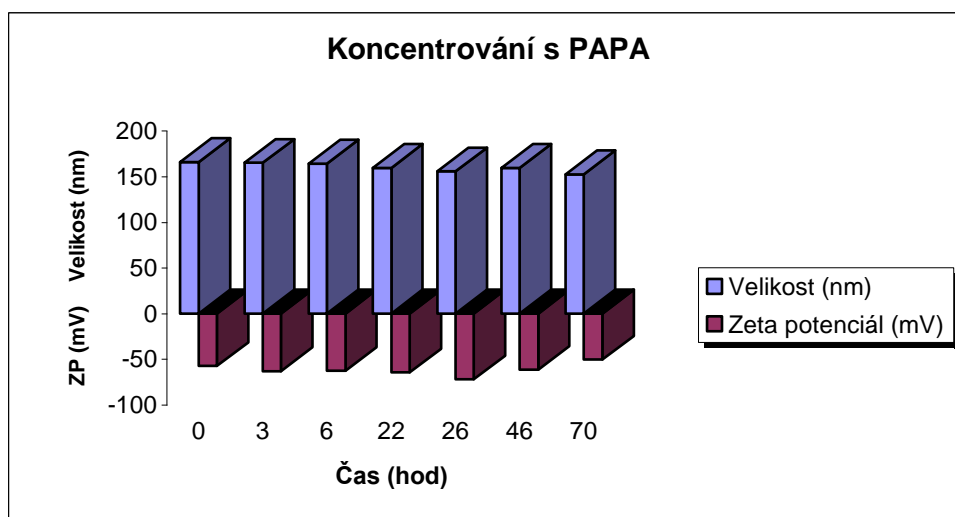


Přístroj zaznamenal 1 pík, částice měly velikost 132,40 nm.

Tab.3: 10% terbinafin, koncentrování s PAPA

Čas(hod)	Velikost(nm)	Zeta potenciál
0	166	-57,63
3	165,2	-63,14
6	164,2	-62,6
22	159,5	-64,58
26	155,7	-71,94
46	159,6	-61,6
70	152,6	-50,53

Obr.52 : Graf závislosti velikosti a zeta potenciálu NČ na čase odebrání



Tab.4: Po 70hod vysušeny a opět rozpuštěny

vzorek	Velikost(nm)	Zeta potenciál (mV)
Bez koncentrování	140,1	-26,89
PAPA,po 6h vyndáno	132,4	-49,66
PAPA	132,4	-48,91

## 3.2 Sušení z vodného roztoku mannitolu

### 3.2.1 Koncentrace mannitolu 2,5%

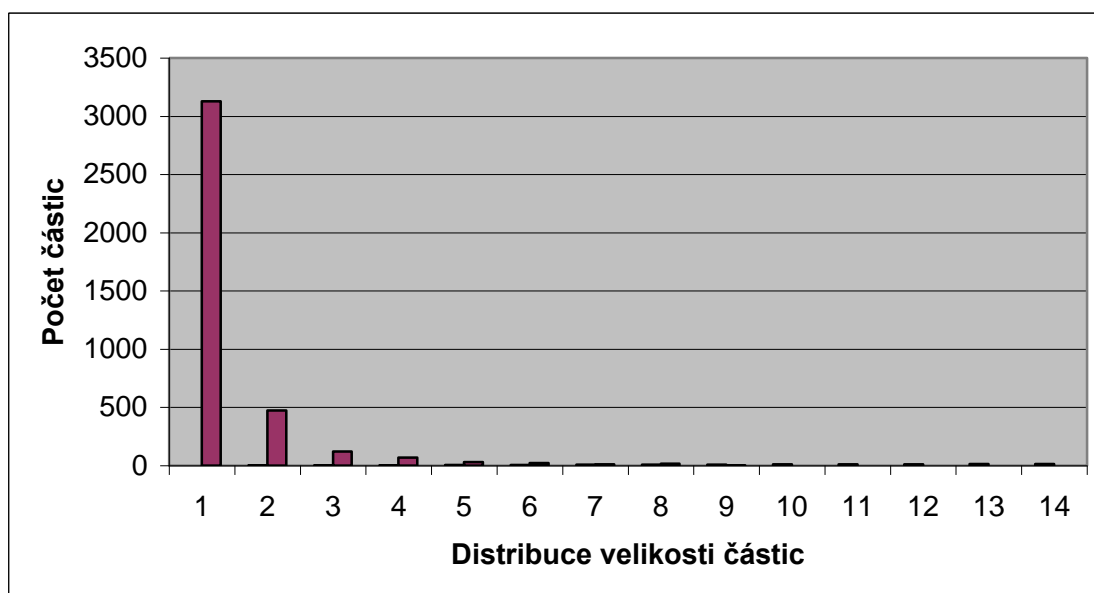
Výkon čerpadla 5%

Teplota na vstupu 110 °C

Třída četnosti	Od um	Do um	Počet částic
1	0	5	3128
2	5	10	475
3	10	15	120
4	15	20	68
5	20	25	29
6	25	30	23
7	30	35	10
8	35	45	17
9	45	55	2
10	55	65	1
11	65	75	0
12	75	85	0
13	85	125	0
14	125	165	0

Statistické funkce: Střední průměr	
Základní jednotky	um
Minimum	0,9896
Maximum	62,8274
Průměr	3,9571
Směrodatná odchylka	4,9007
Medián	2,3235

Obr.53: Rozložení velikosti částic mannitolu- střední průměr vz.č.1 (2,5% mannitol)



### 3.2.2 Koncentrace mannitolu 5%

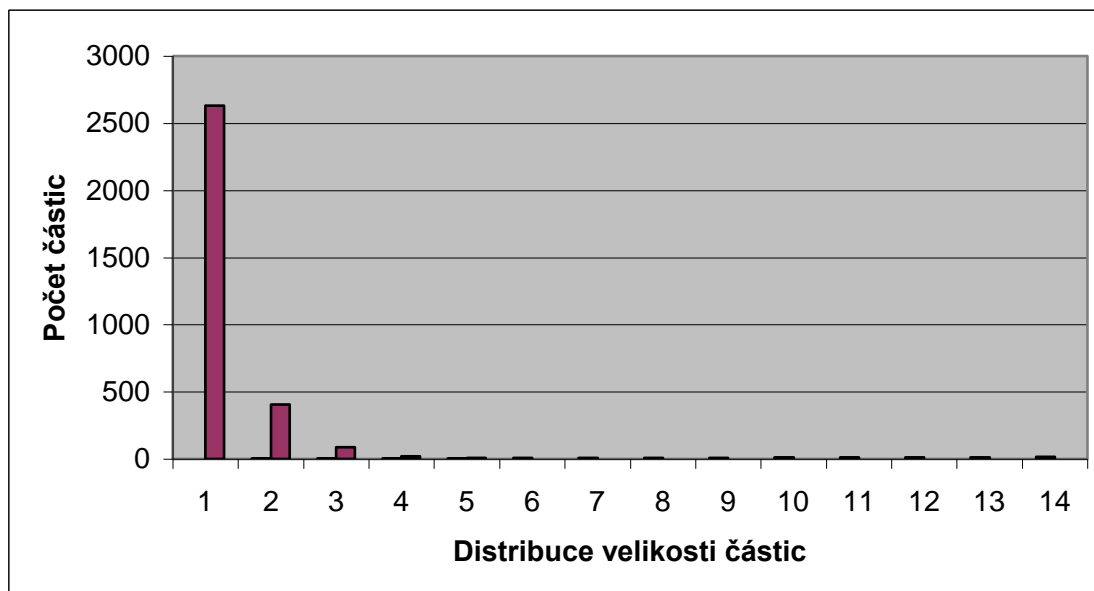
Výkon čerpadla 5%

Teplota na vstupu 110 °C

Třída četnosti	Od um	Do um	Počet částic
1	0	5	2632
2	5	10	405
3	10	15	87
4	15	20	19
5	20	25	6
6	25	30	1
7	30	35	0
8	35	45	1
9	45	55	0
10	55	65	0
11	65	75	0
12	75	85	0
13	85	125	0
14	125	165	0

Statistické funkce: Střední průměr	
Základní jednotky	um
Minimum	0,9684
Maximum	36,8619
Průměr	3,3632
Směrodatná odchylka	2,7835
Medián	2,4853

Obr.54: Rozložení velikosti částic mannitolu- střední průměr vz.č.2 (5% mannitol)



### 3.2.3 Koncentrace mannitolu 7,5%

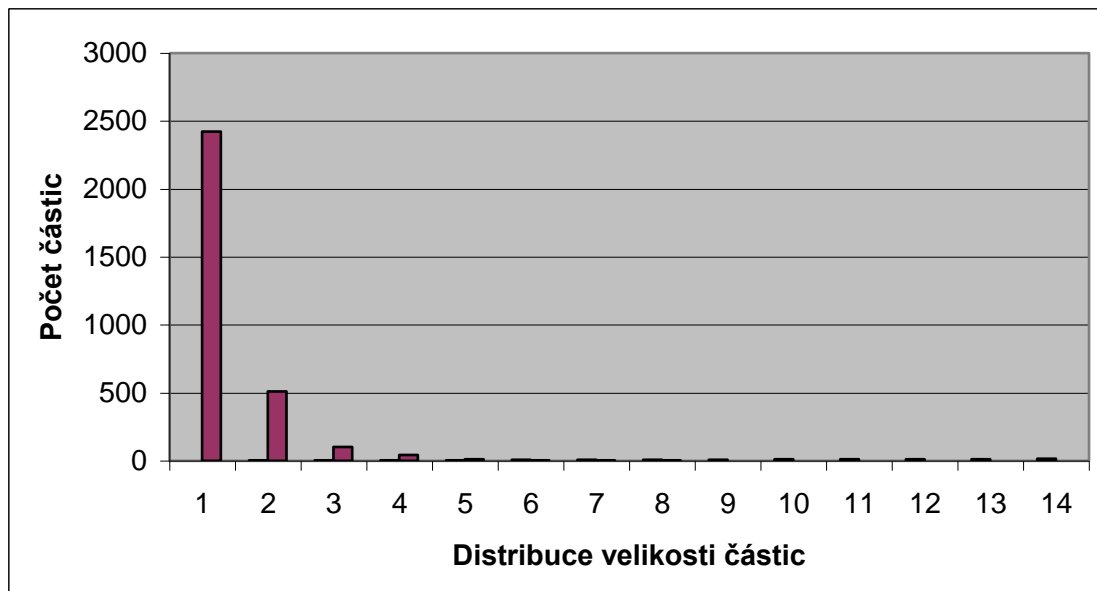
Výkon čerpadla 5%

Teplota na vstupu 110 °C

Třída četnosti	Od um	Do um	Počet částic
1	0	5	2423
2	5	10	512
3	10	15	102
4	15	20	43
5	20	25	10
6	25	30	4
7	30	35	3
8	35	45	2
9	45	55	0
10	55	65	0
11	65	75	0
12	75	85	0
13	85	125	0
14	125	165	0

Statistické funkce: Střední průměr	
Základní jednotky	um
Minimum	0,9651
Maximum	37,0026
Průměr	3,8522
Směrodatná odchylka	3,4924
Medián	2,6741

Obr.55: Rozložení velikosti částic mannitolu- střední průměr vz.č.3 (7,5% mannitol)



### 3.2.4 Koncentrace mannitolu 10%

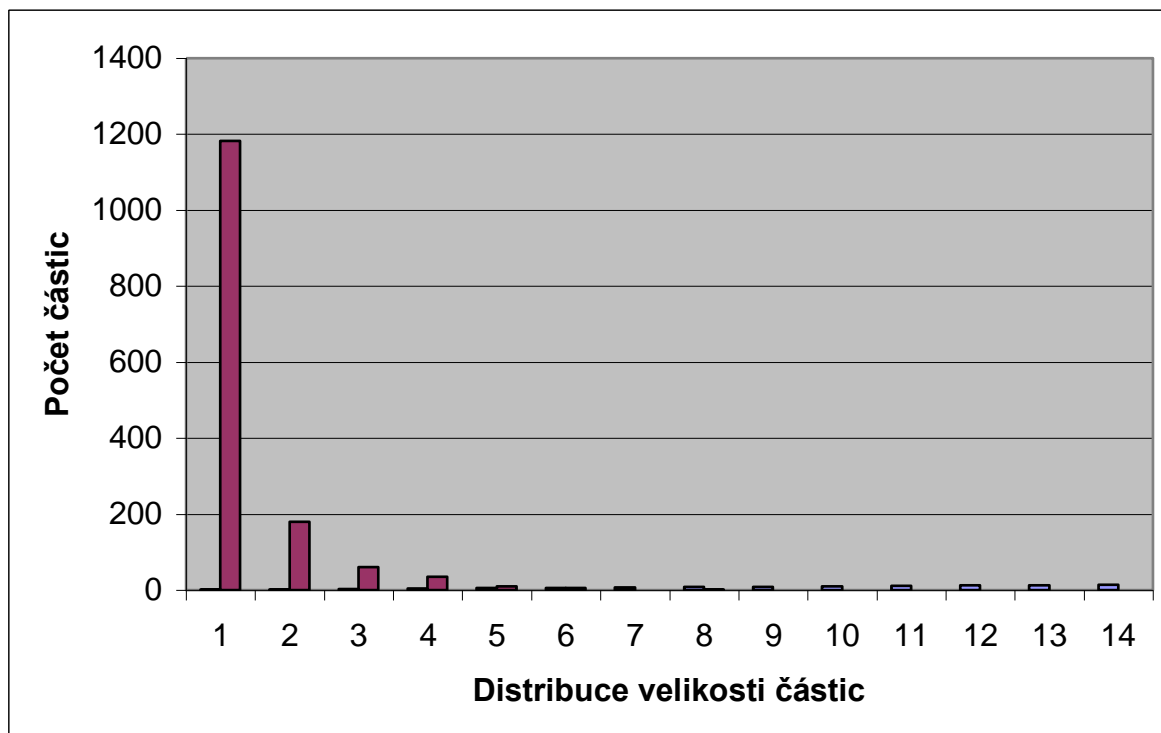
Výkon čerpadla 5%

Teplota na vstupu 110 °C

Třídy četnosti	Od	Do	Počet částic
	um	um	
1	0	5	1182
2	5	10	180
3	10	15	60
4	15	20	35
5	20	25	10
6	25	30	6
7	30	35	0
8	35	45	1
9	45	55	0
10	55	65	0
11	65	75	0
12	75	85	0
13	85	125	0
14	125	165	0

Statistické funkce: Střední průměr	
Základní jednotky	um
Minimum	1,0072
Maximum	36,1284
Průměr	4,1231
Směrodatná odchylka	3,9681
Medián	2,7821

Obr.56: Rozložení velikosti částic mannitolu- střední průměr vz.č.4 (10% mannitol)



### 3.2.5 Koncentrace mannitolu 12,5%

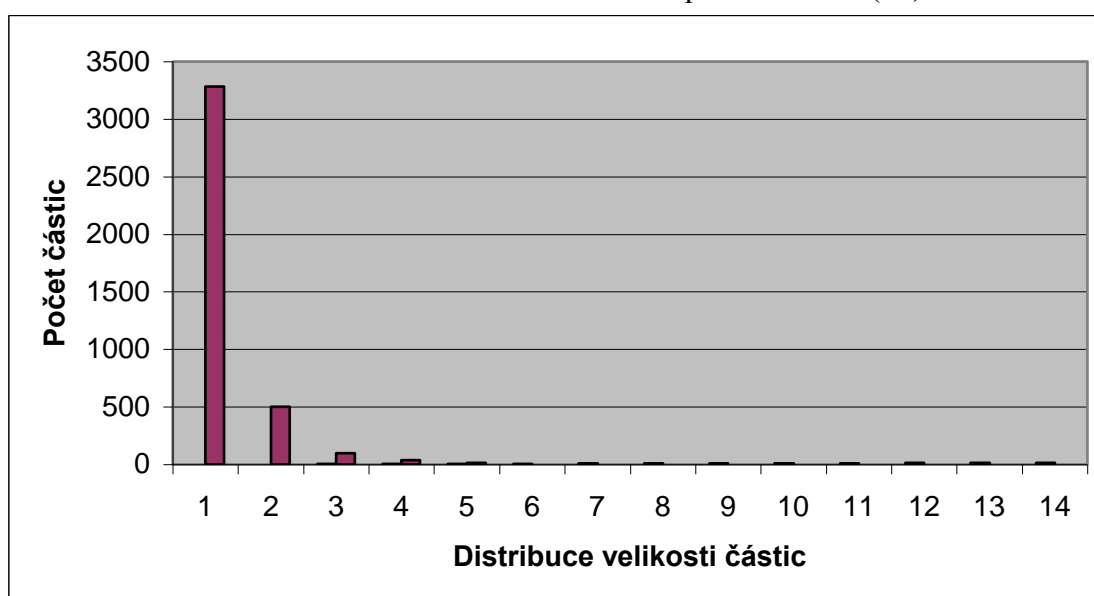
Výkon čerpadla 5%

Teplota na vstupu 110 °C

Třídy četnosti	Od um	Do um	Počet částic
1	0	5	3281
2	5	10	502
3	10	15	99
4	15	20	35
5	20	25	14
6	25	30	0
7	30	35	1
8	35	45	0
9	45	55	0
10	55	65	0
11	65	75	0
12	75	85	0
13	85	125	0
14	125	165	0

Statistické funkce: Střední průměr	
Základní jednotky	um
Minimum	0,9686
Maximum	32,2465
Průměr	3,5438
Směrodatná odchylka	2,8907
Medián	2,6822

Obr.57: Rozložení velikosti částic mannitolu- střední průměr vz.č.5 (12,5% mannitol)





### 3.2.6 Koncentrace mannitolu 15%

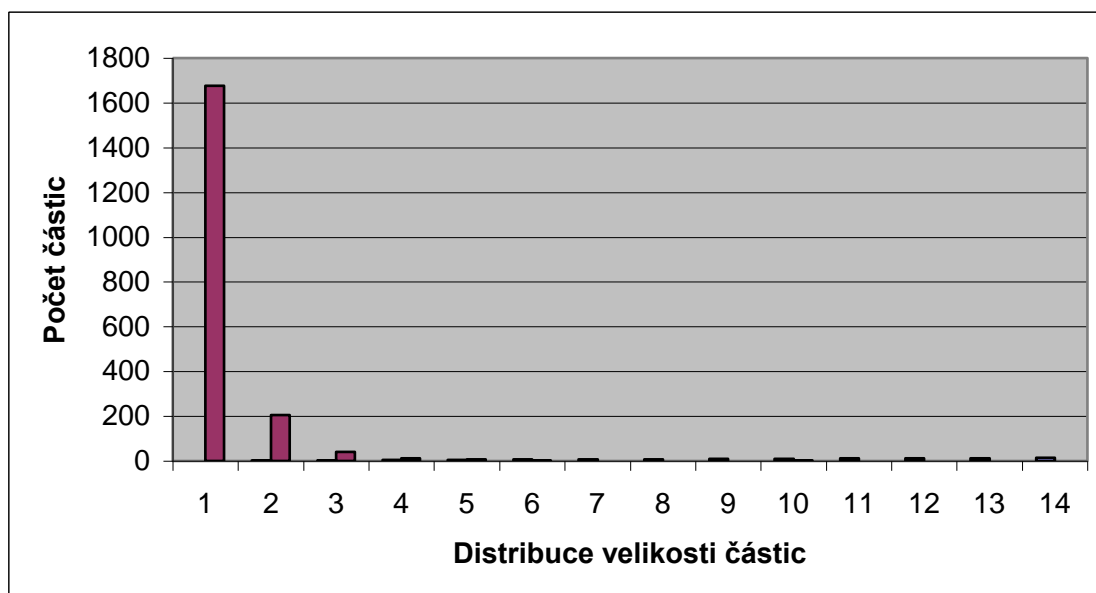
Výkon čerpadla 5%

Teplota na vstupu 110 °C

Třídy četnosti	Od um	Do um	Počet částic
1	0	5	1675
2	5	10	206
3	10	15	40
4	15	20	11
5	20	25	8
6	25	30	2
7	30	35	0
8	35	45	1
9	45	55	0
10	55	65	2
11	65	75	0
12	75	85	1
13	85	125	0
14	125	165	0

Statistické funkce: Střední průměr	
Základní jednotky	um
Minimum	0,9895
Maximum	76,5635
Průměr	3,3009
Směrodatná odchylka	3,7624
Medián	2,2939

Obr.58: Rozložení velikosti částic mannitolu- střední průměr vz.č.6 (15% mannitol)

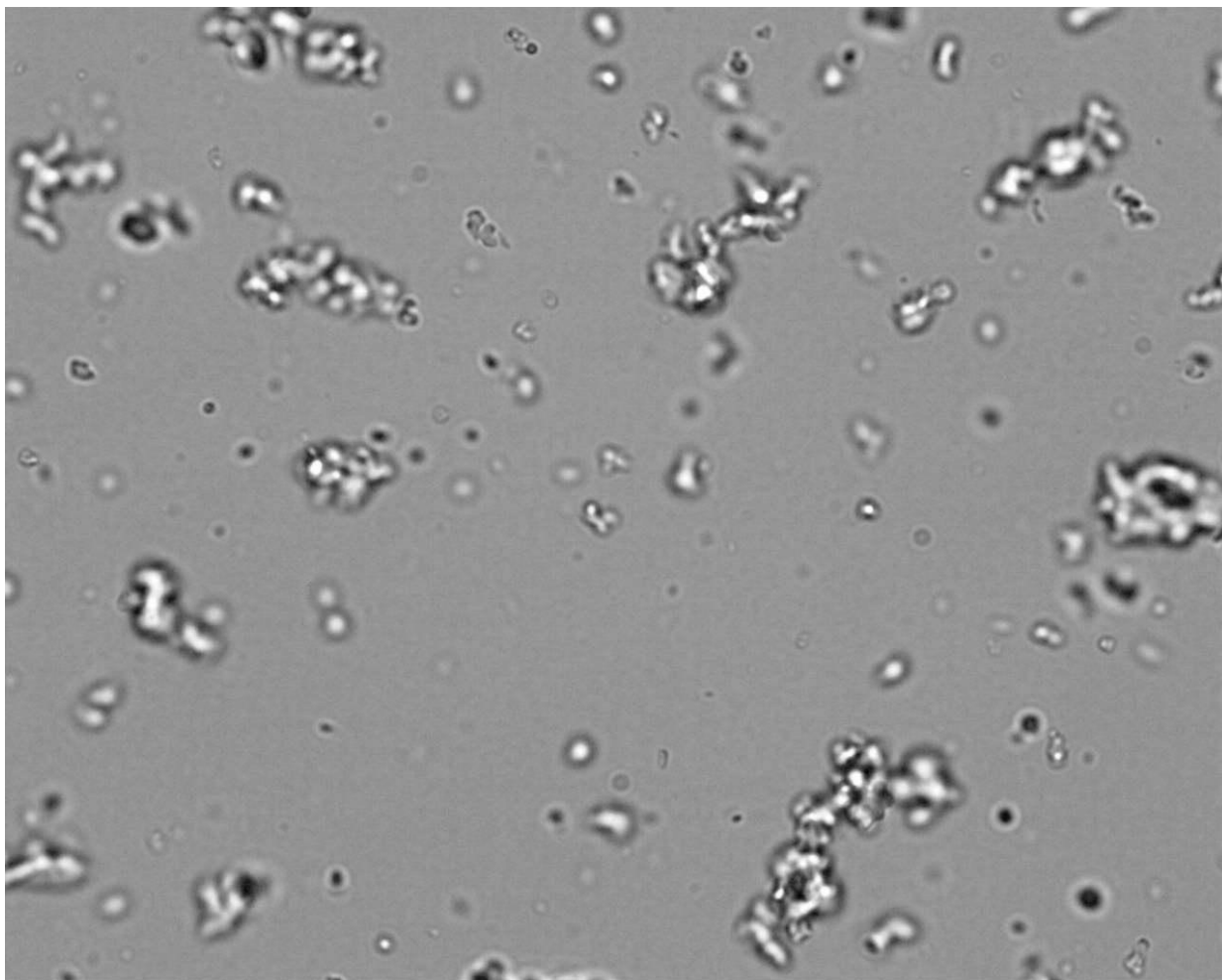


Vz.č.7 (20% mannitol) nebyl měřen mikroskopem ani sušen, protože v suspenzi rozpuštěný mannitol postupně vykrytalizoval.

### 3.3 Mikroskopická analýza obrazu počítačového programu analySIS® FIVE

#### 3.3.1 Koncentrace mannitolu 2,5%

Obr. 59: Mikročástice po sušení z 2,5% mannitolu



sušení z 2,5% vodného roztoku mannitolu

výkon čerpadla 10%

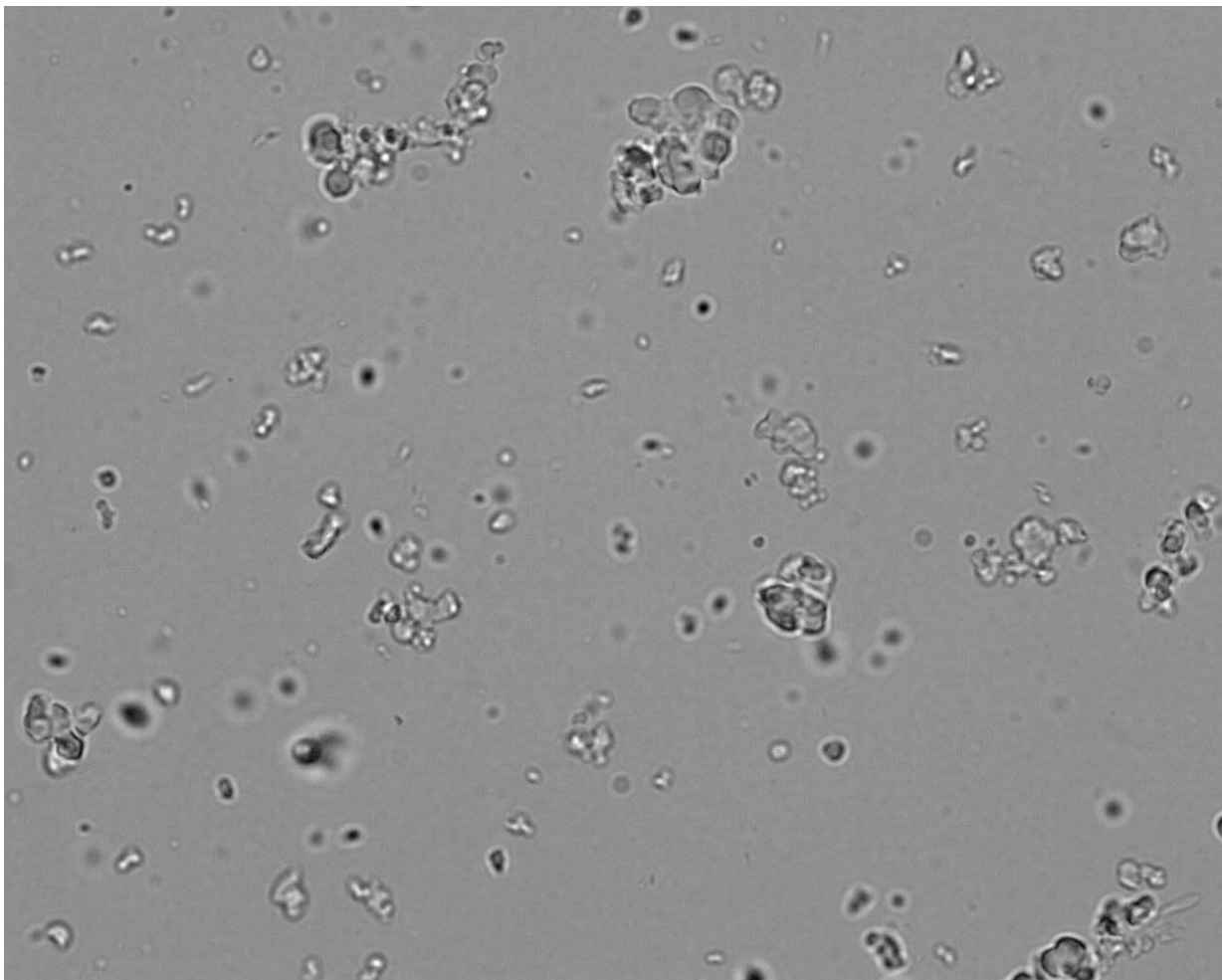
teplota na vstupu 110°C

doba expozice 20 ms

měřítko 500:1

### 3.3.2 Koncentrace mannitolu 5%

Obr. 60: Mikročástice po sušení z 5% mannitolu



sušení z 5% vodného roztoku mannitolu

výkon čerpadla 10%

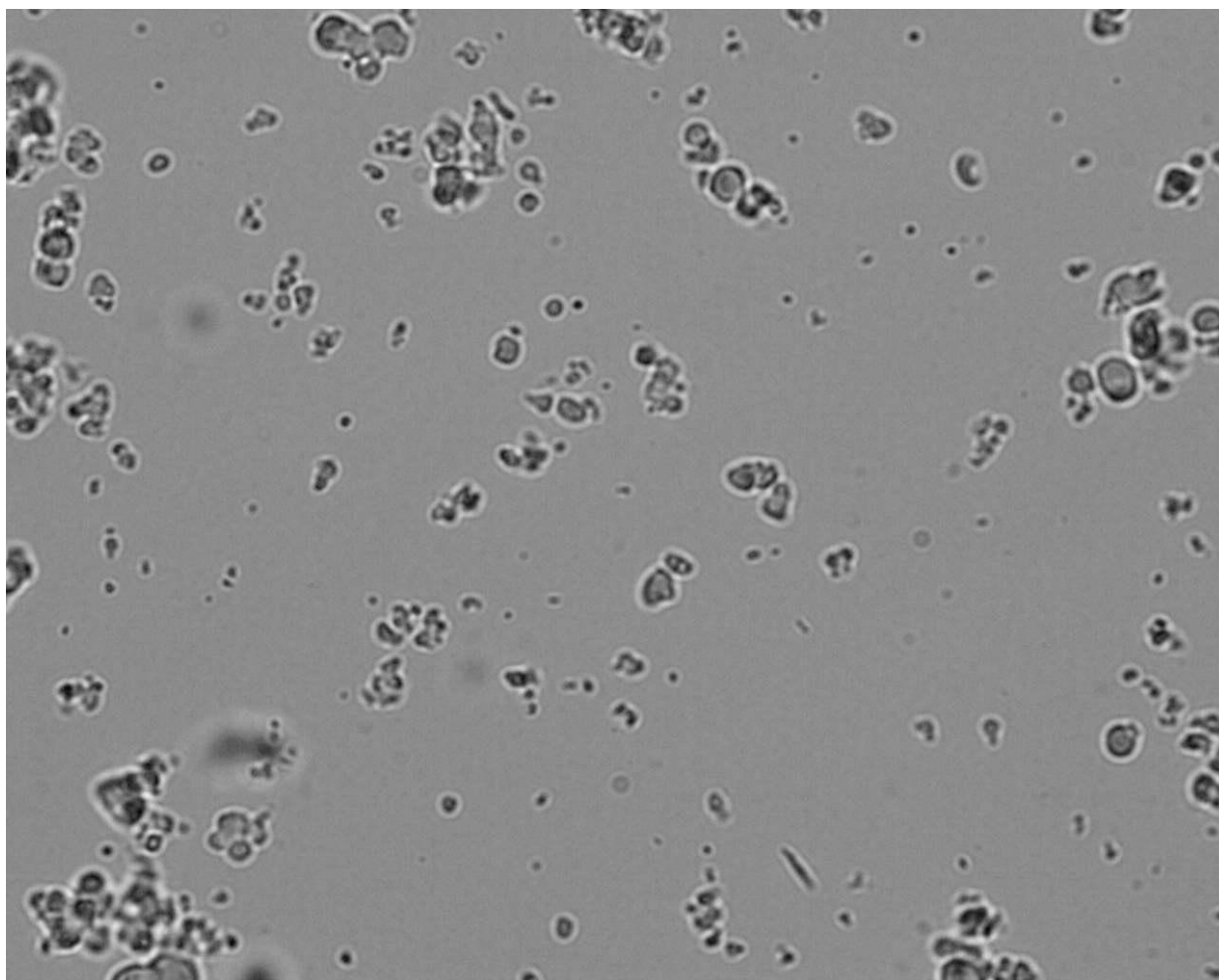
teplota na vstupu 110°C

doba expozice 20 ms

měřítko 500:1

### 3.3.3 Koncentrace mannitolu 7,5%

Obr. 61: Mikročástice po sušení z 7,5% mannitolu



sušení z 7,5% vodného roztoku mannitolu

výkon čerpadla 10%

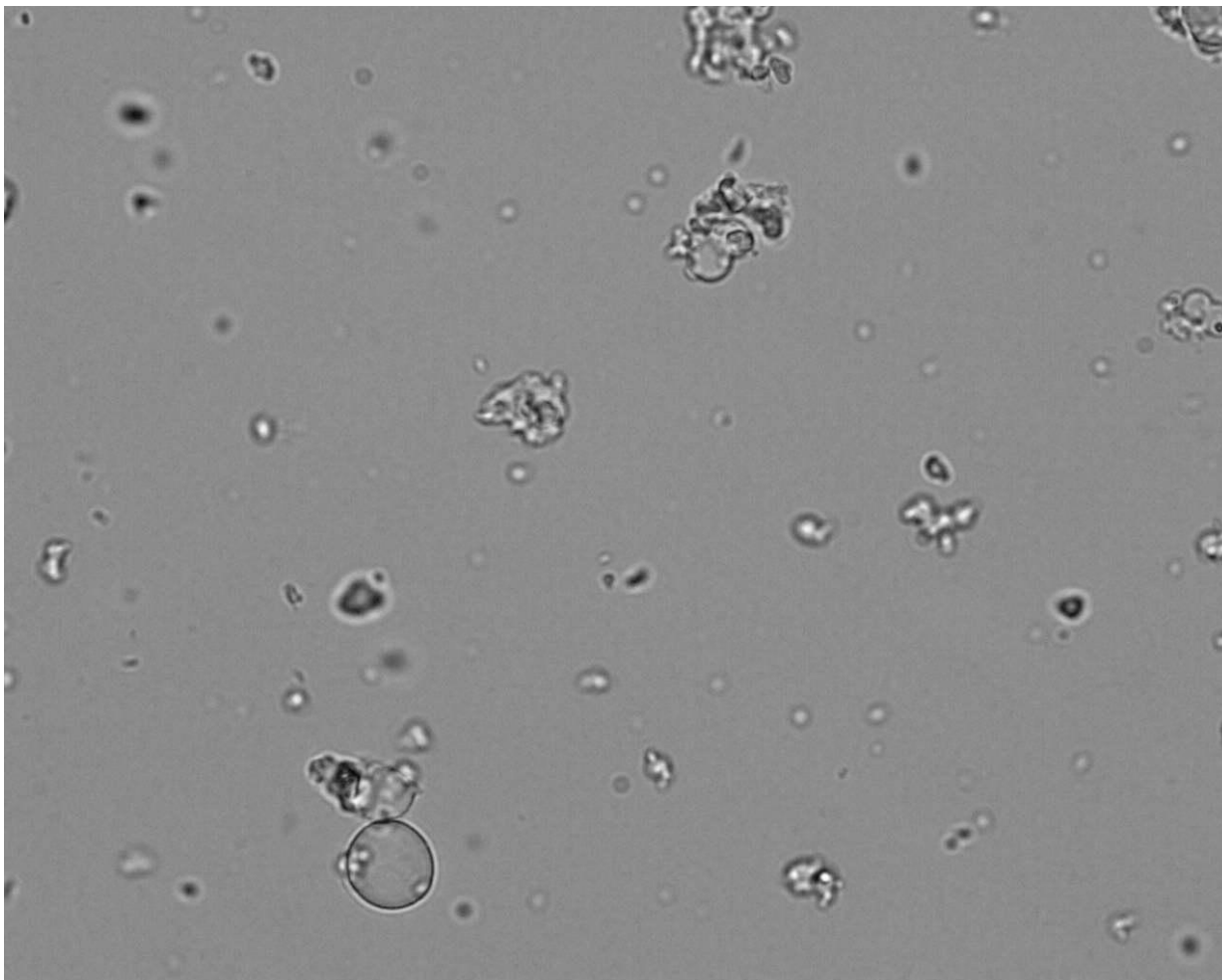
teplota na vstupu 110°C

doba expozice 20 ms

měřítko 500:1

### 3.3.4 Koncentrace mannitolu 10%

Obr. 62: Mikročástice po sušení z **10% mannitolu**



sušení z **10%** vodného roztoku mannitolu

výkon čerpadla 10%

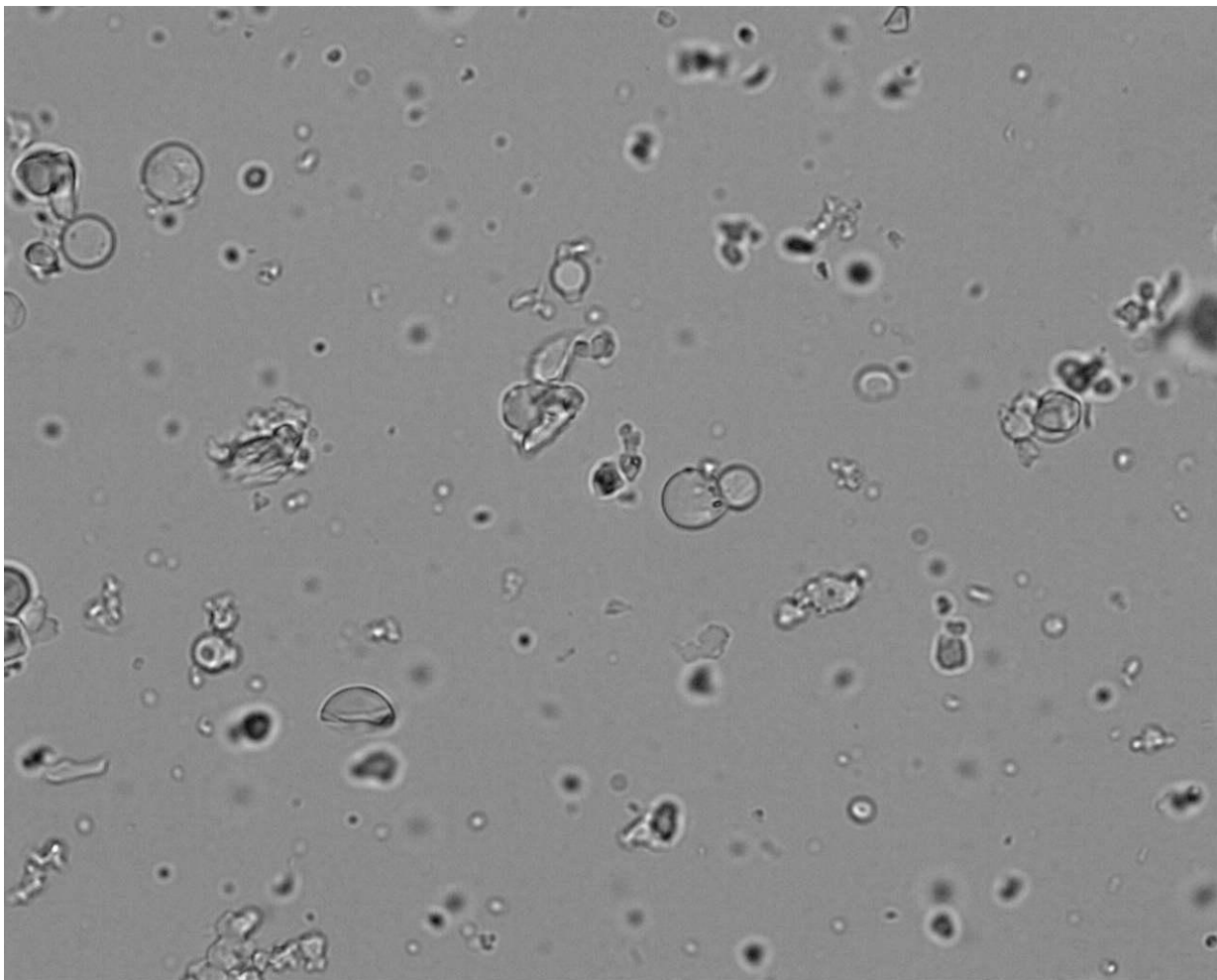
teplota na vstupu 110°C

doba expozice 20 ms

měřítko 500:1

### 3.3.5 Koncentrace mannitolu 12,5%

Obr. 63: Mikročástice po sušení z **12,5% mannitolu**



sušení z **12,5%** vodného roztoku mannitolu

výkon čerpadla 10%

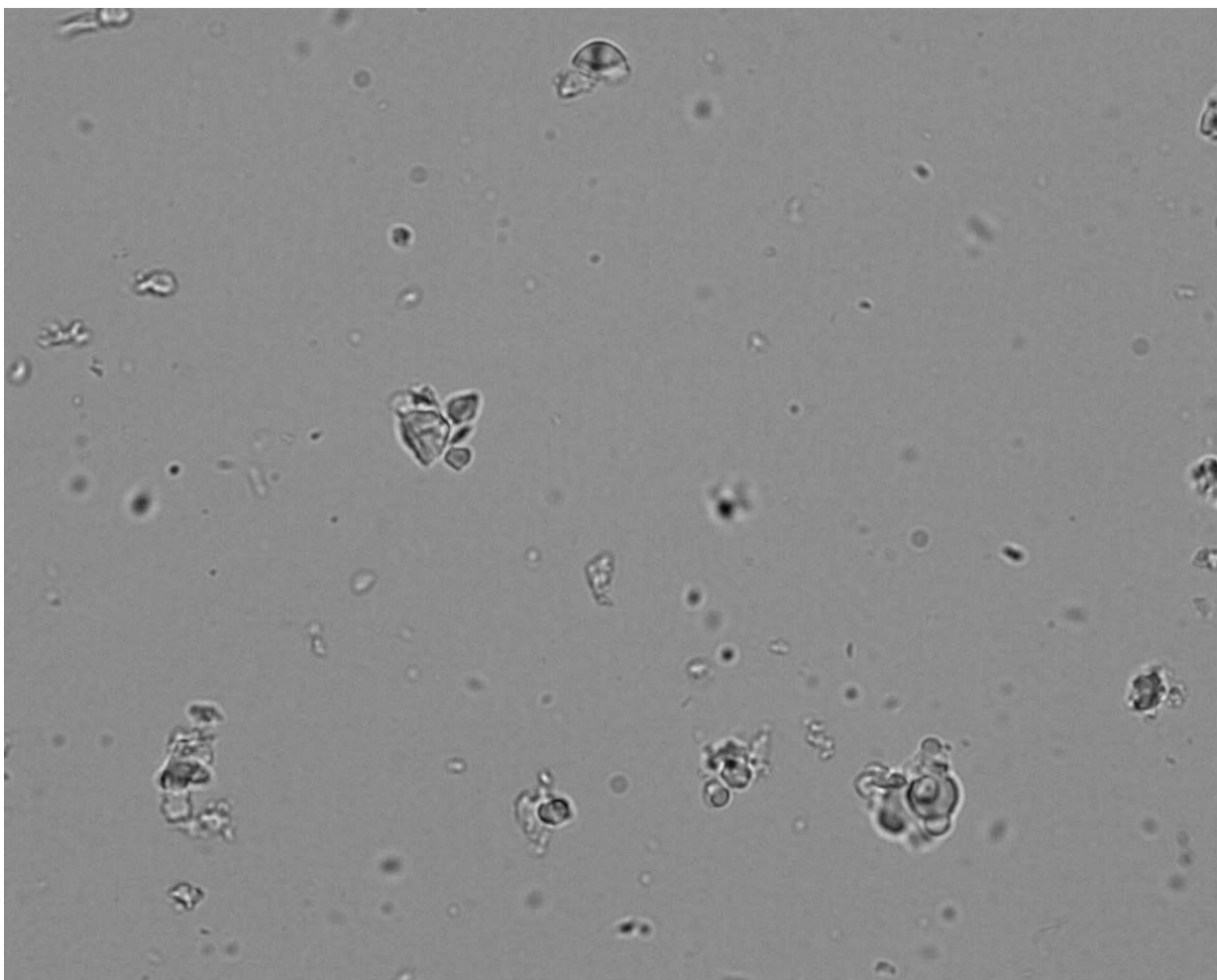
teplota na vstupu 110°C

doba expozice 20 ms

měřítko 500:1

### 3.3.6 Koncentrace mannitolu 15%

Obr. 65: Mikročástice po sušení z **15% mannitolu**



sušení z **15%** vodného roztoku mannitolu

výkon čerpadla 10%

teplota na vstupu 110°C

doba expozice 20 ms

měřítka 500:1

## 4 CÍL PRÁCE

*Cílem předložené práce bylo využít metodiku přípravy nanočástic z biodegradabilních alifatických polyesterových nosičů vypracovanou v diplomové práci. Byl uplatněn postup vycházející z dispergace roztoků nosičů v chlorovaných uhlovodících ve vodném médiu. Jako emulgátor byl využit hydrolyzát želatiny nebo směs lecitinu s polysorbátem. Připravené vzorky jsem měla za úkol proměřit z hlediska jejich velikosti a z hlediska jejich zeta potenciálu pomocí zařízení Zetasizer ZS (Malvern Instruments).*

*Metodika práce byla rozšířena o koncentrování nanodisperze reverzní dialýzou a následné sušení koncentrátu s mannitolem jako nosičem sprejovým sušením. Mikročástice takto získané byly hodnoceny mikroskopickou metodou analýzy obrazu.*



## 5 DISKUSE

### 5.1 K metodice práce

Výsledky, prezentované v předložené rigorózní práci byly získány na katedře farmaceutické technologie farmaceutické fakulty v Hradci Králové v návaznosti na diplomovou práci. Byla využita metoda založená na distribuci rozpouštědla nosiče z vnitřní olejové fáze emulze do její vnější vodné fáze a potom případně do okolní atmosféry. Hlavním přínosem diplomové práce bylo prokázání možnosti připravit nanočástice standardní velikosti z biodegradabilního lineárního oligoesteru kyseliny DL-mléčné (PDLLA). Na rozdíl od běžně využívané metody založené na turbulenci dvou neomezeně mísitelných rozpouštědel nosiče je uvedený dispergační postup možno při použití omezeně mísitelného rozpouštědla poměrně úspěšně regulovat. Pro dispergaci roztoku nosiče byl vybrán výkonný desintegrátor DiAx 900 firmy Heidolph. Přínosem bylo také nalezení vhodného složení systému pro přípravu nanočástic s rozměrem kolem 200 nm. Jako rozpouštědlo PDLLA byl s výhodou použit dichlormethan, jako emulgátor byl vhodný polyvinylalkohol s molekulovou hmotností kolem 10 000 v koncentraci 1,5 %. Hodnota zeta potenciálu byla modifikována adsorpcí chitosanu.

Pro formulaci nanočástic byla v diplomové práci obhájené v roce 2006 vybrána PDLLA, tedy nosič, který má relativně nízký stupeň bobtnání ve vodném médiu, dostatečnou hydrolytickou stabilitu a poměrně vysokou hodnotu teploty skelného přechodu. Koncentrace roztoku PDLLA byla zvolena 1%, tedy velmi nízká, aby bylo možno tuto vnitřní fázi dostatečně dispergovat.

Metodika práce byla rozšířena jednak z hlediska látkového složení studovaného systému při přípravě nanočástic, jednak z hlediska dalšího zpracování disperzního systému s nanočásticemi.

Do vnitřní fáze emulzního systému byl přidán terbinafin ve formě jeho baze.

Místo biologicky inertního polyvinylalkoholu byl využit jako emulgátor plně degradabilní hydrolyzát želatiny nebo biokompatibilní kombinace lecitinu s polysorbátem. Stálost nanodisperze byla sledována po několik hodin po její přípravě.

Koncentrace čerstvě připravených nanočástic ve vnější fázi byla několikanásobně zvýšena metodou reverzní dialýzy za použití superabsorpčního polyakrylamidového polymeru. Takto získaný koncentrát nanočástic byl obohacen mannitolem v různé koncentraci a systém byl

sušen v rozprašovací sušárně Büchi Mini Spray Dryer B-290. Uvedený postup sloužil k získání finálního produktu ve formě mannitolových mikročástic obsahujících různý podíl nanočástic.

Jednotlivé kroky výše uvedeného postupu byly monitorovány z hlediska velikosti nanočástic a jejich zeta potenciálu jako hlavních kvalitativních znaků. Bylo hodnoceno, jestli nedochází ke změnám velikosti nanočástic vlivem koncentrování jejich disperze nebo vlivem jejího sušení a následné redispergace. Mikročástice byly zhodnoceny analýzou obrazu pomocí software analySIS FIVE firmy Olympus.

## **5.2 K vlivu přítomnosti terbinafinu, zahušťování a doby uchovávání koncentráту na velikost nanočástic**

Technika zahušťování nanosuspence pomocí reverzní dialýzy byla vypracována Mgr. Evou Valentovou a Tomášem Lukšem na katedře farmaceutické technologie FaF UK. Při optimálním množství superabsorpčního polymeru byla doba této operace od 0 do 70 hodin.

V této práci byly sledovány případné změny v šesti násobném koncentráту nanočástic z hlediska velikosti nanočástic. Na obrázku 9 je distribuce velikosti částic bez terbinafinu v systému před započítím jejich koncentrování. Charakteristika je v jednotkách nm, je měřena jako intenzita rozptýleného paprsku u původního vzorku. Střední naměřená velikost částic byla 144,6 nm při unimodálním rozdělení hodnot. Ve vzorku byly nalezeny částice od 40 nm do 500 nm. Na obr. 10 je vzorek připravený s 10% terbinafinem. Naměřená hodnota byla při unimodální distribuci 152 nm, tedy vyšší. Jedná se buď o náhodný rozptyl naměřených hodnot nebo o zvětšení velikosti částic vlivem obsaženého terbinafinu.

Po koncentrování vzorku bez terbinafinu byly prokázány nanočástice s rozměrem pouhých 140,1 nm, jak je dokumentováno na záznamu v podobě tabulky 4, tedy nižší. Jedná se buď o náhodnou chybu nebo o zmenšení adsorpční vrstvy tenzidů, v daném případě lecitinu s polysorbátem.

Stav nanosuspence byl sledován v časové řadě po jejich zahuštění. Na obr. 12 až 16 je podchyceno chování šesti násobného koncentráту po dobu 26 hodin. Tato doba byla zvolena jako dostatečná z praktického hlediska dalšího zpracování koncentráту jako meziprojektu. Z časové řady hodnot je zcela zřetelné, že koncentrát je mimořádně stabilní, do 6. hodiny

hodnoty evidentně kolísají mezi 152 a 160 nm. Po 26 hodinách uchovávání při obyčejné teplotě (obr. 16) se projevil vytvoření frakce patrně micelárních částic mezi 10 a 20 nm.

### **5.3 K vlivu přítomnosti hydrolyzátu želatiny na velikost nanočástic**

Hydrolyzát želatiny je směs molekul proteinů a peptidů pocházejících z hovězího kolagenu o střední molekulové hmotnosti několik tisíc. Jedná se o biodegradabilní biokompatibilní tenzid.

Na obrázku 17 je doloženo, že hydrolyzát želatiny použitý v 1% koncentraci je pro stabilizaci nanosystému v pokročilé fázi jeho zahušťování po jeho dispergaci nepoužitelný. Amfolytické molekuly hydrolyzátu patrně interagují a amfolytickým lecitinem a dochází ke spojování nanočástic do velkých shluků, které není možno redispergovat. Totéž bylo prokázáno po zvýšení koncentrace hydrolyzátu na 2 % (obr. 18).

Použití hydrolyzátu želatiny primárně již při dispergaci roztoku nosiče s léčivem bylo možno hodnotit jako úspěšné opatření (obr. 19). Byly nalezeny nanočástice se středním rozměrem 195 nm s frakcí micel s velikostí kolem 20 nm.

### **5.4 K vlivu koncentrace mannitolu při sušení na velikost redispergovaných nanočástic**

Připravený koncentrát nanočástic, jehož stabilita byla prokázána, byl smísen s mannitolem. Tento nosič využitelný pro přípravu mikročástic sprejovým sušením byl využit v šesti různých koncentracích, od 2,5% do 15%. Výsledky měření velikosti nanočástic podrobených procesu koncentrování, rozpouštění mannitolu, sprejového sušení a následného rozpouštění mikročástic za dispergace nanočástic jsou na obrázcích 20 až 25. bylo prokázáno, že v dané řadě jsou nejvýhodnější středně nižší koncentrace mannitolu, tedy 5% a 7,5%. V těchto vzorcích byly prokázány nanočástice kolem 130 nm. Při 2,5% koncentraci byly nanočástice největší, měly rozměr 169 nm (obr. 20). Při použití mannitolu v 10%, 12,5% a 15% koncentraci měly nanočástice rozměr kolem 150 nm (obr. 23 až 25).

## 5.5 Ke stabilitě disperze nanočástic po jejich přípravě

Byly připraveny nanočástice s 10% terbinafinem standardním postupem za použití směsi lecitinu a polysorbátu. Tyto nanočástice byly dlouhodobě sledovány z hlediska změn jejich velikosti. V této sérii měření byla hodnocena nejen možnost agregace částic, ale i jejich případné výraznější botnání. Doba sledování byla 70 hodin.

Vzorek nanočástic měřený těsně po jejich přípravě je na obr. 26. Distribuce velikosti nanočástic je unimodální. Jejich střední rozměr je 169 nm. Na dalších obrázcích č. 27 až č. 32 je patrné, že velikost nanočástic se výrazně nemění. Distribuce velikosti je také prakticky stejná po celou dobu hodnocení, tedy až do 70. hodiny po přípravě.

Zajímavé je snížení velikosti nanočástic po jejich sprejovém sušení s 10% mannitolem a následné redispergaci. Nanočástice měly menší rozměr, byla naměřena hodnota 140 nm (obr. 33). Jako další pozoruhodnou okolnost je možno hodnotit zvýšení rozptylu velikosti částic v obou směrech. Bylo prokázáno více nanočástic pod 30 nm a velmi malý podíl velkých mikročástic s rozměrem mezi 1 a 2  $\mu\text{m}$ .

Hodnota zeta potenciálu byla záporná, v čase kolísala mezi -52 mV a -65 mV, jak je dokumentováno v tabulce 1 a na obr. 34. Změny hodnot zeta potenciálu patrně zachycují náhodné vlivy, trend ve změnách nebyl patrný, což se týká také změn velikosti nanočástic (obr. 34).

## 5.6 Ke stabilitě disperze zahuštěných nanočástic

V této sérii pokusů byla nanosuspenze hodnocena analogicky jako v X.4. Rozdíl byl v koncentrování systému. Nanodisperze byla koncentrována ve dvou vzorcích, u jednoho bylo koncentrování přes noc (na 12hod) přerušeno, u druhého vzorku koncentrování pokračovalo i přes noc. Z hodnot na obr. 35 až 41 a také ze souhrnného vyjádření na obr. 43 je patrné, že v rámci kolísání mezi 155 nm a 169 nm nedocházelo k systematickým změnám velikosti nanočástic. Také hodnota zeta potenciálu byla relativně neměnná, pohybovala se v rozmezí hodnot -55 mV a -74 mV.

Za pozornost stojí vliv sušení a redispergace nanočástic na vznik frakce velmi malých nanočástic s rozměrem kolem 10 nm (na obr. 42). Vlivem mannitolu patrně dochází ke vzniku micel tvořených tenzidy. Obdobný jev u sušeného a redispergovaného vzorku byl zaznamenán také v případě nekonzentrovaného systému (na obr. 33).

Velmi obdobná situace jako ve výše popsaném případě je na obr. 44 až 50. Rozdíl byl v tom, že šesti násobné koncentrování systému bylo realizováno v jedné fázi, v časovém intervalu 0 hodin až 70 hodin. Porovnáním distribuce velikosti nanočástic v řadě vzorků na obr. 35 až 41 a v řadě na obr. 44 až 50 je možno dojít k závěru, že průběh operace zahušťování nemá vliv na změnu velikosti nanočástic. Také zeta potenciál uvedený v tabulce 3 nejevil známky postupné systematické změny.

Na obr. 51 je již potřetí potvrzen vliv sušení 10% mannitolového roztoku a redispergace sprejově sušených nanočástic na vznik micel.

Parametry nanočástic po 70 hodinách uchování jsou v tabulce 4. U hodnot velikostí je jasné, že se neprojevil vliv zpracování, hodnotu nižšího zeta potenciálu by bylo nutno potvrdit opakovaným měřením v dlouhodobější studii.

## **5.7 K velikosti sprejově sušených mannitolových mikročástic**

V šesti násobném koncentrátu nanočástic byl rozpuštěn mannitol v pěti různých koncentracích. Kapalina byla standardním způsobem sušena ve sprejové sušárně. Při analýze obrazu byl využit postup přípravy preparátů a vyhodnocování dat vypracovaný Mgr. E. Valentovou a P. Sedláčkem.

Na obr 53 a v připojené tabulce je rozložení velikosti mannitolových mikročástic obsahujících oligoesterové medikované nanočástice. Mikročástice byly připraveny sušením 2,5% roztoku. Většina mikročástic (přibližně 80 %) je ve velikostní třídě do 5 $\mu$ m, což je na hranici rozlišení světelného mikroskopu. Z obr. 59 je možno usoudit na nepravidelný tvar vzniklý patrně sekundárním shlukováním.

Po zvýšení koncentrace mannitolu na dvojnásobek (5,0 %) bylo rozložení velikosti částic obdobné (obr. 54 a připojená tabulka). Tvar se lišil. Částice byly více pravidelné (obr.60).

Sušením 7,5% roztoku mannitol byly získány mikročástice nepříliš výrazně větší (obr.55 a tabulka). Byly poměrně pravidelné (obr. 61), největší z nich měly kolem 40  $\mu$ m. Také z 10% roztoku mannitol byly získány velmi malé mikročástice s 80% podílem velikostní třídy nejmenších (obr. 56) a s poměrně pravidelným tvarem (obr.62). Totéž platí pro mikročástice z 12,5% roztoku mannitolu (obr.57 a 63).

Patrně vyšší viskozita 15% roztoku mannitol měla za následek získání vzorku, ve kterém byla kromě silně zastoupené frakce velmi malých částic frakce větších v rozmezí od 55  $\mu$ m do 85

$\mu\text{m}$  (obr. 58). Tvar částic však byl relativně pravidelný. Z tohoto výsledku je možno předpokládat, že maximální využitelná koncentrace mannitol je přibližně 15 %.

## 6 ZÁVĚRY

Z původních výsledků dosažených v rámci této rigorózní práce je možno vyvodit závěry o možnosti využití metody reverzní dialýzy pro několikanásobné zvýšení koncentrace nanočástic v systému, jehož složení je dáno podmínkami přípravy těchto nanočástic.

Koncentrovaný koloidní systém obsahující medikované nanočástice z alifatických oligoesterů je dostatečně stabilní v původním složení po přípravě i v koncentrovaném stavu. Nejméně 3 dny se parametry velikosti částic nemění.

Hodnota zeta potenciálu je dostatečná v původním systému i v systému po koncentrování disperze nanočástic.

V koncentrované disperzi nanočástic je možno rozpouštět mannitol až do 15% koncentrace.

Mannitol při sprejovém sušení přebírá funkci nosiče nanočástic pro získání mikročástic vyhovující velikosti a tvaru. Parametry enkapsulovaných oligoesterových nanočástic po jejich redispergaci v hydrofilním médiu budou předmětem navazujících studií.

## 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) M. Chalabala et. Al., *Technologie léků*, Galén, Praha 2001, 225-228
- 3) 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
- 4) 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
- 5) J. Panyam and V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug. Del. Rev.*, 2003, 329-347
- 6) 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
- 7) 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
- 8) M.P. Murphy and R.A. Smith, Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41 (2000), 235–250
- 9) R. Gref, Y. Minamitake, Biodegradable long circulating nanospheres. *Science*, 1994, 263: 1600-1603
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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

- 13) E. Valentová , Characterization of particulate systems containing gentamicin sulfate, University of Navarra, Pamplona, Spain, 2004, 16-18
- 14) M. Liz-Marzán and V. Kamat, Nanoscale materials, Kluwer Academia Publ. Boston, 2003, 136-205
- 15) Jan Švihovec, Pharmindex kompendium 2001, MediMedia information, spol.s.r.o., 2001, 947-949
- 16) Size Theory, firemní manuál, Zetasizer ZS, Malvern instruments
- 17) Zeta potenciál Theory, firemní manuál, Zetasizer ZS, Malvern instruments
- 18) Sheu, T.Y., Rosenberg, M.: Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems, J. Food Sci. 60(1), 1995, 98-103
- 19) Niro A-S, Soeborg, Dánsko,  
[http://www.niro.com/ndk\\_website/NIRO/CMSResources.nsf/filenames/GB\\_Spray\\_Drying.pdf/\\$file/GB\\_Spray\\_Drying.pdf](http://www.niro.com/ndk_website/NIRO/CMSResources.nsf/filenames/GB_Spray_Drying.pdf/$file/GB_Spray_Drying.pdf)
- 20) Dziezak, J.D.: Microencapsulation and encapsulated ingredients, Food Technology 42 (4), 1988, 136-148
- 21) Masters, K.: Spray Drying Handbook (5th ed.), Longman Scientific & Technical, London 1991
- 22) Traub, Darren A.: Spray Dryers, Part 1, Bensenville, USA, 2001,  
[http://www.process-heating.com/CDA/Articles/Drying\\_Files](http://www.process-heating.com/CDA/Articles/Drying_Files)
- 23) microBelcaps s.a., Liège, Belgie,  
<http://www.microbelcaps.com/spraydrying.html>
- 24) Krok za krokem analySIS, *manuál k programu analySIS<sup>®</sup> FIVE*, Soft Imaging System GmbH, Münster, Německo