

Příprava mikro a submikro struktur biodegradabilních polyesterů a jejich charakterizace

Bc. Vendula Spálovská

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Vendula Spálovská
Osobní číslo: T12373
Studijní program: N2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí
Forma studia: prezenční

Téma práce: Příprava mikro a submikro struktur
z biodegradabilních polyesterů a jejich
charakterizace.

Zásady pro vypracování:

1. Provést rešerši na dané téma.
2. Pokusit se připravit a charakterizovat mikro a submikro částice různých struktur z různých biodegradovatelných polyesterů.
3. V závislosti na časových možnostech se pokusit enkapsulovat bioaktivní látku do polymerní matrice mikročástic.
4. Zpracovat výsledky experimentů do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Články v odborných periodících dostupných databázích Web of science, Scopus případně dalších.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petr Stloukal, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Romar Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koptný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ...*VEKDULA JPA'LOVČA'*..... Obor:*CIITM-ZP*.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně*12. 5. 2014*.....

.....*J. Lovča'*.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

1. Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.
2. Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.
3. Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

3. Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

1. Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.
2. Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.
3. Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo testování enkapsulace steroidních hormonů, (β -estradiol, progesteron, kortizon-21 acetát a hydrokortizon) do mikro a submikročásteček připravených ze dvou typů nízkomolekulárního polykaprolaktonu (PCL), lišících se svou molekulovou hmotností, metodou odpaření rozpouštědla. U připravených částic byl sledován vliv výchozího materiálu, enkapsulované látky a podmínek přípravy na velikost částic a účinnost enkapsulace. Byly připraveny dvě série částic, u první byla použita ultrasonifikace během emulgace u druhé nikoli. Podařilo se připravit částice kulovitěho tvaru o rozměrech přibližně 500 μm . Účinnost enkapsulace se pohybovala v širokém rozmezí od 2%, ve vodě nejvíce rozpustného steroidu Hydrocortisonu, až po 100% u ve vodě méně rozpustných steroidů.

Dalším bodem byla příprava expandovaných mikročástic z poly (butylen adipát-co-tereftalátu) (PBAT), známějšího spíše pod komerčním názvem Ecoflex, metodou odpaření rozpouštědla. U této studie byl opět sledován vliv procesních parametrů a podmínek jako jsou rychlost míchání při emulzifikaci, koncentrace stabilizátoru emulze ve vodné fázi, poměr rozpouštědlo/nadouvadlo a koncentrace polymeru na velikost a distribuci částic a jejich morfologii. Byly vytvořené částice s průměrnými velikostmi v rozmezí od 2 do 20 μm . Připravené částice byly dále testovány pro sorpci bisfenolu A. Hmotnost adsorbovaného bisfenolu A byla přibližně v množství okolo 0,09 mg na 1 mg porézních částic.

Klíčová slova: mikročástice, enkapsulace, metoda odpaření rozpouštědla, expandovatelné částice, porézní částice, příprava mikročástic, biopolymery, polykaprolakton (PCL), PBAT.

ABSTRACT

The aim of diploma thesis was firstly to test the encapsulation of steroid hormone (β - estradiol, progesterone, cortisone 21 - acetate, and hydrocortisone) into micro and submicroparticles prepared by the oil in water solvent evaporation technique from two types of low molecular weight polycaprolactone (PCL) differing in their molecular weight. The effect of type of material, kind of incorporated substance and preparation conditions on the final particle size and encapsulation efficiency was investigated. Two series of particles were prepared; in the first serie ultrasonification was used during the emulsification while in second it was not. Particles with size approximately about 500 micrometers with spherical shape were achieved. The efficiency of encapsulation was in the broad range from 2 % for steroid hydrocortisone, which is relatively easy soluble in water, to 100 % for less water soluble steroids.

Secondly the possibilities of preparation of expanded microparticles from poly (butylene adipate -co- terephthalate) (PBAT) better known under the commercial name rather Ecoflex, by the modified solvent evaporation technique was studied. In his part the effect of process parameters and conditions such as stirring speed during emulsification, the concentration of emulsion stabilizer in the aqueous phase, the ratio of solvent and blowing agent and the polymer concentration on the size and distribution of particles and their morphology was studied. The particles with average sizes in the range from 2 to 20 μm were achieved. The prepared porous particles were also tested for the sorption of bisphenol A. Weight of adsorbed bisphenol A was approximately about 0.09 mg to 1 mg of the porous particles.

Keywords: microparticles, encapsulation, oil in water solvent evaporation method, expanded particles, porous particles, preparation of microparticles, biopolymers, polycaprolactone (PCL), PBAT.

Děkuji svému vedoucímu práce panu Ing. Petru Stloukalovi Ph.D. za vedení, trpělivost a čas který mi věnoval a dále svým rodičům, rodině a přátelům za podporu při studiu.

Motto:

Účelem vzdělání není zaplnit mysl, ale ověřit ji. Čím více poznatků si osvojíme, tím více si uvědomujeme, co ještě neznáme.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

OBSAH	9
ÚVOD	11
I. TEORETICKÁ ČÁST	13
1 POLYMERNÍ MIKRO A SUBMIKRO ČÁSTICE A JEJICH CHARAKTERIZACE	14
1.1 STRUKTURA MIKRO A NANOČÁSTIC	14
2 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	16
2.1 POLYKAPROLAKTON (PCL)	19
2.2 POLY (BUTYLEN ADIPÁT-CO-TEREFTALÁT) (PBAT)	20
3 METODY PŘÍPRAVY ČÁSTIC	22
3.1 METODA ODPAŘENÍ ROZPOUŠTĚDLA	22
3.1.1 SYSTÉM O/W	23
3.1.2 SYSTÉM S/O/W	24
3.1.3 SYSTÉM O/O	24
3.1.4 SYSTÉM W/O/W	24
3.2 NANOPRECIPITACE ČÁSTIC	25
3.3 METODA EMULGACE S DIFUZÍ ROZPOUŠTĚDLA	25
3.4 METODA VYSOLOVÁNÍ	25
3.5 FORMULAČNÍ PROMĚNNÉ PARAMETRY PŘI PŘÍPRAVĚ ČÁSTIC	26
4 PŘÍPRAVA MIKROČÁSTIC Z PCL METODOU ODPAŘENÍ ROZPOUŠTĚDLA	27
4.1 SYSTÉM O/W, S/O/W	27
4.1.1 ENKAPSULACE KAPSAICINU DO PCL ČÁSTIC SYSTÉMEM O/W	27
4.1.2 ENKAPSULACE A-TOKOFEROLU (VITAMÍN E) SYSTÉMEM O/W S POUŽITÍM ULTRASONIFIKACE	27
4.1.3 ENKAPSULACE FLUDROKORTIZONU ACETÁTU SYSTÉMEM O/W	28
4.1.4 ENKAPSULACE P-NITROANILINU A RHODAMINU SYSTÉMEM S/O/W	28
4.1.5 ENKAPSULACE NORCANTHARIDÁTU DISODNÉHO SYSTÉMEM S/O/W	29
4.1.6 ENKAPSULACE MELARSOPROLU SYSTÉMEM S/O/W	29
4.2 SYSTÉM W/O/W	30
4.2.1 PŘÍPRAVA PCL ČÁSTIC BEZ ENKAPSULACE SYSTÉMEM W/O/W A SLEDOVÁNÍ Vlivu PROCESNÍCH PROMĚNNÝCH PARAMETRŮ	30
4.2.2 ENKAPSULACE HOVĚŽÍHO SÉROVÉHO ALBUMINU SYSTÉMEM W/O/W	30
4.2.3 ENKAPSULACE ANTIKONCEPČNÍCH HORMONŮ SYSTÉMEM W/O/W	31
4.2.4 ENKAPSULACE BSA SYSTÉMEM W/O/W	31

5	METODY PŘÍPRAVY EXPANDOVATELNÝCH ČÁSTIC.....	35
5.1.1	PŘÍPRAVA PORÉZNÍCH ČÁSTIC Z PLA METODOU ODPAŘENÍ ROZPOUŠTĚDLA SYSTÉMEM O/W	35
5.1.2	PŘÍPRAVA PORÉZNÍCH ČÁSTIC Z PLA METODOU W/O/W S HYDROGEN ULHIČITANEM AMONNÝM JAKO POROGENEM.....	36
5.1.3	PŘÍPRAVA PORÉZNÍCH ČÁSTIC KOMBINACÍ METODY ODPAŘENÍ ROZPOUŠTĚDLA A METODY VYPLAVOVÁNÍ ČÁSTIC S PARAFÍNEM JAK POROGENEM	37
II.	PRAKTICKÁ ČÁST	38
6	MATERIÁLY A METODY PŘÍPRAVY ČÁSTIC	39
6.1	MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	39
6.1.1	MATERIÁL.....	39
6.1.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	39
6.1.3	PŘÍPRAVA ROZTOKU PVA	40
6.1.4	PŘÍPRAVA ROZTOKU 10% METHANOLU	40
6.2	METODY PŘÍPRAVY	41
6.2.1	PŘÍPRAVA PCL ČÁSTIC SE STEROIDY	41
6.2.2	PŘÍPRAVA PORÉZNÍCH ČÁSTIC	44
6.3	CHARAKTERIZACE ČÁSTIC	45
6.3.1	VELIKOST ČÁSTIC	45
6.3.2	SEM.....	46
6.3.3	ÚČINNOST ZAPOUZDŘENÍ ENKAPSULOVANÉ LÁTKY (EE)	46
6.3.4	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ STEROIDU V ČÁSTICÍCH SL	48
6.3.5	SORPČNÍ SCHOPNOST PORÉZNÍCH ČÁSTIC	48
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
7.1	PCL ČÁSTICE A ENKAPSULACE STEROIDNÍCH LÁTEK.....	49
7.1.1	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC	49
7.1.2	STANOVENÍ ÚČINNOSTI ENKAPSULACE EE STEROIDŮ V POLYMERU POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE	52
7.1.1	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP	57
7.2	EXPANDOVANÉ ČÁSTICE	57
7.2.1	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC	57
7.2.2	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP	66
7.3	SORPČNÍ SCHOPNOST PORÉZNÍCH ČÁSTIC	68
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	79
	SEZNAM TABULEK.....	81

ÚVOD

Mikro, submikro a nanočástice našly v posledních letech široké využití v mnoha oblastech lidské činnosti jako je zdravotnictví, zemědělství a environmentální technologie. V medicíně se polymerní mikročástice využívají k cílenému transportu léčiva, které je začleněno do polymerní struktury. Velkou výhodou při enkapsulaci léčiv do polymerní matrice je kontrolované uvolňování enkapsulované látky. Léky se uvolňují z mikročástic vyluhováním z polymeru nebo degradací polymerní matrice, přičemž se polymery rozkládají na lépe odstranitelné monomery. Biologické snášenlivosti je dosaženo použitím přírodních polymerů, jako jsou celulóza, chitin, chitosan nebo polymerů vyrobených z přirozeně se vyskytujících monomerů, jako je kyselina mléčná a kyselina glykolová. Polymery vyrobené ze syntetických monomerů také vykazují dobré vlastnosti, nicméně mohou být pro organismus toxické, proto se spíše volí biodegradabilní a biokompatibilní polymery.

Názorným příkladem možnosti využití enkapsulace látek mohou být antikoncepční hormony, které se v dnešní době běžně objevují v odpadních vodách ve vysokých koncentracích, které mnohdy není schopna daná čistírna odpadních vod odstranit, tyto hormony jsou pak vypouštěny do recipientu a dále do životního prostředí. Některé výzkumy prokázaly narušenou hormonální aktivitu savců, ptáků, plazů, ryb a měkkýšů. Zvýšená koncentrace je způsobena neoptimálním dávkováním těchto hormonů, kdy aktivní látka není zcela tělem vstřebána a odchází ven spolu s močí. Optimálním dávkováním, jakým je řízené kontrolované uvolňování pomocí mikročástic, bychom mohli snížit koncentrace těchto látek v odpadních vodách na minimální množství.

Obdobně lze využít mikročástice v zemědělství pro enkapsulaci pesticidních látek jako jsou herbicidy, fungicidy, insekticidy a další. Takto formovaný systém s postupným uvolňováním může zabránit nežádoucím jevům spojeným s běžnou aplikací agrochemikálií. Polymerní matrice částice pak chrání pesticid před degradací vnějšími vlivy. Zároveň se z ní uvolní dostatečné množství pesticidu, které je účinné, ale současně není toxické pro zemědělské plodiny. Tímto omezíme množství pesticidních látek dodávaných do půdy a jejich únik do vody a životního prostředí. Zvolením biorozložitelného polymeru dosáhneme i rozkladu samotného polymeru, který se enzymatickým působením mikroorganismů postupně rozkládá na monomery, podějí na CO₂, vodu a biomasu. Polymerní matrice není oproti pesticidům toxická, tudíž nejen že polymer chrání enkapsulovanou látku před vnějšími vlivy, ale také působí jako „obal“ který chrání samotného uživatele a lze tak s částicemi lépe manipulovat.

Dále je možné využívat různé strukturní modifikace částic k dosažení požadovaných vlastností, jako jsou např. částice s porézní strukturou. Vzniklá pórovitá struktura zvyšuje specifický povrch částic, na který lze sorbovat různé chemické látky, ale také jej lze využít pro přichycení buněk ve tkáňovém inženýrství. Biodegradabilní polymery, jako je polykaprolakton, se pro svou dobrou biokompatibilitu a pomalou biodegradaci obvykle používají pro přípravu porézní kostry pro přichycení a růst buněk.

Nanomateriály lze také použít pro sanaci v životním prostředí. V oblasti sanace životního prostředí, nanomateriály nabízejí potenciál pro efektivní odstranění znečišťujících látek a biologických kontaminantů. Nanomateriály různých tvarů, jako jsou například nanočástice či vlákna, fungují jako adsorbenty a katalyzátory, jejich kompozity s polymery se používají pro detekci a odstranění plynů (SO_2 , CO , NO_x , *atd.*), znečišťujících chemikálií (arsen, železo, mangan, dusičnany, těžké kovy, *atd.*), organických polutantů (alifatické a aromatické uhlovodíky) a biologických látek, jako jsou viry, bakterie a antibiotika. Nanomateriály vykazují lepší výkon při sanaci životního prostředí než jiné konvenční techniky.

Dále lze využít nanočástice pro úpravu pitné vody a průmyslových odpadních vod znečištěných toxickými ionty kovů, radionuklidy, organickými a anorganickými rozpuštěnými látkami, bakteriemi a viry.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERNÍ MIKRO A SUBMIKRO ČÁSTICE A JEJICH CHARAKTERIZACE

Termín mikročástice je používán pro kulovité částice s průměrem v řádech mikrometrů (od 1 μm do 1 000 μm). Částice o rozměrech v řádu stovek nanometrů jsou označovány často jako submikročástice. Částice, které jsou pak menší než 100 nm se nazývají nanočástice. Částice větší než mikročástice v řádech až několik milimetrů jsou nazývány pelety [1].

Polymerní mikročástice jsou obvykle tvořeny polymerní maticí, ve které může být imobilizováno menší množství účinné aktivní látky [2].

Mikročástice jsou pro nás zajímavé díky svým vlastnostem. Jsou tedy vhodné pro mikrozapouzdření: s řízeným uvolňováním zapouzdřených materiálů, pro ochranu zapouzdřených materiálů proti degradačním reakcím vnějšího prostředí (např. oxidace, dehydratace, UV záření, vliv teploty, kyselin a zásad), a dále pro maskování organoleptických vlastností zapouzdřeného materiálu (barva, chuť, vůně). Mikročástice jsou významné svou snadnou manipulací (výsledný produkt je prášek). Do mikročástic lze enkapsulovat různé druhy materiálů jako jsou léky, proteiny, potraviny, pesticidy a herbicidy [2].

Mikročástice lze také využít jako sorbenty a to tak, že změnou procesních parametrů při výrobě vytvoříme póry, které zvýší specifický povrch částice a tudíž i plochu, na níž lze adsorbovat různé látky z vod a půdy.

1.1 Struktura mikro a nanočástic

Pokud jde o enkapsulaci účinné látky existují dvě různé kategorie mikročástic a to: mikrosféry (resp. mikrokuličky) a mikrokapsle (resp. mikrotobolky) [2].

U mikrokapslí lze rozlišit jádro od obalu, kdy na jádro, bývající většinou v kapalně či plynné formě, přiléhá polymerní obal. Tedy u mikrokapslí je většinou účinná látka uvnitř kapsle, ale může být i adsorbována na jejím povrchu. Naopak u mikrosfér jádro od obalu nelze rozlišit. U mikrosfér může být látka absorbována buď na povrch částice, nebo zapouzdřena do jejich struktury [1,2]. Strukturu nanočástic popisuje obr.1.



Obr. 1 Struktura nanočástic [2]

V bioanalytických stanoveních nanočástice dále rozdělujeme do dalších strukturních typů a to na: kvantové tečky, dendrimery, kovové a polovodičové nanočástice, a magnetické nanočástice. Kvantové tečky jsou krystalické nanočástice z polovodičového materiálu, na jehož povrchu jsou proteiny nebo krátké segmenty DNA. Spojením těchto částic s biomolekulou vzniká fluorescenční sonda, využívaná při monitorování interacelulárních procesů. Dendrimery se skládají z mnoha větví (dendronů) pravidelně umístěných kolem centrálního jádra. Využití dendrimerů spočívá v diagnostice, jako kontrastní látka při zobrazení měkkých tkání. Kovové a polovodičové nanočástice mají výborné optické a magnetické vlastnosti. Magnetické nanočástice obsahující magnetit (Fe_3O_4) jsou používány např. pro magnetické navádění léčiv nebo při magnetickém rezonančním zobrazování. Jsou pokryty polymerní vrstvou, aby nedošlo k adsorpci proteinů na povrch [3].

2 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Biodegradabilní polymery je skupina polymerních materiálů, které podléhají rozkladu vlivem působení mikroorganismů za vzniku oxidu uhličitého, vody, biomasy v případě aerobních podmínek nebo za vzniku oxidu uhličitého, methanu, vody a biomasy v případě anaerobních. V dnešní době existuje velké množství biodegradabilních polymerů, které se využívají v lékařství, zemědělství, i v potravinářství. Mikročástice mohou být vyrobeny z mnoha různých výchozích materiálů, a to jak přírodních tak syntetických, různými technikami přípravy. Biodegradabilních polymery jsou nejčastěji děleny na přírodní a syntetické [4]. Přírodní i syntetické polymery umožňují přípravu nesmírně rozmanitých mikročástic, pokud jde o velikost, distribuci velikosti, složení, chemii povrchu, topografii a morfologii [5].

Jako přírodní polymery označujeme biopolymery vytvořené v přírodě v růstovém cyklu organismů. Jejich syntéza obecně zahrnuje enzymy katalyzované polymerační reakce, které probíhají obvykle v buňkách působením komplexních metabolických procesů [4].

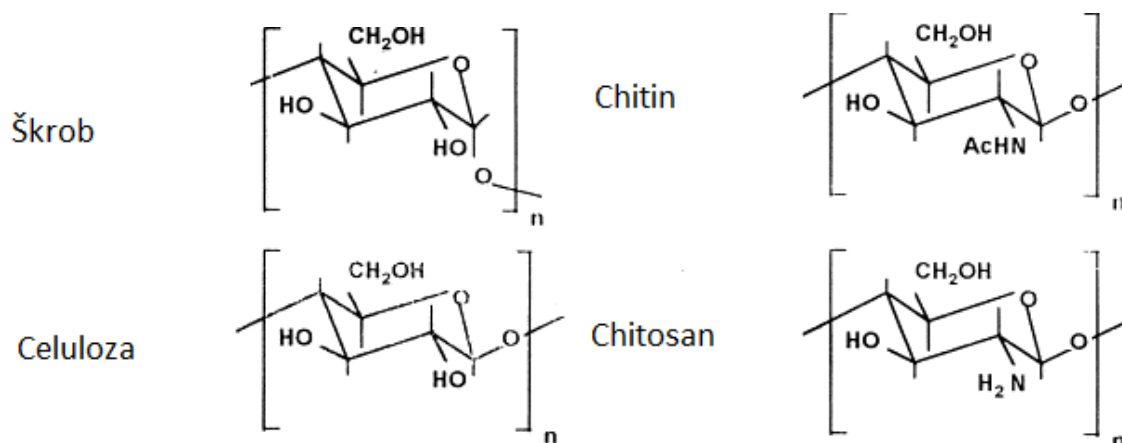
Mezi přírodní polymery patří:

- **polysacharidy** (celulóza, škrob, chitin): jsou to polymery obsahující více než jednu sacharidovou jednotku, v mnoha případech mají pravidelně uspořádanou rozvětvenou strukturu. Strukturu některých polysacharidů popisuje obr.2.

Škrob - je polymer, který se vyskytuje v rostlinách, hlavně v bramborách, kukuřici a rýži. Obecně platí, že lineární polymer (amylosa) tvoří asi 20% hmotnostních procent, a rozvětvený polymer (amylopektin) zbytek. Amylosa je krystalická a může mít průměrnou molekulovou hmotnost až 500 000 g/mol, je dobře rozpustná ve vroucí vodě, naopak amylopektin je ve vroucí vodě nerozpustný. Škrob je široce používán jako surovina ve výrobě balících fólií a zemědělských mulčovacích fólií. Škrob se používá již mnoho let jako přísada do plastů pro různé účely. Bývá přidáván i jako plnivo, výrobky se škrobem jako plnivem jsou pak snadněji rozložitelné pro mikroorganismy [4].

Celulóza – od jiných polysacharidů produkovaných rostlinami se liší svým řetězcem, který je velmi dlouhý a skládá se z jedné opakující se jednotky (celobióza). Celulóza je vysoce krystalická s vysokou molekulovou hmotností, je nerozpustná a netavitelná. V současné době se využívá acetát celulózy pro různou škálu aplikací od vláken, přes fólie, ke vstřikovaným polymerům [6].

Chitin a chitosan - Chitin je makromolekula nacházející se v krunýřích krabů, humrů, krevet a hmyzu. Skládá se z 2-acetamid-2-deoxy- β -D-glukózy. Chitinová vlákna se používají pro výrobu umělé kůže a vstřebatelných stehů. Chitin je nerozpustný ve vodě a materiály z něj jsou biokompatibilní a antimikrobiální, mají i schopnost absorbovat ionty těžkých kovů. Deriváty chitinu mohou být také použity jako nosiče léčiv[4].



Obr. 2 Struktury polysacharidů [4]

- **polypeptidy** (želatina, vlna, hedvábí, kolagen) : jsou to bílkoviny, které z větší části nejsou rozpustné ani tavné (platí především pro vláknité proteiny jako vlna, hedvábí a kolagen). Všechny proteiny jsou specifické kopolymery s pravidelnými uspořádání různých typů α -aminokyselin.

Želatina – živočišná bílkovina skládající se z 19 aminokyselin spojených peptidovými vazbami. Želatina je rozpustná ve vodě, biologicky odbouratelná s rozsáhlým průmyslovým, farmaceutickým a biomedicínským využitím, pro mikroencapsulaci různých léků) a přípravu biologicky rozložitelných hydrogelů. Želatina může být také využita pro přípravu fólie na bázi umělé kůže, které by mohly přilnout k otevřené ráně a chránit ji před ztrátou tekutin a vznikem infekcí [4].

- **bakteriální polyestery (poly-(β -hydroxybutyrát))**: Přírodní polyestery, které jsou produkovány řadou různých bakterií jako intracelulárních produkty.

Poly-(β -hydroxybutyrát) (PHB), je vysoce krystalický s teplotou tání 180 ° C a vysokou teplotou skelného přechodu T_g . Biodegradace PHB a jeho kopolymerů byla zkoumána v půdách, aktivovaném kalu a mořské vodě [7].

Mezi syntetické biodegradabilní polymery patří:

- **polyestery** - alifatické polyestery s vysokou molekulovou hmotností
Poly (glykolová) kyselina (PGA) - je nejjednodušší lineární, alifatický polyester. PGA a její kopolymer poly (glykolová kyselina-*co*-kyselina mléčná) (PGA / PL) se používají pro rozložitelné a vstřebatelné stehy. Jejich velkou výhodou je jejich rozložitelnost jednoduchou hydrolyzou esterových vazeb ve vodném prostředí, jako mohou být tělesné tekutiny. Produkty rozkladu jsou nakonec metabolizovány na oxid uhličitý a vodu, nebo jsou vylučovány ledvinami [8].
- **poly (ϵ -kaprolaktonu) (PCL)** – je používán jako matrice v systémech s řízeným uvolňováním léčiva. PCL je obvykle připraven polymerací za otevření kruhu (tzv. ring-opening polymerizace) ϵ -kaprolaktonu. PCL může být degradován enzymaticky [4].
- **poly (vinylalkohol) (PVA)** - je nejvíce snadno biologicky odbouratelný vinylový polymer. Je snadno degradovatelný v odpadní vodě a aktivovaných kalech. PVA může tvořit komplexy s řadou sloučenin, a může být použit při detoxikaci organismu. PVA byl rovněž použit jako polymerní nosič pro pesticidy a herbicidy [6].
- **kyselina polymléčná (PLA) a její kopolymery**, jsou biokompatibilní a biodegradabilní materiály vykazující dobré mechanické vlastnosti a zvýšenou odolnost k vnějšímu prostředí [8]. PLA je řazena do skupiny lineárních alifatických polyesterů. Je ze všech nejpoužívanější, v těle degraduje za vzniku kyseliny mléčné, která se z těla snadno vylučuje [6]. Kopolymery kyseliny polymléčné se hydrolyticky štěpí na kratší řetězce alkoholů a kyselin [7].

Nanočástice mohou být připraveny buď přímo z předem vytvořeného syntetického polymeru nebo z přírodních polymerů [2]. Jsou to materiály které se dostatečně rychle odbourají z organismu bez negativních vedlejších účinků. Jako přírodní materiály se nejvíce používá kolagen, celulóza, želatina a chitin, buď v čisté nebo částečně upravené podobě nebo v podobě derivátů (chitin, celulóza). Ze syntetických materiálů se v současnosti využívá kyselina polymléčná a její kopolyestery, kyselina polyglykolová, polykaprolakton a polyuretany [8].

V této práci jsem se zabývala přípravou částic ze dvou biodegradabilních materiálů, které jsou popsány podrobněji níže.

2.1 Polykaprolakton (PCL)

Poly(ϵ -kaprolakton) PCL je syntetický polyester, který díky přítomnosti esterových vazeb ve svých makromolekulách může být snadno depolymerizován, asimilován a následně mineralizován různými druhy mikroorganismů jako jsou bakterie, plísně, kvasinky nebo houby běžně se vyskytující v přírodě. PCL se biologicky rozkládá během několika měsíců až několik let v závislosti na molekulové hmotnosti, stupni krystalinity polymeru a podmínkách degradace. Oproti jiným polymerům využívajících ve zdravotnictví PCL degraduje mnohem pomaleji a to v řádech až několika let (2-4 roky). Polykaprolakton (PCL) je vlastnostmi i chemicky velmi podobný kyselině polymléčné a polyglykolové [8].

PCL je stejně jako kyselina polymléčná řazen mezi lineární alifatické polyestery, je to biologicky odbouratelný polyester s nízkou teplotou tání kolem $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotou skelného přechodu asi $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dobře rozpustný. Při pokojové teplotě je PCL vysoce rozpustný v chloroformu, dichlormethanu, tetrachlormethanu, benzenu, toluenu, cyklohexanonu a 2 - nitropropan; naopak špatně je rozpustný v acetonu, 2 - butanonu, ethylacetátu, dimethylformamidu a acetonitrilu; a nerozpustný v alkoholech, petroletheru, diethyletheru ve vodě [6].

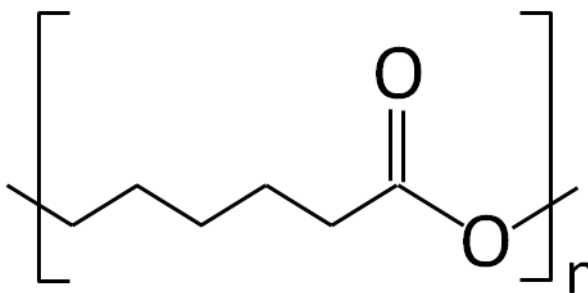
Polykaprolakton je důležitý polymer pro své mechanické vlastnosti, mísitelnost s velkou řadou jiných polymerů a biologickou rozložitelnost. PCL je hydrofobní, semikrystalický polymer, jehož krystalinita má tendenci s rostoucí molekulovou hmotností klesat. PCL je mísitelný s mnoha jinými polymery (jako je například poly (vinyl chlorid), poly (styren - akrylonitril), poly (akrylonitril - butadien - styren), poly (bisfenol -A), a ostatní polykarbonáty, nitrocelulózy a butyrát celulózy) a dalšími [9]. Některé z charakteristických vlastností PCL jsou uvedeny v tab. 1., chemická struktura polykaprolaktonu je zobrazena na obr. 3.

Existují dva postupy pro výrobu polykaprolaktonu a to: polykondenzace z kyseliny hydroxykarboxylové (kyselina 6-hydroxyhexanová), a polymerace s otevřením laktonového kruhu (ϵ -kaprolaktonu). Polykondenzace je klasická ekonomicky nenáročná metoda, její nevýhodou je nízký výtěžek a relativně nízká molekulová hmotnost vzniklého polymeru. Naopak polymerací za otevření kruhu můžeme syntetizovat vysokohmotnostní polyestery s požadovanými vlastnostmi a proto je tato polymerace více používána [9].

Od 70. let 20. století se polykaprolakton začal zkoumat jako potenciální materiál pro biomedicínské využití, a to především pro kontrolované uvolňování léčiv.

Tab. 1 Vlastnosti polykaprolaktonu (PCL)

Vlastnosti	Rozsah
Molekulová hmotnost M_w	530-630 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Hustota ρ	1,071-1,200 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
Teplota skelného přechodu T_g	(-65)-(-60) $^{\circ}\text{C}$
Teplota rozkladu	350 $^{\circ}\text{C}$
Pevnost v tahu σ	4,785 Mpa



Obr. 3 Chemická struktura polykaprolaktonu

2.2 Poly (butylen adipát-co-tereftalát) (PBAT)

Poly (butylen adipát-co-tereftalát) známý také pod komerčním názvem Ecoflex je biologicky odbouratelný aromatický kopolyester na bázi monomerů 1,4-butandiolu, kyseliny adipové a kyseliny tereftalové. Chemická struktura PBAT je zobrazena na obr. 4. Za standardních podmínek se PBAT rozkládá působením mikroorganismů na své základní monomery, které jsou nakonec mineralizovány až na CO_2 , vodu a biomasu. PBAT má vysokou molekulovou hmotnost a má podobné vlastnosti jako nízkohustotní polyethylen (LDPE). Folie z tohoto materiálu jsou odolné vůči přetržení, vodě a změnám teploty. Hustota tohoto materiálu se pohybuje až do $1,4 \text{ g/cm}^3$, teplota tání je v rozmezí od 100 do 120°C [10,11].

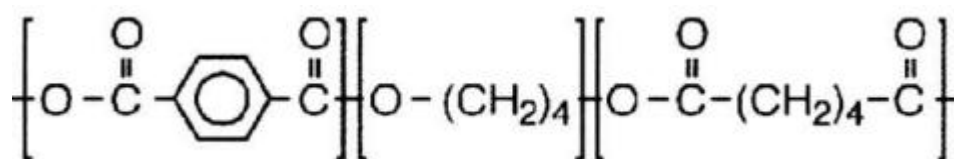
PBAT se využívá pro výrobu obalových folií, zemědělských mulčovacích folií, kompostovatelných tašek pro organický kuchyňský odpad [12]. Je svařitelný a vhodný pro

styk s potravinami, proto se využívá pro obalové folie a pro výrobu kelímků a krabic pro rychlé občerstvení [10].

Jako biodegradabilní plast splňuje požadavky kladené na kompostovatelné pytle, což zahrnuje konkrétně odolnost fólie vůči vodě, dále dobu, po kterou zůstává pytel stabilní vzhledem k organickému odpadu a bezproblémové zpracování v kompostárně. Nejvíce lze Ecoflex využít při výrobě kompostovatelných pytlů na organický odpad, fólií pro zemědělské účely a domácnosti, obalového materiálu, a v neposlední řadě obalové materiály a nádoby na bázi škrobu (např. tácky, kelímky) pro rychlého občerstvení a catering [12].

Ve vyzrálém kompostu se folie z PBAT rozkládají při 58 °C za 14 dní více než z 50 %. Mulčovací fólie vyrobené z biodegradabilního materiálu je možno po sklizni jednoduše zaorat společně se zbytky rostlin do země, kde se fólie postupně zcela rozloží [11].

Materiál byl také testován k výrobě mikro a submikročásteček použitelných v různých oblastech lidské činnosti, jako příklad je uvedena příprava částic v práci [13].



Obr 4 Chemická struktura materiálu PBAT [12]

3 METODY PŘÍPRAVY ČÁSTIC

Metody přípravy mikro a nanočástic lze rozdělit do dvou hlavních skupin, a to podle toho zda příprava částic vyžaduje použití polymerizační reakce nebo zda máme již daný polymer vytvořený [14].

Při volbě vhodné metody pro přípravu mikro a nano částic se řídíme fyzikálně-chemickými vlastnostmi látky, kterou chceme enkapsulovat a vlastnostmi polymerního materiálu. V závislosti na jejich vlastnostech pak můžeme vybrat nejvhodnější metodu pro dosažení účinného zachycení požadovaného množství látky [14].

Mezi jednu z nejpoužívanějších fyzikálně mechanických metod přípravy mikročástic z již připraveného polymeru patří metoda odpaření rozpouštědla. Tato metoda je velmi oblíbená, díky snadné proveditelnosti a pro svou přístrojovou nenáročnost. Výsledným produktem při této metodě jsou pak mikrosféry [15]. Výhodou této metody je vysoká účinnost zapouzdření. Hlavní nevýhodou je použití organických rozpouštědel [14].

Metoda odpaření rozpouštědla včetně jejich modifikací a další metody využívané při přípravě mikro a nanočásti z již připraveného polymeru jsou blíže popsány v následujících bodech. Všechny tyto metody mají stejný základní princip, a to že je nejprve vytvořen vhodný emulzní systém, z něhož se pak vhodným způsobem odstraní rozpouštědlo a dojde k vysrážení polymerních částic.

3.1 Metoda odpaření rozpouštědla

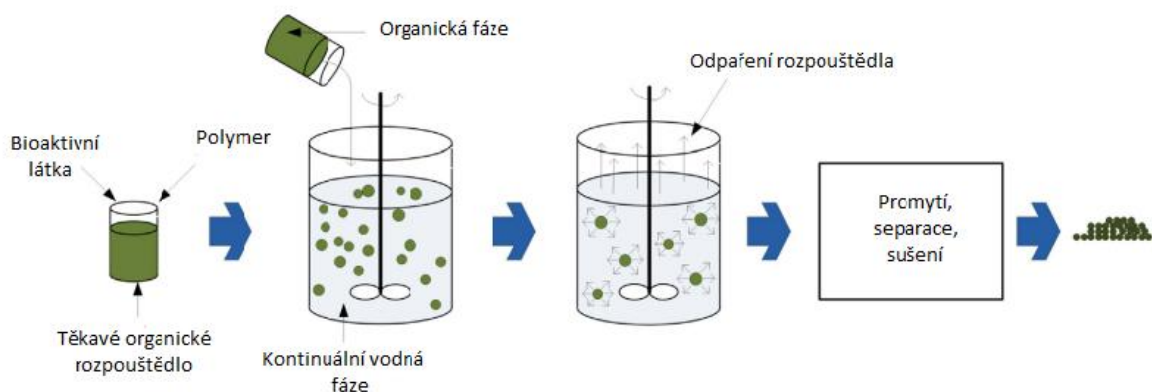
Tato metoda je nepoužívanější metoda pro přípravu mikročástic do nichž se enkapsuluje účinná léčivá látka či jiná aktivní látka. Princip metody spočívá v odpaření rozpouštědla, které obsahuje rozpuštěné nebo dispergované léčivo a polymer. Během odpařování rozpouštědla se z rozpuštěného polymeru formují částice, které do své struktury současně uzavírají léčivo nebo jinou látku, kterou chceme enkapsulovat v daném polymeru. Základní princip této metody lze rozdělit do několika kroků. V prvním kroku je polymer rozpuštěn v rozpouštědle, které nelze mísit s vodou. V roztoku polymeru je následně rozpuštěna nebo dispergována látka kterou chceme uzavřít v polymeru. Následuje vznik lipofilní (olejové) fáze, která je poté emulgována pomocí vysoko rychlostního míchání a/nebo ultrazvuku do kontinuální vodné fáze obsahující vhodný stabilizátor. Při tomto kroku vzniká jemná emulze O/W, kde O je označení pro olejovou fázi (někdy též nazývána organickou fází) a W pro fázi vodnou. Organické rozpouštědlo se v posledním kroku odpařuje na rozhraní voda/vzduch, jeho

úbytkem a vlivem míchání se z polymeru formují mikročástice. Vzniklé částice se následně separují různými způsoby, jako např. filtrací nebo liofilizací [15].

Existuje několik modifikací metody odpaření rozpouštědla, které se používají v závislosti na rozpustnosti enkapsulované látky ve vodě. Tyto modifikace jsou popisovány jako tzv. systémy, které se skládají z emulze ze dvou a více fází. Každý tento systém však obsahuje tzv. vnitřní fázi, ve které je zpravidla rozpuštěn polymer a vnější kontinuální fáze, která zabraňuje rychlému odpaření rozpouštědla.

3.1.1 Systém O/W

V tomto systému se mísí organická (olejová) fáze, kterou je polymer rozpuštěný v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou, s kontinuální vodnou fází obsahující stabilizátor emulze. Emulzifikací pak vzniká emulze O/W (olej ve vodě) dvou vzájemně nemísitelných fází, kdy je organická fáze s rozpuštěným polymerem rozptýlena ve formě drobných kapiček. Při odpařování rozpouštědla se pak z těchto kapiček vysrážením vytváří částice, do jejichž struktury se případně enkapsuluje rozpuštěná či rozptýlená aktivní látka. Tento systém je vhodný především pro enkapsulaci látek obtížně rozpustných ve vodě [16]. Jednoduché schéma přípravy je zobrazeno na obr.5.



Obr. 5 Schéma přípravy částic metodou odpaření rozpouštědla systémem O/W [5]

Příklad využití tohoto systému je uveden v práci [16], kde byly připravovány částice z PLA s enkapsulovaným metazachlorem což je herbicidní pesticid. Postup byl následující: PLA bylo rozpuštěno v chloroformu spolu s metazachlorem za vzniku olejové fáze. Jako vodná fáze sloužil roztok želatiny, která sloužila jako stabilizátor emulze. Směs obou fází se dále dispergovala při vysokých otáčkách (11 000 – 18 000) po dobu 5 minut za stálého chlazení, aby nedošlo k předčasnému odpaření rozpouštědla. Vzniklá emulze byla dále vystavena ultrazvuku za použití ultrazvukové sondy. Po ultrasonifikaci bylo rozpouštědlo odpařováno za

sníženého tlaku při stálém míchání. Vzniklé částice byly odděleny centrifugací a dekantací promyty. Následně byly částice zmrazeny a lyofilizovány [16].

Obdobnou metodou byly připraveny částice i v této diplomové práci, a to jak v přípravě PCL částic s enkapsulovanými steroidními látkami, tak při přípravě expandovatelných PBAT (Ekoflex) částic.

3.1.2 Systém S/O/W

Tento systém přípravy částic je obdobný jako u systému O/W. Jediný rozdíl spočívá v tom, že aktivní látka (léčivo) je málo rozpustné až nerozpustné v organické (olejové) fázi, a proto je rozptýleno v roztoku pevné formě v podobě malých částic. Aktivní látka musí být tedy již předem nadrcena či namleta na velmi jemný prášek.

3.1.3 Systém O/O

Systém O/O je další modifikací metody odpaření rozpouštědla kdy je oproti systému O/W vodná kontinuální fáze nahrazena olejovou (lipofilní, organickou) fází ve které se enkapsulovaná látka nerozpouští. Tím se eliminuje ztráta enkapsulované látky únikem do vodné fáze jako u systému O/W. Obě olejové fáze jsou vzájemně nemísitelné. Jako kontinuální fáze (druhá olejová fáze) se používají hlavně netěkavé kapaliny, jako jsou např. minerální či rostlinné oleje a netěkavá organická rozpouštědla [15].

Názorný příklad použití této metody je uveden při přípravě mikročástic pro perorální podání Diklofenaku:

Jako polymer byl použit Eudragit[®] RS což je nerozpustný aminoalkylmetakrylátový kopolymer, který v případě použití pro enkapsulaci aktivní látky, zajišťuje prodloužené uvolňování léčiva. Jako rozpouštědlo sloužil methanol, jako vnější vodná fáze byl použit 1-5% roztok sorbitanu monooleátu (Span[®] 80) v tekutém parafinu. Velikost částic se upravila mícháním. Po odpaření se mikročástice přefiltrovaly, promyly petroletherem a sušily. Stanovení obsahu léčiva se měřilo fotometricky, stanovení velikosti částic se měřilo optickým mikroskopem propojeným s počítačem pomocí speciálního softwaru [17].

3.1.4 Systém W/O/W

V tomto systému se využívá vícenásobné emulze. Nejprve se vyrobí základní emulze W/O, která se dále vmíchá do vnější vodné fáze za vzniku dvojité emulze. Olejová fáze, mezi dvěma vodnými fázemi slouží jako bariéra vůči úniku enkapsulované látky ze spodní vodné

fáze. Metoda je proto vhodná pro nízké koncentrace látek s vysokou rozpustností ve vodě [15].

Opačným mechanismem pak funguje systém O/W/O. Tento systém je vhodný pro enkapsulaci lipofilních látek [15].

3.2 Nanoprecipitace částic

Nanoprecipitace jednou z běžných rychlých metod přípravy nanočástic, jako jsou nanosféry a nanokapsle. Polymer, který je rozpuštěný v rozpouštědle mísitelném s vodou je vstříkovan do vodného roztoku s povrchově aktivní látkou. Přítomnost povrchově aktivní látky je však závislá na typu polymeru. Rozpouštědlo okamžitě difunduje do vodného roztoku, dojde tak k vysrážení polymeru [18]. Takto lze připravit částice s velikostí kolem 200 nm. Pro tuto metodu lze použít i netoxická rozpouštědla, proto ji lze použít i pro přípravu léčivých nanočástic [19].

3.3 Metoda emulgace s difuzí rozpouštědla

Tato metoda spočívá ve vložení léčiva do částic jednoduchou difuzí. Metodu lze rozdělit opět do několika kroků. V prvním kroku se polymer i látka určená k enkapsulaci rozpustí v rozpouštědle, které je částečně mísitelné s vodou. Roztok polymeru a léčiva se v dalším kroku emulguje do vodného roztoku obsahující stabilizátorem emulze nasyceného rozpouštědlem. Vzniklá emulze se zředí vodou, což způsobí difuzi rozpouštědla z kontinuální fáze a tím dojde i k vytvoření samotných částic. Rozpouštědlo se následně odpaří zahřátím, částice se přefiltrují a vysuší [20].

Hlavní výhodou této metody je jednoduché ovládání velikosti částic a vysoké účinnosti zapouzdření. Naopak nevýhodou může být únik části látky určené k zapouzdření do vnější vodné fáze. Proto je vhodné používat látky spíše lipofilní povahy, nebo látky méně rozpustné ve vodě [21].

3.4 Metoda vysolování

Tato metoda je v principu podobná metodě emulgace difuzí rozpouštědla. Hlavním rozdílem je ovšem použití rozpouštědla zcela mísitelného s vodou (např. aceton) a jako vnější fázi vodný roztok obsahující vysolovací činidlo (chlorid hořečnatý, chlorid vápenatý). Částice se získají reverzním vysolovacím efektem, kdy po naředění emulze velkým množstvím vody dojde k vysrážení polymeru ve formě částic [21].

3.5 Formulační proměnné parametry při přípravě částic

Mikročástice s enkapsulovanou aktivní látkou mají několik charakteristik, jako je distribuce velikosti částic, vnitřní struktury a morfologie povrchu. Tyto charakteristiky pak v konečném důsledku určují způsob a rychlost uvolňování účinné látky imobilizované v částici.

Všechny tyto vlastnosti jsou ovlivněny velkým počtem formulačních a procesních proměnných parametrů, jako jsou fyzikálně-chemické vlastnosti použitých materiálů a provozní podmínky při samotném výrobním procesu [5].

Při samotném procesu výroby je příprava částic ovlivněna v první řadě mechanickým mícháním (jeho rychlosti a dobou trvání) a dále použitím ultrasonifikace při emulzifikaci, koncentrací polymeru a enkapsulované látky, koncentrací stabilizátoru ve vnější vodné fázi. Jako další faktory můžeme označit i teplotu při přípravě části a rychlost míchání při odpařování rozpouštědla. Pozornost musí být věnována i poměru objemů primární a kontinuální fáze, a také koncentrace látky, kterou chceme enkapsulovat.

V rámci této diplomové práce byla pozornost zaměřena jednak na vliv ultrasonifikace na velikost částic a účinnost u enkapsulace aktivních látek (u PCL částic). U expandovatelných částic pak vliv rychlosti míchání, koncentrace stabilizátoru, koncentrace polymeru a vliv poměru rozpouštědlo/nadouvadlo na velikost částic a vzniklých pórů.

4 PŘÍPRAVA MIKROČÁSTIC Z PCL METODOU ODPAŘENÍ ROZPOUŠTĚDLA

Existuje velké množství příkladů využití metody odpaření rozpouštědla pro enkapsulaci velmi rozmanitých látek. V následujících bodech je stručně popsáno využití této metody při přípravě částic z polykaprolaktonu (PCL). Shrnutí těchto příkladů včetně rozpustnosti jednotlivých enkapsulovaných látek je uvedeno v tab.2.

4.1 Systém O/W, S/O/W

4.1.1 Enkapsulace kapsaicinu do PCL částic systémem O/W

Metoda O/W byla použita při enkapsulaci kapsaicinu do PCL mikročástic. Kapsacinoidy mají několik farmakologických účinků, jako jsou protizánětlivé, protinádorové, antioxidační a také protiobězní účinky. Kapsacinoidy lze využít pro úlevu od bolesti, pro prevenci proti rakovině a pro zlepšení hubnutí. Kapsacinoidy se vyskytují hlavně v chilli, ale pro jejich ostrost je omezeno dlouhodobé užívání gastrointestinálním traktem. V uvedené studii bylo dáno za cíl připravit PCL mikročástice s enkapsulovaným kapsaicinem pro orální podání pro zlepšení jejich žaludeční snášenlivost. Mikročástice byly připraveny pomocí jednoduché emulze O/W metodou odpaření rozpouštědla. Polymer (PCL, $M_w=70\,000-90\,000$ g/mol) byl rozpuštěn v organickém rozpouštědle (dichlormethan) s přidáním kapsaicinu za vzniku organické fáze. Organická fáze se přidá k vodné fázi (2% roztok PVA) za mechanického míchání (3 500 ot./min) po dobu 5 minut. Emulze byla míchána při teplotě místnosti následujících 6 hodin při 1 000 ot./min. Po odpaření rozpouštědla byly částice odděleny centrifugací, promyty destilovanou vodou a usušeny v sušárně při teplotě cca 40°C po dobu 6 hodin. Takto připravené částice měly velikost od 4 do 12 μm , účinnost enkapsulace byla 90-99% [22].

4.1.2 Enkapsulace α -tokoferolu (vitamín E) systémem O/W s použitím ultrasonifikace

Tato studie byla zaměřena na enkapsulaci α -tokoferolu do PCL částic. α -tokoferol je antioxidant známý též jako vitamin E, je rozpustný v tucích a zneškodňuje volné radikály. Příprava částic proběhla následovně: polymer (PCL, $M_w=65\,000$ g/mol) byl rozpuštěn spolu s α -tokoferolem v organickém rozpouštědle (dichlormethan, nebo dichlormethan:acetonitril v poměru 1:1). Jako vodná fáze byl použit roztok PVA připravený z 2 g polyvinylalkoholu (PVA) a 100 ml fosfátového pufru. Emulgace probíhala pomocí ultrasonifikace v ledové

lázni. Vzniklá emulze O/W byla následně míchána na magnetickém míchadle při 300 ot./min po dobu cca 12 hodin. Vytvořené částice byly odděleny centrifugací a lyofilizovány. Účinnost enkapsulace se pohybovala od 25 do 98%. Z výsledků bylo zjištěno, že účinnost enkapsulace s vyšší koncentrací polymeru (3g, 5g) roste, naopak se zvyšující se dobou ultrasonifikace (1-3 min) klesá. Velikost částic se pohybovala od 250 do 1050 nm. Velikost částic byla ovlivněna ne pouze koncentrací polymeru, ale také použitím rozpouštědla (dichlormethan; dichlormethan:hexan (1:1)). Jednoznačný vliv na velikost částic měla pak délka ultrasonifikace. Pozorováním pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byl zjištěn pravidelný kulovitý tvar připravených částic [23].

4.1.3 Enkapsulace fludrokortizonu acetátu systémem O/W

Fludrokortizon acetát se používá při léčbě chorob způsobených poruchou endokrinního systému. Příprava částic probíhala následovně: 25 mg poly (ϵ -kapolaktonu) se rozpustilo v 10 ml dichlormethanu s různými koncentracemi fludrokortizonu acetátu (od 10 do 150 mg), vše se míchalo na magnetickém míchadle. Vzniklá organická fáze se vlila do vnější vodné fáze 0,1% roztoku polyvinylalkoholu o různých objemech (100-800 ml). Míchání probíhalo při 1 500 otáčkách za minutu po dobu 2 hodin, dokud se neodpařilo rozpouštědlo. Částice se izolovaly filtrací (filtr 45 μ m), třikrát promyly destilovanou vodou a sušily ve vakuu po dobu 24 hodin. Pomocí SEM bylo pozorována v suspenzích s menším objemem vnější vodné fáze (100 - 400 ml) přítomnost krystalů. Dále bylo pomocí SEM zjištěno, že mikročástice připravené s nízkými koncentracemi fludrokortizonu vykazují hladký homogenní povrch bez známek krystalizace na povrchu. Velikost připravených částic byla od 20 do 120 μ m [24].

4.1.4 Enkapsulace p-nitroanilinu a rhodaminu systémem S/O/W

Modifikací metody O/W je systém S/O/W, kde S značí pevnou část. Tímto systémem se zabývá Wang a kol. v práci Distribuce léků v poly (ϵ -kapolakton) mikrosfér. Jako vzorové sloučeniny byl vybrán p-nitroanilin a rhodamin B. PCL (MW 10 000) mikrosféry byly vyrobeny následovně: PCL byl rozpuštěn v 10 ml dichlormethanu, tím se vytvořila organická fáze (O). K dichlormethanu se dávkovaly různé koncentrace rhodaminu. Léky v tomto systému byly pevnou fází. K organické fázi (O) a pevné fázi (S) se následně přidalo 300 ml 2% roztoku celulózy a vzniklá emulze se intenzivně míchala do odpaření rozpouštědla. Po ukončení odpařování rozpouštědla se částice zfiltrovaly, promyly a lyofilizovaly po dobu minimálně 24 hodin. Produkty byly uchovávány při 4°C pro další analýzy. Vzniklé částice vykazovaly kulovitý tvar s hladkým povrchem bez pórů. Částice s nitroanilinem měly velikost

od 50 do 150 μm , částice s rhodaminem od 130 do 330 μm . Bylo zjištěno, že p-nitroanilin který je málo rozpustný ve vodě (1mg/l) byl rovnoměrně rozmístěn uvnitř vyrobených částic. Naopak ve vodě více rozpustný rhodamin B (10 mg/l) by rozprostřen spíše na povrchu částic, což následně vedlo k rychlému uvolnění léčiva z částice [25].

4.1.5 Enkapsulace norcantharidátu disodného systémem S/O/W

Jako látka pro enkapsulaci byl zvolen norcantharidát disodný (DSNC), což je účinný lék proti rakovině ledvin, avšak je toxický pro gastrointestinální trakt. Příprava částic byla následující. Ve 3 ml dichlormethanu se rozpustilo 50-250 mg DSNC a 150-750 mg poly (ϵ -caprolaktonu) (MW 50 000), směs se intenzivně homogenizovala v homogenizátoru. Vzniklá disperze se po kapkách přikapávala do 40 ml 1% roztoku polyvinylalkoholu. Míchání probíhalo při 1 000 otáčkách za minutu po dobu 1 hodiny, po té následovalo odpaření rozpouštědla pod tlakem (20 kPa) při stejné rychlosti otáček. Vytvořené částice se odfiltrovaly, promyly deionizovanou vodou a vysušily se v exikátoru při teplotě místnosti. Bylo zjištěno, že při konstantním zvyšování množství polymeru a množství léku a při pevné rychlosti míchání se zvyšuje velikost vytvořených částic i účinnost zapouzdření. Vyrobené částice měly velikost od 39 do 258 μm . Pozorováním pomocí skenovací elektronové mikroskopie bylo zjištěno že vytvořené částice jsou kulovitěho tvaru, hrubé a porézní. Porozita částic byla zapříčiněna fyzikálně chemickými vlastnostmi vybraného léku [26].

4.1.6 Enkapsulace melarsoprolu systémem S/O/W

Melarsoprol se používá při léčbě africké tripanosomiázy známé spíše pod názvem spavá nemoc. Částice byly připraveny metodou S/O/W a to následujícím způsobem: 50 mg melarsoprolu se přidalo k 10 ml dichlormethanu v němž byl rozpuštěný poly (ϵ -kaprolakton). Špatná rozpustnost léku vedla ke vzniku suspenze S/O. K suspenzi se přidal vnější vodná fáze, kterou tvořilo 800 ml 0,1% roztoku polyvinylalkoholu. Mechanickým mícháním při 1 500 otáčkách za minutu se docílilo vytvoření emulze S/O/W. Míchání pokračovalo po další dvě hodiny dokud nedošlo k odpaření rozpouštědla a vytvrnutí mikročástic. Částice se izolovaly filtrací, třikrát promyly vodou a sušily ve vakuu po dobu 24 hodin. Částice byly následně pozorovány pod optickým mikroskopem, jejich velikost byla odhadnuta od 18 do 50 μm . Při pozorování pomocí skenovacího elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že částice jsou hrubé s krystaly na povrchu [27].

4.2 Systém W/O/W

4.2.1 Příprava PCL částic bez enkapsulace systémem W/O/W a sledování vlivu procesních proměnných parametrů

V práci [28] od Ibraheem a kol. se zabývali přípravou polykaprolaktonových mikročástic metodou dvojité emulze. Tato emulze byla připravena ve dvou krocích. V prvním kroku byla připravena primární emulze (W_1/O) tak, že se k vnitřní vodní fázi (W_1) přidal dichlormethan (DCM) ve kterém bylo rozpuštěné PCL ($M_w = 14\ 000\ \text{g/mol}$). Tyto dva roztoky byly následně homogenizovány za vzniku primární emulze (W_1/O). Ve druhém kroku se primární emulze emulgovala s vnější vodní fází (W_2) obsahující polyvinylalkohol (PVA) (Mowiol[®] 4-88, $M_w = 31\ 000\ \text{g/mol}$), který sloužil jako stabilizátor, pomocí ultra-turrax homogenizátoru (T-25 basic IKA-WERK) při určitých otáčkách a určitém čase za vzniku dvojité emulze ($W_1/O/W_2$).

Cílem této práce bylo studovat vliv různých parametrů na vlastnosti připravených částic (např. velikost částic, zeta potenciál, morfologie a velikost části). Dále se sledovaly procesní parametry jako je obsah polymeru, koncentrace stabilizátoru (PVA), objemy vnitřní a vnější vodné fáze, čas a rychlost míchání v obou krocích emulgačního procesu [28].

Touto studií bylo následně zjištěno, že velikost částic ovlivnilo míchání až při přípravě druhé emulze. Zvýšením otáček míchání a prodloužením doby míchání se docílilo menší velikosti částic. Zároveň bylo upozorováno že koncentrace polykaprolaktonu neměla na velikost částic téměř žádný vliv. Dále bylo zjištěno, že nízké koncentrace stabilizátoru (PVA) vedou k menší velikosti částic. Částice byly pozorovány skenovacím elektronovým mikroskopem a podrobeny dalšímu výzkumu jako je zkoumání vhodné látky pro enkapsulaci a její následné uvolňování z těchto částic [28].

4.2.2 Enkapsulace hovězího sérového albuminu systémem W/O/W

V práci [29] se zabývali přípravou nanočástic několikanásobnou emulzí. Cílem práce bylo připravit částice jako potenciální nosiče proteinových léčiv. Jako modelové léčivo byl vybrán hydrofilní hovězí sérový albumin (BSA). Nejdříve se protein rozpustil v destilované vodě, následně se tento roztok emulgoval v dichlormethanu ve kterém byl rozpuštěný polymer (polykaprolakton) ($MW\ 42\ 000$, Aldrich, Steinheim, Německo). Emulgace probíhala na magnetickém míchadle při 1 500 otáčkách za minutu za vzniku primární emulze. Tato primární emulze se poté homogenizovala s roztokem PVA v ledové lázni po dobu 3 minut.

Následovalo odpařování dichlormethanu pod tlakem, během něj se formují částice a enkapsulují do své struktury modelovou látku. Po odpaření dichlormethanu se částice izolovaly centrifugací, dvakrát promyly destilovanou vodou a nechaly lyofilizovat. Při práci bylo hodnoceno několik proměnných parametrů jako množství proteinu (25-400mg), koncentrace roztoku PVA (0,05-0,4%), množství polymeru (0,25-2g) a objem vnější vodné fáze (100-300 ml). Velikost vzniklých částic byla 200-300 nm. Na velikost částic mělo vliv množství proteinu, jeho zvýšením se zvýšila i velikost částic. Zvýšením objemu vnější vodné fáze vedlo ke zvýšení účinnosti zachycení proteinu a zvýšení velikosti částic. Při zvýšení koncentrace PVA ve vnější vodné fázi došlo ke snížení velikosti vzniklých částic. Avšak toto snížení velikosti nebylo nijak výrazné [29].

4.2.3 Enkapsulace antikoncepčních hormonů systémem W/O/W

Antikoncepční látky patří do skupiny endokrinních disruptorů (EDC), což jsou látky které mohou narušit činnost žláz [30].

Příkladem je přípravy injekčních mikročástic obsahujících antikoncepční hormony je v [31]. Jako modelové látky byl použit levonorgestrel a ethinilestradiol, které jsou běžně obsaženy v antikoncepčních pilulkách. Léčivo bylo zde rozpuštěno ve směsi ethanol/voda v poměru 7:3, směs byla emulgována v 10 ml dichlormethanu s rozpuštěným polymerem (poly (ϵ -kaprolakton)). Vzniklá emulze byla míchána při 4 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, po té se přidala k vnější vodné fázi kterou tvořil 1% roztok polyvinylalkoholu. Tím vznikl systém vícenásobné emulze W/O/W. Tato emulze byla následně míchána po dobu 4 hodin při 6 000 otáčkách za minutu do odpaření rozpouštědla. Vytvořené mikročástice byly odděleny centrifugací, třikrát promyty fosfátovým pufrům o pH 7,4 a usušeny ve vakuu. V této studii byl sledován vliv změny koncentrace polymeru. Vzniklé částice měly velikost od 8 do 25 μ m. Také bylo zjištěno, že zvýšením koncentrace polymeru v organické fázi vede ke zvýšení velikosti vzniklých částic. Účinnost enkapsulace byla od 46 do 58% [31].

4.2.4 Enkapsulace BSA systémem W/O/W

Jako modelovou látku autoři [32] vybrali hovězí sérový albumin (BSA). Roztok BSA (188 mg BSA v 1ml ultračisté vody) byl jako vnitřní vodná fáze. Ta se emulgovala s vnější organickou fází (6% roztok PCL (MW44 000) v dichlormethanu) při rychlosti 8 000 otáček za minutu při teplotě místnosti za vzniku emulze voda v oleji W/O. Primární emulze se emulgovala s vnější vodnou fází (50ml 5% roztoku PVA) při stejných podmínkách, za vzniku

emulze voda v oleji ve vodě (W/O/W). Opařování rozpouštědla probíhalo pod tlakem na magnetickém míchadle při 8000 otáčkách za minutu přes noc do následujícího dne. Vzniklé mikročástice se oddělily centrifugací, třikrát promyly ultračistou vodou a lyofylozovaly. Ve studii byly zkoumány účinky změny procesních parametrů na velikost částic. Jako proměnné byla vybrána koncentrace polymeru, vliv poměru protein/polymer, koncentrace PVA, objem vnější vodné fáze a doba míchání. Výsledky ukázaly, že zvýšení koncentrace polymeru v pevném objemu organického rozpouštědla má za následek zvýšení průměrné velikosti částic a zlepšení účinnosti zachycení proteinu. Dále bylo zjištěno, při zkoumání vlivu poměru protein/polymer, že zvýšením koncentrace BSA při konstantní hmotnosti polymeru klesá účinnost zachycení BSA v částicích. Při změně koncentrace PVA (0,5-10%) byla sledována i změna velikosti částic (8-6 μm), tedy se zvyšující se koncentrací PVA ve vodném roztoku se snižovala i velikost připravených částic. Sledováním doby míchání při konstantní rychlosti míchání (8 000 otáček za minutu) bylo zjištěno, že s prodlužující se dobou míchání (2-15 minut) se snižuje velikost částic, přičemž nejlepší účinnosti zachycení se dosáhlo při čase 5 minut. Velikost připravených částic se pohybovala od 2 do 10 μm . V závěru práce bylo tedy zjištěno, že volbou vhodných podmínek získáme hladké kulovité a homogenní PCL částice se střední velikostí 10 μm [32].

Tab. 2 Souhrn uvedených příkladů přípravy částic z polykaprolaktonu (PCL) různými systémy metody odpaření rozpouštědla

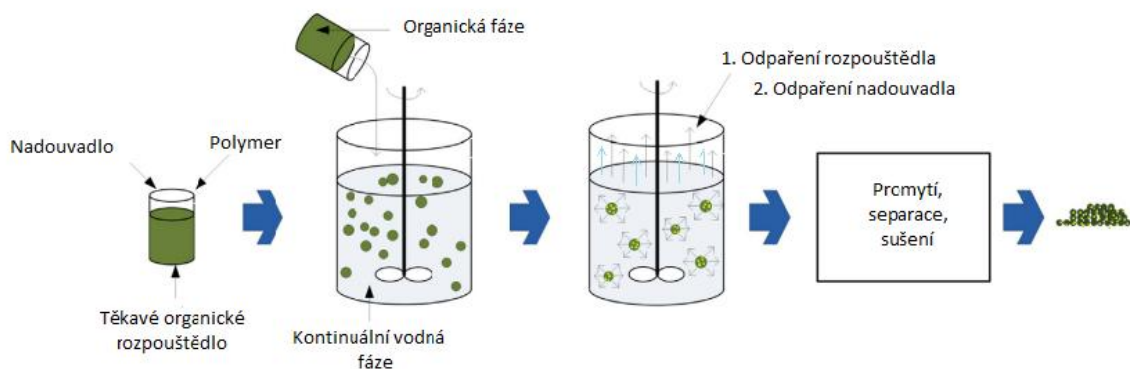
Metoda	Organická fáze	Obsah stabilizátoru ve vodné fázi	Polymer /molární hmotnost [g/mol]	Způsob emulgace	Enkapsulovaná látka (její rozpustnost ve vodě)	Velikost částic [μm]	Účinnost enkapsulace EE [%]	Reference
O/W	Dichlormethan	2% PVA	PCL (Mw=70 000-90 000)	3 500 ot./min (5 min)	Kapsaicin (nerozpustný ve vodě)	4-12	90-99	[22]
O/W	Dichlormethan: acetonitril	PVA	PCL (Mw= 65 000)	Ultrasonifikace (1-3 min.)	α-tokoferol	0,25-1,05	---	[23]
O/W	Dichlormethan	0,1% PVA	PCL (Mw=neudáno)	400 ot./min	Fludrokortizon acetát (140 mg/l)	20-120	80	[24]
S/O/W	Dichlormethan	2% roztok celulózy	PCL (Mw= 10 000)	---	Nitroanilin (1 mg/l) Rhodamin (10 mg/l)	50 – 150 130-330	41- 99 12-39	[25]

Metoda	Organická fáze	Obsah stabilizátoru ve vodné fázi	Polymer /molární hmotnost [g/mol]	Způsob emulgace	Enkapsulovaná látka (její rozpustnost ve vodě)	Velikost částic [μm]	Účinnost enkapsulace EE [%]	Reference
S/O/W	Dichlormethan	1% PVA	PCL (Mw= 50 000)	---	Norcantharidát sodný (DSNC) (vysoce rozpustný)	39 – 258	2-80	[26]
S/O/W	Dichlormethan	0,1% PVA	PCL (Mw=neudáno)	13 500 (3 min)	Melarsoprol (špatně rozpustný)	18 – 50	82	[27]
W/O/W	Dichlormethan	W ₁ = voda W ₂ = PVA	PCL (Mw= 14 000)	17 500 (5 min.)	---	6-38	---	[28]
W/O/W	Dichlormethan	W ₁ = voda W ₂ = 0,05-0,4% PVA	PCL (Mw –neudáno)	1 500 ot./min (2 hod)	Hovězí sérový albumin (BSA) (rozpustný)	2-10	60-85	[29]
W/O/W	Dichlormethan	W ₁ = voda W ₂ = 1 % PVA	PCL (Mw –neudáno)	4 000 (10 min)	Levonorgestrel, (2,05 mg/l) Ethinilestradiol (11,06 mg/l)	8-25	46 – 58	[31]
W/O/W	Dichlormethan	W ₁ = voda W ₂ = 5 % PVA	PCL (Mw= 44 000)	8 000 ot./min	Hovězí sérový albumin (BSA)	2-6	1-35	[32]

5 METODY PŘÍPRAVY EXPANDOVATELNÝCH ČÁSTIC

Příprava porézních částic je obdobná jako příprava jiných mikročástic, nejčastěji se používá přídavek tzv. porogen (resp. nadouvadlo) v určitém kroku příprav, který zajistí žádanou pórovitou strukturu částic. Jako nadouvadlo se často používá organické rozpouštědlo, nemísitelné s vodou, které má vyšší bod varu než rozpouštědlo v němž je rozpuštěný polymer, ale může být také použita jiná látka, jako je šumivá sůl či parafín. V každém případě je porogen látka, která se přechodně enkapsuluje do matrice částice a po odpaření rozpouštědla se z této matrice různými způsoby odstraní za vzniku pórů.

Tedy to znamená, že při použití těkavého rozpouštědla jako nadouvadla, se při odpařování rozpouštědla s nižším bodem varu zformují částice do kulovitého tvaru a při následném odpaření nadouvadla (vyšší bod varu) se v matrici částic vytvoří póry. Stručné schéma přípravy porézních částic je zobrazeno na obr.6.



Obr. 6 Schéma přípravy expandovatelných částic

5.1.1 Příprava porézních částic z PLA metodou odpaření rozpouštědla systémem O/W

Metoda, která byla použita pro přípravu porézních částic v praktické části této práce je popsána v [33], zde byly připraveny porézní částice z PLA ($M_w=200\ 000$ g/mol). Stručně lze přípravu částic popsat následovně: PLA bylo rozpuštěno v dichlormethanu, následně byl přidán n-hexan v určitém poměru ku dichlormethanu (v tomto případě poměr dichlormethan/hexan byl 9:1). Jako vodná fáze byl použit 5% roztok PVA. Tímto způsobem bylo připraveno devět vzorků u kterých se měnil vždy jeden procesní parametr jako je rychlost míchání při emulgaci (300, 500, 800 ot./min), poměr dichlormethan/hexan (9:1; 9,5:0,5; 8:2) a koncentrace PLA (5%,3%,8%), ostatní parametry byly při přípravě

vždy konstantní. V tab.3 jsou uvedeny měněné parametry a výsledná velikost připravených částic a vzniklých pórů. Zvýšením rychlosti míchání (vzorek A,B,C) se snížila velikost částic a také velikost vzniklých pórů na nich. Zvýšením koncentrace nadouvadla (n-hexan) (vzorek D,B,E) se zvýšila jak velikost částic tak velikost vzniklých pórů. Snížením koncentrace PVA (vzorky B,F) se sice zvýšila velikost částic, ale velikost pórů na nich se snížila. Zvýšením koncentrace PLA (vzorky G,B,H) se zvýšila velikost částic a snížila velikost pórů [33].

Tab. 3 Parametry při přípravě PLA částic, velikost připravených částic a průměr vzniklých pórů[33]

Vzorek	C _{PLA} (W/V)	C _{PVA} (W/V)	Rychlost míchání (ot./min)	Poměr dichlometan/hexan	Průměrná velikost (μm)	Velikost pórů (μm)
A	5%	0,8%	300	9:1	471	24 \pm 4
B	5%	0,8%	500	9:1	290	16 \pm 3
C	5%	0,8%	800	9:1	176	12 \pm 2
D	5%	0,8%	500	9,5 : 0,5	251	5 \pm 1
E	5%	0,8%	500	8:2	413	30 \pm 5
F	5%	0,5%	500	9:1	390	10 \pm 2
G	3%	0,8%	500	9:1	241	20 \pm 4
H	8%	0,8%	500	9:1	429	7 \pm 2

5.1.2 Příprava porézních částic z PLA metodou W/O/W s hydrogen uhličitánem amonným jako porogenem

Porézní mikročástice vyrobené z biologicky rozložitelných polymerů vykazují velký potenciál jako mikronosiče pro kultivaci buněk v tkáňovém inženýrství. Například v [30] byl biologicky odbouratelný poly (DL -laktid) (PLA), použit pro výrobu porézních mikrosfér připravených metodou odpaření rozpouštědla pomocí dvojité emulze W/O/W. Porézní polymerní mikročástice byly vyrobeny modifikací metody odpaření rozpouštědla a to metodou dvojité emulze W/O/W. V této metodě se do vnitřní vodní fáze (W₁) přidala šumivá sůl, v tomto případě hydrogen uhličitán amonný (HN₄ HCO₃).

K vnitřní vodné fázi se přidala organická fáze (polymer (PLA) rozpuštěný v organickém rozpouštědle), obě fáze se emulgovaly v ledové lázni pomocí vysokorychlostního homogenizátoru z vzniku primární emulze W_1/O . K primární emulzi byla přidána druhá vodní fáze W_2 (0,1% roztok PVA) a vše se míchalo na magnetickém míchadle za vzniku dvojité emulze. Při tomto druhém emulgačním procesu se rozkládá uhličitán amonný na oxid uhličitý a amoniak, vzniklé plynové bubliny pak vytvářejí porézní strukturu částic. V míchání se pokračovalo do odpaření rozpouštědla. Vytvořené částice byly následně několikrát promyty deionizovanou vodou a usušily. Průměr takto vytvořených částic se pohyboval od 150 do 250 μm [34].

5.1.3 Příprava porézních částic kombinací metody odpaření rozpouštědla a metody vyplavování částic s parafínem jak porogenem

V této studii [35] připravovali částice kombinací dvou metod a to metodou odpaření rozpouštědla a metodou vyplavování částic. Příprava částic probíhala následující způsobem: polymer (PCL) spolu s parafínem by rozpuštěn v chloroformu za stálého míchání (při teplotě nad 20°C, jinak by se parafín mohl vysrážet do roztoku). Tato olejová fáze byla dále vstříkována do vodného roztoku PVA a vzniklá emulze se míchala při 40°C po následujících 12 hodin. Vzniklé částice (700 do 1000 μm) byly promyty, odděleny filtrací a lyofilizovány. Po lyofilizaci byly částice ponořeny do n-hexanu pro odstranění parafínu, dále promyty ethanolem a destilovanou vodou a usušeny [35].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁLY A METODY PŘÍPRAVY ČÁSTIC

6.1 Materiál a přístrojové vybavení

6.1.1 Materiál

Materiál pro přípravu PCL částic s enkapsulovanou steroidní látkou

- poly (ϵ -kaprolakton) 29 ($M_w = 8\,333$ g/mol; Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze),
- poly (ϵ -kaprolakton) 30 ($M_w = 19\,836$ g/mol; Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze),
- polyvinylalkohol (PVA) (Poval ® PVA 205, Kuraray, Japonsko),
- chloroform p.a. koncentrovaný ($M_w = 119,38$, IPL, Uherský Brod),
- methanol p.HPLC (chromapur G, Chromservis, Praha),
- destilovaná voda,
- steroidní látky: β -estradiol ($M_w = 272,38$ g/mol), progesteron ($M_w = 314,46$ g/mol), kortizon 21-acetát ($M_w = 402,48$ g/mol), hydrokortizon ($M_w = 362,46$ g/mol) (vše Sigma-Aldrich)

Materiál pro přípravu porézních částic

- Ekoflex (Poly(butylen adipát-co-tereftalát) (PBAT)) (BASF, USA),
- dichlormethan ($M_w = 84,93$ g/mol, Bod varu = 40°C , Uherský Brod),
- n-hexan ($M_w = 86,18$ g/mol, Bod varu = 69°C , Uherský Brod),
- polyvinylalkohol (PVA) (Poval ® PVA 205, Kuraray, Japonsko),
- methanol p.HPLC (chromapur G, Chromservis, Praha),
- destilovaná voda.

6.1.2 Přístrojové vybavení

Přístrojové vybavení pro přípravu a vyhodnocení PCL částic s enkapsulovanou steroidní látkou:

- vysokorychlostní homogenizátor Ultra-turrax ® (T 18 Basic, IKA ®, Belgie),
- ultrazvukový homogenizátor SONOPULS HD 2200 (ULTRAZVUK, Hradec Kr.),
- magnetické míchadlo (RH Basic, IKA ®, Belgie),
- vakuová pumpa Solid PTFE (KNF Laboport®, Neuberger, USA),

- centrifuga EBA 20 (Hettich, Německo),
- analyzátor částic Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK),
- lyofilizátor Scan Vac (Cool Safe, Labo Gene, Dánsko),
- skenovací elektronový mikroskop (Tescan, Brno),
- kapalinový chromatograf – kolona s reverzní fází 5 μm C 18 (Watrex, Česká republika), detektor UV Waters 2487 (Waters, USA)

Přístrojové vybavení pro přípravu a vyhodnocení porézních částic

- Vysokorychlostní homogenizátor Ultra-turrax $\text{\textcircled{R}}$ (T 18 Basic, IKA $\text{\textcircled{R}}$, Belgie),
- magnetické míchadlo (RH Basic, IKA $\text{\textcircled{R}}$, Belgie),
- vakuová pumpa Solid PTFE (KNF Laboport $\text{\textcircled{R}}$, Neuberger, USA),
- centrifuga EBA 20 (Hettich, Německo),
- lyofilizátor Scan Vac (Cool Safe, Labo Gene, Dánsko),
- optický mikroskop Olympus (CX31RBSF)
- skenovací elektronový mikroskop (Tescan, Brno).
- dvoupaprskový spektrofotometr Unicam UV 500 (Spectronic Camspec Ltd, UK)

6.1.3 Příprava roztoku PVA

Roztok polyvinylalkoholu byl použit jako vnější vodná fáze při přípravě částic a zároveň jako stabilizátor emulze.

0,5% roztok PVA byl připraven následovně: do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,5 g PVA (Poval $\text{\textcircled{R}}$ 205) následně bylo přidáno cca 50 ml destilované vody. Pro rozpuštění PVA byl roztok míchán pomocí magnetického míchadla při teplotě 60°C po dobu 40 minut. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu byl roztok doplněn destilovanou vodou po rysku a promíchán.

6.1.4 Příprava roztoku 10% methanolu

Roztok methanolu byl použit pro promívání připravených částic. Roztok byl připraven do 100 ml odměrné baňky smícháním 10 ml methanolu v destilované vodě, doplněn po rysku destilovanou vodou a promíchán.

6.2 Metody přípravy

6.2.1 Příprava PCL částic se steroidy

6.2.1.1 Příprava částic bez enkapsulace steroidu

Částice bez enkapsulovaného steroidu byly připraveny metodou O/W odpařením rozpouštědla. Nanočástice byly připraveny následujícím způsobem: ve vialce o objemu cca 10 ml bylo rozpuštěno 40 mg polykaprolaktonu (PCL 29, PCL 30) ve 400 μ l chloroformu. K této organické fázi (O) byly poté přidány 4 ml vnější vodné fáze (W) obsahující 0,5% PVA, který sloužil jako stabilizátor emulze. Tímto vznikl systém dvou fází olej ve vodě (O/W). Směs byla homogenizována pomocí vysokorychlostního homogenizátoru (Ultra Turrax T 18 Basic, IKA ®, Belgie) při 24 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut za vzniku emulze. Pro porovnání byly částice z každého polymeru připraveny dvakrát, přičemž u jednoho vzorku ze dvojice byla prováděna ultrasonifikace a u druhého nikoli. Ultrasonifikace probíhala na ultrazvukovém homogenizátoru SONOPULS HD 2200 (ULTRAZVUK, Hradec Králové) při pulzaci 50% a amplitudě 100% po dobu 5 minut. Vzhledem k malému objemu vzorku byl vzorek během homogenizace i ultrasonifikace chlazen pomocí ledové tříště, aby nedocházelo k předčasnému odpaření rozpouštědla (chloroform). Po ultrasonifikaci následovalo odpaření rozpouštědla pod tlakem vytvořeným vývěvou za stálého míchání na magnetickém míchadle (RH Basic, IKA ®, Belgie), při 140 otáčkách za minutu do odpaření rozpouštědla při laboratorní teplotě.

U připravených částic byla změřena velikost částic na Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK).

Po změření velikosti částic byla provedena separace částic. Částice byly odděleny centrifugací na malé centrifuze (EBA 20, Hettich, Německo) při 6 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Po slití supernatantu byly částice dvakrát promyty 10 ml 10% roztokem methanolu. Nakonec bylo k promytým částicím přidáno 10 ml destilované vody a částice se nechaly lyofilizovat v lyofilizátoru Scan Vac (Cool Safe, Labo Gene, Dánsko).

6.2.1.2 Příprava částic s enkapsulovaným steroidem

Nanočástice byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla a to metodou jednoduché emulze O/W. Tato metoda je rovněž popsána výše při přípravě částic bez steroidu.

Do vialky bylo naváženo 40 mg polykaprolaktonu (PCL 29, PCL 30) a 8 mg steroidu (β -estradiol, progesteron, kortizon 21-acetát, hydrokortizon). Vše bylo následně rozpuštěno ve 400 μ l chloroformu. U β -estradiolu a hydrokortizonu bylo, pro zlepšení rozpustnosti steroidu, přidáno ještě 40 μ l methanolu. K rozpuštěnému polymeru se steroidem byly přidány 4 ml 0,5% vodného roztoku PVA. Směs byla homogenizována pomocí vysokorychlostního homogenizátoru (Ultra Turrax T 18 Basic, IKA ®, Belgie) při 24 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut za vzniku emulze. Následovala ultrasonifikace na ultrazvukovém homogenizátoru SONOPULS HD 2200 (ULTRAZVUK, Hradec Králové) při pulzaci 50% a amplitudě 100% po dobu 5 minut. Po ultrasonifikaci bylo z emulze pod tlakem odpařováno rozpouštědlo, za stálého míchání, na magnetickém míchadle (RH Basic, IKA ®, Belgie) při 330 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě.

U připravených částic byla změřena velikost částic na analyzátoru částic Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK).

Po změření velikosti částic byla provedena separace částic. Částice byly odděleny centrifugací na malé centrifuze (EBA 20, Hettich, Německo) při 6 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Po slítí supernatantu byly částice dvakrát promyty 10 ml 10% roztoku methanolu. Nakonec bylo k promytým částicím přidáno 10 ml destilované vody a částice se nechaly lyofilizovat v lyofilizátoru Scan Vac (Cool Safe, Labo Gene, Dánsko).

Z lyofilizovaných částic byl vybrán vzorek, který byl pozorován pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Tescan, Brno). Dále byla sledována účinnost enkapsulace pomocí kapalinové chromatografie. V tab.4 je popsáno složení jednotlivých vzorků včetně jejich označení.

Tab. 4 Složení jednotlivých vzorků při přípravě částic s použitím ultrazvuku (ULT)

Označení vzorku	Polymer	Steroid	Rozpouštědlo
PR 30 ULT	PCL 30	Progesteron	400 µl chloroform
KO 30 ULT		Kortizon 21-acetát	400 µl chloroform
HY 30 ULT		Hydrokortizon	400 µl chloroform + 40 µl methanol
ES 30 ULT		B-estradiol	400 µl chloroform + 40 µl methanol
PR 29 ULT	PCL 29	Progesteron	400 µl chloroform
KO 29 ULT		Kortizon 21-acetát	400 µl chloroform
HY 29 ULT		Hydrokortizon	400 µl chloroform + 40 µl methanol
ES 29 ULT		B-estradiol	400 µl chloroform + 40 µl methanol

6.2.1.3 Příprava částic s enkapsulovaným steroidem bez ultrasonifikace

Tyto částice byly připraveny obdobným způsobem jako výše uvedené částice, avšak bez ultrasonifikace. Tedy následovně: polymer byl spolu s příslušným steroidem rozpuštěn v rozpouštědle (chloroform, případně chloroform + methanol v poměru 10:1), následně byla přidána vnější vodná fáze v podobě 0,5% roztoku PVA. Směs byla homogenizována při 24 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut za stálého chlazení pomocí ledové tříště. Následovalo odpaření rozpouštědla pod tlakem při 140-340 otáčkách za minutu do odpaření rozpouštědla. Po odpaření rozpouštědla byla u částic změřena velikost, částice byly odděleny centrifugací a dvakrát promyty 10% roztokem methanolu. Promyté částice spolu s 10 ml destilované vody byly ponechány k lyofilizaci.

Byla zjišťována účinnost enkapsulace pomocí kapalinové chromatografie. Tabulka 5 popisuje složení jednotlivých vzorků a jejich označení.

Tab. 5 Složení jednotlivých vzorků při přípravě částic bez ultasonifikace (BU)

Označení vzorku	Polymer	Steroid	Rozpouštědlo
ES 29 BU	PCL 29	B-estradiol	400 µl chloroform +
ES 30 BU	PCL 30	B-estradiol	40 µl methanol
PR 29 BU	PCL 29	Progesteron	400 µl chloroform
PR 30 BU	PCL 30	Progesteron	
KO 29 BU	PCL 29	Kortizon 21-acetát	400 µl chloroform
KO 30 BU	PCL 30	Kortizon 21-acetát	
HY 29 BU	PCL 29	Hydrokortizon	400 µl chloroform +
HY 30 BU	PCL 30	Hydrokortizon	40 µl methanol

6.2.2 Příprava porézních částic

6.2.2.1 Metoda přípravy porézních částic

Do vialky o objemu cca 20 ml bylo naváženo cca 100 mg polymeru, jako polymer byl zvolen poly (butylen adipát-co-tereftalát) (PBAT). 100 mg PBAT bylo rozpuštěno v rozpouštědle složeném z hexanu a dichlormethanu v různých poměrech (9:1, 19:1, 39:1). Po rozpuštění polymeru bylo přidáno 10 ml roztoku PVA (0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05%). Systém dvou fází (O/W) byl míchán pomocí vysokorychlostního homogenizátoru Ultra turrax (6 000 ot/min, 24 000 ot/min) po dobu 5 minut za vzniku emulze. Vzniklá emulze byla ponechána na míchadle při 200 otáčkách za minutu k volnému odpařování. Po odpaření rozpouštědla byla změřena velikost připravených částic pomocí optického mikroskopu. Částice byly odděleny centrifugací a dvakrát promyty 10% roztokem methanolu. Po slítí supernatantu bylo k odděleným částicím přidáno 10 ml destilované vody. Částice se po té nechaly lyofilizovat do druhého dne. Vybrané vzorky byly dále pozorovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Byl sledován dále vliv změny některých parametrů (tab.6) na velikost a distribuci částic. V případě některých částic byla pozorována morfologie pomocí SEM. Částice byly dále použity pro stanovení jejich sorpčních schopností, konkrétně pro sorpci bisfenolu A.

Tab. 6 složení jednotlivých vzorků a procesní parametry při přípravě porézních částic

Označení vzorku	Navážka polymeru [mg]	Poměr Dichlormethan: n-Hexan	Dichlormethan [ml]	n-Hexan [ml]	Koncentrace PVA [%]	Rychlost míchání [ot./min]
E1	107,5	9:1	0,900	0,100	0,50	6 000
E2	104,0	19:1	0,950	0,050	0,50	6 000
E3	105,7	39:1	0,975	0,025	0,50	6 000
EKO 1	118,6	9:1	0,900	0,100	0,50	24 000
EKO 2	112,9	19:1	0,950	0,050	0,50	24 000
EKO 3	107,5	39:1	0,975	0,025	0,50	24 000
FLEX 1	102,9	9:1	0,900	0,100	0,25	6 000
FLEX 2	103,0	9:1	0,900	0,100	0,10	6 000
FLEX 3	110,2	9:1	0,900	0,100	0,05	6 000
EK 50	50,2	9:1	0,900	0,100	0,50	6 000
EK 200	197,2	9:1	0,900	0,100	0,50	6 000

6.3 Charakterizace částic

6.3.1 Velikost částic

U připravených částic byla nejdříve změřena jejich velikost a to buď pomocí Zetasizer nano nebo optickým mikroskopem v programu Qwick Photo Camera 2.2. Po změření velikosti částic byly částice lyofilizovány.

Zetasizer pomáhá charakterizovat koloidní částice, nanočástice, makromolekuly polymerů a proteinové roztoky. Měření je založeno na principu dynamického rozptylu světla (DLS), které spočívá v tom, že jemné částice a molekuly jsou v neustálém náhodném tepelném pohybu (tzv. Brownův pohyb). Menší částice se rozptylují rychleji než větší částice. Rychlost Brownova pohybu je tedy určena teplotou, a proto je teplotní ovládání nezbytné pro přesné měření. Pro měření rychlosti difúze se používá laser. Intenzita rozptylu se

v určitém úhlu s časem mění, to je detekováno za použití lavinové fotodiody (APD). Změny intenzity jsou digitálně analyzovány, a je vytvořena korelační funkce [36].

Velikost částic byla měřena při 25°C vždy třikrát vedle sebe, pomocí analyzátoru částic dle návodu od výrobce.

Expandovatelné částice byly pozorovány pomocí optické mikroskopie a to optickým mikroskopem OLYMPUS při zvětšení 400x, jejich velikost byla vyhodnocena v PC programu Qwick Photo Camera 2.2. Z výsledných hodnot byla určena distribuce velikosti částic a průměrná velikost částic.

6.3.2 SEM

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) umožňuje pozorování a charakterizaci heterogenních organických a anorganických materiálů v rozmezí nanometrů až mikrometrů. Elektronovou mikroskopií získáme trojrozměrný obraz povrchů široké škály materiálů se zvětšením 10 – 10 000x.

SEM umožňuje zobrazení povrchu struktur. Vzorek materiálu se pokryje ultratenkou vrstvou kovu a skenuje se svazkem elektronů. Detekují se jak rozptýlené, tak ze vzorku vyražené elektrony. Ze získaného signálu se rekonstruuje obraz povrchu vzorku. Aby se zabránilo atmosférického vlivu na primární a sekundární elektrony, pracuje se za vysokého vakua [37].

V našem případě byly vzorky pokryty Platino-Paladiovou vrstvou. Vzorek s enkapsulovanou látkou byl pozorován při zvětšení 40 000x, s použitím SE detektoru a urychlovacím napětím elektronů 10 00kV. Vzorky porézních částic byly pozorovány při zvětšení 5 000x a 2 000x s použitím BSE detektoru při urychlovacím napětí elektronů 5 000kV.

6.3.3 Účinnost zapouzdření enkapsulované látky (EE)

Účinnost enkapsulace (EE) byla definována jako poměr mezi hmotností zapouzdřeného steroidu ku jeho celkové hmotnosti na začátku procesu.

Účinnost enkapsulace lze vypočítat pomocí rovnice (1):

$$EE (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného steroidu}}{\text{počáteční hmotnost steroidu}} \cdot 100 \quad (1)$$

Přičemž koncentrace enkapsulovaného steroidu byla zjištěna tak, že 1mg připravených částic bylo louženo v 5 ml methanolu. Uvolněný steroid byl následně stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Koncentrace steroidů byla analyzována pomocí HPLC na uzavřené koloně s reverzní fází Reprosil 5 μm C18 (Watrex, Česká republika), mobilní fáze byla methanol/voda (60:40). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min s duální detekcí pomocí UV detektoru při 200 a 240 nm.

V tab. 7 jsou uvedeny rozpustnosti jednotlivých steroidních látek ve vodě a vlnová délka použitá při měření. V tab. 8 jsou uvedeny výsledky měření na kapalinovém chromatografu, ze kterých byly sestrojeny kalibrační křivky (obr 9-12).

Tab. 7 Rozpustnost jednotlivých bioaktivních látek ve vodě

Steroidní látka	Rozpustnost v H_2O [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]		λ [nm]
	Při 25°C		
β -estradiol	3,90		200
Progesteron	8,81		200
Kortizon 21-acetát	27,80		200
Hydrokortizon	320,00		240

Tab. 8 Výsledky měření pomocí kapalinové chromatografie pro stanovení kalibračních křivek jednotlivých hormonů

Typ steroidu	β -estradiol	Progesteron	Kortizon 21-acetát	Hydrokortizon
Vlnová délka [nm]	200	200	200	240
Retenční čas [min]	15,5	34,5	9,9	7,2
Koncentrace [mg/l]	Plocha píku [-]			
5,0	1150853	362245	256884	299247
1,0	199000	66630	51776	62386
0,1	30846	7525	4433	4907

6.3.4 Stanovení množství steroidu v částicích SL

Množství steroidu v částicích – steroid loading (SL %) bylo definováno jako množství zapouzdřené steroidní látky dělené konečnou hmotností částic se zapouzdřeným steroidem, popsané v rovnici (2):

$$SL (\%) = \frac{\text{hmotnost enkapsulovaného steroidu}}{\text{hmotnost částic}} \cdot 100$$

(2)

6.3.5 Sorpční schopnost porézních částic

Expandovatelné částice byly použity pro zjištění jejich sorpčních schopností. Jako látka pro sorpci byl vybrán bisfenol A, což je toxická látka schopná narušovat funkci hormonů využívající se při výrobě epoxidových pryskyřic a polykarbonátů ze kterých se vyrábí i kojenecké lahve. Bisfenol A je v současné době všudypřítomný, byl zaznamenán v ovzduší, vodě, těle živočichů i v lidské tkáni. Tato látka je zařazena jako látka zdraví škodlivá.

Postup experimentu byl následující:

Navážilo se 20 mg porézních částic ke kterým byly přidány 4 ml roztoku bisfenolu A o koncentraci 500 mg/l. Suspenze byla ponechána k sorpci po dobu 72 hodin na třepačce při 180 ot./min při teplotě 25°C. Po uplynulé době se vzorky přefiltrovaly přes filtr 0,22 μm a byla změřena jejich absorbance při λ= 276 nm. Byla také změřena kalibrační křivka bisfenolu A z níž bylo vypočítáno množství adsorbované látky.

Pro porovnání byly připraveny částice bez pórů (ECO nano) a to tak že 100 mg PBAT bylo rozpuštěno v chloroformu, jako vodná fáze sloužil 0,5% roztok PVA. Obě fáze byly dispergovány pomocí ultrazvukové hřídelové míchačky. Poté následovalo odpaření rozpouštědla. Tímto způsobem byly připraveny částice s velikostí přibližně 0,57 μm.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 PCL částice a enkapsulace steroidních látek

Cílem této studie bylo pozorovat možnosti enkapsulace steroidních látek lišících se významně svou rozpustností ve vodě do matrice dvou typů PCL s různou molekulovou hmotností.

7.1.1 Stanovení velikosti částic

Velikost částic byla stanovena pomocí Zetasizer Nano, vzorky byly měřeny třikrát vedle sebe. Průměrná velikost částic a polydisperzita jsou uvedeny v tab.9 pro částice z PCL 29 a v tab.10 pro částice připravené z PCL 30. Dále je zde uveden výtěžek připravených částic. Pomocí použité metody se nám podařilo připravit částice submikrometrových rozměrů zhruba v rozsahu 400-700 nm. Při porovnání výsledků získaných pro oba typy PCL je patrné, že molekulová hmotnost použitých nízkomolekulárních PCL nemá v tomto případě zásadní vliv na velikost částic.

U obou typů polymerů také není vidět výrazný vliv ultrasonifikace na velikost částic, pouze u částic z PCL 29 s enkapsulovaným B-estradiolem (ES 29 ULT, ES 29 BU) a kortizonem (KO 29 ULT, KO 29 ULT) je již znatelný rozdíl. Vliv ultrazvuku pravděpodobně nehrál tak zásadní roli jak by se mohlo očekávat, jelikož velikost emulzního systému a díky tomu výsledných částic byla již zmenšena natolik vysokorychlostním homogenizátorem, že energie ultrazvuku nebyla již pro další zjemnění emulze dostačující.

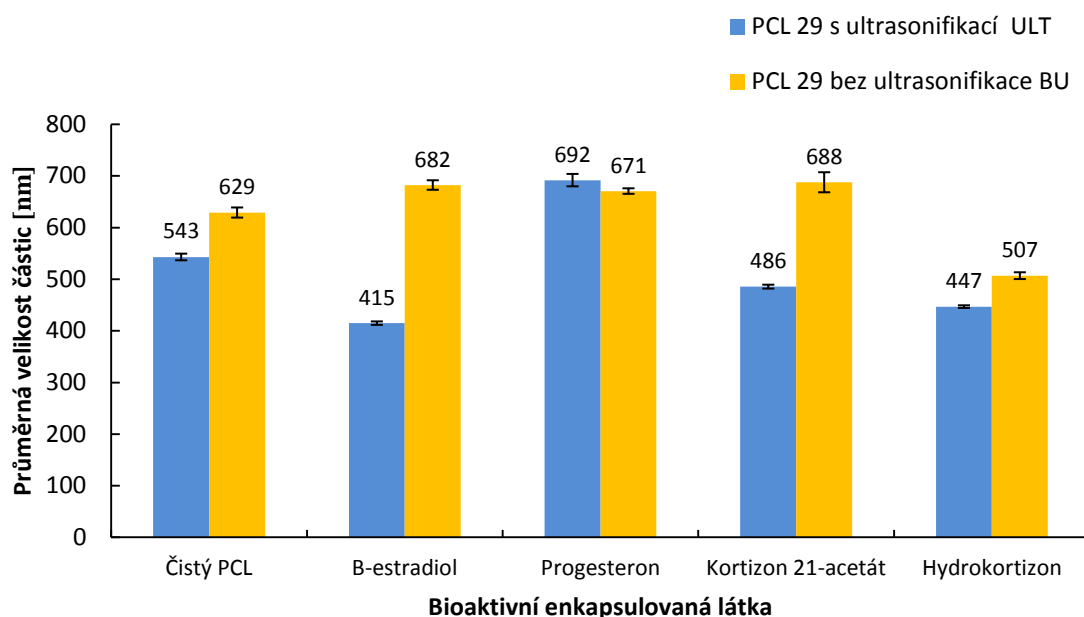
Velikost částic nebyla, tomto případě, nijak výrazně ovlivněna ani druhem enkapsulované látky a jak je patrné z výsledků pro účinnost enkapsulace ani množstvím enkapsulované látky (kapitola 7.1.2). Malý vliv množství enkapsulované látky na velikost částic připravených metodou odpaření rozpouštědla byl již pozorován v práci [16].

Na obr. 7 je znázorněno porovnání průměrných velikostí částic, včetně jejich chybových úseček, z PCL 29 s použitím ultrasonifikace při přípravě a bez jeho použití. Na obr. 8 je znázorněno porovnání pro částice připravené z PCL 30s ultrasonifikací a bez ultrasonifikace. Zde lze pozorovat pouze malý vliv na velikost částic, s maximálním rozdílem velikostech částic u jednotlivých steroidů do 50 nm.

V tab.9 je také uveden výtěžek částic, tato nízká hodnota je ovlivněna pravděpodobně několika procesy během přípravy a to dekantací a lyofilizací. Při dekantaci a promývání se značné množství částic, díky své malé hmotnosti, odplaví. U lyofilizaci docházelo zase v úletu lyofilizovaných částic. Pro vyšší výtěžek by bylo nutné změnit způsob promývání a separace částic, a při procesu lyofilizace zamezit úletu částic.

Tab. 9 Výsledky měření velikosti částic pomocí Zetasizer pro PCL 29

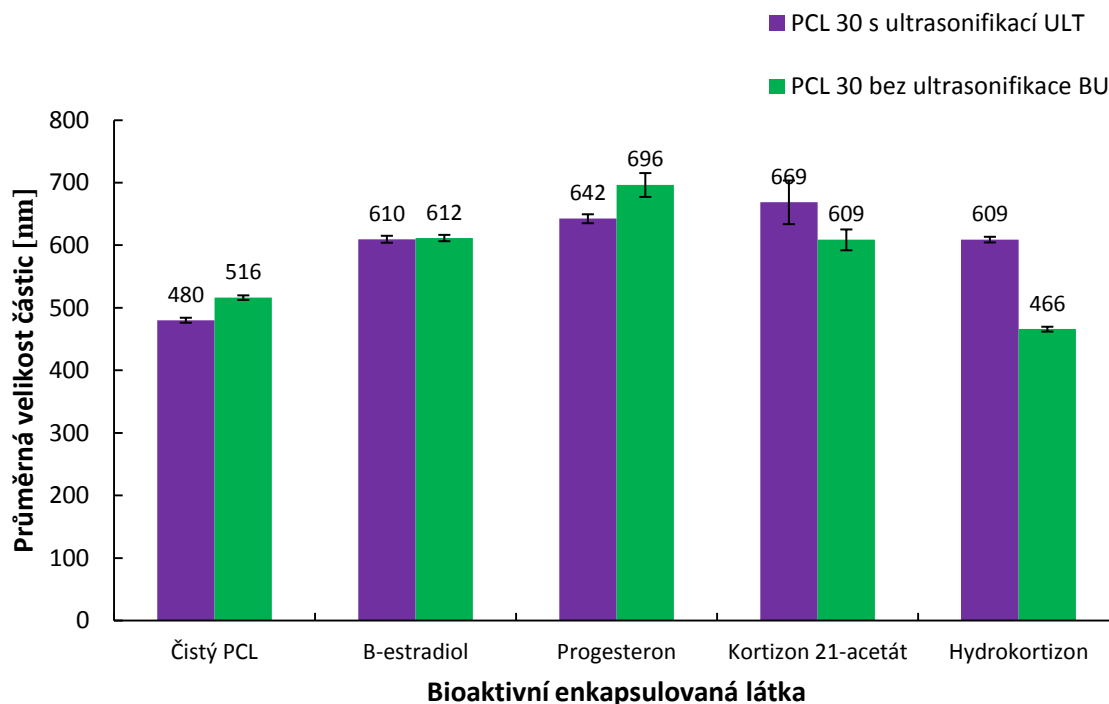
Označení vzorku	Popis vzorku	Průměrná velikost částic [nm]	Polydisperzita [1]	Výtěžek [%]
PR 29 ULT	Progesteron	691,8 ± 11,99	0,285 ± 0,01	28,33
KO 29 ULT	Kortizon 21-acetát	485,5 ± 3,77	0,355 ± 0,02	32,50
HY 29 ULT	Hydrokortizon	446,8 ± 2,54	0,245 ± 0,00	20,21
ES 29 ULT	B-estradiol	414,4 ± 3,35	0,296 ± 0,02	33,33
ES 29 BU	B-estradiol Bez ultrasonifikace	682,3 ± 9,23	0,420 ± 0,04	32,74
PR 29 BU	Progesteron Bez ultrasonifikace	670,6 ± 5,36	0,384 ± 0,02	41,42
KO 29 BU	Kortizon 21-acetát Bez ultrasonifikace	687,7 ± 19,44	0,398 ± 0,03	36,66
HY 29 BU	Hydrokortizon Bez ultrasonifikace	506,7 ± 6,56	0,268 ± 0,00	23,28
Č 29 ULT	Čistý PCL 29	543,0 ± 6,44	0,375 ± 0,02	36,59
Č 29 BU	Čistý PCL 29 Bez ultrasonifikace	629,0 ± 9,81	0,375 ± 0,01	40,49



Obr. 7 Porovnání velikostí částic z PCL 29 vzhledem k použití ultrasonifikace

Tab. 10 Výsledky měření velikosti částic na Zetasizer pro PCL 30

Označení vzorku	Popis vzorku	Průměrná velikost částic [nm]	Polydisperzita [1]	Výtěžek [%]
PR 30 ULT	Progesteron	642,5 ± 7,14	0,398 ± 0,03	23,54
KO 30 ULT	Kortizon 21-acetát	668,7 ± 34,86	0,405 ± 0,02	25,63
HY 30 ULT	Hydrokortizon	609,1 ± 4,52	0,371 ± 0,02	30,21
ES 30 ULT	B-estradiol	609,7 ± 5,58	0,309 ± 0,04	36,67
ES 30 BU	B-estradiol Bez ultrasonifikace	611,6 ± 5,09	0,395 ± 0,01	33,94
PR 30 BU	Progesteron Bez ultrasonifikace	696,4 ± 19,07	0,508 ± 0,10	39,59
KO 30 BU	Kortizon 21-acetát Bez ultrasonifikace	608,7 ± 16,69	0,366 ± 0,02	34,94
HY 30 BU	Hydrokortizon Bez ultrasonifikace	465,9 ± 3,87	0,235 ± 0,02	17,39
Č 30 ULT	Čistý PCL 30	480,2 ± 4,00	0,270 ± 0,01	34,07
Č 30 BU	Čistý PCL 30 Bez ultrasonifikace	516,3 ± 3,65	0,297 ± 0,02	25,92

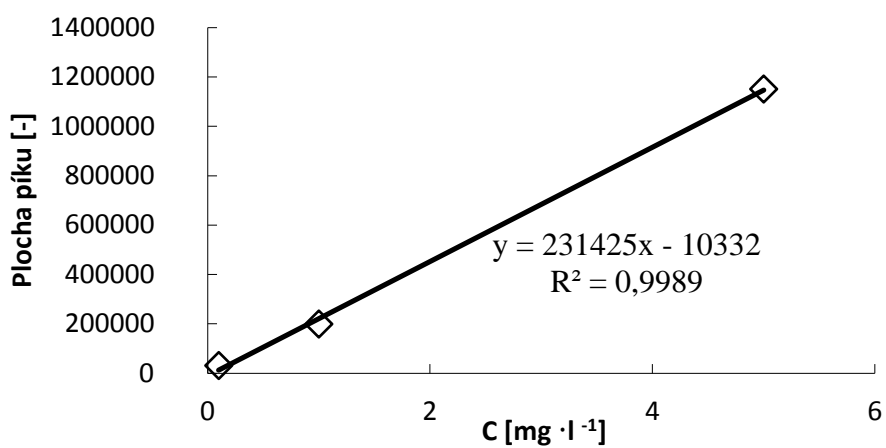


Obr. 8 Porovnání velikosti částic připravených z PCL 30 vzhledem k použití ultrasonifikace

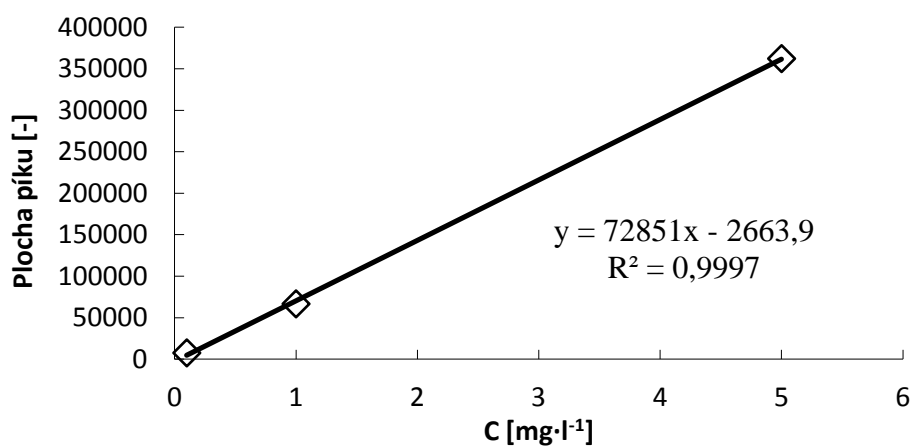
V porovnání s jinými zde uvedenými metodami přípravy částic byly v rámci této práce připraveny částice s menší velikostí než ve výše uvedených studiích. Malá velikost částic je zapříčiněna vysokou rychlostí míchání při emulgaci (24 000 ot./min). Pokud bychom porovnali velikost částic s velikostí připravených částic v [28], které byly vytvořeny z PCL podobné molární hmotnosti s nižší rychlostí míchání při emulgaci, ale metodou dvojité emulze, částice vytvořené v rámci této práce budou opět menší. Můžeme se tedy domnívat, že existuje možnost změny velikosti částic při změně emulzního systému, tedy že při použití metody jednoduché emulze (O/W) s vysokou rychlostí míchání lze připravit částice s menší velikostí než při použití metody dvojité emulze (W/O/W).

7.1.2 Stanovení účinnosti enkapsulace EE steroidů v polymeru pomocí kapalinové chromatografie

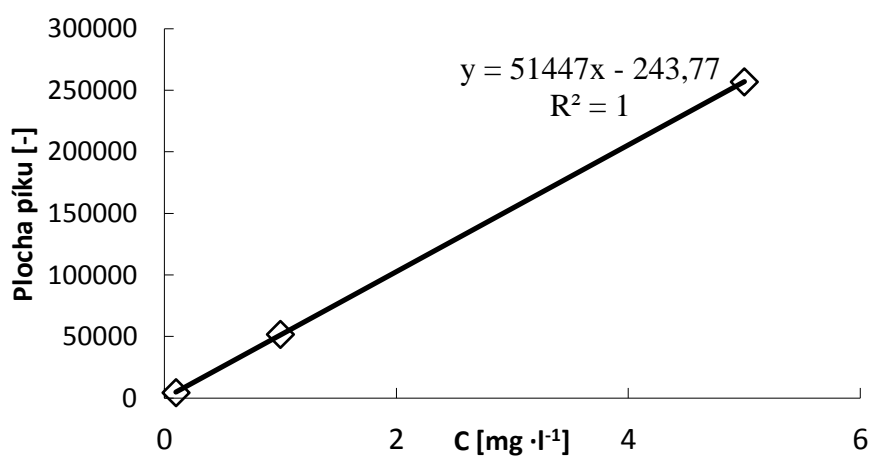
Pro každou ze steroidních látek byla stanovena kalibrační křivka (Obr. 9-12) z níž následně byla vypočtena koncentrace enkapsulované látky. Výsledky účinnosti enkapsulace pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tab.11.



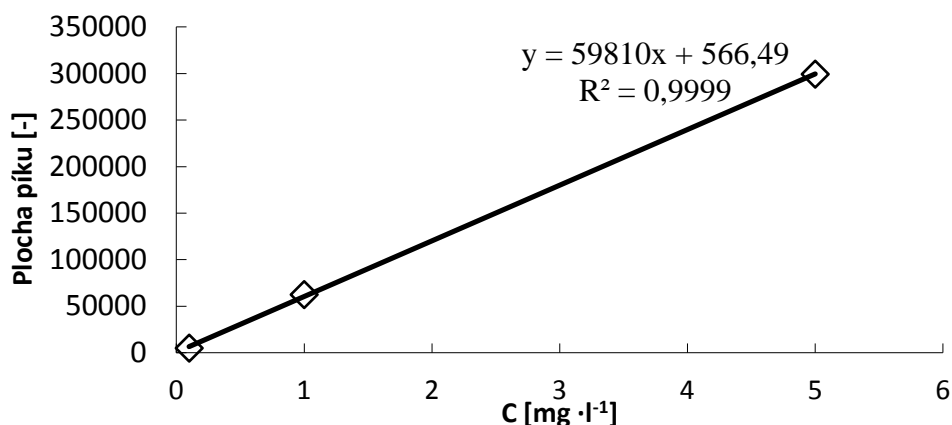
Obr. 9 Kalibrační křivka pro β -estradiol



Obr. 10 Kalibrační křivka pro Progesteron



Obr. 11 Kalibrační křivka pro Kortizon 21- acetát



Obr. 12: Kalibrační křivka pro Hydrokortizon

Účinnost enkapsulace byla zjištěna z koncentrace enkapsulovaného hormonu, která byla zjištěna kapalinou chromatografií, výpočtem z rovnice (1). Dále bylo vypočítáno steroidní zatížení částic podle rovnice (2). V tab.11 jsou uvedeny výsledky výpočtů účinnosti enkapsulace EE a steroidního zatížení částic SL pro jednotlivé vzorky s enkapsulovanou steroidní látkou.

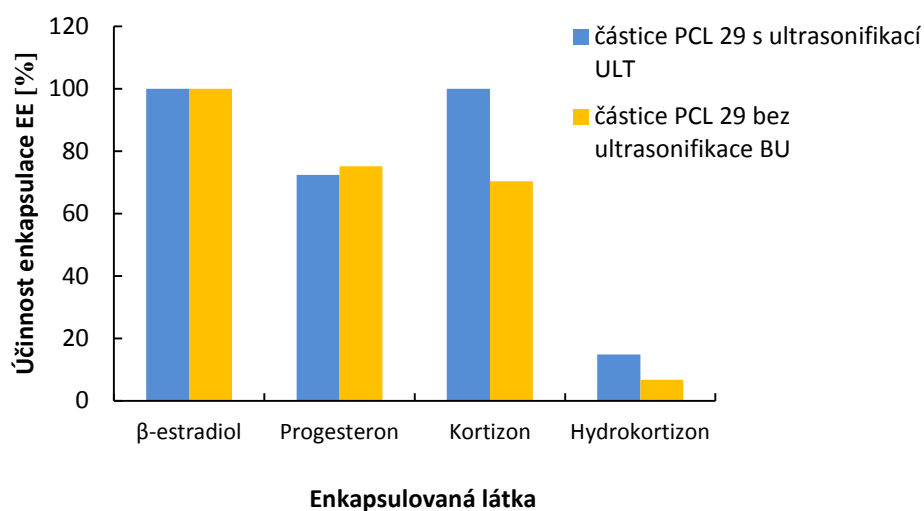
Tab. 11 Účinnost enkapsulace EE steroidů u jednotlivých vzorků

	Označení vzorku	Polymer	Steroidní látka	Množství steroidu v částicích SL [%]	Účinnost enkapsulace EE [%]
Částice připravené s ultrasonifikací	ES 29 ULT	PCL 29	B-estradiol	20,90	100
	ES 30 ULT	PCL 30	B-estradiol	21,05	100
	PR 29 ULT	PCL 29	Progesteron	14,58	72,44
	PR 30 ULT	PCL 30	Progesteron	13,34	66,52
	KO 29 ULT	PCL 29	Kortizon 21-acetát	23,59	100
	KO 30 ULT	PCL 30	Kortizon 21-acetát	19,72	95,98
	HY 29 ULT	PCL 29	Hydrokortizon	2,97	14,84
	HY 30 ULT	PCL 30	Hydrokortizon	2,09	10,39

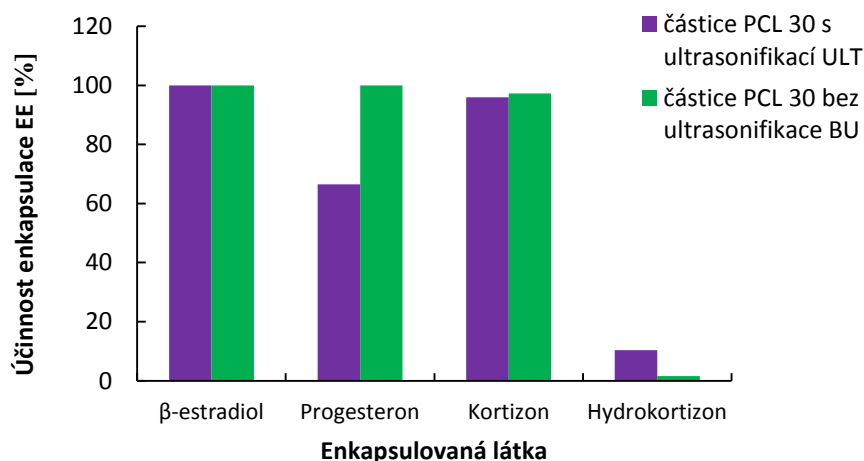
	Označení vzorku	Polymer	Steroidní látka	Množství steroidu v částicích SL [%]	Účinnost enkapsulace EE [%]
Částice připravené bez ultrasonifikace	ES 29 BU	PCL 29	B-estradiol	27,75	100
	ES 30 BU	PCL 30	B-estradiol	24,11	100
	PR 29 BU	PCL 29	Progesteron	14,87	75,21
	PR 30 BU	PCL 30	Progesteron	21,64	100
	KO 29 BU	PCL 29	Kortizon 21-acetát	14,92	70,34
	KO 30 BU	PCL 30	Kortizon 21-acetát	20,48	97,28
	HY 29 BU	PCL 29	Hydrokortizon	1,38	6,73
	HY 30 BU	PCL 30	Hydrokortizon	0,32	1,59

Pro několik použitých steroidních látek byla účinnost enkapsulace přibližně 100%, v těchto případech se můžeme domnívat že enkapsulovaná látka nahradila část matrice polymeru, tedy enkapsulace proběhla na úkor ztráty polymeru během přípravy. Rozhodně můžeme potvrdit, že účinnost enkapsulace byla vyšší u látek, které mají nižší rozpustnost ve vodě. U látek s vysokou rozpustností ve vodě, jako je hydrokortizon byla účinnost enkapsulace velmi nízká.

Jak lze pozorovat na obr.13 a obr.14 účinnost enkapsulace pravděpodobně nijak razantně neovlivnilo použití ultrasonifikace při přípravě částic. Nicméně v některých případech je byly zaznamenány výraznější rozdíly v použití ultrazvuku a to v případě enkapsulace progesteronu do matrice PCL 30 (PR 30 BU, ULT) a hydrocortisonu do PCL 29 (KO 29 BU, ULT). V prvním případě je účinnost enkapsulace s použitím ultrazvuku menší ve druhém větší. Menší účinnost enkapsulace byla zaznamenána také v případě enkapsulace hydrocortisonu do obou typů PCL bez použití ultrazvuku (HY 29 BU, HY 30 BU).



Obr. 13 Účinnost enkapsulace pro PCL 29 vzhledem k použití ultrasonifikace



Obr. 14 Účinnost enkapsulace pro PCL 30 vzhledem k použití ultrasonifikace

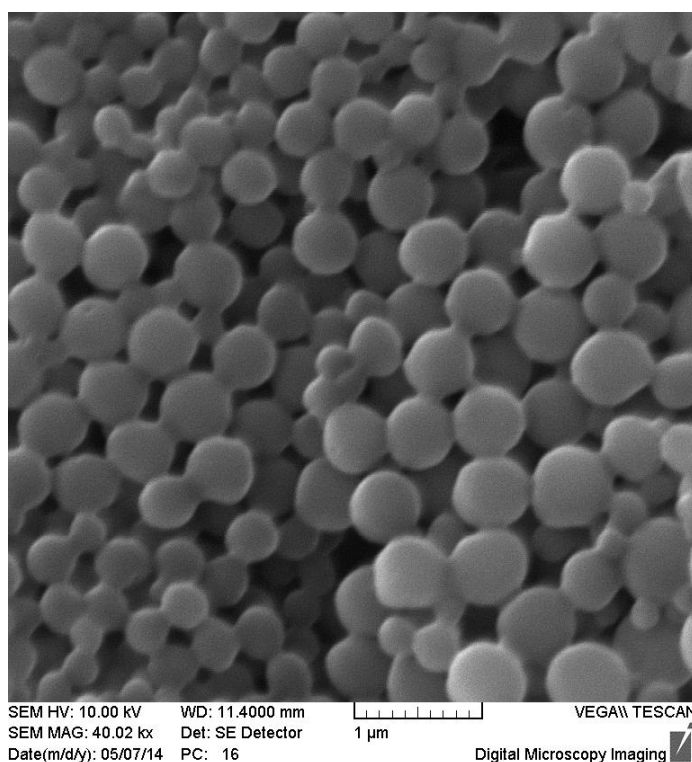
V porovnání s jinými studiemi je účinnost enkapsulace pro látky málo rozpustné až nerozpustné (β -estradiol, progesteron) podobná. Například u práce [26], kdy byl enkapsulován nerozpustný kapsaicin byla účinnost enkapsulace až 99%. U rhodaminu B, uváděného ve stejné práci [26], je rozpustnost přibližně stejná jako u progesteronu, účinnost enkapsulace je však dvakrát až třikrát nižší než u částic vytvořených v rámci této práce.

U látek více rozpustných ve vodě (hydrokortizon) byla stanovena nízká účinnost enkapsulace, podobně nízká účinnost enkapsulace byla stanovena i v práci [32], kdy byl

enkapsulován hovězí sérový albumin (BSA) za přibližně stejných podmínkách při emulgaci.

7.1.1 Skenovací elektronový mikroskop

Tvar výsledných částic byl pozorován pomocí SEM při zvětšení 40 000x pro vzorek ES 29 ULT, který byl vybrán jako vhodný příklad, jelikož obsahoval maximální množství steroidu, které může ovlivnit. Jak je možné vidět na obr. 15 částice jsou kolovitého tvaru, nepříliš polydisperzního charakteru odpovídající submikrometrových rozměrům naměřených pomocí zeta-sizeru.



Obr. 15 Vzorek PR 29 ULT, při zvětšení 40 000

7.2 Expandované částice

Cílem této studie byla optimalizace metody pro přípravu porézních mikročástic z materiálu Ecoflex a studium vlivu procesních parametrů a podmínek na velikost připravených částic.

7.2.1 Stanovení velikosti částic

Velikost připravených částic se stanovila pomocí optického mikroskopu v programu Quick Photo Camera. Průměrné velikosti připravených částí a výtěžek je zaznamenán v tab.16. Porovnání průměrných velikostí je znázorněno na obr.24.

Studium vlivu množství nadouvadla při rychlosti homogenizace 6000 ot/min

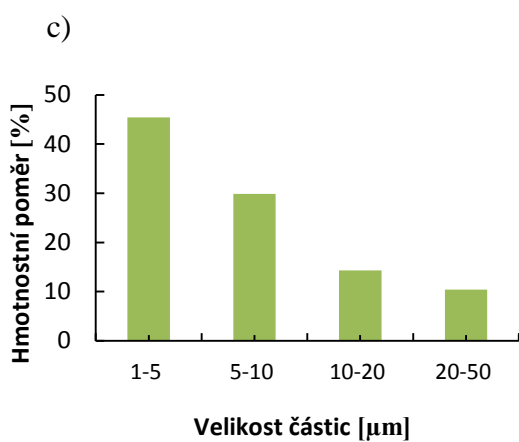
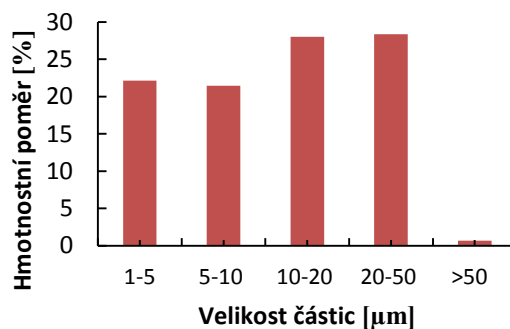
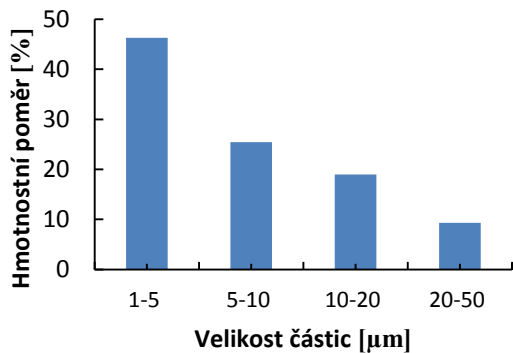
Byla studována distribuce velikosti částic u jednotlivých vzorků. U vzorku E 1-3 byl měněn poměr rozpouštědlo/nadouvadlo. V tab.12 jsou uvedeny výsledky distribuce velikosti částic pro vzorky E1,E2 a E3. Na obr 16 a) je histogram velikosti částic pro vzorek E1, kde byl poměr dichlormethan/hexan 9:1 a rychlost míchání při emulgaci 6 000 ot/min., největší zastoupení v tomto vzorku měly částice s velikostí do 5 μm . Na obr.16 b) je znázorněna distribuce velikosti částic pro vzorek E2 kde byl poměr dichlormethan/hexan 19:1, zde byla distribuce velikosti částice značně polydisperzní. Obr. 16 c) popisuje distribuci velikosti části pro vzorek E 3, kdy byl poměr dichlormethan/hexan 39:1. U tohoto vzorku obdobně jako u vzorku E1 převládaly částice s velikostí do 5 μm . Na obr.17 jsou znázorněny distribuce velikosti částic pro vzorky E 1, E2, E3.

*Tab. 12 Distribuce velikosti částic pro vzorky (poměr ChCl_3 :*n*-hexan): E1(9:1), E2(19:1), E3(39:1); rychlost míchání 6 000 ot./min*

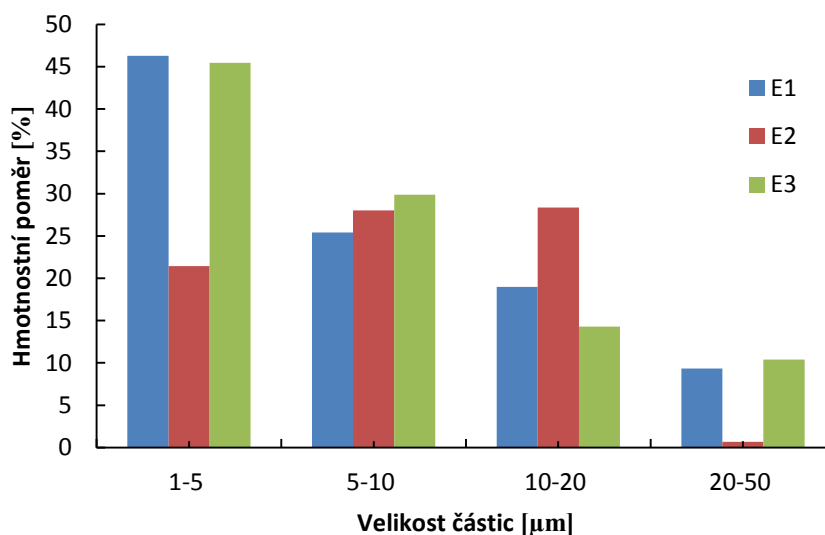
Velikost částic [μm]	Hmotnostní zastoupení [%]		
	E1	E2	E3
1-5	46,30	21,45	45,45
5-10	25,40	28,03	29,87
10-20	18,97	28,37	14,29
20-50	9,32	0,69	10,39
Průměrná velikost [μm]	8,02	13,94	8,06

a)

b)



Obr. 16 Histogramy distribuce velikosti porézních mikročástic. a) vzorek E1, b) vzorek E2, c) vzorek E3



Obr. 17 Histogram distribuce velikosti porézních mikročástic, porovnání vzorků E1 (CH_2Cl_2 :n-hexan 9:1), E2(19:1), E3(39:1) – emulzifikace při 6 000 ot./min

Studium vlivu rychlosti homogenizace při 24 000 ot/min na velikost částic

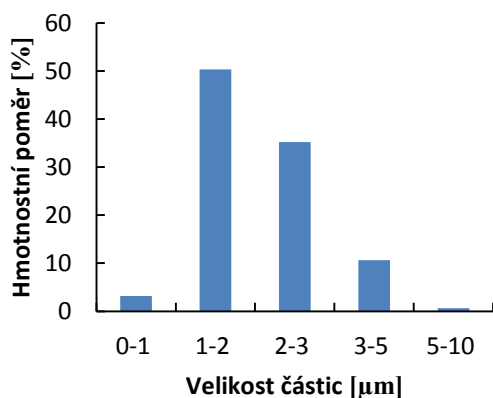
U série vzorků EKO byla oproti předchozí sérii (E) zvýšena rychlost otáček při emulzifikaci. Obr.18 a)b)c) popisuje distribuci velikosti částic u vzorků EKO 1, EKO 2, EKO 3. Z histogramů je patrné že částice měli velikost maximálně 10 μ m. Na obr.19 kde jsou znázorněny všechny histogramy pro vzorky EKO je patrné, že největší zastoupení u těchto vzorků mají částice od 1 do 3 μ m. Distribuce velikosti částic je uvedena v tab.13.

Vliv změny rychlosti míchání je lépe znázorněný na obr.24, kde jej lze porovnat s částicemi E1-3, které byly homogenizovány při rychlosti 6 000 ot./min.

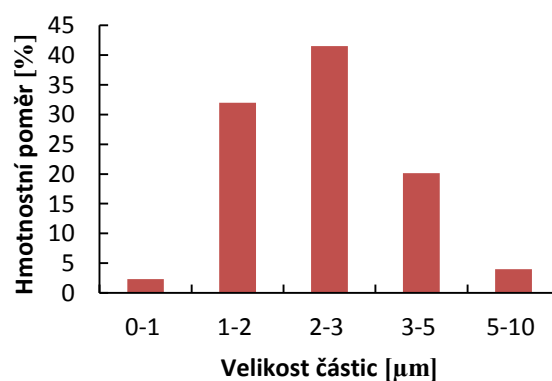
Tab. 13 Distribuce velikosti částic pro vzorky (poměr $CH_2Cl_2:n$ -hexan): EKO1(9:1), EKO2(19:1), EKO3(39:1); rychlost míchání 24 000 ot./min

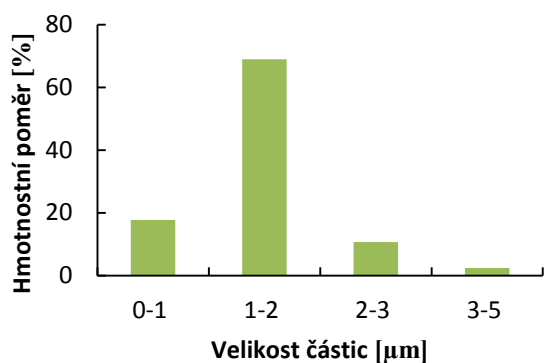
Velikost částic [μ m]	Hmotnostní zastoupení [%]		
	EKO 1	EKO 2	EKO 3
0-1	3,18	2,33	17,79
1-2	50,34	32	68,92
2-3	35,20	41,5	10,78
3-5	10,65	20,17	2,51
5-10	0,62	4	0
Průměrná velikost [μm]	1,58	2,03	1,04

a)



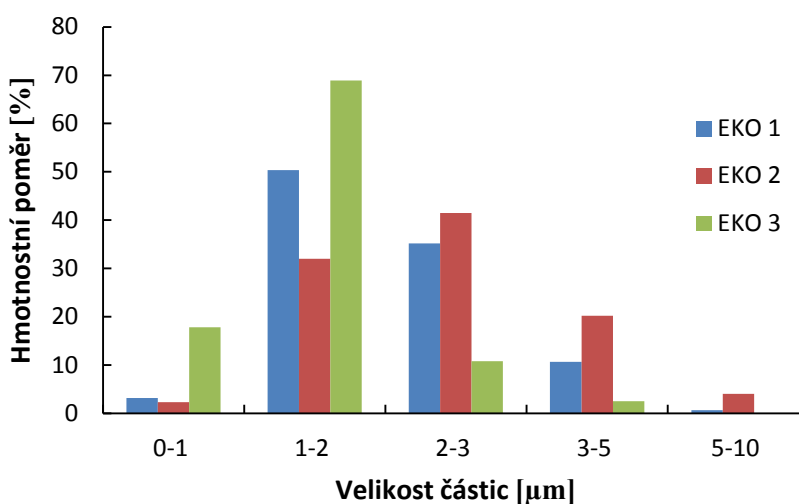
b)





c)

Obr 18 Histogramy distribuce velikosti porézních mikročástic a) vzorek EKO 1; b) vzorek EKO 2; c) vzorek EKO 3



Obr. 19 Porovnání distribuce velikosti částic u vzorků EKO1, EKO2, EKO3

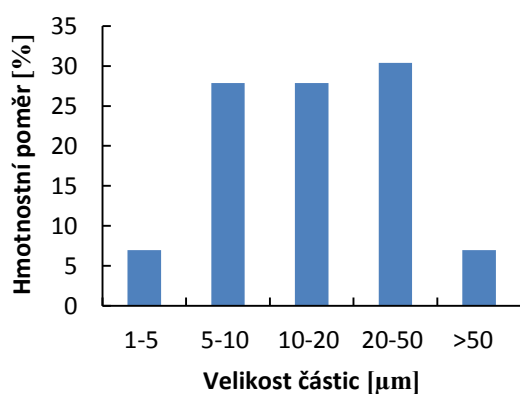
Studium vlivu změny koncentrace stabilizátoru emulze na velikost částic

U vzorků s názvem FLEX byla měněna koncentrace stabilizátoru emulze (PVA). Rychlost otáček (6 000ot/min), poměr rozpouštědlo/nadouvadlo (9:1) a množství polymeru (100 mg) byly konstantní. Distribuci velikosti částic shrnuje tab.14 a popisuje obr.20. Na obr. 21 je znázorněno porovnání distribuce velikosti částic všech vzorků FLEX.

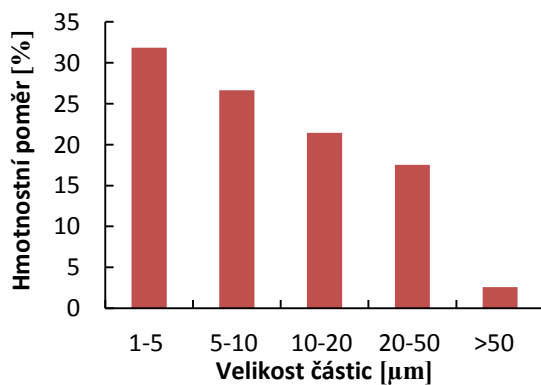
Tab. 14 Distribuce velikosti částic pro vzorky (koncentrace PVA)
 FLEX 1(0,25%), FLEX 2(0,10%), FLEX 3(0,05%)

Velikost částic [μm]	Hmotnostní zastoupení [%]			
	E 1	FLEX 1	FLEX 2	FLEX 3
1-5	46,30	6,96	31,82	37,5
5-10	25,40	27,85	26,62	23,21
10-20	8,97	27,85	21,43	22,14
20-50	9,32	30,38	17,53	16,07
>50	0	6,96	2,6	1,07
Průměrná velikost [μm]	8,02	18,53	11,86	11,18

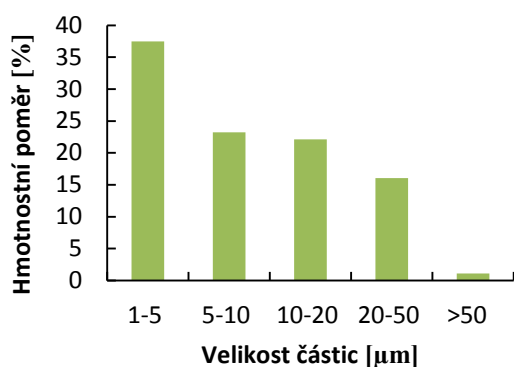
a)



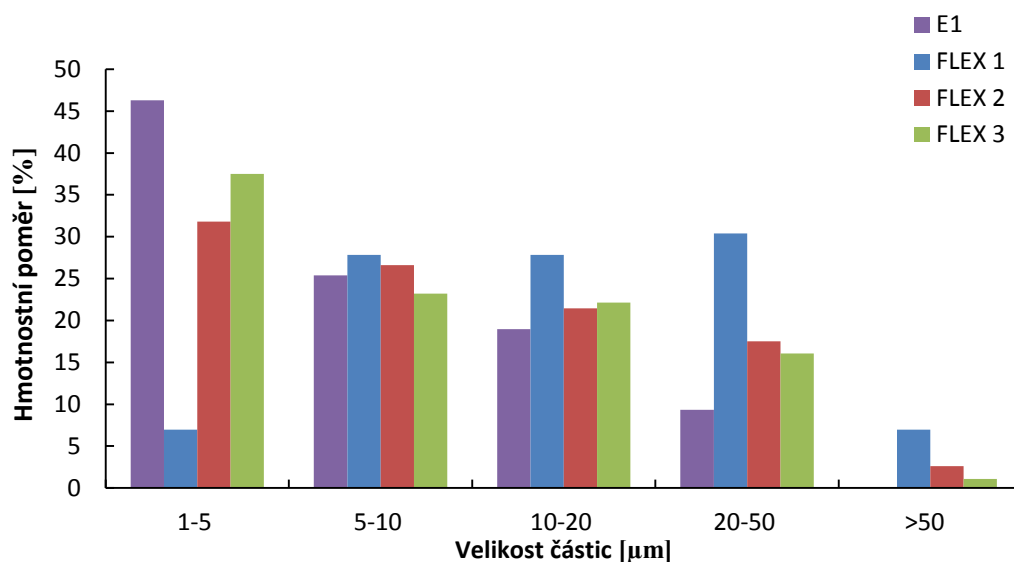
b)



c)



Obr. 20 Histogramy velikosti porézních mikročástic a) vzorek FLEX 1; b) vzorek FLEX 2; c) vzorek FLEX 3



Obr. 21 Porovnání jednotlivých histogramů velikosti částic pro vzorky FLEX 1; FLEX 2 a FLEX 3

Studium změny koncentrace výchozího polymeru

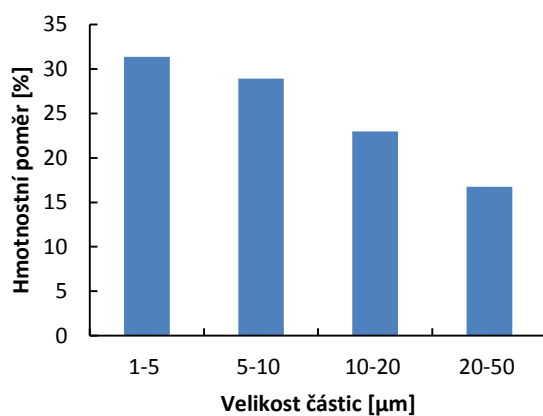
Posledním měněným parametrem u částic z PBAT byla koncentrace výchozího polymeru. Podařilo se připravit částice z 50 mg a 200 mg polymeru (PBAT). Obr. 22 popisuje histogramy distribuce velikosti částic u těchto vzorků. Obr.23 porovnává distribuci velikosti částic obou vzorků. V tab.15 je uvedena distribuce velikosti částic pro vzorky EKO 1-2 a E1.

Tab. 15 Distribuce velikosti částic pro vzorky: E1 (100 mg)
EKO 50 mg a EKO 200 mg

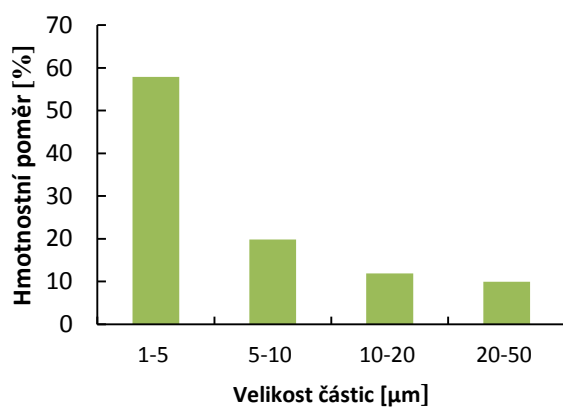
Velikost částic	Hmotnostní zastoupení [%]
-----------------	---------------------------

[μm]	E 1	EKO 50	EKO 200
1-5	46,30	31,35	57,92
5-10	25,40	28,92	19,80
10-20	18,97	22,97	11,88
20-50	9,32	16,76	9,90
Průměrná velikost [μm]	8,02	10,57	7,76

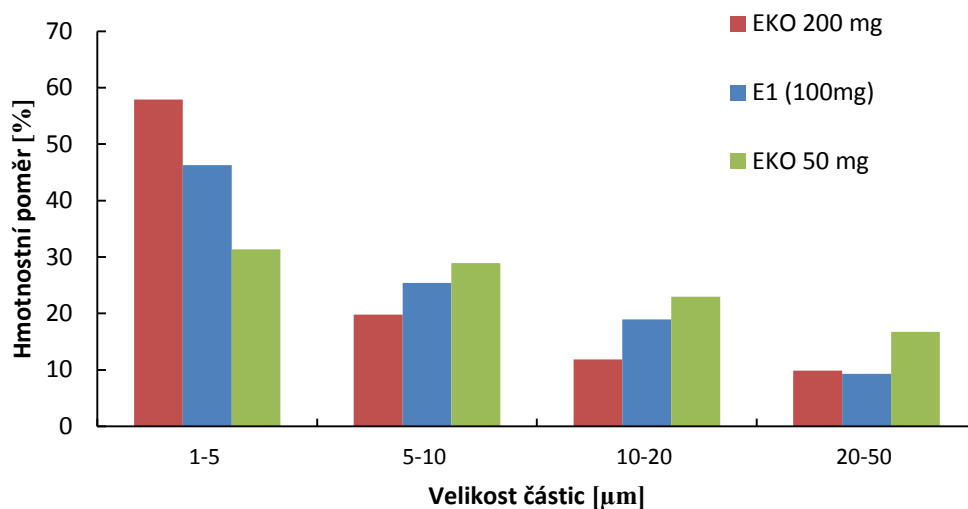
a)



b)



Obr. 22 Histogramy distribuce velikosti částic pro vzorky EKO 50 mg, EKO 200 mg



Obr. 23 Porovnání distribuce velikosti částic u vzorků EKO 200 mg, E1 (100mg) a EKO 50 mg

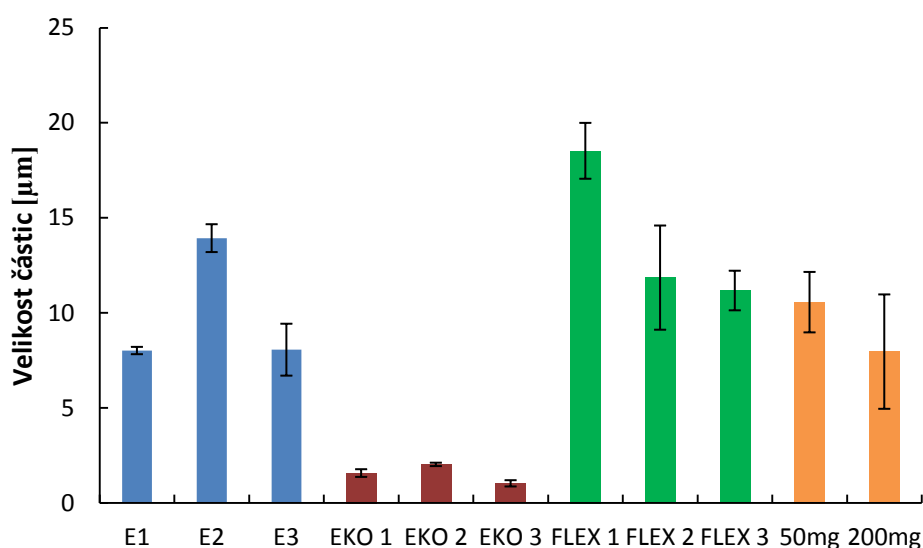
Srovnání průměrné velikosti porézních částic

Největší průměrná velikost částic byla u vzorku FLEX 1, kde byl poměr dochlormethan/hexan 9:1 a koncentrace stabilizátoru emulze byla 0,25%. Nejmenší částice byly u vzorků EKO 1-3, kde se měnila rychlost míchání při emulgaci. Z toho plyne, že zvýšením rychlosti míchání při emulgaci se sníží i velikost připravených částic.

Tab. 16 Průměrné velikosti a výtěžek připravených porézních částic

Vzorek	Průměrná velikost částic [μm]	Výtěžek [%]
E1	8,02 ± 0,19	45,77
E2	13,94 ± 0,73	48,37
E3	8,06 ± 1,37	45,98
EKO 1	1,58 ± 0,21	40,05
EKO 2	2,03 ± 0,09	35,15
EKO 3	1,04 ± 0,17	39,35

Vzorek	Průměrná velikost částic [μm]	Výtěžek [%]
FLEX 1	$18,53 \pm 1,47$	44,91
FLEX 2	$11,86 \pm 2,74$	40,08
FLEX 3	$11,18 \pm 1,04$	46,51
EKO 50 mg	$10,57 \pm 1,59$	49,80
EKO 200 mg	$7,96 \pm 3,00$	55,68

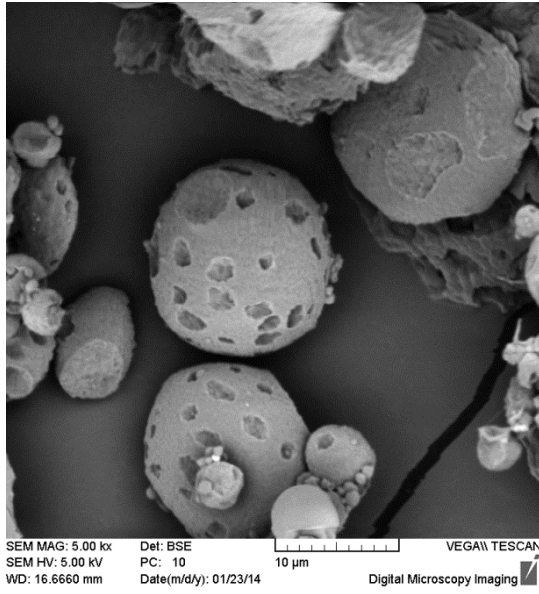


Obr. 24 Porovnání průměrných velikostí připravených částic

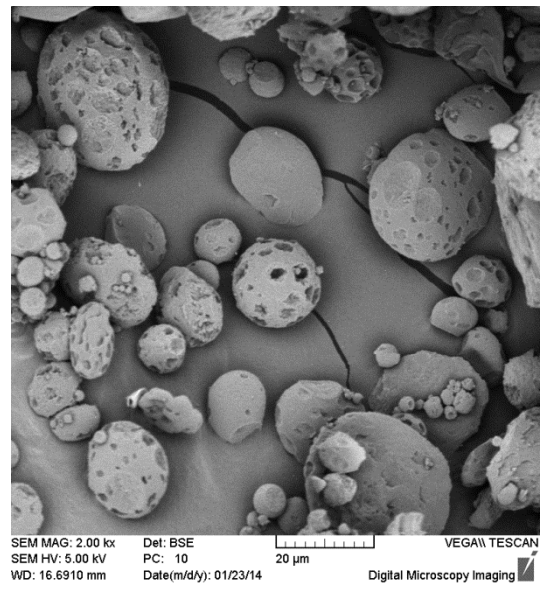
7.2.2 Skenovací elektronový mikroskop

Tvar výsledných částic a jejich morfologie byla opět pozorována pomocí SEM při zvětšení 2000x a 5000x pro vzorky E1-E3, které byly vybrán jako vhodný příklad, jelikož se lišily množstvím nadouvadla u nichž se očekávaly výrazné změny v morfologii povrchu částic. Jak je možné vidět na obr. 25 částice jsou kulovitěho tvaru s evidentními póry na povrchu, ne příliš polydisperzního charakteru odpovídající submikrometrových rozměrům naměřených pomocí zeta-sizeru. Ze snímků je možné pozorovat, že se velikost pórů výrazně snižovala se snižující se koncentrací n-hexanu (nadouvadla).

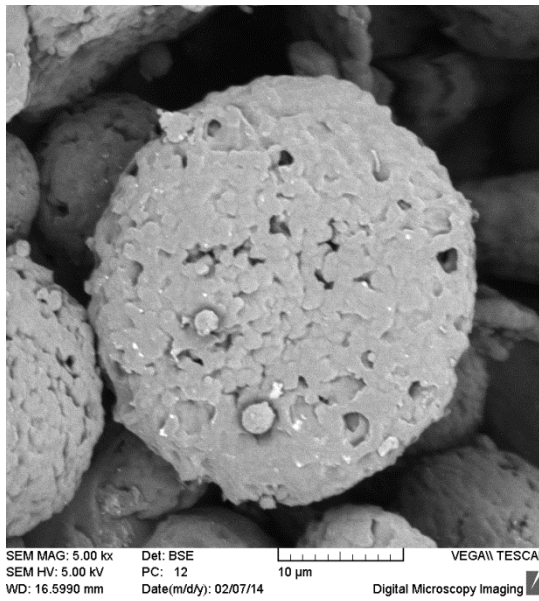
a)



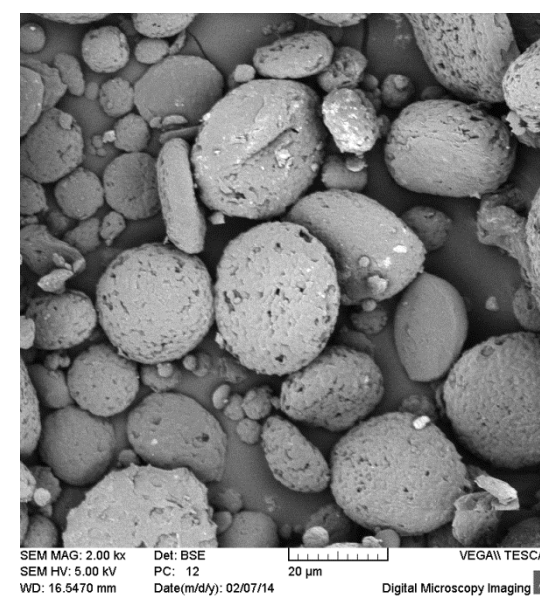
b)



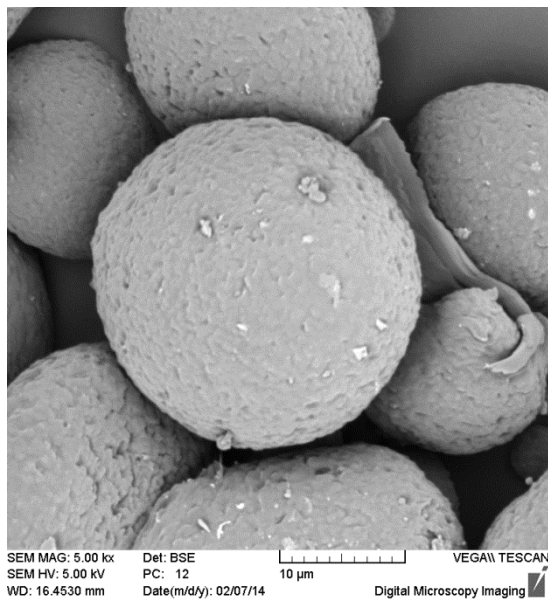
c)



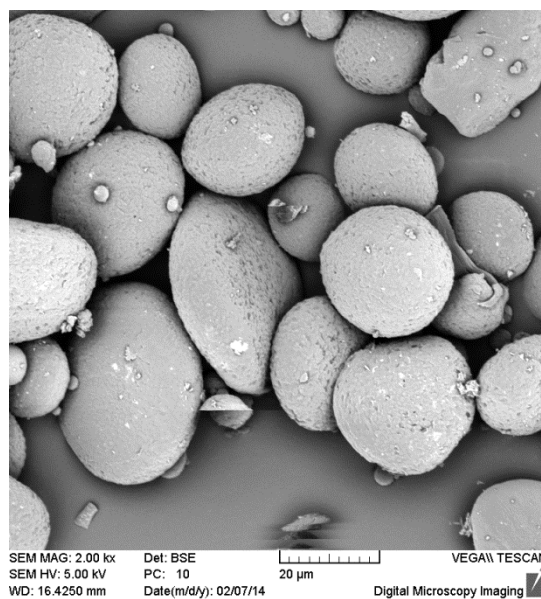
d)



e)



f)



Obr. 25 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu pro vzorky (zvětšení): a) E1 (5 000x); b) E1 (2 000x); c) E2 (5 000x); d) E2 (2 000x); e) E3 (5 000x); f) E3 (2 000x)

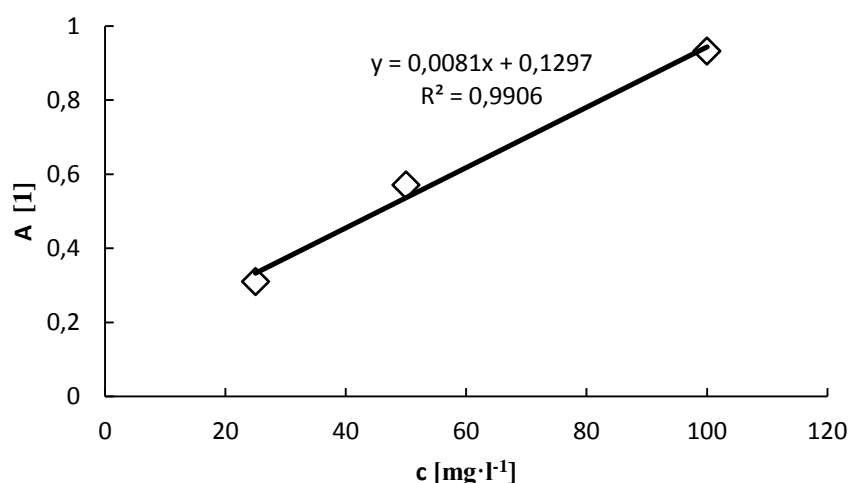
7.3 Sorpční schopnost porézních částic

Sorpční schopnost porézních částic byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 276 nm. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka (obr.26) a bylo vypočítáno množství bisfenolu A absorbovaného na částice. Výsledky spolu s velikostí částic jsou uvedeny v tab.17. Na obr.27 je znázorněno porovnání adsorbovaného množství bisfenolu A celkového a vztaženého na 1mg částic. Pro porovnání jsou v grafech uvedeny i částice připravené bez nadouvadla s menší velikostí.

Tab. 17 Hmotnost adsorbovaného bisfenolu A na porézní částice

Vzorek	Velikost [μm]	Hmotnost adsorbovaného
		Bisfenolu A na 1 mg částic [mg/mg]
ECO nano – bez pórů	0,57	0,0378
E1	8,02 ± 0,19	0,0844
E2	13,94 ± 0,73	0,0859
E3	8,06 ± 1,37	0,0987

Vzorek	Velikost [μm]	Hmotnost adsorbovaného
		Bisfenolu A na 1 mg částic [mg/mg]
EKO 1	$1,58 \pm 0,21$	0,0861
EKO 2	$2,03 \pm 0,09$	0,0875
EKO 3	$1,04 \pm 0,17$	0,832
FLEX 1	$18,53 \pm 1,47$	0,0867
FLEX 2	$11,86 \pm 2,74$	0,0882
FLEX 3	$11,18 \pm 1,04$	0,0858
EKO 50 mg	$10,57 \pm 1,59$	0,0874
EKO 200 mg	$7,96 \pm 3,00$	0,0867

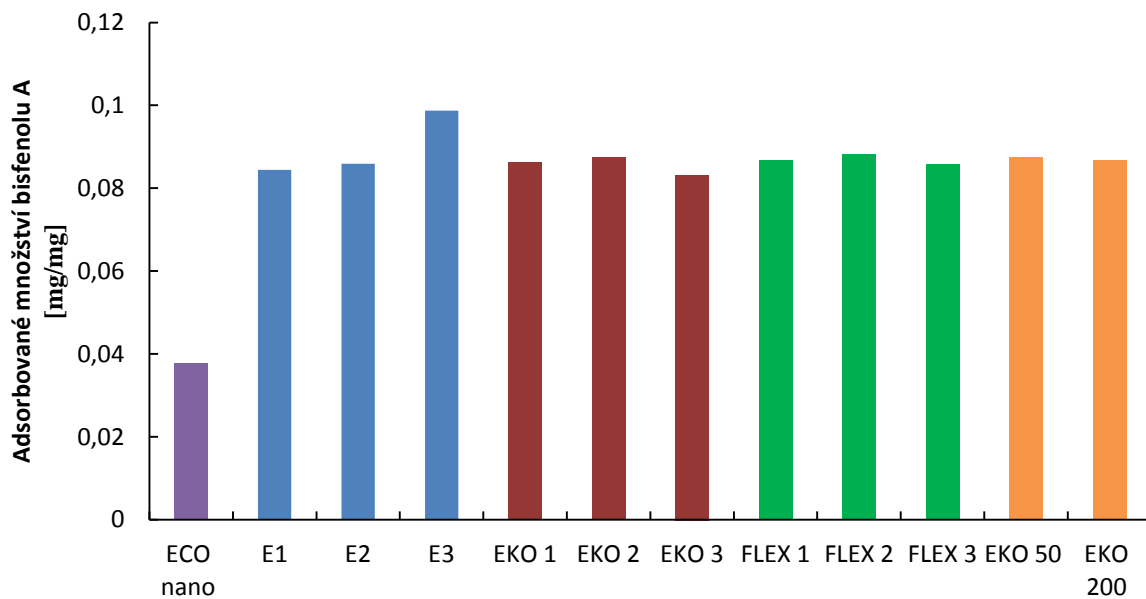


Obr. 26 Kalibrační křivka pro bisfenol A, měřená při 276 nm

Jak je patrné z grafu (obr. 27) porézní částice připravené v rámci diplomové práce vykazují mnohem lepší sorpční schopnosti bisfenolu A než v případě částic bez porézní struktury, ačkoli jsou tyto částice více jak o jeden řád menší. Nejlepší sorpční schopnost pak vykazovaly částice E3, které měly nejnižší koncentraci nadouvadla. Dále si můžeme všimnout, že u částic s označení EKO 1-3, je stejná účinnost sorpce jako u ostatních porézních částic, i když velikost částic byla několikanásobně nižší. Z toho můžeme tvrdit,

že sorpce se projevuje s vyšší účinností u částic s porézní strukturou, bez vlivu velikosti porézních částic.

Nicméně výsledky uvedené v této práci jsou prvotní a je třeba dalšího zkoumání pro přesná a pravdivá tvrzení.



Obr. 27 Množství absorbované Bisfenolu A na hmotnost částic u jednotlivých vzorků a neporézních submikročástic (ECO nano)

ZÁVĚR

V rámci této práce byly připraveny částice ze dvou typů PCL o různých molekulových hmotnostech, do nichž byly enkapsulovány steroidní látky. Částice byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla, konkrétně metodou jednoduché emulze O/W. Při přípravě částic byl sledován vliv použití ultrazvuku při emulzifikaci. Podařilo se připravit částice o velikosti 400-700 nm. U připravených částic byl sledován vliv ultrasonifikace na velikost částic a účinnost enkapsulace.

Z provedených studií bylo zjištěno, že použití ultrasonifikace nemá velký vliv na změnu velikosti částic. Bylo by pravděpodobně potřeba dodání mnohem většího množství energie do systému prostřednictvím ultrazvuku, aby došlo k výraznějšímu zmenšení částic. Na velikost částic neměla vliv ani molární hmotnost polymerů.

Účinnost enkapsulace byla u částic s enkapsulovanou látkou málo rozpustnou ve vodě (b-estradiol, progesteron, kortizon) 60-100%. U 100% účinnosti je podezření, že během přípravy došlo ke ztrátě polymeru na úkor steroidu. Účinnost enkapsulace, u látky relativně dobře rozpustné ve vodě (hydrokortizon), byla zjištěna velmi nízká a to v rozmezí od 1-15%. U hydrokortizonu byla účinnost enkapsulace vyšší u částic připravených s ultrasonifikací (HY 29 ULT, HY 30 ULT), a to 10-15%, u částic bez ultrasonifikace (HY 29 BU, HY 30 BU) byla 1-7%, tedy minimálně o polovinu nižší. Takto nízká účinnost enkapsulace je ovlivněna hlavně rozpustností enkapsulované látky ve vodě. Z uvedených výsledků lze tedy tvrdit, že ultrasonifikace neměla zásadní vliv na účinnost enkapsulace, ačkoliv se u některých případech zřejmě její vliv projevil.

Dalším bodem této práce byla příprava porézních částic z PBAT metodou odpaření rozpouštědla systémem O/W. Při přípravě částic bylo měněno několik parametrů a to: poměr rozpouštědlo/nadouvadlo, rychlost míchání při emulgaci, koncentrace stabilizátoru emulze (PVA) ve vodné fázi a množství polymeru. Zde byl sledován vliv změny těchto parametrů na velikost připravených částic. Nejrazantnější změna ve velikosti částic byla při změně rychlosti míchání při emulgaci. Zajímavé zjištění bylo při změně počáteční koncentrace polymeru, kdy se zvyšující se koncentrací polymeru snižovala i velikost částic.

Poslední studií bylo testování sorpční schopnosti připravených porézních částic, kdy byl adsorbován bisfenol A. Nejvyšší sorpční účinnost měly částice E1, tedy částice s nižším množstvím nadouvadla. Porézní částice byly porovnávány jednak mezi sebou, ale také i

s neporézními nanočásticemi z PBAT. Bylo zjištěno, že neporézní částice mají sorpční schopnost pouze cca 0,03mg bisfenolu A na 1 mg částic, oproti porézním částicím, které měly sorpční až třikrát vyšší a to 0,09 mg adsorbovaného bisfenolu A na 1 mg porézních částic. Z toho můžeme tvrdit, že zvýšením specifického povrchu, například vytvořením pórů, lze získat vyšší účinnost adsorpce chemických látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VYSLOUŽIL, J. et al. Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*, 2013, vol. 107, no. 1, s. 16-23. ISSN: 0009-2770.
- [2] PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug-loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2006, vol. 2, no. 1, s. 8-21. ISSN:1549-9634.
- [3] KRÁL, V. et al., Nanomedicína- současný stav a perspektivy: velký potenciál, nebo jen módní slogan? *Chemické listy*, 2006, vol. 100, s 4-9, ISSN: 1213-7103.
- [4] CHANDRA, R., RUSTGI, RENU, Biodegradable polymers, *Progress in Polymer Science*, Volume 23, Issue 7, November 1998, p. 1273-1335
- [5] CAMPOS, E., BRANQUINHO, J., CARREIRA, A.S., CARVALHO, A., COIMBRA, P., FERREIRA, P., GIL, M.H. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications *European Polymer Journal*, Volume 49, Issue 8, August 2013, Pages 2005-2021
- [6] PRNKA, T., ŠPERLINK, K. Sedmý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje, Ostrava: Repronis, 2006, 179 s. ISBN 80-732-9134-7.
- [7] KLOSE, D., SIEPMANN, F., ELKHARRAZ, K., How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 314, Issue 2, 18 May 2006, Pages 198–206
- [8] PETRÁŠ, D., KIMMER, D. SOUKUP, K., KLUSOŇ, P., Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*, 2009, vol. 103, s 1009-1016, ISSN: 1213-7103.
- [9] LABETA, M., THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review Received 15th January 2009, First published as an Advance Article on the web 25th September 2009, DOI: 10.1039/b820162p
- [10] Biodegradable Polymers – Inspired by Nature: Ecoflex, Ecovio. [on-line]. [cit. 21.11.2009]. Dostupný z [www](http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions:/publish/common/upload/biodegradable_plastics/Ecoflex_Brochure.pdf): <www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions:/publish/common/upload/biodegradable_plastics/Ecoflex_Brochure.pdf>.
- [11] PLASTICS PORTAL, Informace o produktu Ecoflex ® firmy BASF [online] . [cit. 2014-05-03]., Dostupné z: http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/portal/show/content/products/biodegradable_plastics/ecoflex

- [12] YAMAMOTO, M., WITT, U., SKUPIN, G., BEIMBORN, G., MÜLLER, R.J., Biodegradable aliphatic aromatic polyester „Ecoflex“ . [on-line]. [cit.6.4.2014]. Dostupné z [www: <www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v04/bpol4011_299_305.pdf>](http://www.vch.de/books/biopoly/pdf_v04/bpol4011_299_305.pdf)
- [13] STLOUKAL, P., KASPARKOVA, V., KOUTNY, M. *Preparation of submicroparticles based on biodegradable co-polyester: Development, energy, environment, economics international conference on development, energy, environment, economics, Puerto de la Cruz, Tenerife, November 30 - December 2, 2010*. Athens: NAUN, 2010. ISSN ISBN: 978-960-474-253-0.
- [14] PINTO REIS, C. et al. Nanoencapsulation I. Methods for Preparation of Drug- loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2006, vol. 2, no. 1, s. 8-21. ISSN:1549-9634.
- [25] VYSLOUŽIL, J. et al. Příprava léčivých mikročásteček metodou odpařování roz-pouštědla. *Chemické listy*, 2013, vol. 107, no. 1, s. 16-23. ISSN: 0009-2770.
- [16] STLOUKAL, P., KUCHARCZYK, P., SEDLARIK, V., BAZANT, P., a KOUTNY, M. Low Molecular Weight Poly(lactic acid) Microparticles for Controlled Release of the Herbicide Metazachlor: Preparation, Morphology, and Release Kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012-04-25, vol. 60, issue 16, s. 4111-4119. DOI: 10.1021/jf300521j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf300521j>
- [17] KREJČOVÁ, K., GRYZOVÁ, E., RABIŠKOVÁ, M., Polymerové mikročástečky pro perorální přípravek diklofenaku, *Chemické listy*, 2009, vol. 103, s 81-97, ISSN: 1213-7103.
- [18] LETCHFORD, K., BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007, vol. 65, p. 259–269.
- [19] LEGRAND, P. LESIEUR, S., BOCHOT, A., GREF, R., RAATIES, W., BARRATT, G., VAUTHIER, C. Influence of Polymer Behaviour in Organic Solution on the Production of Polylactide Nanoparticles by Nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics* 2007, vol. 344, no. 1-2, p. 33-43.

- [20] QUINTANAR-GUERRERO, D., TAMAYO-ESQUIVEL, D., GANEM QUINTANAR, A., ALLEMANN, E., DOELKER, E. Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2005, vol. 26, p. 211-218.
- [21] RAO, J. P., GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* 2011, vol. 36, p. 887-913.
- [22] ALMEIDA, M.A., NADAL, J.M., GRASSIOLLI, S. PALUDO, K.S., ZAWADZKI, S.F.,GRUZ. L., PAULA, J.P., FARAGO, P.V. Enhanced gastric tolerability and improved anti-obesity effect of capsaicinoids-loaded PCL microparticles Original Research Article *Materials Science and Engineering: C*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 30 March 2014
- [23] BYUN, Y., HWANG, JIN BONG, SUNG HWAN BANG, DARBY, D., COOKSEY, K., DAWSON, P.L., PARK, H.J. WHITESIDE, S. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles Original Research Article *LWT - Food Science and Technology*, Volume 44, Issue 1, January 2011, Pages 24-28
- [24] GIBAUD, S., NAJIM JABIR AL AWWADI, DUCKI, C., ASTIER, A. Poly(ϵ -caprolactone) and Eudragit® microparticles containing fludrocortisone acetate Original Research Article *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 269, Issue 2, 28 January 2004, Pages 491-508
- [25] WANG, X., WANG, Y., WEI, K., ZHAO, N., ZHANG, S., CHEN, J., Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release, *Journal of Materials Processing Technology*, Volume 209, Issue 1, 1 January 2009, Pages 348-354
- [26] WANG, S., GUO., S. CHENG, L. Disodium norcantharidate loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres: I. Preparation and evaluation *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 350, Issues 1-2, 28 February 2008, Pages 130-137

- [27] GIBAUD, S., GAIA, A., ASTIER, A. Slow-release melarsoprol microparticles
Original Research Article International Journal of Pharmaceutics, Volume 243,
Issues 1–2, 28 August 2002, Pages 161-166
- [28] IBRAHEEM, D., IQBAL, M., AGUSTI, G., FESSI, H., ELAISSARI, A., Effects
of process parametres on the colloidal properties of polycaprolactone
microparticles prepared by double emulsion like process, *Colloids and Surfaces
A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 445, 20 March 2014,
Pages 79-91
- [29] LAMPRECHT, A., ULBRICH N., PÉREZ, M. HOMBREIRO, LEHR, C.-M,
HOFFMAN, M., MAINCENT, P., Biodegradable monodispersed nanoparticles
prepared by pressure homogenization-emulsification, *International Journal of
Pharmaceutics*, Volume 184, Issue 1, 5 July 1999, Pages 97-105
- [30] EKOLOGICKÝ INSTITUT VERONICA. *Chemické látky ve vodě* [online]. [cit.
2014-05-03]. Dostupné z: <http://www.veronica.cz/?id=561>
- [31] MAGHARLA DASARATHA DHANARAJU, KIRAN VEMA, RAJADAD
JAYAKUMAR, CHADRESEKAR VAMSADHARA. Preparation and
characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones
International Journal of Pharmaceutics, Volume 268, Issues 1–2, 11 December
2003, Pages 23-29
- [32] BENOIT, A., BARAS, B., GILLARD, J. Preparation and characterization of
protein-loaded poly (ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery,
Article International Journal of Pharmaceutics, Volume 184, Issue 1, 5 July 1999,
Pages 73-84M
- [33] HONG, Y., GAO, CH., SHI, Y. a SHEN, J. Preparation of porous polylactide
microspheres by emulsion-solvent evaporation based on solution induced phase
separation. *Polymers for Advanced Technologies*. 2005, vol. 16, issue 8, s. 622-
627. DOI: 10.1002/pat.629. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pat.629>
- [34] SHI, X., SUN, L., JIANG, J., ZHANG, X., DING, W. and GAN, Z. (2009),
Biodegradable Polymeric Microcarriers with Controllable Porous Structure for
Tissue Engineering, *Macromolecular Bioscience*, Volume 9, Issue 12, pages
1211–1218, December 8, 2009 DOI: 10.1002/mabi.200900224

- [35] ZHANG, Q., TAN, K., YE, Z., ZHANG, Y., TAN, W., LANG, M. Preparation of open porous polycaprolactone microspheres and their applications as effective cell carriers in hydrogel system Original Research Article Materials Science and Engineering: C, Volume 32, Issue 8, 1 December 2012, Pages 2589-2595
- [36] Informace k produktu Zetasizer – návod k použití

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PCL	Poly(ϵ -kaprolakton).
PBAT	Poly(butylen adipát-co-tereftalát)
PHB	Poly (β -hydroxybutyrát)
PGA	Poly(glykolová kyselina)
PGA/PL	Kopolymer poly(glykolová-co-kyselina mléčná)
PVA	Poly(vinylalkohol)
EE	Účinnost enkapsulace
SL	Množství steroidu v částicích

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i> Struktura nanočástic [2]	15
<i>Obr. 2</i> Struktury polysacharidů [4]	17
<i>Obr. 3</i> Chemická struktura polykaprolaktonu	20
<i>Obr. 4</i> Chemická struktura materiálu PBAT [12]	21
<i>Obr. 5</i> Schéma přípravy částic metodou odpaření rozpouštědla systémem O/W [5]	23
<i>Obr. 6</i> Schéma přípravy expandovatelných částic.....	35
<i>Obr. 7</i> Porovnání velikostí částic z PCL 29 vzhledem k použití ultrasonifikace	51
<i>Obr. 8</i> Porovnání velikosti částic připravených z PCL 30 vzhledem k použití ultrasonifikace	52
<i>Obr. 9</i> Kalibrační křivka pro β -estradiol.....	53
<i>Obr. 10</i> Kalibrační křivka pro Progesteron	53
<i>Obr. 11</i> Kalibrační křivka pro Kortizon 21- acetát	53
<i>Obr. 12:</i> Kalibrační křivka pro Hydrokortizon	54
<i>Obr. 13</i> Účinnost enkapsulace pro PCL 29 vzhledem k použití ultrasonifikace	56
<i>Obr. 14</i> Účinnost enkapsulace pro PCL 30 vzhledem k použití ultrasonifikace	56
<i>Obr. 15</i> Vzorek PR 29 ULT, při zvětšení 40 000	57
<i>Obr. 16</i> Histogramy distribuce velikosti porézních mikročástic. a) vzorek E1, b) vzorek E2, c) vzorek E3	59
<i>Obr. 17</i> Histogram distribuce velikosti porézních mikročástic, porovnání vzorků E1 (CH_2Cl_2 :n-hexan 9:1), E2(19:1), E3(39:1) – emulzifikace při 6 000 ot./min	59
<i>Obr. 18</i> Histogramy distribuce velikosti porézních mikročástic a) vzorek EKO 1;	61
<i>Obr. 19</i> Porovnání distribuce velikosti částic u vzorků EKO1, EKO2, EKO3.....	61
<i>Obr. 20</i> Histogramy velikosti porézních mikročástic a) vzorek FLEX 1; b) vzorek FLEX 2; c) vzorek FLEX 3	63
<i>Obr. 21</i> Porovnání jednotlivých histogramů velikosti částic pro vzorky FLEX 1;	63
<i>Obr. 22</i> Histogramy distribuce velikosti částic pro vzorky EKO 50 mg, EKO 200 mg.....	64
<i>Obr. 23</i> Porovnání distribuce velikosti částic u vzorků EKO 200 mg, E1 (100mg) a EKO 50 mg	65
<i>Obr. 24</i> Porovnání průměrných velikostí připravených částic.....	66
<i>Obr. 25</i> Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu pro vzorky (zvětšení): a) E1 (5 000x); b) E1 (2 000x); c) E2 (5 000x); d) E2 (2 000x); e) E3 (5 000x); f) E3 (2 000x).....	68

<i>Obr. 26 Kalibrační křivka pro bisfenol A, měřená při 276 nm</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 27 Množství absorbované Bisfenolu A na hmotnost částic u jednotlivých vzorků a neporézních submikročástic (ECO nano).....</i>	<i>70</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Vlastnosti polykaprolaktonu (PCL)</i>	20
<i>Tab. 2 Souhrn uvedených příkladů přípravy částic z polykaprolaktonu (PCL) různými systémy metody odpaření rozpouštědla</i>	33
<i>Tab. 3 Parametry při přípravě PLA částic, velikost připravených částic a průměr vzniklých pórů[33]</i>	36
<i>Tab. 4 Složení jednotlivých vzorků při přípravě částic s použitím ultrazvuku (ULT)</i>	43
<i>Tab. 5 Složení jednotlivých vzorků při přípravě částic bez ultasonifikace (BU)</i>	44
<i>Tab. 6 složení jednotlivých vzorků a procesní parametry při přípravě porézních částic</i>	45
<i>Tab. 7 Rozpustnost jednotlivých bioaktivních látek ve vodě</i>	47
<i>Tab. 8 Výsledky měření pomocí kapalinové chromatografie pro stanovení kalibračních křivek jednotlivých hormonů</i>	47
<i>Tab. 9 Výsledky měření velikosti částic pomocí Zetasizer pro PCL 29</i>	50
<i>Tab. 10 Výsledky měření velikosti částic na Zetasizer pro PCL 30</i>	51
<i>Tab. 11 Účinnost enkapsulace EE steroidů u jednotlivých vzorků</i>	54
<i>Tab. 12 Distribuce velikosti částic pro vzorky (poměr $CHCl_3$:n-hexan): E1(9:1), E2(19:1), E3(39:1); rychlost míchání 6 000 ot./min</i>	58
<i>Tab. 13 Distribuce velikosti částic pro vzorky (poměr CH_2Cl_2:n-hexan): EKO1(9:1), EKO2(19:1), EKO3(39:1); rychlost míchání 24 000 ot./min</i>	60
<i>Tab. 14 Distribuce velikosti částic pro vzorky (koncentrace PVA)</i>	62
<i>Tab. 15 Distribuce velikosti částic pro vzorky: E1 (100 mg)</i>	63
<i>Tab. 16 Průměrné velikosti a výtěžek připravených porézních částic</i>	65
<i>Tab. 17 Hmotnost adsorbovaného bisfenolu A na porézní částice</i>	68