VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

ÚSTAV TECHNOLOGIE LÉKŮ

# Stabilitní testování mikročásticové lékové formy založené na PLGA s obsahem mirtazapinu připravené metodou odpaření rozpouštědla

Diplomová práce

Brno 2014 Beata Nagyová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Martina Kejdušová, Ph.D.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Farmaceutická fakulta

Ústav technologie léků

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

| | |
|---|---|
| Jméno a příjmení: | **Beata NAGYOVÁ** |
| Osobní číslo: | **F09101** |
| Studijní program: | **M5206 farmacie** |
| Studijní obor: | **farmacie** |

Název tématu: **Stabilitní testování mikročásticové lékové formy založené na PLGA s obsahem mirtazapinu připravené metodou odpaření rozpouštědla.**

Zásady pro vypracování:

1- Literární rešerše
2- Studium literatury s danou problematikou
3- Zpracování výsledků a jejich hodnocení
4- Sepsání práce a odevzdání

Seznam vhodné literatury:

**1- Komárek, P., Rabišková, M. Technologie léků. 3. vydání, Praha: Galén 2006**
**2- Český lékopis 2009 ? Doplněk 2010, Praha: Grada**
**3- Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th. ed., London: PhP Pharmaceutical Press 2006, 918 p.**
**4- České a zahraniční vědecké časopisy**

Vedoucí diplomové práce: **PharmDr. Martina Kejdušová, Ph.D.**
Ústav technologie léků

Datum zadání diplomové práce: **22. března 2012**
Termín odevzdání diplomové práce: **20. dubna 2014**

| Diplomant | Přednosta ústavu | Děkan |
|---|---|---|

Farmaceutické fakulty
Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

**Stabilitní testování mikročástic připravených metodou odpaření rozpouštědla z jednoduché emulze o/v**

**ABSTRAKT:** Stabilitními zkouškami je možné prokázat, jak se mění kvalita látky nebo přípravku s časem vlivem různých faktorů prostředí jako je teplota, vlhkost a světlo. Účelem experimentální práce bylo stabilitní testování mikročástic založených na kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) Rezomeru ® – S s obsahem mirtazapinu, připravené metodou odpaření rozpouštědla z jednoduché emulze typu o/v. U připravených mikročástic byl hodnocen výtěžek procesu, obsah mirtazapinu, enkapsulační účinnost a morfologie. Disoluční zkouška byla provedena před vlastní stabilitní zkouškou v čase 0 měsíců a poté po 3 a 6 ti měsících testování. Porovnáním disolučních profilů s kinetickými modely byl určen mechanismus uvolňování mirtazapinu z mikročástic.

**Klíčová slova:** stabilitní testování, mikročástice, metoda odpaření rozpouštědla, PLGA, mirtazapin

**Stability testing of microparticles prepared solvent evaporation method from simple emulsion o/w**

**ABSTRACT:** Stability testing can demonstrate how the quality of the substance or preparation is changing over time due to various environmental factors such as temperature, humidity and light. The purpose of the experimental work was to test the stability of the microparticles based on a copolymer of polylactic and glycolic acid (PLGA) Rezomer® - S containing mirtazapine, prepared by solvent evaporation from a simple emulsion, o/w. Prepared microparticles were evaluated with yield, content of mirtazapine, encapsulation efficiency and surface morphology. Dissolution test was performed prior to stability testing at 0 months and then after 3 and 6 months of testing. Mathematical modeling was used to predict mirtazapine release mechanism.

**Key words:** stability testing, microparticles, solvent evaporation method, PLGA, mirtazapine

**PROHLÁŠENÍ:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Brno, duben 2014 Beáta Nagyová

…….....

**PODĚKOVÁNÍ:**

Na tomto místě chci poděkovat vedoucí své diplomové práce PharmDr. Martině Kejdušové, Ph.D. za odborné vedení a vstřícný přístup. Dále děkuji PharmDr. Jakubovi Vysloužilovi za cenné rady a pracovníkům Ústavu technologie léků za vytvoření příjemného pracovního prostředí a podmínek pro provedení experimentální části práce.

**OBSAH**

**1. ÚVOD ..... 8**

**2. CÍL PRÁCE ..... 9**

**3. TEORETICKÁ ČÁST ..... 10**

3.1 Lékové mikroformy ..... 10
3.1.1 Mikročástice ..... 10
3.1.2 Důvody výroby a použití lékových mikroforem ..... 11
3.1.3 Přípravky s mikročásticemi v současnosti ..... 12

3.2 Způsoby výroby mikročástic ..... 14
3.2.1 Metoda odpaření rozpouštědla z emulzního systému ..... 15
3.2.2 Ostatní modifikace metody odpaření rozpouštědla ..... 16

3.3 Pomocné látky při přípravě mikročástic metodou odpaření rozpouštědla ..... 22
3.3.1 Polymery ..... 22
3.3.2 Pomocné látky vnitřní fáze emulzního systému ..... 26
3.3.3 Pomocné látky vnější fáze emulzního systému ..... 27

3.4 Parametry, které ovlivňují vlastnosti mikročástic ..... 31
3.4.1 Formulační proměnné parametry ..... 32
3.4.2 Procesní proměnné parametry ..... 35

3.5 Stabilita a její hodnocení ..... 36
3.5.1 Ověřování stability ..... 37
3.5.2 Hodnocení výsledků stabilitních zkoušek ..... 39

3.6 Mirtazapin ..... 40
3.6.1 Vlastnosti mirtazapinu ..... 40
3.6.2 Mirtazapin v hromadně vyráběných léčivých přípravcích ..... 42

**4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ..... 43**

4.1 Přístroje a zařízení ..... 43
4.2 Suroviny, pomocné látky a chemikálie ..... 44
4.3 Příprava mikročástic ..... 44
4.4 Hodnocení kvalitativních parametrů ..... 45
4.4.1 Optický mikroskop a skenovací elektronová mikroskopie ..... 45
4.4.2 Kalibrační křivka pro mirtazapin ..... 46
4.4.3 Stanovení obsahu mirtazapinu v mikročásticích a enkapsulační účinnost 46
4.4.4 Stanovení výtěžku procesu ..... 47
4.4.5 Disoluční zkouška a stanovení faktoru podobnosti ..... 47
4.4.6 Stanovení kinetiky uvolňování mirtazapinu ..... 48
4.4.7 Metodika stabilitní zkoušky ..... 52

**5. VÝSLEDKY.....53**

5.1 Snímky z optického mikroskopu.....53
5.2 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu.....55
5.3 Ekvivalentní průměr a sfericita.....55
5.4 Stanovení obsahu a enkapsulační účinnosti.....59
5.5 Stanovení výtěžku procesu.....59
5.6 Disoluční zkouška a stanovení faktoru podobnosti.....60
5.7 Vstupní disoluční data pro jednotlivé vzorky.....64
5.8 Stanovení kinetiky uvolňování mirtazapinu.....67
5.9 Stanovení hodnot parametrů $t_{15\%}$ a $t_{50\%}$.....68

**6. DISKUZE.....69**

**7. ZÁVĚR.....79**

**8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....80**

**9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....90**

# 1. ÚVOD

Výzkum v oblasti farmaceutické technologie je v současnosti zaměřen na vývoj inovativních technologií a odstraňování omezení, která přinášejí konvenční lékové formy. Dochází k vývoji takových lékových forem, které zajišťují optimální biologickou dostupnost, stabilitu a terapeutickou účinnost léčiva. Výsledkem je rozvoj mikroenkapsulačních technik a tvorba mikročásticových lékových forem, které poskytují řadu výhod oproti konvenčním cestám podání léčiva. Lékové mikroformy umožňují odstranit nedostatky tradičních lékových forem a nabízejí alternativní cestu podání léčiva, která vede k vylepšení profilu uvolňování a zvýšení biologické dostupnosti (Lam a Gambari, 2013).

Technika mikroenkapsulace metodou odpařování rozpouštědla je dnes široce využívaná ve farmaceutickém průmyslu. Existuje několik modifikací této metody. Při volbě konkrétního podtypu rozhodují vlastnosti daného léčiva, zejména jeho rozpustnost ve vodě (Li a kol. 2008).

Důležitými vlastnostmi polymerů, používaných ve farmaceutické technologii, jsou biodegradovatelnost a biokompatibilita. V důsledku metabolických přeměn v organismu se molekulová hmotnost polymeru snižuje a léčivo je uvolňováno předem určenou rychlostí, která vychází z vlastností konkrétního polymeru. Mezi biodegradovatelné polymery patří i kopolymer kyseliny mléčné a glykolové PLGA, který je často využívaný jako nosič pro řízené uvolňování léčiv, zejména typu peptidů a proteinů (Rabišková 2005)

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo testování stability připravených mikročástic založených na kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) - Rezomeru ® – S s obsahem mirtazapinu, který byl zvolen jako modelové léčivo. Jako metoda přípravy mikročástic bylo v experimentální části práce použito odpaření rozpouštědla z jednoduché emulze typu o/v v závislosti na rozpustnosti léčiva mirtazapinu.

Mikročástice byly připraveny ve třech šaržích za použití rozpouštědla dichlormethanu v objemu 5 ml při rychlosti 600 otáček za minutu. Vnější fáze byla tvořena 800 g roztoku polyvinylalkoholu o koncentraci 0,1 %. U připravených mikročástic byly za pomoci optického a elektronového mikroskopu hodnoceny morfologické vlastnosti – tvar, povrch a velikost. Dále byl stanoven výtěžek, enkapsulační účinnost a obsah léčiva v mikročásticích. Připravené mikročástice se podrobily zkoušce disoluce a zkouška se opakovala po 3 a 6 měsících u vzorků skladovaných v lednici při 8 ºC. Následně se hodnotil mechanismus uvolňování léčiva z připravených mikročástic a byly stanoveny faktory podobnosti mezi jednotlivými disolučními profily.

Pro vypracování experimentální části bylo nezbytné nastudovat řadu odborné literatury týkající se problematiky lékových mikroforem a metody odpaření rozpouštědla. Tyto poznatky jsou soustředěny v teoretické části diplomové práce.

# 3. TEORETICKÁ ČÁST

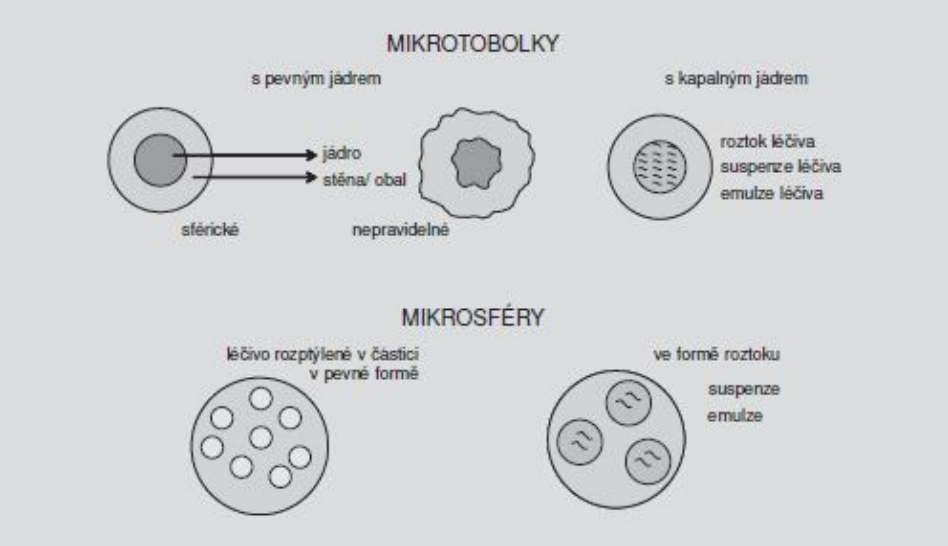
## 3.1 Lékové mikroformy

### 3.1.1 Mikročástice

Mikročástice jsou dnes považovány za jeden z nejperspektivnějších typů moderních lékových forem. Jedná se o lékové mikroformy, řazené mezi částicové lékové formy, které se uplatňují v přípravcích především s řízeným uvolňováním léčiva a cílenou distribucí léčiva (Komárek a kol. 2006).

Lékové mikroformy můžeme rozdělit do několika typů, v závislosti na vlastnostech a použitém technologickém postupu při výrobě. Základními typy jsou pelety, mikročástice, nanočástice, lipozomy, niozomy, farmakozomy a uzávěrové komplexy cyklodextrinů. Společným znakem těchto částic je převážně sférický nebo semisférický tvar. Částice se od sebe liší zejména svým rozměrem. Velikost mikročástic se pohybuje v řádech jednotek až stovek μm. Nově zařazenými typy jsou dendrimery, nanotubuly a mikrotubuly. Z vyjmenovaných typů lékových mikroforem jsou v technologii perorálních přípravků úspěšně využívány zejména pelety a mikročástice (Komárek a kol. 2006, Bajerová a kol. 2009)

Podle struktury lze mikročástice rozdělit na mikrotobolky a mikrosféry (obr. **1**). Mikrotobolky jsou tvořeny kapalným, pevným nebo plynným jádrem, na které těsně přiléhá polymerem tvořený obal. Jádra bývají nejčastěji tuhá, protože vytvoření obalu kolem pevného jádra je snazší. U mikrosfér není rozlišeno jádro a obal, léčivo je rovnoměrně rozptýleno v matrici v pevné nebo kapalné podobě (jako suspenze nebo emulze) (Vysloužil a kol. 2013[1], Chalabala a kol. 2001).




Obr. **1:** Uložení účinné látky v mikročásticích a jejich struktura (Rabišková 2005)

### 3.1.2 Důvody výroby a použití lékových mikroforem

Lékové mikroformy jsou poloproduktem. Konečná, tzv. násobná léková forma, vzniká jejich adjustací do ampulek pro parenterální podání, případně naplněním do tvrdých želatinových tobolek nebo lisováním do tablet pro perorální podání. Částice se objevují nyní i v lékových formách pro podání topické a transdermální (Komárek a kol. 2006).

Existuje celá řada důvodů, proč jsou léčivé látky ve farmacii zapracovány do lékových mikroforem. Lze tak efektivně překrýt nepříjemnou chuť léčivé látky, oddělit od sebe reagující léčivé látky a zapracovat i těkavá léčiva. Pokud je jádro částice opatřené obalem, je léčivo chráněno před nežádoucími vnějšími vlivy, např. ochrana v oleji rozpustných vitaminů před oxidací vzdušným kyslíkem (Chalabala a kol. 2001). Plyny nebo kapaliny mohou být uzavřením do lékové mikroformy převedeny na prášek (Dalmoro a kol. 2011).

Vzhledem k násobnému charakteru lékových mikroforem lze jejich použitím zabránit podráždění žaludeční sliznice léčivem. Dávka je složena z většího počtu jednotek, po jejím perorálním podání se částice vlivem peristaltiky rovnoměrně rozmístí v gastrointestinálním traktu, a tím se sníží riziko lokálních nežádoucích účinků. Je to výhodné především u léčiv dráždících trávicí systém, např. kyselina acetylsalicylová,

chlorid železnatý nebo chlorid draselný. Určitý podíl částic v násobné lékové formě navíc může být upraven tak, aby došlo k rychlému vstřebání účinné látky a vytvoření minimální terapeutické koncentrace, zbývající podíl částic pak udržuje hladinu účinné látky na dosažené úrovni (Komárek a kol. 2006, Chalabala a kol. 2001).

Nejvýznamnějšími důvody použití lékových mikroforem je možnost řízeného uvolňování léčiva a dosažení uvolňování léčiva na konkrétním místě v organismu. Léčiva lékových forem I. generace mají obtížně předvídatelnou biologickou dostupnost (Bajerová a kol. 2009). Léčivo se uvolňuje kinetikou prvního řádu, což znamená, že po podání léčiva dosáhne jeho koncentrace v plazmě maxima a pak klesá. V takovém případě je k udržení terapeutického účinku léčiva nutné jeho opakované podávání, aby nedošlo k poklesu plazmatické koncentrace pod terapeutickou hladinu.

Moderní farmaceutická technologie se v současnosti zaměřuje na vývoj a výrobu lékových forem, které zajišťují uvolňování léčiva po stanovený čas a v požadované dávce. Tak je možné udržet potřebnou terapeutickou hladinu léčiva v krevní plazmě, což přispívá zejména k prodloužení účinku léčiva, snížení celkové dávky léčiva potřebné k terapii a snížení výskytu vedlejších a nežádoucích účinků léčiva. To vše vede i k zlepšení celkové compliance pacienta (Vysloužil a kol. 2013[1], Lam a Gambari 2013).

Jako příklad lze uvést vývoj mikronizované lékové formy fenofibrátu. Fenofibrát je hypolipidemikum, které v první generaci bylo nutno dávkovat 3x100mg denně, léčba však byla doprovázena špatnou gastrointestinální snášenlivostí a vzestupem jaterních transamináz u léčených pacientů. Vývoj pokračoval dále ke čtvrté generaci, která umožňuje řízené uvolňování mikronizovaného fenofibrátu na inertním nosiči. Vznikl supra-mikronizovaný fenofibrát, kde fáze rozpouštění a vstřebávání již mikronizovaného léčiva bylo zdokonaleno vylepšenou výrobní technologií léku, díky které došlo k uspořádání jednotlivých mikronizovaných částic na povrch inertního jádra nosiče a vznikla patentovaná forma tzv. "ostružina". Fenofibrát je v této formě užíván pacienty jen jednou denně v dávce 160 mg (Guichard 2000)

### 3.1.3 Přípravky s mikročásticemi v současnosti

Uplatněním mikročástic ve farmacii je možné poskytnout pacientům účinnější a bezpečnější farmakoterapii. Vlastnosti mikročástic umožňují jejich proniknutí zejména

do postiženého orgánu a tkáně, kde uvolněné léčivo může působit na zhoubné buňky, aniž by negativně ovlivňovalo zdravou tkáň. Dochází tak ke snížení množství nežádoucích účinků léčiva.

Cena v současnosti dostupných přípravků je vysoká. Přípravky obsahují účinné látky zejména povahy peptidů, mikročástice pak bývají tvořené kyselinou mléčnou nebo kopolymerem kyseliny glykolové a mléčné. Jako příklad lze uvést na mikročásticích založené parenterálně podávané léky s obsahem látek tryptorelinu nebo leuprorelinu, inhibujících růst určitých typů nádorů závislých na hormonech, jako jsou děložní myomy nebo karcinomy prostaty (Rabišková 2005). Z přípravků obsahujících mikročásticovou lékovou formu jsou nyní v České republice registrovány Decapeptyl Depot® (injekční roztok, obsahující mikrotobolky) a Sandostatin LAR® (lyofilizát) (Vysloužil a kol. 2013[1]). Příklady některých komerčně dostupných přípravků, založených na mikročásticové lékové formě, jsou uvedeny v tabulce **1.**

Tab. **1**: Příklady přípravků založených na mikročásticové lékové formě (Šnejdrová a Ditrich 2010).

| **Přípravek** | **Účinná látka** | **Polymerní nosič** |
|---|---|---|
| **Arestin®** | Minocyklin | PLGA |
| **Decapeptyl Depot®** | Tryptorelin | PLGA nebo PLA |
| **Lupron Depot®** | Leuprolid | PLGA nebo PLA |
| **Nutropin Depot®** | Růstový hormon | PLGA |
| **Prostap ® SR, Prostap ® 3** | Leuprorelin | PLGA |
| **Risperidal Consta®** | Risperidon | PLGA |
| **Sandostatin LAR Depot®** | Oktreotid | PLGA-glukóza |
| **Somatuline LA®** | Lanreotid | PLGA |
| **Suprecur MP®** | Buserelin | PLGA |
| **Trelstar LA Depot®** | Tryptorelin | PLGA |

## 3.2 Způsoby výroby mikročástic

Mikročástice je možné připravit několika různými mikroenkapsulačními technikami. Mikroenkapsulace je technologický proces, během kterého dochází k uzavření účinných látek do mikroskopických částic. Látky mohou být v pevném, kapalném nebo plynném stavu (Dalmoro a kol. 2011).

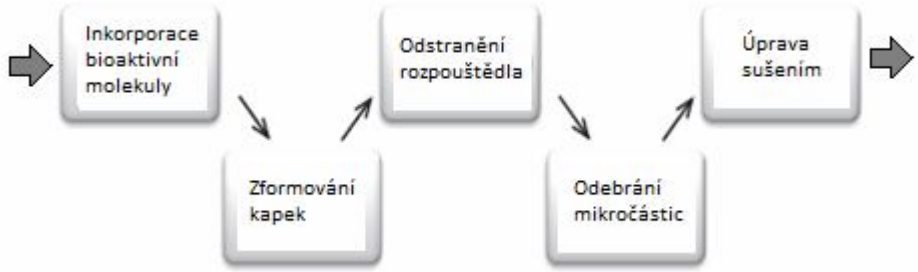
Výběr vhodné metody je ovlivněn především typem zvoleného polymeru, požadovanou velikostí částic a chemickými vlastnostmi léčiva (Ré a Biscans 1999). Metoda musí navíc splňovat určité požadavky. Chemická stabilita a biologická aktivita inkorporovaného léčiva musí být v průběhu enkapsulačního procesu zachovány. Během některých procesů například dochází k denaturaci enkapsulovaných proteinů působením kyselého nebo zásaditého prostředí nebo kontaktem s některými organickými rozpouštědly. Připravené mikročástice, určené pro injekční podání, by měly mít přiměřenou velikost (< 250μm). Enkapsulační účinnost a výtěžek mikročástic by měli být vysoké a profil uvolňování léčiva reprodukovatelný (Park 2005).

Metody enkapsulace jsou rozdělovány do dvou skupin, podle toho, jaký mechanizmus vede ke vzniku mikročástic. První skupinu tvoří metody chemické, druhou skupinu pak metody fyzikálně – mechanické. Někteří autoři dávají přednost rozdělení procesů enkapsulace na metody typu A a typu B (tab. **2**), protože metody fyzikálně - mechanické mohou zahrnovat chemickou reakci a metody chemické mohou být odkázány na fyzikální jev (Thies 2003).

Tab**. 2:** Rozdělení metod přípravy mikročástic (přepracováno podle Thiese 2003).

| **Metody typu A** | **Metody typu B** |
|---|---|
| Komplexní koacervace | Sprejové sušení a sprejové chlazení |
| Polymerová inkompatibilita | Odstředivá extruze |
| Mezifázová polymerizace na l/l nebo s/l rozhraní | Mezifázová polymerizace na s/g nebo l/g rozhraní |
| *In situ* polymerizace | Obalování ve fluidní vrstvě |
| Odpařování rozpouštědla | Rotační aglomerace |
| Extruze – s odkapávacím Zařízením | Zvlákňování z taveniny |

Všechny metody však sestávají z pěti základních kroků (obr. **2**) – inkorporace bioaktivní látky do systému, zformování kapek, následného odstraňování rozpouštědla a odebrání vzniklých mikročástic, které jsou různými způsoby vysušovány (Dalmoro a kol. 2011).




,

Obr. **2 :** Základní kroky při procesech mikroenkapsulace (přepracováno podle Dalmoro a kol. 2011).

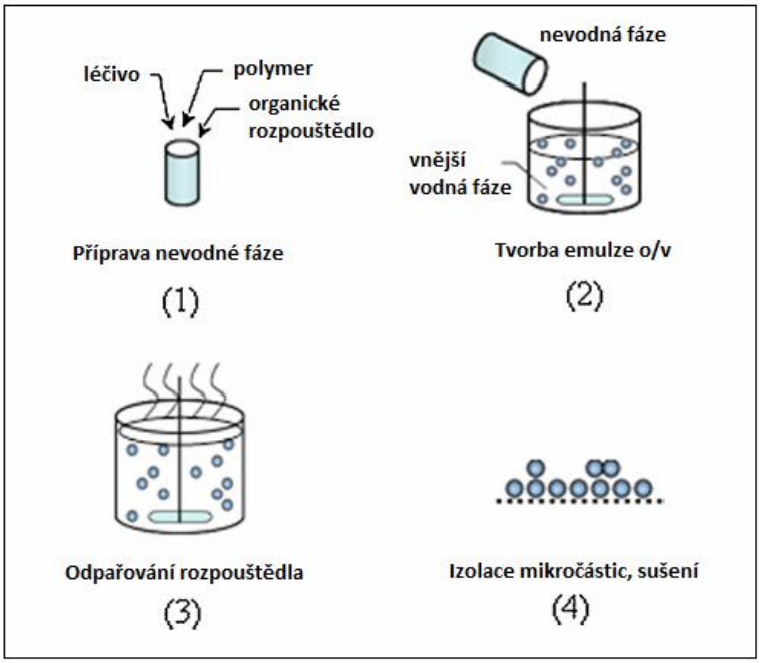
### 3.2.1 Metoda odpaření rozpouštědla z emulzního systému

Mikroenkapsulace prostřednictvím odpaření rozpouštědla z vnitřní fáze emulze je metoda běžně využívaná ve farmaceutickém průmyslu. Obliba metody spočívá především v její jednoduchosti a přístrojové nenáročnosti. Získaným produktem jsou mikrosféry, ze kterých je léčivo řízeně uvolňováno. Metoda zahrnuje řadu modifikací. Výběr konkrétního postupu, který povede k enkapsulaci, závisí zejména na hydrofilitě nebo hydrofobitě daného léčiva. Pro léčiva ve vodě málo rozpustná nebo nerozpustná (hydrofobní) se používá modifikace se systémem o/v, která je zároveň i nejjednodušší variantou a ostatní modifikace jsou od ní odvozeny (Li a kol. 2008, Vysloužil a kol. 2013[1]).

Podstatou metody je odpařování části emulze, která obsahuje rozpuštěné nebo dispergované léčivo a polymer. Během odpařování rozpouštědla se formují pevné matrice, do jejichž struktury je uzavíráno léčivo. Těkavá rozpouštědla jsou odstraňována odpařováním, v ostatních případech pak extrakcí kontinuální (vodnou) fází (Wischke a Schwendeman 2008). Nejjednodušší varianta metody zahrnuje následující kroky (obr. **3**) – nejprve je připravena lipofilní (nevodná) fáze, která

obsahuje rozpuštěné nebo dispergované léčivo v roztoku polymeru a organického rozpouštědla. Lipofilní fáze je následně pomocí tenzidů emulgována do vodné fáze. Vzniká emulze typu o/v. Odpařením rozpouštědla z vnitřní fáze a mícháním jsou z polymeru vytvářeny mikrosféry. Vodná fáze se suspendovanými mikrosférami je zfiltrována, získané mikrosféry se promyjí a suší.

Pro léčiva ve vodě rozpustná tato modifikace není vhodná, protože taková léčiva unikají ve větším množství do vodné fáze, což potom vede k jejich nižšímu obsahu v mikročásticích (Vysloužil a kol. 2013[1], O´Donnel a McGinity 1997). Hydrofilní léčivo může být navíc v organickém rozpouštědle nerozpustné (Li a kol. 2008).




Obr. **3**: Schematické znázornění přípravy mikročástic metodou odpaření rozpouštědla z emulze o/v (přepracováno podle Li a kol. 2008).

### 3.2.2 Ostatní modifikace metody odpaření rozpouštědla

#### a. Modifikace se systémem v/o

Metoda odpaření rozpouštědla byla vyvinuta původně pro lipofilní léčiva. Touto metodou je však možná enkapsulace i hydrofilních léčiv, pokud bude upravena tak, aby difuze hydrofilního léčiva do vnější fáze byla omezena. Jednou z možností úprav je

modifikace se systémem v/o, kde vnitřní fáze je vodná a vnější fáze je tvořena látkou, která je s vodou nemísitelná, např. minerální olej (Gibaud a kol. 2002) nebo ethylacetát (Imsombut a kol. 2010).

Pro enkapsulaci vysoce hydrofilního léčiva 3,4-diaminopyridinu byly použity modifikace se systémem o/v a v/o. V případě systému v/o byla vnitřní vodná fáze tvořena směsí acetonu (7,5 ml) a etanolu (2,5 ml), vnější olejovou fázi tvořil minerální olej (200 ml) s obsahem sorbitan trioleátu. Ukázalo se, že použití modifikace v/o bylo vhodnou alternativou pro enkapsulaci vysoce hydrofilního léčiva (Gibaud a kol. 2002).

### b. Modifikace se systémem o/o

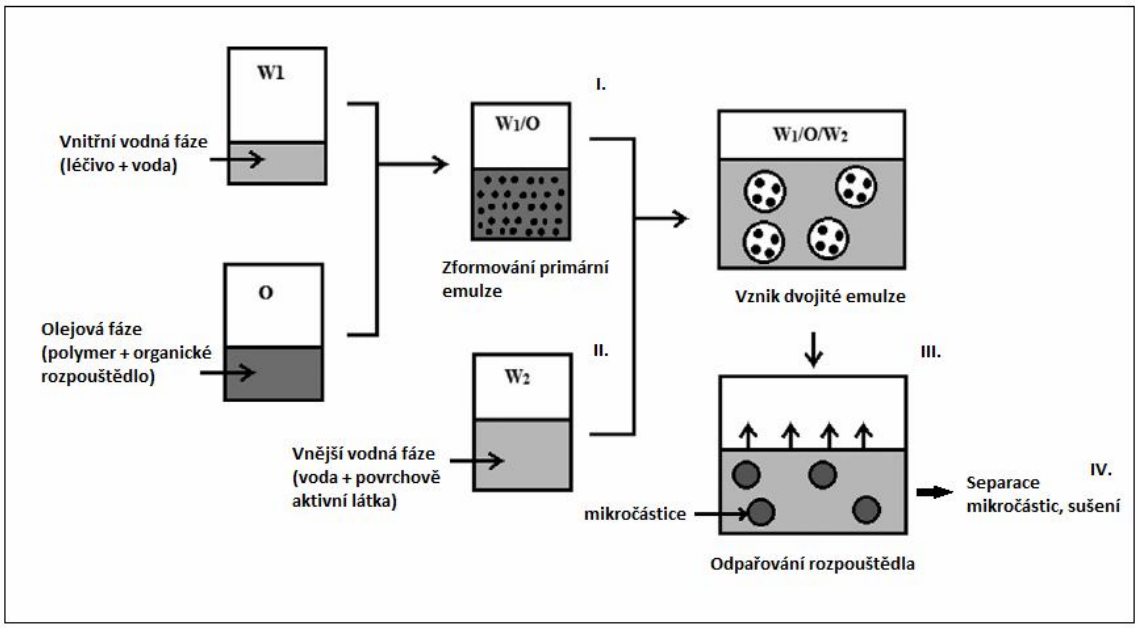
V případě modifikace o/o je vnější vodná fáze nahrazena lipofilní fází (Li a kol. 2008). Tyto dvě lipofilní fáze jsou vzájemně nemísitelné. Léčivo je navíc ve vnější lipofilní fázi nerozpustné, tím je zabráněno jeho úniku do této vnější fáze (O´Donnel a McGlinity 1997). Tato metoda poskytuje několik výhod pro enkapsulaci proteinů, peptidů a hydrofilních léčiv. Použití běžných metod pro enkapsulaci proteinů a peptidů s použitím polymeru PLGA (např. modifikace v/o, v/o/v; fázová separace nebo sprejové sušení) přináší určité obtíže, které mohou být použitím modifikace o/o odstraněny. Jedná se zejména o nízkou enkapsulační účinnost, denaturace proteinu během enkapsulačního procesu a problém s řízeným uvolňováním aktivního proteinu (Hamishehkar a kol. 2009). Tato modifikace je také alternativou pro hydrofilní léčiva, protože nemůže docházet k jejich úniku do vodné fáze (Vysloužil a kol. 2013[1]).

Modifikace se systémem o/o byla použita pro přípravu PLGA mikročástic. Insulin byl použit jako modelový protein a zároveň hydrofilní léčivo. Průměr mikročástic byl v rozmezí 1,04 – 8,47 μm. Největší vliv na velikost částic měla molekulová hmotnost polymeru a jeho koncentrace (Hamishehkar a kol. 2009).

### c. Modifikace se systémem v/o/v

Tato metoda je založena na vzniku tzv. násobné emulze (Vysloužil a kol. 2013[1]). Je vhodná zejména pro enkapsulaci látek ve vodě dobře rozpustných, což jsou například

vakcíny, proteiny a peptidy (Makadia a Siegel 2011). Celý proces sestává ze čtyř hlavních kroků (obr. **7**). Nejprve probíhá primární emulgace, vodný roztok účinné látky (vodná fáze $v_1$) je emulgován do roztoku organického rozpouštědla a polymeru (olejová fáze o) za vzniku primární emulze $v_1/o$. Poté je tato primární emulze emulgovaná do druhé vodné fáze ($v_2$) s obsahem stabilizátoru. Z vytvořené násobné emulze $v_1/o/v_2$ je organické rozpouštědlo odstraněno odpařováním nebo extrakcí, což vede k zformování částic. V posledním kroku jsou částice sesbírány filtrací nebo centrifugací a sušeny, např. lyofilizací (Meng a kol. 2003). Význam olejové fáze spočívá v zabránění úniku léčiva z vnitřní vodné fáze $v_1$ do vnější vodné fáze $v_2$ (Vysloužil a kol. 2013[1]).




Obr. č. **4**: Znázornění přípravy mikročástic metodou odpaření rozpouštědla z dvojité emulze v/o/v (Giri a kol. 2012).

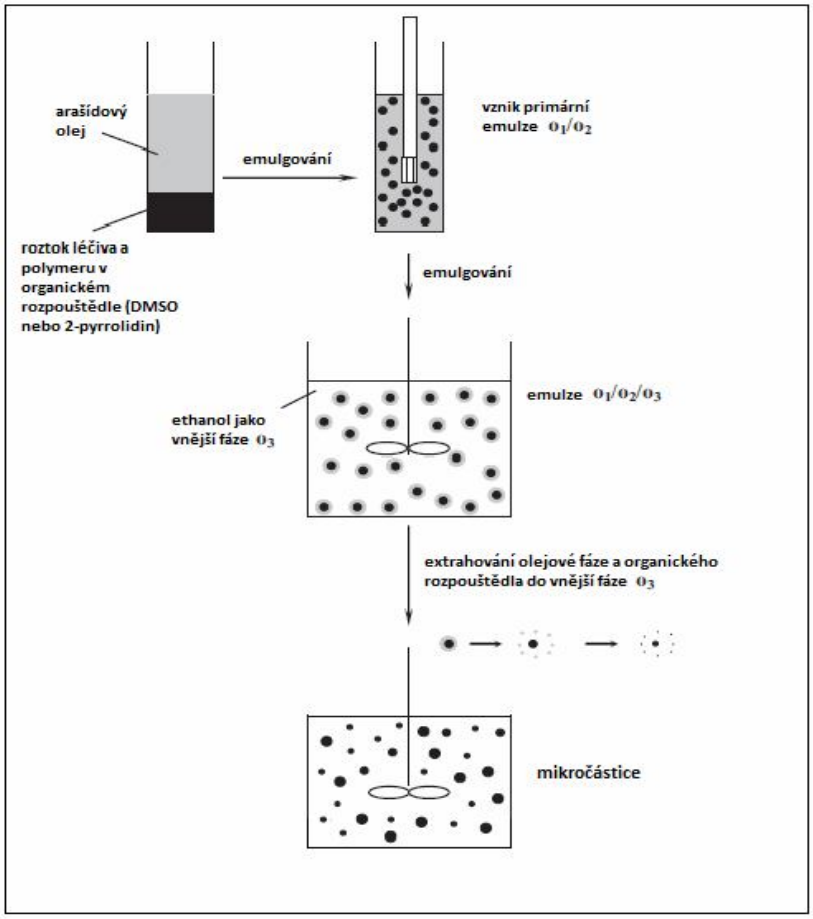
Jako příklad lze uvést přípravu mikročástic s obsahem acetaminofenu a stěnou z polymerní látky kyseliny polymléčné. Cílem bylo porovnání metody násobné emulze $v_1/o/v_2$ s metodou o/v a s metodou o/v s použitím kosolventů (alkohol, alkan). Pokud byla vnitřní vodná fáze v násobné emulzi tvořena pouze malým množstvím vody, v tomto případě 2 ml, tak enkapsulační účinnost byla trojnásobná oproti metodě se systémem o/v. Metoda násobné emulze $v_1/o/v_2$ tak vykazovala ze všech tří metod nejvyšší enkapsulační účinnost. To má veliký význam, protože spolu s nejvyšší

enkapsulační účinností lze získat velmi dobře řízené uvolňování léčiva (Lai a Tsiang 2005).

### d. Modifikace se systémem o/o/o

Nově byla použita metoda extrakce rozpouštědla v systému o/o/o (obr. **6**). Léčivo je v tomto případě rozpuštěno nebo dispergováno v roztoku PLA nebo PLGA a organického rozpouštědla, mísitelného s vodou (př. dimethysulfoxid) ($o_1$). Tato směs je emulgována do olejové fáze (př. arašídový olej) ($o_2$) za vzniku primární emulze $o_1/o_2$, která je nakonec přidána do vnější fáze (př. etanol) ($o_3$). Vznikne emulze $o_1/o_2/o_3$ a zformují se prvotní kapky s obsahem léčiva. Organické rozpouštědlo a olejová fáze jsou extrahovány do vnější fáze $o_3$ za neustálého míchání. V důsledku toho dojde k zpevnění kapek s uzavřeným léčivem. Vnější fáze $o_3$ je s organickým rozpouštědlem a olejovou fází mísitelná, polymer v ní ale rozpustný není. Hlavními výhodami této metody je snížení objemů a spotřeby rozpouštědel, možnost použití méně toxických rozpouštědel (rozpouštědlo nemusí být těkavé ani s vodou nemísitelné) a poměrně vysoká enkapsulační účinnost v porovnání s modifikací metody typu v/o/v (Elkharraz a kol. 2011).

Pomocí této metody byl enkapsulován oligonukleotid o molekulové hmotnosti 6347,5 Da. Jako fáze $o_1$ byl použit dimethylsulfoxid nebo 2-pyrrolidon v množství 0,90 ml. Fáze $o_1$ byla emulgovaná do arašídového oleje ($o_2$) v poměrech 1:1, 1:2 a 1:3. Vytvořená primární emulze $o_1/o_2$ byla přidána do 400 ml etanolu ($o_3$). Mikročástice, kde byl použit dimethysulfoxid, byly menší v důsledku jeho nižší viskozity. Velikost částic se zároveň snižovala s rostoucím poměrem fází $o_1/o_2$. Bylo tomu tak proto, že velikost mikročástic závisí na průměru počátečních zformovaných kapek, které bývají v případě velkého množství oleje menší a jemněji dispergovány (Elkharraz a kol. 2011).




Obr. **5:** Schéma přípravy mikročástic metodou extrakce v systému o/o/o. Vytvořené mikročástice jsou sesbírány pomocí síta, následně jsou míchány v ethanolu po dobu 30 minut, zfiltrovány a sušeny (Elkharraz a kol. 2011).

### e. Modifikace se systémem o/v/o

Metoda s modifikací o/v/o je podobná metodě se systémem v/o/v, jedná se o její lipofilní analog. V tomto případě je však nejprve vytvořena primární emulze $o_1/v$ dispergováním vnitřní olejové fáze ve vodné fázi. Primární emulze je následně emulgována do vnější olejové fáze $o_2$. Modifikace $o_1/v/o_2$ je určena především pro enkapsulaci hydrofobních léčiv (Genta a kol. 1997).

### f. Modifikace se systémem s/o/v a s/o/o

Použití modifikací s/o/v a s/o/o získalo v posledních letech své uznání, neboť umožňují zlepšit stabilitu enkapsulovaných proteinů. Nejčastěji používanou metodou pro přípravu mikročástic bývá metoda dvojité emulze v/o/v. Častým problémem však je, že během tohoto procesu dochází k inaktivaci a agregaci proteinu v důsledku jeho naadsorbování na rozhraní olej/voda, které vzniká emulgováním vodného roztoku proteinu do organického rozpouštědla. Systémy s/o/v a s/o/o tento problém odstraňují, protože zde není vytvářena primární emulze $v_1$/o (Giri a kol. 2012).

U systému s/o/v je pevná látka (vnitřní pevná fáze) dispergována v roztoku polymeru a organického rozpouštědla. Tato suspenze je zavedena do vodné fáze o velkém objemu s obsahem emulgátorů, např. polyvinylakoholu nebo polyethylenglykolu. Systém s/o/o je založen na podobném principu. Zde je vnitřní pevná fáze oddělena od vnější olejové fáze olejovou vrstvou (Giri a kol. 2012).

Příkladem využití metody odpaření rozpouštědla se systémem s/o/v je příprava mikročástic s enkapsulovanými nanočásticemi s obsahem léčiva hydrocortison acetátu (nanoparticles-in-microparticles, NIMs) (Lee a kol. 2013).

### g. Modifikace se systémem v/o/o , v/o/o/o

V systému v/o/o je vnitřní vodná fáze oddělena olejovou fází od vnější olejové fáze. Vnější fáze by měla být tvořena látkou, ve které budou léčivo a polymer minimálně rozpustné. To také zabrání hydrofilním látkám difundovat do vnější olejové fáze (Giri a kol. 2012, Vysloužil a kol. 2013[1]). Emulze v/o/o/o vznikne, pokud je systém v/o/o přidán do další lipofilní látky. Produktem jsou tzv. multifazické mikrosféry (O´Donnel a McGinity 1997).

Hydrofilní léčiva propranolol hydrochlorid, teofylin, acetaminofen a takrin byla inkorporována do mikrosfér prostřednictvím metody odpařování rozpouštědla z násobné emulze typu v/o/o. Jako primární a sekundární olejová fáze byly použity dichlormethan a kukuřičný olej, jako polymerní látka byl zvolen Eudragit ® S100, protože je těžce rozpustný v kukuřičném oleji. Přítomnost vnitřní vodné fáze byla nezbytná pro tvorbu

stabilních kapek v primární emulzi a urychlení jejich zpevnění. Teplota kontinuální fáze ovlivnila stabilitu emulze a následně morfologii mikrosfér. Čím větší byl objem kontinuální fáze, tím byla velikost připravených mikrosfér nižší. Enkapsulační účinnost byla více než 80 %, výjimku tvořil pouze acetaminofen, který má vyšší rozpustnost v kukuřičném oleji (vnější fáze) než ve vodě. Ukázalo se, že enkapsulační účinnost závisí na tom, zda je léčivo rozpustné ve vodné nebo vnější olejové fázi. Profil uvolňování léčiva byl závislý na pH. Při pH 7,4 bylo léčivo uvolňováno rychleji než v kyselém prostředí (Lee a kol. 1999).

## 3.3 Pomocné látky při přípravě mikročástic metodou odpaření rozpouštědla

### 3.3.1 Polymery

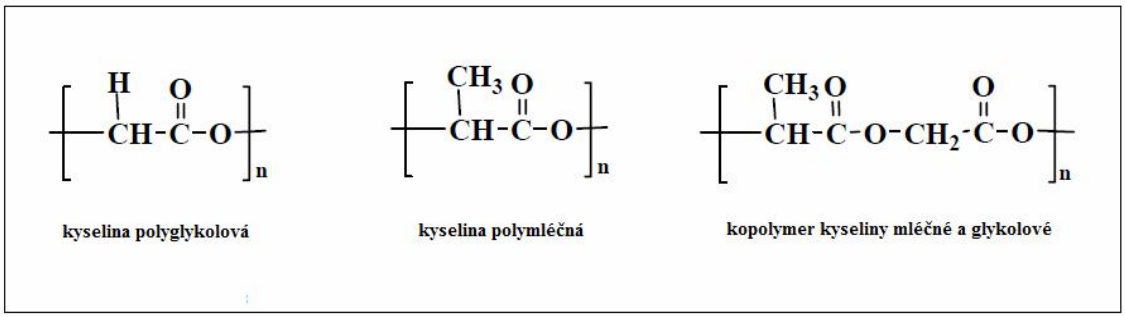
Nosičem léčiva v mikročásticích jsou především polymerní látky. Uvolnění léčiva z takových mikročástic probíhá prostřednictvím metabolických přeměn. V organismu dojde po podání k postupné degradaci polymeru, tím se jeho molekulová hmotnost postupně snižuje a léčivo je z lékové formy uvolňováno předem určenou rychlostí (Rabišková 2005).

Nezbytnými vlastnostmi polymerů používaných ve farmaceutické technologii jsou jejich biodegradovatelnost a biokompatibilita. Biodegradovatelné polymerní látky jsou v organismu odbourávány na netoxické produkty. Biokompatibilita znamená, že látka je organismem dobře tolerována a po podání nebude způsobovat žádné vedlejší účinky, ať už lokální nebo systémové (Li a kol. 2008). Biodegradovatelné polymery jsou buď syntetické, polosyntetické nebo jsou přírodního původu. Přírodní polymery podléhají v organismu enzymatické degradaci, syntetické polymery mají ve své struktuře hydrolyzovatelné vazby, např. esterové, amidové nebo peptidové a jsou degradovány hydrolytickou reakcí (Patel a Chakraborty 2013).

Výběr vhodného polymeru závisí zejména na tom, jaká bude cesta podání léčiva, jaké množství polymeru se do organismu dostane prostřednictvím mikročástic v jedné dávce, jaká je požadovaná rychlost uvolňování léčiva a jak dlouho má jedna podaná dávka působit (Wischke a Schwendeman, 2008).

Nejvíce používanou skupinou polymerů pro přípravu mikročástic jsou syntetické termoplastické alifatické polyestery α-hydroxykyselin (obr. **6**), **polymer kyseliny mléčné (PLA), polymer kyseliny glykolové (PGA) a zejména kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA)**. Byly schváleny Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) k použití pro přípravu lékových forem v humánní farmakoterapii. Jejich vlastnosti odpovídají současným požadavkům, jsou biokompatibilní, biodegradovatelné a mechanicky odolné (Jain 2000).

Uvedené polymery mohou být syntetizovány přímou polymerizací taveniny kyseliny mléčné a glykolové nebo prostřednictvím reakce, při které dochází k otevření kruhů cyklických struktur kyseliny mléčné a glykolové (Cabezas a kol. 2013).




Obr. **6:** Chemická struktura polyesterů PLG, PLA a PLGA (Park 2005).

V organismu jsou odbourávány jednoduchou hydrolýzou esterových vazeb. Reakce je vázána na vodné prostředí, což jsou v tomto případě tělesné tekutiny. Degradační produkty jsou vylučovány ledvinami nebo jsou metabolizovány až na oxid uhličitý a vodu (Chandra a Rustgi 1998).

**Polymer kyseliny glykolové** je jedním z prvních používaných biodegradovatelných polymerů. Jedná se o vysoce krystalický polymer (45 – 55%), ve své struktuře postrádá boční methylové skupiny, které jsou přítomny v struktuře kyseliny polymléčné. Nevýhodou je, že je velmi málo rozpustný v organických rozpouštědlech. Jeho degradace je navíc velmi rychlá a vznikající degradační produkty jsou kyselé povahy. Z těchto důvodů je jeho samostatné použití omezeno a bývá proto součástí kopolymerů (Nair a Laurencin 2007, Makadia a Siegel 2011).

Kyselina mléčná má na rozdíl od kyseliny glykolové chirální uhlík ve své struktuře, vyskytuje se tedy ve dvou opticky aktivních formách. Pokud je polymer tvořen jen L-formou, tak bude ve výsledku krystalický a bude degradován pomaleji, protože krystalinita omezuje degradaci. Polymer tvořený racemickou směsí D, L-formy bude amorfní povahy (Sinha a Trehan 2003, Makadia a Siegel 2011).

**Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové** je z dostupných biodegradovatelných polymerů ideální. Je vysoce biokompatibilní a rychlost jeho degradace je možné ovlivnit různým poměrem obsahů kyseliny glykolové a mléčné (Makadia a Siegel 2011, Park 2005).

Léčivo je z částice uvolňováno difuzí póry polymerní matrice nebo erozí materiálu, případně kombinací difuze a eroze. Rychlost procesu degradace závisí na řadě parametrů, zejména na poměru obsahů kyseliny mléčné a glykolové, molekulové hmotnosti kopolymeru a také na tvaru a struktuře matrice (Nair a Laurencin 2007).

Různou molekulovou hmotností a především různým poměrem obsahu kyseliny mléčné a kyseliny glykolové mohou být předem přesně nastaveny rychlost degradace a mechanické vlastnosti kopolymeru. Kyselina mléčná obsahuje ve své struktuře boční methylové skupiny, a proto je hydrofobnější než kyselina glykolová. Při obsahu kyseliny glykolové vyšším než 70 % je kopolymer amorfní povahy a je degradován rychleji. Pokud však bude v kopolymeru převažovat obsah kyseliny mléčné, tak bude méně hydrofilní, bude absorbovat méně vody a jeho degradace následně bude probíhat pomaleji. To je vhodné především pro prodloužené uvolňování léčiva. (Park 2005, Jain 2000, Makadia a Siegel 2011).

Při poměru kyseliny mléčné a glykolové 50:50 bude výsledný kopolymer méně stabilní a degradace proběhne během jednoho až dvou měsíců. Ale při poměru 85:15 bude kopolymer odbourán až za 6 měsíců (Nair a Laurencin 2007).

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové podléhá degradaci ve vodném prostředí, kde dochází k hydrolytickému štěpení esterových vazeb. Účast enzymů na jeho degradaci zatím nebyla potvrzena. Zjištěné rozdíly v degradační rychlosti v *in vivo* a *in vitro* podmínkách ale naznačují možné uplatňování enzymů (Muthu 2009).

Celý proces biodegradace PLGA lze shrnout do 3 základních fází (Muthu 2009, Šnejdrová a Ditrich 2010):

1. Na počátku proniká do polymerní matrice voda a dochází k náhodnému štěpení esterových vazeb v polymerních řetězcích. Vzrůstá tak počet koncových

karboxylových skupin. V důsledku toho dochází u většího množství polymeru k výraznému snížení pH, což vede k rychlejší autokatalytické hydrolýze. Molekulová hmotnost je snižována, ale zatím nedochází k úbytku hmotnosti polymeru a nejsou uvolňovány monomery.

2. Během další fáze, označované jako eroze, je molekulová hmotnost ještě více snižována a navíc dochází k výraznému úbytku celkové hmotnosti polymerní matrice. Z polymerních řetězců jsou uvolňovány rozpustné oligomery a monomery, které následně difundují na povrchu matrice.

3. V poslední fázi jsou i z oligomerů uvolňovány rozpustné monomery a polymer je kompletně rozpuštěn.

Dalším polymerem ze skupiny alifatických polyesterů je **poly(ε-kapronolakton)**. Je biodegradovatelný, biokompatibilní a netoxický. Degradace v organismu probíhá velmi pomalu, protože je hydrofobní a semikrystalický. Tyto vlastnosti vedly k jeho použití při přípravě mikrosfér, nanosfér a implantátů. Vzhledem k mimořádně pomalé degradaci v organismu se uplatňuje při přípravě lékových forem určených pro dlouhodobé uvolňování léčiva (více než 1 rok) (Sinha a kol. 2004, Chandra a Rustgi 1998).

**Poly(β hydroxybutyrát)** patří mezi přírodní polyestery. Je metabolickým produktem širokého spektra bakterií jako intracelulární zásobní materiál a zdroj energie. Jeho výhodou je, že je získáván z obnovitelných zdrojů (Chandra a Rustgi 1998). Díky své hydrofobitě a vysoké krystalinitě je jeho odbourávání v organismu prodloužené. Rychlost odbourávání v organismu však může být různě upravena vytvořením jeho kopolymeru s poly(β hydroxyvalerátem) (Adrianov a Payne 1998).

Pro přípravu mikročástic bývá používán i **polymethylmethakrylát** ze skupiny derivátů kyseliny metakrylové, který byl schválen Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Jedná se o syntetický homopolymer, který není biodegradovatelný, ale pouze biokompatibilní. Je klasifikovaný jako tvrdý, rigidní, ale křehký materiál s teplotou skelného přechodu 105 ºC. Po uvolnění léčiva setrvává v organismu, dokud není fyzicky odstraněn. Mikročástice připravené z polymethymethakrylátu jsou například aplikovány při nahrazování měkkých i tvrdých

tkání v těle. Výhodou je jeho nízká cena. (Campos a kol. 2013, Mekala a kol. 2012, Li a kol. 2008, Bettencourt a Almeida 2012).

**Ethylcelulosa** je derivát přirozeně se vyskytujícího homopolymeru celulosy. Je to ethylether celulosy, tvořený řetězcem β-anhydroglukosových jednotek, které jsou spojeny acetalovými vazbami. Běžně je vyráběna působením etylchloridu na alkalickou celulosu. Ethylcelulosa je hydrofobní a rozpouští se pouze v organických rozpouštědlech. Je nerozpustná například ve vodě, glycerolu nebo propyleglykolu (Chalabala a kol. 2001). Má řadu vlastností, pro které je vhodná pro přípravu mikročástic. Je biokompatibilní, stabilní v průběhu skladování a není toxická (Dabbagh a kol. 1996).

### 3.3.2 Pomocné látky vnitřní fáze emulzního systému

Vnitřní fáze emulzního systému je tvořena rozpouštědlem, zvoleným polymerem a rozpuštěným nebo dispergovaným léčivem. Rozpouštědlo vnitřní fáze emulzního systému musí splňovat několik základních kritérií. Především je nutné, aby bylo nemísitelné s vnější fází systému a zvolený polymer byl v daném rozpouštědle rozpustný. Dalšími nezbytnými vlastnostmi rozpouštědla jsou vysoká těkavost a nízký bod varu. V připravených mikročásticích mohou být na konci procesu přípravy přítomna rezidua organických rozpouštědel, která mohou z toxikologického hlediska představovat určité riziko. Vybrané rozpouštědlo by proto nemělo být toxické (Li a kol. 2008, Herrmann a Bodmeier 1998).

**Dichlormethan** je nejpoužívanějším rozpouštědlem pro přípravu PLGA mikročástic. Všechny varianty kopolymeru PLGA o různé molekulové hmotnosti a s různým poměrem obsahu kyseliny glykolové a mléčné se v něm snadno rozpouští. Jeho rozpustnost ve vodě je zanedbatelná. Vzhledem k svému nízkému bodu varu (39, 8 ºC) a značné těkavosti se snadno odpařuje ze systému a také dochází k odpaření jeho reziduí během procesu sušení mikročástic (Sah 2000). Byla však u něj však potvrzena karcinogenita, což vede ke snaze nahradit jej méně toxickými rozpouštědly (Li a kol. 2008).

Dichlormethan může být nahrazen **ethylacetátem,** který vykazuje nižší toxicitu. Je ale asi 4,5 krát mísitelnější s vodou. V emulzním systému přechází větší množství

ethylacetátu do vnější vodné fáze, což vede ke srážení polymeru a vzniku vláknitých agregátů. Pokud je vnitřní fáze s jeho obsahem převedena přímo do vnější (vodné) fáze, nedochází z tohoto důvodu k zformování prvotních kapek. Tento problém lze odstranit, pokud bude vnitřní fáze nejprve emulgována do malého množství vodné fáze a teprve po zformování prvotních kapek bude tato emulze přidána do většího objemu vodné fáze (Li a kol. 2008, Sah 1997).

**Ethylformiát**, jako další použitelné rozpouštědlo, je na rozdíl od dichlormethanu nechlorovaný a není klasifikován jako karcinogen. Problém však představuje, podobně jako u ethylacetátu, jeho částečná mísitelnost s vodou, která většinou tvoří vnější fázi emulzního systému. Protože má ethylformiát vyšší bod varu a nižší tlak par než dichlormethan, odpařuje se z emulzního systému 2,1 krát rychleji (Sah 2000).

Ve vnitřní fázi emulzního systému bývají používány další pomocné látky, které přípravu mikročástic usnadní nebo určitým způsobem ovlivní jejich výsledný charakter. Látky, tzv. **porogeny**, jsou používány pro zvýšení pórovitosti mikročástic. Přítomností pórů je urychlena degradace polymeru a ovlivněna rychlost uvolňování léčiva. Používán je hexan, organické rozpouštědlo, které nerozpouští kyselinu polymléčnou ani kopolymer kyseliny mléčné a glykolové. Dochází k jeho inkorporaci do mikročástic a formování pórů (Li a kol. 2008).

Pokud léčivo určené k enkapsulaci není zcela rozpustné v rozpouštědle vnitřní fáze, jsou použity pro jeho rozpuštění **kosolventy**. Nejčastěji je k tomuto účelu volen ethanol nebo methanol (Reithmeier a kol. 2001).

### 3.3.3 Pomocné látky vnější fáze emulzního systému

Volba vnější fáze závisí na typu modifikace metody. Ve většině případů je vnější fáze emulzního systému tvořena vodou, která je nejlevnějším rozpouštědlem a není toxická. Navíc je teplota varu vody mnohem vyšší než u používaných organických rozpouštědel pro tuto metodu přípravy mikročástic. U lipofilních modifikací metody je vnější fáze tvořena minerálními oleji nebo netěkavými organickými rozpouštědly

(Vysloužil a kol. 2013[1]). Lze také použít i některé rostlinné oleje, například kukuřičný nebo arašídový olej (Lee a kol. 1999, Elkharraz a kol. 2011).

## 1. Látky stabilizující emulzní systém

Do vnější fáze jsou přidávány některé pomocné látky, zejména látky stabilizující emulzní systém, tzv. emulgátory. Podle mechanizmu stabilizace emulzního systému jsou tyto látky rozdělovány na tenzidy, nepravé, nerozpustné a komplexní emulgátory (Chalabala a kol. 2001).

Většina emulgátorů je řazena do skupiny tenzidů, surfaktantů neboli **povrchově aktivních látek (PAL)**, které snižují povrchové napětí vnější fáze a mezipovrchové napětí mezi polární a nepolární kapalinou. Umožňují tak rovnoměrné rozptýlení vnitřní fáze v nemísitelné vnější fázi. Zabraňují také aglomeraci a koalescenci zformovaných kapek, a tím stabilizují připravenou emulzi. Vhodný surfaktant by měl umožnit vznik mikročástic s úzkou distribucí velikostí částic a uvolňování léčiva tak bude předvídatelnější a stabilnější. Pro výběr vhodného surfaktantu je třeba znát polaritu obou fází emulzního systému, požadovanou velikost částic a sféricitu (Li a kol. 2008).

Molekula surfaktantu obsahuje dvě části, hydrofilní a hydrofobní (Komárek a kol. 2006). Podle toho, jaké povahy je hydrofilní část molekuly, jsou rozlišovány 4 základní typy povrchově aktivních látek: aniontové, kationové, amfoterní a neiontové. Aniontové surfaktanty po disociaci uvolní do roztoku negativně nabitý aniont, kationtové naopak pozitivně nabitý kationt. Amfoterní surfaktanty se v prostředí s alkalickým pH chovají jako aniontové, v prostředí s kyselým pH jako kationtové. Neiontové surfaktanty žádný náboj nemají a ve vodném prostředí nedisociují (Li a kol. 2008).

### a.) Pravé emulgátory ze skupiny surfaktantů

Výběr surfaktantu ovlivňuje číselně vyjádřená hodnota jeho hydrofilně – lipofilní rovnováhy (HLR). Je to poměr hydrofilních a lipofilních vlastností částí molekuly surfaktantu. Hodnota do 9 znamená lipofilní povahu, hodnota HLR nad 11 znamená, že surfaktant bude hydrofilními povahy. Pro stabilizaci emulze typu o/v jsou používány surfaktanty s hodnotou HLR 8 - 18 (Komárek a kol. 2006).

Natrium – oleát

Natrium – oleát patří do skupiny aniontových surfaktantů. Jedná se o ester kyseliny olejové a hydroxidu sodného. Používá se zejména pro stabilizaci emulzního systému typu o/v (Komárek a kol. 2006). Byl uplatněn například při přípravě PLGA mikrosfér s obsahem peptidu metodou odpaření rozpouštědla z emulze typu o/v . Použitá koncentrace natrium-oleátu byla 0,4 % (Jeyanthi a kol. 1996).

Natrium-dodecyl-sulfát, známý také jako natrium-lauryl-sulfát, je jedním z nejpoužívanějších aniontových surfaktantů. Bývá součástí tzv. komplexních emulgátorů. Stabilizuje emulzní systém typu o/v. Pro své výhodné fyzikálně chemické vlastnosti je využíván v mnoha oblastech technologie a výzkumu. Upravuje smáčivost a usnadňuje penetraci kůží, proto se uplatňuje v kosmetickém průmyslu a je obsažen v řadě čisticích prostředků. U savců může vyvolávat podráždění oka a kůže (Komárek a kol. 2006, Cserhati a kol. 2002). Studie z posledních let se zabývají i jeho možnou farmakologickou aktivitou. Bylo potvrzeno, že natrium-dodecyl-sulfát je ligandem jaderného receptoru aktivovaného peroxisomovými proliferátory PPAR γ. Je to způsobeno tím, že natrium-dodecyl-sulfát má ve své struktuře dvanáctiuhlíkatý řetězec, podobný struktuře kyseliny laurové. Mastné kyseliny jsou endogenními ligandy tohoto receptoru. Ligandy PPARγ receptoru aktivují transkripci specifických genů a následně ovlivňují některé biologické funkce, zejména diferenciaci adipocytů a lipidový metabolismus (Lida a kol. 2013).

Sorbitan-monooleát (Span ® 80)

Jedná se o ester anhydridu sorbitolu s kyselinou oleoovou. Jeho hydrofilně – lipofilní rovnováha má hodnotu 4,3. Patří mezi nejpoužívanější neiontové surfaktanty pro stabilizaci emulzí typu v/o. Je však možné i jeho použití pro stabilizaci emulze typu o/o. Jako příklad může být uvedena příprava mikročástic s obsahem ampicilinu. V daném případě byl hodnocen vliv koncentrace emulgátoru na vlastnosti připravených mikročástic. Koncentrace emulgátoru se pohybovala v rozmezí od 1,5 % do 6 %. Distribuce velikosti částic byla výrazně širší se vzrůstem koncentrace sorbitan-monooleátu (Song a kol. 2005).

**b.) Nepravé emulgátory**

Tyto látky vytvářejí vysoce viskózní disperze. Vysoká viskozita prostředí znemožňuje pohyb dispergovaných kapek a zabraňuje tak jejich koalescenci. Nejčastěji jsou pro tyto účely využívány polymery kyseliny akrylové, agar, pektin nebo xantanová guma. Používány jsou i makromolekuly s povrchovou aktivitou, které vytváří vysoce viskózní disperze (Komárek a kol. 2006).

Pro modifikaci o/v za použití dichlormethanu a vody je nejpoužívanější **polyvinylalkohol (PVA)**. Jedná se o syntetickou povrchově aktivní makromolekulární látku, která také zvyšuje viskozitu vnější fáze, a proto je používána ke stabilizaci emulzí (Rowe a kol. 2006). Částečně hydrolyzovaný PVA umožňuje produkci mikročástic o velmi malé velikosti. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací PVA ve vnější fázi se velikost mikročástic snižuje. Přidáváním PVA do vnější fáze je snižováno povrchové napětí a vzniká jemnější emulze, a tím i menší mikročástice. Ale povrchové napětí může být snižováno jen do dosažení kritické micelární koncentrace surfaktantu. Jakmile dosáhne koncentrace této určité hladiny, další přídavek PVA již nepovede ke vzniku nových micel (Li a kol. 2008, Vysloužil a kol. 2013[1]).

Želatina

Želatina je čištěná bílkovina s vyšší molekulovou hmotností, která existuje ve dvou typech v závislosti na způsobu získávání. Želatina typu A je připravovaná kyselou hydrolýzou živočišného kolagenu a želatina typu B jeho částečnou alkalickou hydrolýzou. Pro farmaceutické účely se používá i směs typů A a B. Jako emulgující látka stabilizuje emulzní systém tím, že zvyšuje viskozitu vnější fáze. Patří mezi gelotvorné látky, po nabobtnání a zahřátí nad 40 ºC vytváří sol, který následným ochlazením přechází v gel (Chalabala a kol. 2001, Rowe a kol. 2006).

Pektin je vysokomolekulární látka rostlinného původu sestávající z jednotek kyseliny galakturonové, které jsou spojeny α-1,4 glykosidovými vazbami. Je snadno rozpustný ve vodě, ale nerozpouští se ve většině organických rozpouštědel. Pro své vlastnosti je ve farmaceutické technologii používaný jako emulgátor a regulátor viskozity. Výhodou je, že je netoxický a nedráždivý (Rowe a kol. 2006).

Karmelosa sodná sůl má typickou molekulovou hmotnost v rozmezí 90 000 – 700 000. S její rostoucí koncentrací stoupá viskozita roztoku. Z toho důvodu je primárně využívaná jako stabilizátor emulzí a bývá i součástí očních a topických přípravků (Rowe a kol. 2006).

### c.) Nerozpustné emulgátory

Jedná se o amfifilní anorganické i organické látky ve formě jemného prášku. Jsou smáčeny částečně olejovou i vodnou fází. Mechanizmus, kterým stabilizují emulzní systém, spočívá v tom, že se hromadí na rozhraní fází a vytvářejí vrstvu, která mechanicky zabraňuje koalescenci dispergovaných kapek. Z této skupiny se pro stabilizaci emulzí typu o/v nejčastěji používá Aerosil® (koloidní oxid křemičitý), bentonit a Veegum® (křemičitan hlinito-hořečnatý) (Komárek a kol. 2006)

### 2. Látky s protipěnivým účinkem

Kromě povrchově aktivních látek jsou do vnější fáze přidávány látky s protipěnivým účinkem. Při zvýšení rychlosti míchání v průběhu přípravy mikročástic je systém rozrušován a dostává se do něj více vzduchu. V důsledku toho dochází k pěnění, které znesnadňuje tvorbu mikročástic (Li a kol. 2008). Používány jsou látky na bázi silikonu nebo nesilikonové. Jejich přidáním do systému jsou bublinky vzduchu rychleji rozptýleny (Berchane a kol. 2006).

## 3.4 Parametry, které ovlivňují vlastnosti mikročástic

Výsledné vlastnosti mikročástic připravených metodou odpaření rozpouštědla jsou závislé na mnoha faktorech, které musí být nastaveny tak, aby byla získána léková forma s řízeným uvolňováním léčiva. Účinnost tohoto mikroenkapsulačního procesu je ovlivněna rozpustností vybraného léčiva, rozdělovacími koeficienty a složením

polymeru. Podstatnou roli hraje také volba modifikace této metody (O´Donnel a McGinity 1997).

Proměnné parametry jsou dalšími faktory, které ovlivňují vlastnosti mikročástic. Formulační proměnné parametry jsou spojeny s použitými pomocnými látkami, zejména s jejich typem, koncentrací a množstvím nebo objemem. Procesní proměnné parametry znamenají laboratorní podmínky, za kterých je proces přípravy proveden (Vysloužil a kol. 2013[1]).

### 3.4.1 Formulační proměnné parametry

#### 1. Vliv koncentrace polymeru

Koncentrace polymeru je jedním z klíčových faktorů, které přímo ovlivňují charakteristiku mikročástic a profil uvolňování léčiva. Velikost mikročástic roste spolu se vzrůstem koncentrace polymeru. Rychlost uvolňování léčiva se však snižuje. Zvyšování velikosti mikročástic je pravděpodobně také spjato s vyšší viskozitou koncentrovanějšího roztoku polymeru. Pokud je koncentrace polymeru nižší, vznikají pórovitější částice. Pórovitost bývá ovlivněna dvěma faktory. Roztok s nízkou koncentrací polymeru je méně viskózní a prvotní zformované kapky mají v takovém roztoku větší tendenci ke koalescenci, což vede k vzniku větších pórů. Naopak roztok s vyšší koncentrací polymeru rychleji koaguluje a vytváří těsnější strukturu v důsledku zapletení řetězců. To je také důvod, proč při nižší koncentraci polymeru vznikají mikročástice uvolňující léčivo rychleji. Takové mikročástice jsou navíc menší, což k rychlejšímu uvolňování léčiva přispívá (Yang a kol. 2001, Mao a kol. 2008, Pliszczak a kol. 2011).

Zpevňování částic probíhá při vyšší koncentraci polymeru rychleji, dochází k tvorbě viskózní vrstvy polymeru na povrchu kapek. Vrstva polymeru zabraňuje případnému difundování léčiva do vnější fáze, to následně vede k vyšší enkapsulační účinnosti (Yang a kol. 2000).

### 2. Molekulová hmotnost polymeru

Fyzikální vlastnosti mikročástic, jako hustota, pórovitost a distribuce velikostí, jsou podstatně ovlivněny molekulovou hmotností použitého polymeru. Pokud mají tuhnoucí kapky vyšší koncentraci polymeru s nízkou molekulovou hmotností, budou mít výsledné mikročástice vyšší hustotu, ale budou méně pórovité. Polymery o nižší molekulové hmotnosti jsou rozpustnější v rozpouštědlech, proto musí být během přípravy odstraněna mnohem větší frakce rozpouštědla, aby došlo k zformování částic Při vyšší rozpustnosti polymeru navíc proces zpevňování kapek trvá déle. Větší rozpustnost polymeru s nižší molekulovou hmotností také umožňuje zmenšení zformovaných kapek, což vede následně k tvorbě menších částic (Mehta a kol. 1996).

### 3. Objem vnější a vnitřní fáze

Poměr objemů vnitřní a vnější fáze nemá příliš vliv na enkapsulační účinnost, ale má výrazný dopad na morfologii povrchu mikročástic. Při vysokém poměru fází jsou vytvářeny mikročástice s menším počtem pórů a hladším povrchem, což je způsobeno rychlejším zpevněním zformovaných kapek. Nižší poměr objemů fází vede ke vzniku částic s menší hustotou, ale větší velikostí. Navíc je ovlivněn i profil uvolňování léčiva, protože při snížení poměru fází je prvotní množství uvolněného léčiva, tzv. *burst* efekt, výrazně vyšší. To může být způsobeno tím, že povrch mikročástic má při nižším poměru fází více pórů a uvolňování léčiva je proto rychlejší (Yang a kol. 2000, Mao a kol. 2008).

### 4. Typ a koncentrace emulgátoru

Zvýšená koncentrace emulgátoru snižuje mezifázové napětí a zabraňuje koalescenci kapek. Proto je koncentrace emulgátoru důležitým faktorem při přípravě mikročástic, neboť ovlivňuje jak proces emulgace a tvorbu kapek, tak i jejich zpevnění během procesu (Heiskanen a kol. 2012). Rostoucí koncentrace emulgátoru ve vnější fázi vede ke vzniku menších mikročástic (Capan a kol. 1999). Při použití emulgátorů, které

zvyšují viskozitu prostředí, jsou v emulzi obtížněji vytvářeny drobné kapky, a proto jsou vzniklé mikročástice větší. Koncentrace emulgátoru má vliv i na enkapsulační účinnost. Do dosažení limitní koncentrace emulgátoru vzrůstá enkapsulační účinnost spolu se zvyšováním koncentrace emulgátoru. Po dosažení této hranice však další zvyšování koncentrace emulgátoru vede k poklesu enkapsulační účinnosti. Byl také prokázán vliv koncentrace emulgátoru na profil uvolňování léčiva. Vyšší koncentrace emulgátoru vede k tvorbě menších mikročástic s větším povrchem, které uvolňují léčivo rychleji. Může ale nastat situace, kdy vyšší koncentrace emulgátoru má za následek pomalejší uvolňování léčiva. Je tomu tak proto, že vyšší koncentrace emulgátoru zvýší viskozitu vnější fáze, což znesnadní difuzi léčiva do vnější fáze. Při vyšší koncentraci emulgátoru je navíc emulze stabilnější, léčivo je v polymerní matrici distribuováno rovnoměrněji a neukládá se při povrchu mikročástice, jako tomu je v případě použití nízké koncentrace emulgátoru (Yang a kol. 2001).

### 5. Přídavek anorganické soli do vnější fáze

Přidání určitého množství soli do vnější fáze může ovlivnit velikost mikročástic a jejich výslednou morfologii. Při přípravě PLGA mikročástic za použití modifikace v/o/v bylo přidáno do vnější fáze systému 10 % chloridu sodného. Mikročástice vykazovaly vyšší tvrdost a hustotu. Jejich povrch byl pravidelný a hladký bez zjevných trhlin nebo kráterů. Vnitřní struktura mikročástic byla hustší a obsahovala mnohem menší dutiny, než mikročástice, připravené bez přídavku chloridu sodného. Přítomnost chloridu sodného ve vnější fázi indukuje únik vody z vnitřní fáze. Voda prochází skrz organickou vrstvu, která se v tomto případě chová jako difuzní bariéra mezi dvěma vodnými fázemi. V důsledku toho dovnitř částice pronikne méně vody, dutiny v částici jsou menší a jejich vnitřní struktura hustší (Péan a kol. 1998).

### 6. Viskozita vnější fáze

V literatuře je běžně uváděna změna viskozity vnitřní fáze, avšak viskozita vnější fáze bývá obměňována zřídka, neboť vnější fáze je svojí viskozitou blízká vodě a navíc je komplikovaný odběr mikročástic z viskóznější kapaliny. Je známo, že viskozita

vnitřní fáze roste s vyšší molekulovou hmotností polymeru a s jeho vyšší koncentrací. Vyšší koncentrace polymeru vede k zvýšení enkapsulační účinnosti. Mikročástice mají větší velikost, počáteční *burst* efekt je nižší a uvolňování léčiva je pomalejší. Typ rozpouštědla rovněž ovlivňuje viskozitu vnější fáze, ale obměna rozpouštědla za tímto účelem není běžně prováděna (Yang a kol. 2000, Li a kol. 2008).

### 3.4.2 Procesní proměnné parametry

#### 1. Teplota

Teplota během přípravy má vliv na některé z klíčových vlastností mikročástic. Jedním z nedostatků metody odpaření rozpouštědla je časová náročnost odpaření rozpouštědla z emulzního systému. Vyvstala proto snaha proces urychlit. Přípravou mikročástic za zvýšené teploty lze celý proces přípravy urychlit, protože odpaření rozpouštědla je závislé na teplotě. Zvyšování teploty však musí probíhat konstantně. Nekontrolovatelné urychlení odpaření rozpouštědla má negativní vliv na kvalitu řízeného uvolňování léčiva z mikročástic. Rychlejší odpařování rozpouštědla vede také ke vzniku sférických mikročástic s velmi hladkým povrchem a minimem pórů, protože mikročástice jsou zformovány rychleji. Nízká pórovitost poté znamená pomalejší uvolňování léčiva (Miyazaki a kol. 2006). Teplota by však neměla být příliš vysoká, aby nedošlo k znehodnocení léčiva a neměla by dosáhnout bodu varu rozpouštědla (Li a kol. 2008). Vliv teploty je zřejmě závislý na typu použité modifikace metody. Při použití modifikace v/o/v při přípravě PLGA mikročástic se velikost mikročástic s rostoucí teplotou zvyšovala (Yang a kol. 2000). Naopak, při přípravě dextranových mikročástic s obsahem theofylinu v systému acetonu a tekutého parafinu vznikaly při nižší teplotě větší mikročástice (Miyazaki a kol. 2006).

#### 2. Tlak

Odstraňováním rozpouštědla za tlaku nižšího než je atmosférický lze dobu přípravy mikročástic výrazně zkrátit. Při nižším tlaku je teplota varu rozpouštědla nižší,

rozpouštědlo je těkavější, a proto se z emulze rychleji odpaří. To vede i k rychlejšímu formování mikročástic (Meng a kol. 2004). Tlak má zřejmý vliv i na enkapsulační účinnost, charakter povrchu částic a jejich velikost. Výsledky jednotlivých studií se v tomto směru rozcházejí, což znamená, že vliv tlaku bude závislý i na dalších faktorech, jako jsou použitá modifikace metody, typ léčiva a pomocných látek. Například při přípravě mikročástic s obsahem lidokainu modifikací o/v vedlo snížení tlaku k poklesu enkapsulační účinnosti (Chung a kol. 2001). Naopak, při přípravě mikročástic s obsahem bovinního hemoglobinu s použitím modifikace v/o/v nebyla vlivem sníženého tlaku (30 kPa) výrazně ovlivněna enkapsulační účinnost (Meng a kol. 2004).

### 3. Míchání

Velikost mikročástic je určena zejména rychlostí míchání, neboť míchání poskytuje energii nezbytnou k dispergování vnitřní fáze do vnější fáze. Vyšší rychlost míchání vede ke vzniku menších mikročástic, protože působící silou vznikne jemnější emulze a zformované kapky jsou menší. Nevýhodou však je, že výtěžek mikročástic je při vyšší rychlosti míchání nižší, protože zformované kapky jsou častěji rozbíjeny vlivem působící síly. Jako příklad lze uvést přípravu PLGA mikročástic s enkapsulovaným sérovým bovinním albuminem s použitím modifikace v/o/v. V tomto případě zvýšení rychlosti míchání z 500 otáček na 700 otáček za minutu vedlo k poklesu výtěžku z 90 na 85,1 %. Z tohoto důvodu musí být rychlost míchání předem optimalizovaná, aby byl výtěžek mikročástic o požadované velikosti dostatečný (Yang a kol. 2001).

## 3.5 Stabilita a její hodnocení

Léčivé přípravky podléhají po určité době rozkladným procesům. Dochází ke změně fyzikálních a chemických vlastností a časem klesá biologická účinnost. Stabilita je v tomto případě definována jako schopnost účinné látky a léčivého přípravku zachovat si po určitou dobu ve stanovených mezích a za stanovených podmínek

uchovávání určenou jakost. Za míru stability je považována doba použitelnosti léčivého přípravku. Stabilita léčivých přípravků je hodnocena prostřednictvím stabilitních testů, během kterých jsou v daných časových intervalech sledovány změny jakosti, jako například změna obsahu účinné látky v přípravku (Chalabala a kol. 2001).

### 3.5.1 Ověřování stability

Aby mohl být léčivý přípravek registrován a jeho výroba byla povolena, musí být stanovena doba jeho použitelnosti. Je tedy nutné znát jeho stabilitu. Stabilita je ověřována prostřednictvím stabilitních zkoušek, které jsou prováděny u hromadně vyráběných léčivých přípravků, účinných látek a nových pomocných látek. Stabilitní zkoušky sledují v daném časovém intervalu zvolené fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické známky jakosti účinné látky nebo přípravku, které jsou za tímto účelem vystaveny působení vybraných vnějších vlivů prostředí, jako je teplo, světlo nebo vlhkost. Na základě jejich výsledků pak mohou být stanoveny podmínky skladování a doba použitelnosti (Komárek a kol. 2006, Nageswari a kol. 2012).

Existují dva typy zkoušek, které jsou prováděny před registrací nového přípravku, tzv. stabilitní zkoušky zrychlené a tzv. stabilitní zkoušky dlouhodobé. Při vývoji nového léčivého přípravku bývají používány zkoušky vlhkým teplem, suchým teplem a tepelným namáháním. Stabilitní zkoušky jsou prováděny v klimatických komorách při konstantních podmínkách nebo v klimatizovatelných místnostech, které umožňují nastavení a udržení podmínek na požadované úrovni (Komárek a kol. 2006).

#### 1. Zátěžové zkoušky a uměle navozený proces degradace

Tzv. zátěžové zkoušky zpravidla předcházejí oficiálním stabilitním zkouškám. Účelem zátěžových zkoušek je odhalit způsob vzniku degradačních produktů a následně jejich strukturu. Zátěžové zkoušky probíhají za mnohem náročnějších podmínek. V jejich průběhu se tedy mohou objevit i takové degradační produkty účinné látky nebo přípravku, které by nebyly při zrychlených a zejména dlouhodobých stabilitních zkouškách objeveny, což má význam v případě potenciální toxicity některých

degradačních produktů (Görög 2000). Zátěžové zkoušky také umožňují prokázat specifitu analytických metod určených ke zhodnocení výsledků stabilitních zkoušek, protože jejich prostřednictvím jsou získávány potřebné informace o všech možných degradačních produktech dané látky (Blessy a kol. 2013).

Uměle navozený proces degradace je používán pro nové účinné látky a přípravky. Podmínky, za kterých je prováděn, představují větší zátěž pro danou látku, než běžné stabilitní zkoušky. Jejich účelem je objasnění cesty degradace dané látky a struktury degradačních produktů (Blessy a kol. 2013). Svým rozsahem pokrývá všechny podmínky a vlivy, které se mohou objevit během skladování a distribuce. Tento způsob zkoušení dále umožňuje například zhodnotit citlivost daného léčiva nebo přípravku ke konkrétním vlivům, jako je například teplo, vlhkost nebo oxidace (Singh a kol. 2013).

## 2. Stabilitní zkoušky zrychlené

Doba zkoušení bývá nejméně 6 měsíců. Zkouška je zpravidla prováděna při teplotě o 15 ºC vyšší než je běžná teplota při skladování, což je 25 ºC. Relativní vzdušná vlhkost je v tomto případě 75 %. Tato varianta však představuje pro zkoušený vzorek vysokou zátěž. Existuje proto i druhá varianta této zkoušky, kdy zkoušení probíhá po dobu jednoho roku při teplotě 30 ºC a relativní vzdušné vlhkosti 60 % (Komárek a kol. 2006). Běžný režim při těchto zkouškách je teplota 40 ºC ± 2 ºC/ relativní vlhkost 75 % ± 5 % po dobu 6 měsíců (Görög 2000).

## 3. Stabilitní zkoušky dlouhodobé

Dlouhodobé zkoušky probíhají za takových podmínek, které odpovídají podmínkám uchovávání daného přípravku nebo účinné látky. Většina látek je běžně skladována při teplotě v rozmezí 10 - 25 ºC při relativní vzdušné vlhkosti do 60 %. V průběhu zkoušení jsou tyto hodnoty udržovány na horní hranici, běžným režim zkoušení tak bývá teplota 25 ± 2 ºC /relativní vlhkost 60 % ± 5 %. Vzorek je hodnocen nejprve na začátku testu, v čase 0 a poté je hodnocen po uplynutí 3, 6, 12, 18 a 24

měsíců. Doba celého zkoušení odpovídá době použitelnosti daného přípravku (Komárek a kol. 2006, Görög 2000).

Podmínky stabilitních zkoušek mohou být přizpůsobeny účelům konkrétní studie. Jako příklad lze uvést stanovení fyzikálních vlastností a stability liposomů a vesikulů (Pheroid™) s obsahem účinné látky mefloquinu, používané k profylaxi a terapii malárie. Stabilitní zkouška byla prováděna po dobu 3 měsíců. Lipidová emulze byla skladována při teplotě 5 ± 3 ºC, a dále při režimech teplota 25 ± 2 ºC/ relativní vlhkost 60 ± 5 % a teplota 30 ± 2 ºC/relativní vlhkost 65 ± 5 %. Bylo hodnoceno zejména pH, velikost, enkapsulační účinnost a morfologie liposomů a vesikul. Po uplynutí doby zkoušení byla u liposomů zaznamenána dvojnásobná velikost oproti původní velikosti v důsledku tvorby agregátů. Při skladovacích teplotách 25 ºC a 30 ºC došlo také k velkému poklesu pH. Vesikuly byly svojí velikostí, strukturou a enkapsulační účinností stabilnější v porovnání s liposomy (Slabbert a kol. 2011).

#### 4. Zkouška tepelným namáháním

Tato zkouška je založena na principu extrémního střídání teplot. Vzorky jsou vystavovány po dobu 6 týdnů působením teplot -20 ºC a +25 ºC, a to střídavě po dobu jednoho týdne. Vzorek je hodnocen nejprve na začátku a poté až po skončení testování (Komárek a kol. 2006).

### 3.5.2 Hodnocení výsledků stabilitních zkoušek

Účinná látka a léčivý přípravek stabilitní zkoušce vyhovují, jestliže splňují požadavky na fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické znaky jakosti. Pro všechny typy přípravků jsou prováděna organoleptická hodnocení, kdy je sledována změna vzhledu. U některých lékových forem jsou prováděny zkoušky fyzikální, například u čípků a tablet. Chemickými zkouškami je sledován vznik degradačních produktů. Biologické zkoušky jsou prováděny například u antibiotik nebo hormonů, tedy tam, kde běžné biologické zkoušky nedostačují (Komárek a kol. 2006).

Pro zhodnocení výsledků stabilitních zkoušek jsou využívány analytické metody, které prokazují stabilitu (SIM, stability indicating methods). Jedná se o validované analytické metody určené k stanovení poklesu množství účinné látky v přípravku následkem degradace. Umožňují také detekovat změnu stability daného léčiva i přípravku v čase, aniž by byl výsledek ovlivněn jinými degradačními produkty, pomocnými látkami nebo nečistotami. (Blessy a kol. 2013).

Pro analýzu degradačních produktů jsou nejčastěji využívány varianty kapalinové chromatografie, zejména vysoce účinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech RP-HPLC, spojená s UV detektorem (Blessy a kol. 2013). Poměrně nová metoda využívaná k prokazování stability je ultra účinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech RP-UPLC. Její výhoda ve srovnání s klasickou HPLC metodou, je zkrácení doby separace vzorků a snížení spotřeby rozpouštědla. Tato metoda byla například použita pro stanovení přítomnosti nečistost a degradačních produktů léčiva desloratadinu (Rao a kol. 2010). Dále byla použita k posouzení léčiva imatinib mesylátu (Nageswari a kol. 2012).

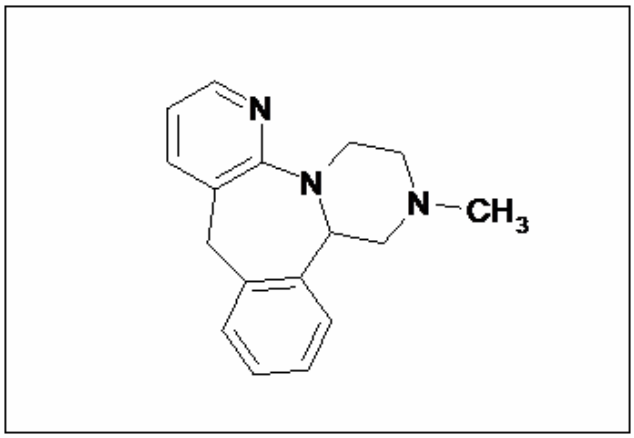
## 3.6 Mirtazapin

### 3.6.1 Vlastnosti mirtazapinu

Mirtazapin je syntetické léčivo ze skupiny tetracyklických antidepresiv. Je to centrálně působící derivát mianserinu. Inhibuje zpětné vychytávání noradrenalinu blokádou presynaptických adrenergních $\alpha_2$ – receptorů. Serotoninergní působení je modulováno prostřednictvím 5-$HT_{1a}$ receptorů. Současně také působí antagonisticky na serotoninových receptorech 5-$HT_{2a}$, 5-$HT_{1c}$ a 5-$HT_3$ a vede ke zvýšenému uvolňování serotoninu a noradrenalinu. Pro tyto vlastnosti je označován některými autory jako noradrenergní a specificky serotoninergní antidepresivum (noradrenergic and specific serotonergic antidepressant, NaSSA) (Suchopár a kol. 2009).

Indikací k podání mirtazapinu jsou deprese různé etiologie. Jeho účinek nastupuje rychle, obyčejně po 1. – 2. týdnu užívání a maxima dosahuje po třech týdnech.

Vzhledem k dlouhému biologickému poločasu (20 – 40 hodin) účinek dlouho přetrvává, což umožňuje jeho podávání pacientům v jedné denní dávce. Počáteční dávka je zpravidla 15 mg denně a je postupně zvyšována na udržovací dávku 45 mg denně. Po perorálním podání se rychle vstřebá a v játrech dochází k jeho biotransformaci na aktivní metabolit demethymirtazapin. Vylučuje se ze 75 % močí. Z chemického hlediska se jedná o 2-methyl-1,2,3,4,10,14b-hexahydrobenzo[c]pyrazino[1,2-a]pyrido[3,2-f]azepin (obr. **7**). Je to bílý nebo krémově bílý krystalický prášek, který je těžce rozpustný ve vodě.




Obr**. 7:** Strukturní vzorec mirtazapinu

Mezi jeho nejčastější nežádoucí účinky patří zejména zvýšení chuti k jídlu a následné zvyšování tělesné hmotnosti, únava a ospalost. Naopak chybí nežádoucí účinky známé u SSRI – insomnie, sexuální dysfunkce nebo úzkost, vyvolávané stimulací na 5-$HT_2$ receptorech, protože je antagonistou na 5-$HT_2$ receptorech. Mirtazapin je však i antagonistou histaminových $H_1$- receptorů, což je příčinou jeho poměrně silného sedativního účinku. Antagonismem $H_1$- receptorů může také působit proti možnému anxiogennímu vlivu, který vzniká jako důsledek posílené funkce noradrenalinu. (Lincová a kol. 2007, Suchopár a kol. 2009).

### 3.6.2 Mirtazapin v hromadně vyráběných léčivých přípravcích

V přípravcích, které jsou v současnosti registrované v České republice, existuje mirtazapin ve dvou typech lékové formy, a to v perorálních potahovaných tabletách nebo tabletách, které jsou dispergovatelné v ústech. Zatím není registrovaný takový léčivý přípravek, kde by byl mirtazapin obsažen v lékové mikroformě (Suchopár a kol. 2009).

# 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Přístroje a zařízení

Laboratorní váhy KERN 440 – 47N (Gottl. KERN & GmbH, Německo)

Analytické váhy KERN 870 – 13 (Gottl. KERN & GmbH, Německo)

Rotor – statorový homogenizátor WiseTis® HG-1SD (Wisd Laboratory Instruments, Witeg Labortechnik GmbH, Německo)

Horkovzdušná sušárna HORO - 048B ( Dr. Ing. A. Hoffmann, Německo)

Optický mikroskop ECLIPSE SMZ 1500 (Nikon, Japonsko)

Spektrofotometr LAMBDA 125 (Perkin Elmer Instruments, USA)

Disoluční přístroj SOTAX AT 7 SMART (Sotax, Švýcarsko)

Mechanické míchadlo HEIDOLPH RZR 2021 a RZR 2020 (Sigma Aldrich, USA)

Stabilitní box pro konstantní podmínky APT.Line KBF (Binder GmbH, Německo)

Lednice (Gorenje, Slovinsko)

Skenovací elektronový mikroskop – MIRA3 (Tescan, Brno, Česká republika)

Naprašovací zařízení SCD 005 Sputter Coaterr (BalTec Inc., Balzers, Švýcarsko)

## 4.2 Suroviny, pomocné látky a chemikálie

Čištěná voda (Aqua purificata) – ČL 2009

Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové - Resomer® RG 504 S – číslo šarže: RES-0469 (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Německo)

Polyvinylalkohol – číslo šarže: 363138-500G, Mr 31. 000 – 50. 000, viskozita 5,5 – 6,6 cP (Sigma Aldrich, USA)

Mirtazapinum – číslo šarže: 390310 (Zentiva a. s, Česká Republika)

Dichlormethan – číslo šarže: 1707190712 (Penta Ing. Petr Švec, Česká Republika)

Tlumivý fosforečnanový roztok pH 7,2 – složení: chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, chlorid hořečnatý, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, dihydrogenfosforečnan sodný (vše Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

## 4.3 Příprava mikročástic

Mikročástice byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla z jednoduché emulze o/v. Nejprve byla připravena vnitřní olejová fáze. Smícháním 700 mg polymeru PLGA (Resomer® S) a 200 mg mirtazapinu vznikla směs, která byla dispergována v 5 ml organického rozpouštědla dichlormethanu. Vzniklá olejová fáze byla homogenizována 1 minutu při otáčkách 20 000 pomocí rotor – statorového homogenizátoru WISE TIS a poté vemulgována do vnější vodné fáze, která byla tvořena 0,1% roztokem PVA (0,8 g PVA v 800 ml vody). Odpařování rozpouštědla z připravené emulze probíhalo při 600 otáčkách za minutu po dobu 60 minut. Vytvořené

mikročástice byly izolovány pomocí síta s velikostí ok 80 μm a třikrát promyty destilovanou vodou. Poté byly sušeny v horkovzdušné sušárně po dobu 24 h při teplotě 25 ºC.

Byly připraveny celkem 3 šarže PLGA mikročástic s obsahem mirtazapinu. Každá šarže se skládala ze čtyř cyklů. Podmínky přípravy jednotlivých šarží mikročástic jsou shrnuty v tabulce **3.**

Tab. **3**: Podmínky přípravy jednotlivých šarží

| Šarže | Koncentrace PVA (%) | Počet otáček (rpm) |
|---|---|---|
| A | 0,1 | 600 |
| B | 0,1 | 600 |
| C | 0,1 | 600 |

## 4.4 Hodnocení kvalitativních parametrů

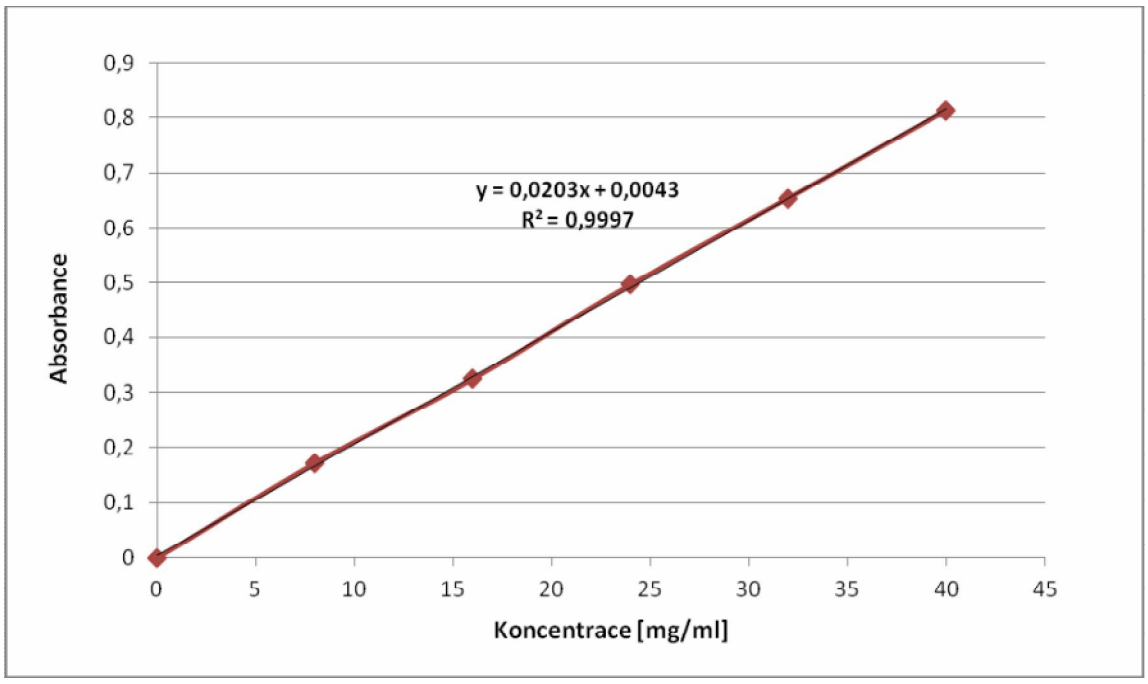
### 4.4.1 Optický mikroskop a skenovací elektronová mikroskopie

Pomocí optického mikroskopu Nikon SMZ 1500 byly zhodnoceny základní parametry připravených mikročástic, ekvivalentní průměr a sféricita. Vzorek mikročástic od každé šarže byl nanesen na tmavé podložní sklíčko. Celkem bylo změřeno 100 náhodně vybraných mikročástic od každé šarže. Snímky mikročástic byly poté pořízeny pomocí snímací kamery při různém zvětšení.

Skenovací elektronová mikroskopie byla provedena za účelem zhodnocení vzhledu a vlastností povrchu připravených mikročástic. Vzorky byly pomocí oboustranné lepicí pásky adjustovány na válcový nosič a poté byly potaženy 10 nm silnou vrstvou zlata. Snímky byly pořízeny při urychlujícím napětí 6,0 kV.

### 4.4.2 Kalibrační křivka pro mirtazapin

Pro sestrojení kalibrační křivky mirtazapinu byly nejprve připraveny vzorky mirtazapinu v dichlormethanu o známé koncentraci a následně měřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 295 nm. Absorbance byla změřena u každého vzorku celkem 3x. Kalibrační křivka vytvořena na základě získaných hodnot (obr. **8**).




Obr. **8**: Kalibrační křivka mirtazapinu

### 4.4.3 Stanovení obsahu mirtazapinu v mikročásticích a enkapsulační účinnost

Do odměrné baňky o objemu 25 ml bylo naváženo přesné množství vzorku a doplněno dichlormethanem po rysku. Roztoky s obsahem vzorku byly důkladně promíchány a poté u nich byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 295 nm. S pomocí vytvořené kalibrační křivky byly získané hodnoty absorbance přepočítány na obsah mirtazapinu v mikročásticích. Byly také vypočítány směrodatné

odchylky. Pro každou připravenou šarži byl obsah mirtazapinu stanoven 3x. Z naměřených hodnot byla vypočítána enkapsulační účinnost (EE) podle vztahu 1 (Song a kol. 2005):

$$EE = \frac{\text{Skutečné množství mirtazapinu v mikročásticích}}{\text{Množství použitého mirtazapinu}} \times 100\ [\%] \qquad [1]$$

### 4.4.4 Stanovení výtěžku procesu

Pro každou připravenou šarži je výtěžek mikročástic definován jako podíl hmotnosti sesbíraných mikročástic a součtu hmotnosti použitého polymeru a léčiva, násobeného 100, vypočítaný podle vztahu 2. Výsledek je pak vyjádřen v procentech (Song a kol. 2005):

$$\text{Výtěžek} = \frac{\text{Celková hmotnost připravených mikročástic}}{\text{Celková hmostnost použitého materiálu (polymer + léčivo)}} \times 100\ [\%] \qquad [2]$$

### 4.4.5 Disoluční zkouška a stanovení faktoru podobnosti

Pro disoluční zkoušku byla použita modifikovaná košíčková metoda. Jako disoluční médium byl použit tlumivý fosforečnanový roztok o pH 7,2. Do 6 disolučních nádob bylo odměřeno 500 ml disolučního média. Dále bylo vypočítané množství mikročástic navážené na analytických vahách vloženo do 6 disolučních nádob. Všechny nádoby byly umístěny v disoluční lince do vodní lázně, jejíž teplota byla vytemperována na 37 ± 0,5 ºC. Uvolňování léčiva z mikročástic probíhalo při 100 otáčkách za minutu.

Poté byly prováděny odběry vzorků v následujících časech: do 1 hodiny byl vzorek odebírán po 15 minutách, do 2 hodin po 30 minutách a do 72 hodin po 120 minutách. Z odebraných vzorků se pomocí spektrofotometru určilo množství uvolněného léčiva v procentech. Ze získaných hodnot byly následně sestrojeny grafy vyjadřující závislost procent uvolněného léčiva na čase.
Pro zhodnocení podobnosti disolučních profilů byl použit faktor podobnosti $f_2$ podle vztahu 3 (Gowda a kol. 2011):

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^{n} (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \qquad [3]$$

$R_t$ je množství látky srovnávaného vzorku v procentech, které bylo uvolněno v daném časovém intervalu t
$T_t$ je množství látky testovaného vzorku v procentech, které bylo uvolněno v časovém intervalu t

Hodnota faktoru podobnosti může být v rozmezí od 0 do 100. Pokud bude hodnota rovna 100, znamená to, že disoluční křivky srovnávaného a testovaného vzorku jsou identické. Se vzrůstající odlišností disolučních křivek se bude hodnota blížit k 0 (Sahoo a kol. 2010). U dvou porovnávaných disolučních křivek by měla být hodnota faktoru podobnosti od 50 výše, v takovém případě jsou porovnávané křivky považovány za podobné (Gowda a kol. 2011, Lu a kol. 2007).

### 4.4.6 Stanovení kinetiky uvolňování mirtazapinu

Modely uvolňování léčiva jsou založeny na matematických funkcích, které popisují jednotlivé disoluční profily. Disoluční profily látek jsou posuzovány podle odvozených parametrů konkrétního modelu (Dash a kol. 2010). Porovnávání disolučních profilů látek s těmito modely uvolňování léčiva se provádí za účelem

zjištění kinetiky a mechanismu uvolňování léčiva z lékové formy (Kormanová a kol. 2010). Na základě získaných hodnot z disoluční zkoušky byl disoluční profil mirtazapinu porovnáván s následujícími modely uvolňování:

Kinetika 0. řádu

Uvolnění léčiva z lékových forem, které nejsou rozděleny a uvolňují léčivo pomalu, lze vyjádřit vztahem 4:

$$Q_1 = Q_0 + K_0 t \qquad [4]$$

$Q_1$ je množství léčiva, uvolněného v čase $t$

$Q_0$ je počáteční množství léčiva v roztoku

$K_0$ je rychlostní konstanta reakce 0. řádu

$t$ je čas

Vztah popisuje uvolňování léčiva z lékových forem, jako jsou například transdermální systémy, matricové tablety nebo osmotické systémy. Léčivo je uvolňováno ve stále stejném množství za jednotku času, nezávisle na koncentraci (Costa a Lobo 2001).

Kinetika 1. řádu

Lékové formy uvolňující léčivo podle tohoto modelu jsou zejména pórovité matrice s obsahem ve vodě rozpustného léčiva. Léčivo je uvolňováno úměrně množství léčiva, které zůstává v matrici, to znamená, že množství uvolněného léčiva za jednotku času se snižuje. Model je popisován vztahem 5:

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \qquad [5]$$

$Q_t$ je množství léčiva, uvolněného v čase $t$

$Q_0$ je počáteční množství léčiva v roztoku

$K_1$ je rychlostní konstanta reakce 1. řádu

Model byl také používán k popisu absorpce a eliminace některých léčiv (Costa a Lobo 2001).

Higuchiho model

Tento model popisuje kinetiku uvolňování léčivých látek z matric procesem difuze (Costa a Lobo 2001). Model je popisován rovnicí 6:

$$Q = \sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \qquad [6]$$

$Q$ vyjadřuje množství léčiva v čase t
$C$ je počáteční koncentrace léčiva
$Cs$ je rozpustnost léčiva v matricovém médiu
$D$ je difuzní koeficient

Rovnice je také aplikovatelná pro systém, kde jsou částice dispergované v uniformní matrici, která se chová jako difuzní médium (Costa a Lobo 2001).

Hixson – Crowelův model

Hixson a Crowel r. 1931 rozpoznali, že pravidelné plochy částic jsou přímo úměrné třetí mocnině jejich objemu. Model se používá k analýze uvolňování léčiva z matricových tablet, jehož mechanismus není přesně znám nebo je kombinací více typů uvolňování léčiva. Pro model byla odvozena rovnice 7:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \qquad [7]$$

$W_0$ je počáteční množství léčiva v lékové formě
$W_t$ je zbývající množství léčiva v lékové formě v čase $t$
$K_s$ představuje konstantu, zahrnující vztah povrch-objem

Tento model předpokládá, že rychlost uvolňování je určena velikostí částic lékové formy, nikoli difuzí přes polymerní matrici (Kormanová a kol. 2010). Rovnice popisuje uvolňování léčiva z takového systému, kde dochází k změně povrchu a průměru částic nebo tablet (Dash a kol. 2010).

Korsmeyer – Peppasův model

V roce 1983 Korsmeyer a kol. vyvinuli jednoduchý semi-empirický model vztahující uvolňování léčiva exponenciálně k uplynulému času *t*. Model je vyjádřen rovnicí v obecnější formě 8:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \qquad [8]$$

*a* je konstanta zahrnující strukturální a geometrickou charakteristiku lékové formy
*n* je exponent uvolňování, který charakterizuje mechanismus uvolňování léčiva
$M_t/M_\infty$ je zlomek uvolněného léčiva v čase *t*
*t* je čas

Vztah je používaný pro analýzu uvolňování léčiva z polymerních matric. Na základě hodnot exponentu *n* lze určit mechanismus uvolňování léčiva z dané lékové formy (tab. **2**). Pokud je hodnota exponentu *n* rovna 0,5, jedná se o Fickovu difuzi. Hodnota exponentu větší než 0,5 ale menší než 1 naznačuje anomální transport, kdy dochází ke kombinaci eroze a difuze. Hodnota *n* rovna 1 znamená, že dochází k erozi a léčivo je uvolňováno kinetikou nultého řádu, tedy nezávisle na koncentraci (Dvořáčková a kol. 2009).

Tab. **4**: Interpretace hodnot exponentu uvolňování *n* (Dvořáčková a kol. 2009).

| **Hodnota exponentu uvolňování *n*** | **Mechanismus uvolňování léčiva** |
|---|---|
| 0,5 | Fickova difuze |
| 0,5 □ *n* □ 1,0 | anomální transport – kombinace difuze a eroze matrice |
| 1,0 | eroze matrice – kinetika 0. řádu (nezávislá na koncentraci) |
| více než 1,0 | Konstantní rychlost pohyblivých front a lineární váhový přírůstek matrice |

Baker – Lonsdaleův model

Model byl odvozen roku 1974 od Higuchiho modelu a popisuje uvolňování léčiva z matric kulového tvaru podle vztahu 9:

$$f_t = \frac{3}{2}\left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)^{2/3}\right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \qquad [9]$$

$M_t$ představuje množství léčiva uvolněného v čase t

$M_\infty$ je množství léčiva uvolněného při nekonečném čase

$k$ je konstanta uvolňvání

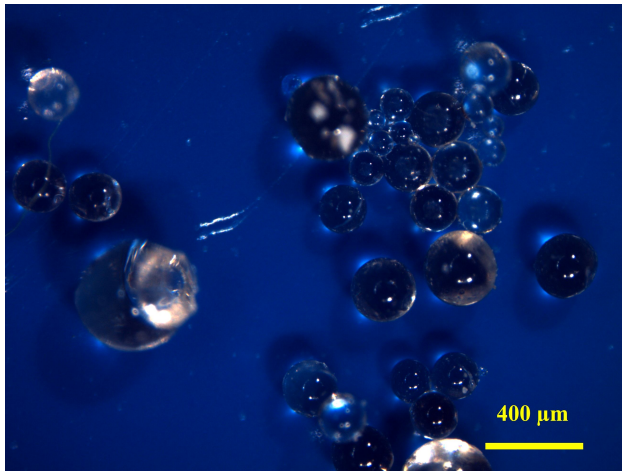
Rovnice je určena k linearizaci disolučních dat u mikrotobolek a mikrosfér (Costa a Lobo 2001).

### 4.4.7 Metodika stabilitní zkoušky

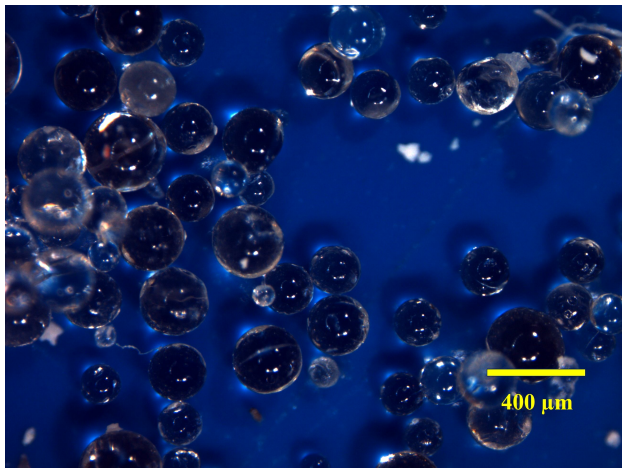
Do lékovek z tmavého skla o objemu 25 ml bylo naváženo 500 mg vzorku šarže. Vzorky byly umístěny do lednice s nastavenou teplotou 8 ± 0,5 ºC a do stabilitního boxu, kde byla teplota temperována na 25 ± 0,5 ºC s relativní vlhkostí 60%. Nejprve byla disoluční zkouška provedena v čase 0 měsíců. Po 3 a 6 ti měsících byly vzorky opět podrobeny disoluční zkoušce.

# 5. VÝSLEDKY

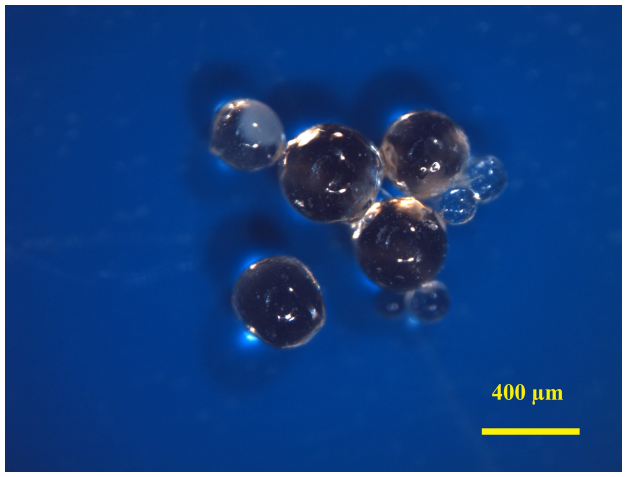
## 5.1 Snímky z optického mikroskopu



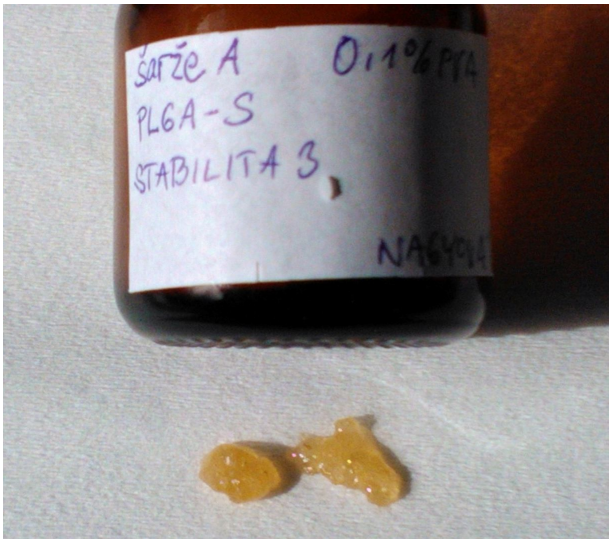

Obr. **9:** Snímek mikročástic šarže A z optického mikroskopu




Obr. **10:** Snímek mikročástic šarže B z optického mikroskopu

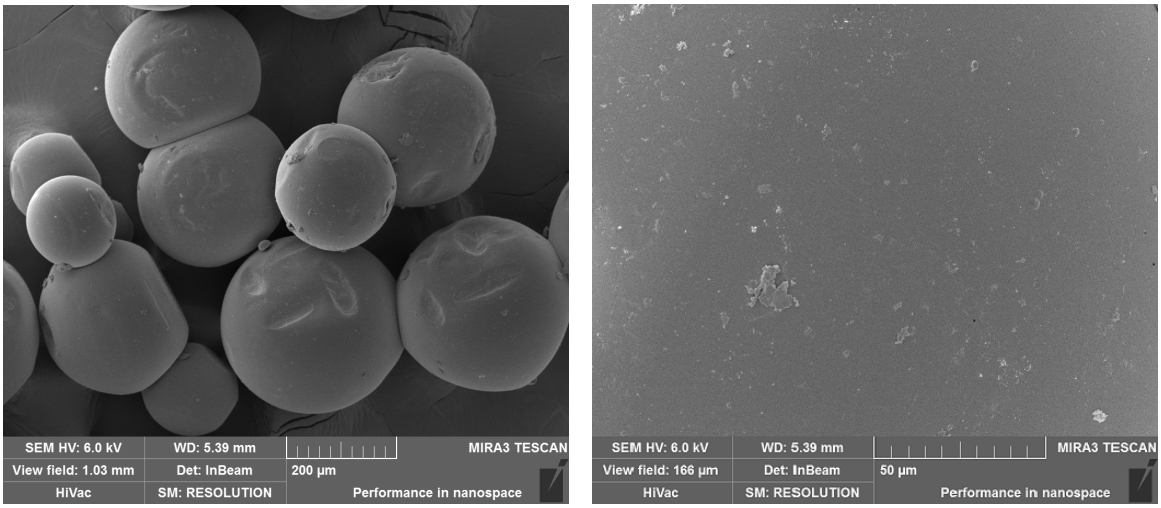



Obr. **11:** Snímek mikročástic šarže C z optického mikroskopu




Obr. **12**: Snímek mikročástic šarže A po 3 měsících skladování ve stabilitním boxu při 25 ºC a relativní vlhkosti 60 %

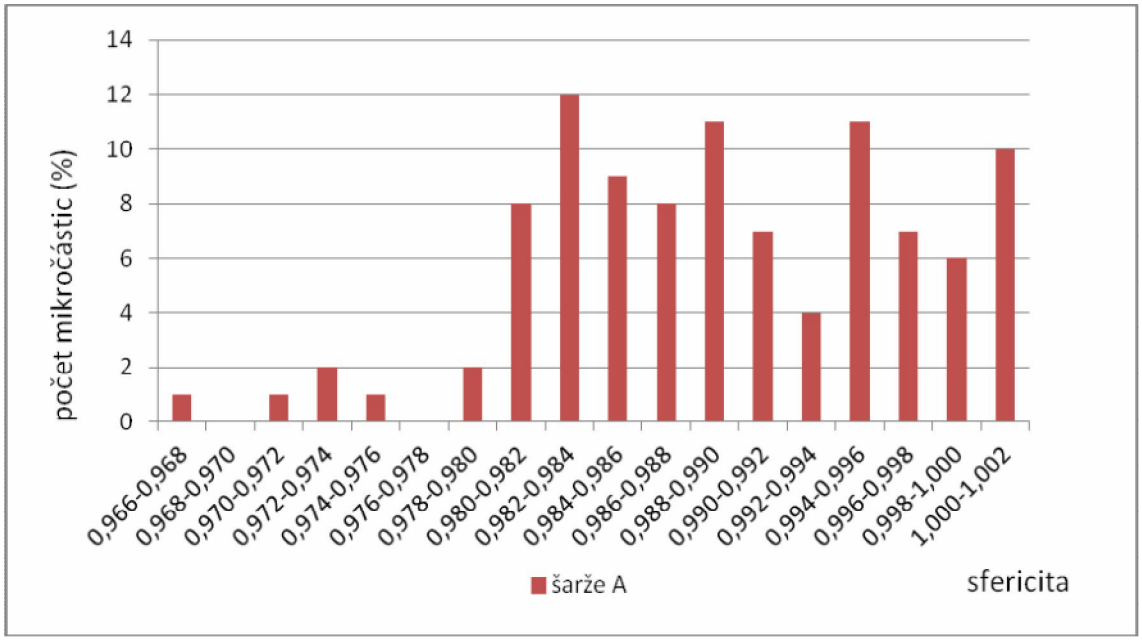
## 5.2 Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu



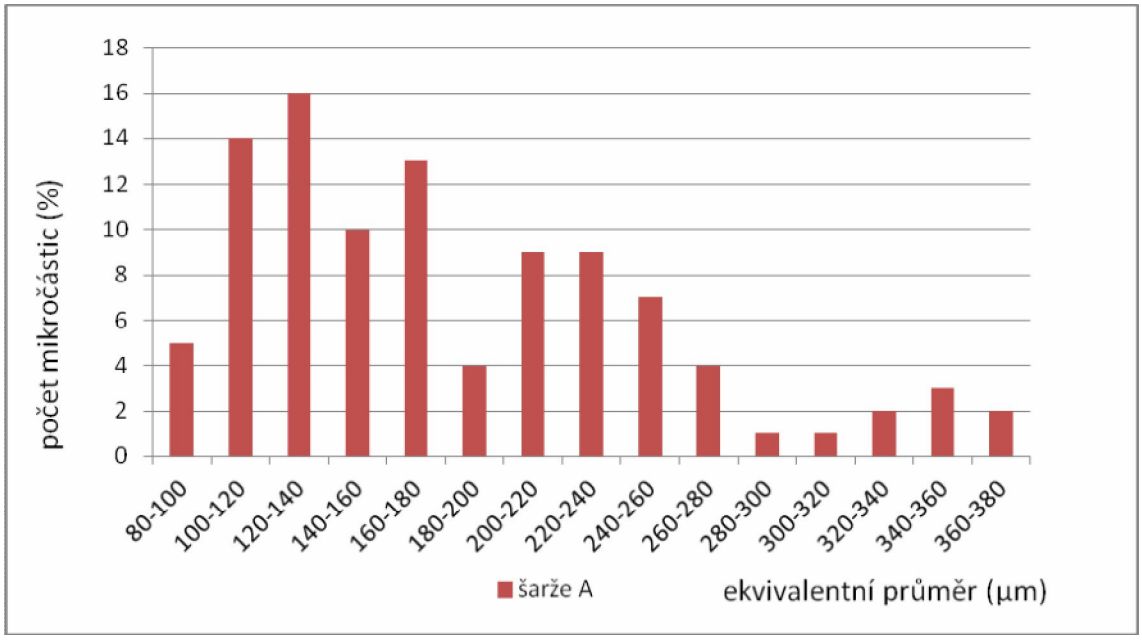

**(1)** **(2)**

Obr. **13**: Snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu – (1) – vzorek šarže A v čase 0, před provedením stabilitní zkoušky, (2) – detail povrchu

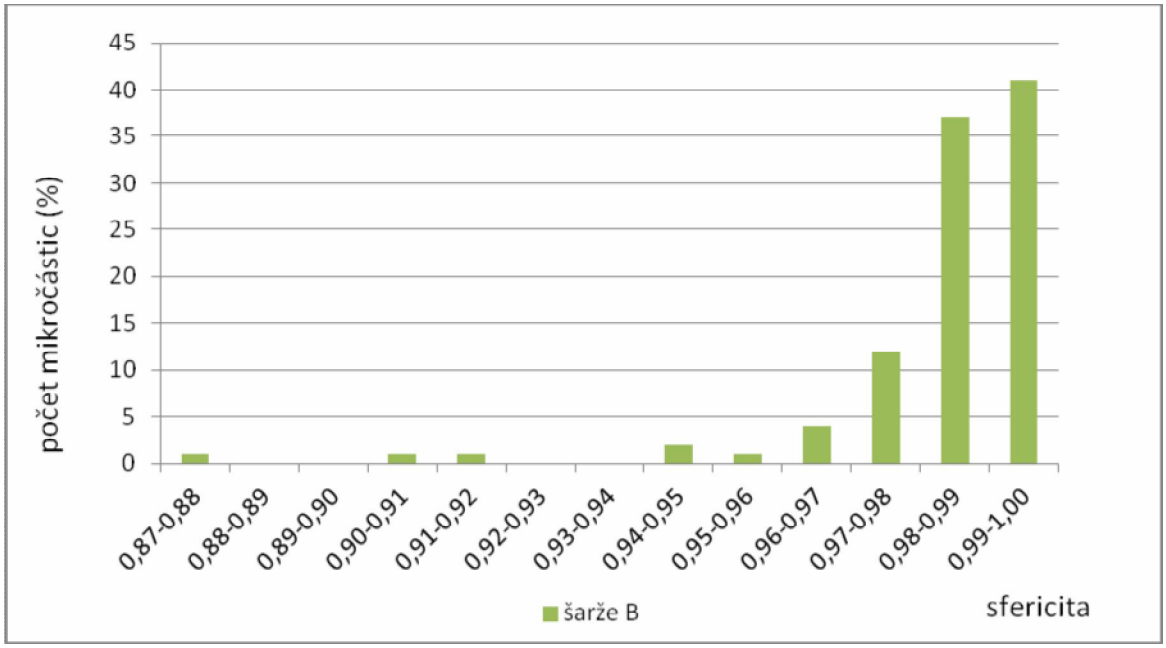
## 5.3 Ekvivalentní průměr a sfericita



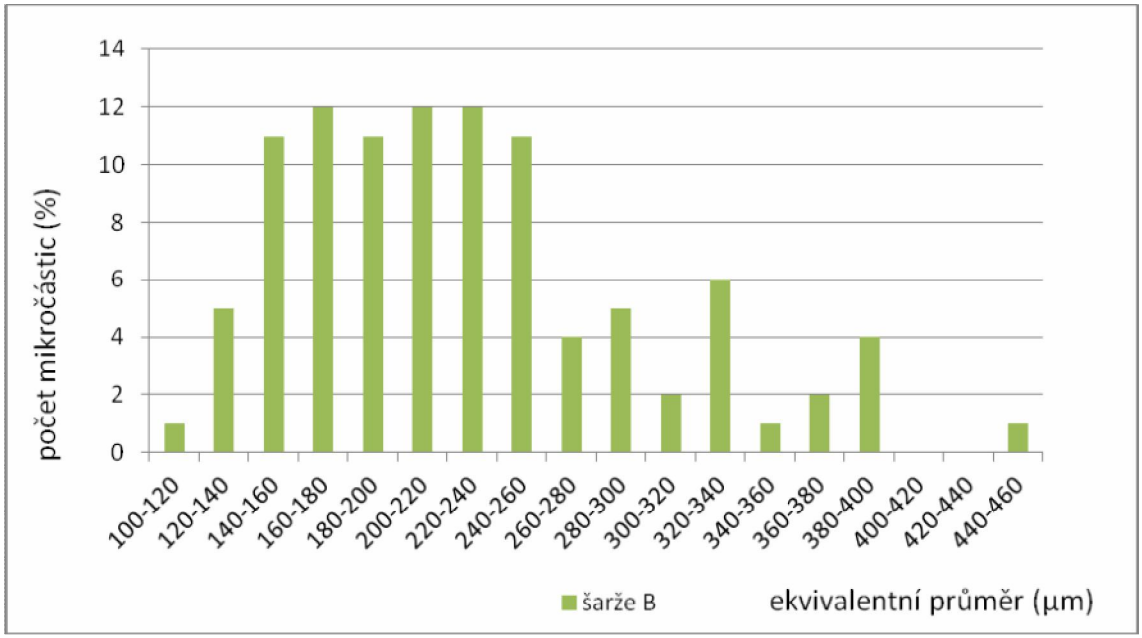

Obr. **14:** Sféricita připraveného vzorku mikročástic - šarže A



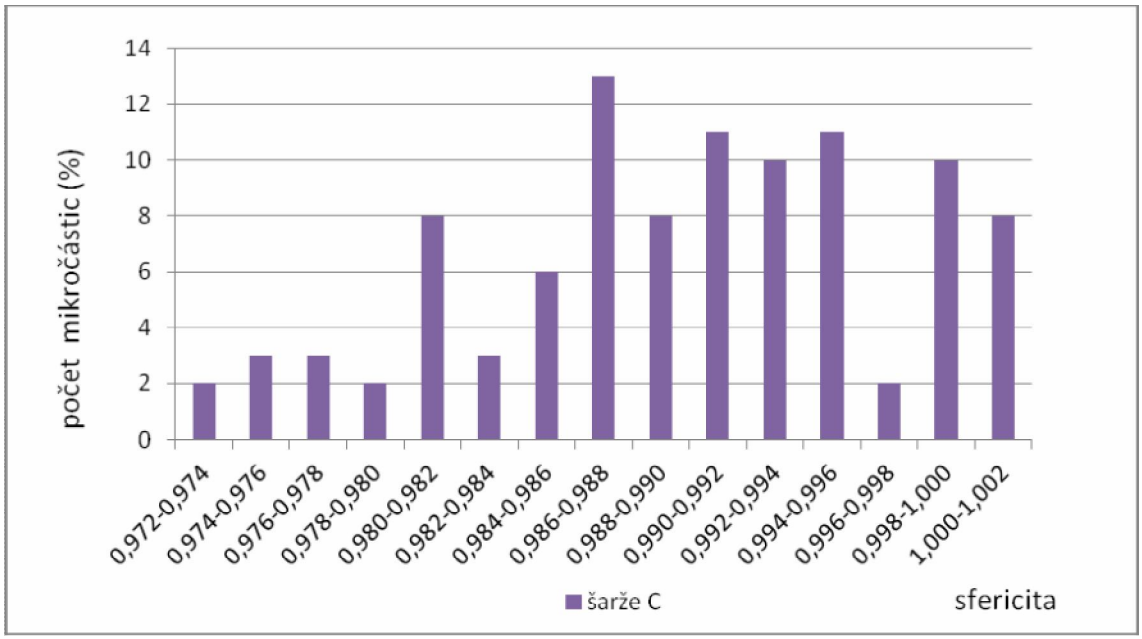

Obr. **15**: Ekvivalentní průměr připraveného vzorku mikročástic - šarže A



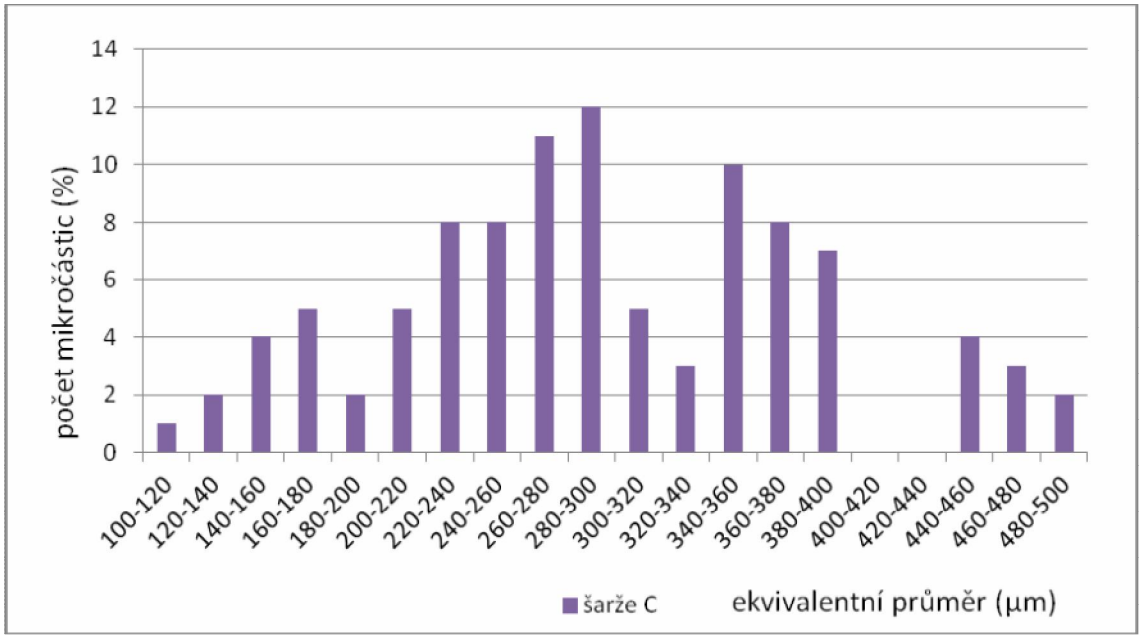

Obr. **16**: Sfericita připraveného vzorku mikročástic - šarže B




Obr. **17**: Ekvivalentní průměr připraveného vzorku mikročástic - šarže B




Obr. **18:** Sfericita připraveného vzorku mikročástic - šarže C




Obr. **19**: Ekvivalentní průměr připraveného vzorku mikročástic - šarže C

Tab**. 5:** Směrodatné odchylky pro ekvivalentní průměr a sfericitu

| **Šarže** | **SD pro ekvivalentní průměr** | **SD pro sfericitu** |
|---|---|---|
| **A** | 69,799 | 0,0075 |
| **B** | 70,878 | 0,0187 |
| **C** | 87,482 | 0,0072 |

## 5.4 Stanovení obsahu a enkapsulační účinnosti

Tab. **6**: Obsah a enkapsulační účinnost

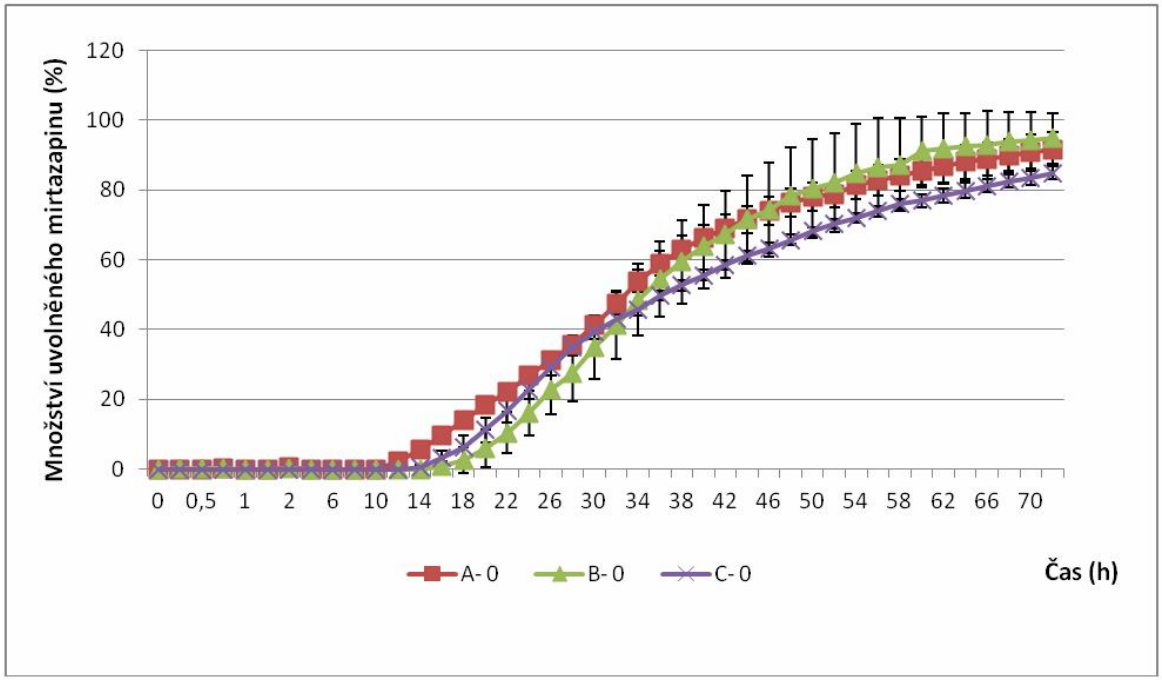
| Šarže | Praktický obsah [mg / 5 mg částic] | SD | EE [%] | SD |
|---|---|---|---|---|
| **A** | 0,933 | 0,055 | 61,07 | 5,257 |
| **B** | 0,847 | 0,055 | 44,67 | 2,853 |
| **C** | 0,953 | 0,094 | 56,60 | 5,597 |

## 5.5 Stanovení výtěžku procesu

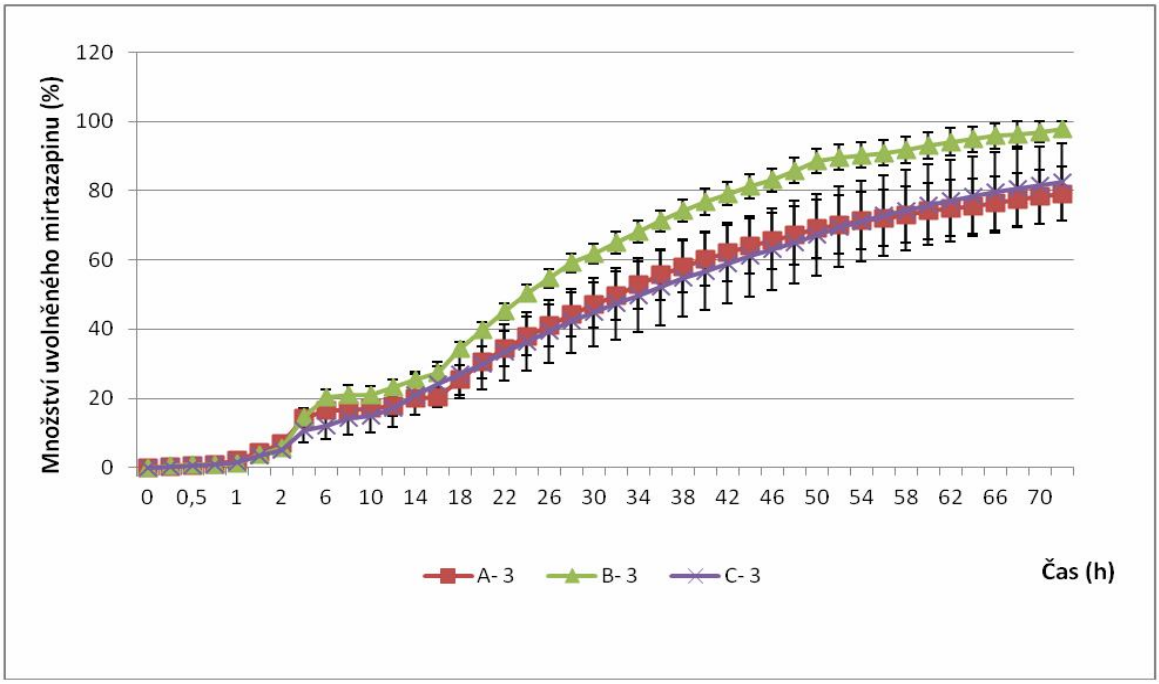
Tab. **7**: Výtěžek procesu pro jednotlivé šarže

| Šarže | Výtěžek [%] |
|---|---|
| **A** | 74,11 |
| **B** | 58,62 |
| **C** | 65,96 |

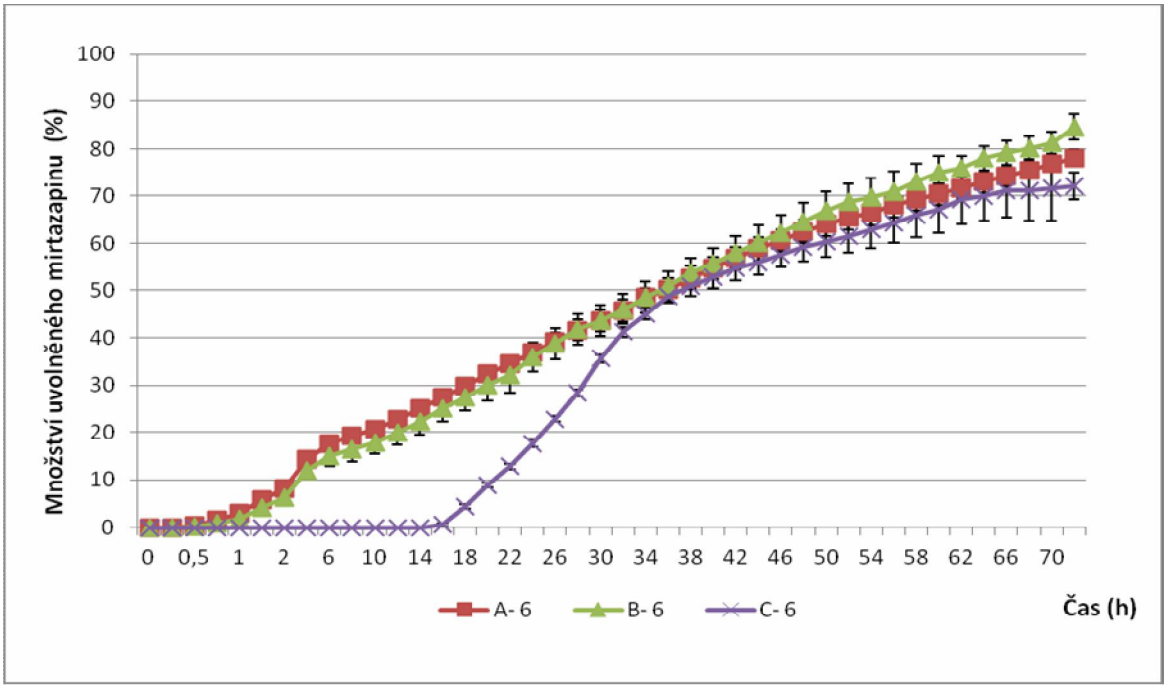
## 5.6 Disoluční zkouška a stanovení faktoru podobnosti




Obr. **20:** Závislost množství uvolněného léčiva z mikročástic šarže A, B a C na čase na začátku pokusu v čase 0 měsíců




Obr. **21:** Závislost množství uvolněného léčiva z mikročástic šarže A, B a C na čase po 3 měsících skladování v lednici při teplotě 8 ºC




Obr. **22:** Závislost množství uvolněného léčiva z mikročástic šarže A, B a C na čase po 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8ºC

**Faktory podobnosti - porovnávání v rámci času**

Tab. **8**: Faktory podobnosti mezi jednotlivými disolučními profily šarží A, B a C připravených mikročástic v čase 0 měsíců

| **Porovnávané vzorky** | **Faktor podobnosti $f_2$** |
|---|---|
| A-0 x B-0 | 60,75 |
| A-0 x C-0 | 55,08 |
| B-0 x C-0 | 51,28 |

Tab. **9**: Faktory podobnosti mezi jednotlivými disolučními profily šarží A, B a C připravených mikročástic po 3 měsících skladování v lednici při teplotě 8 ºC

| **Porovnávané vzorky** | **Faktor podobnosti $f_2$** |
|---|---|
| A-3 x B-3 | 42,58 |
| A-3 x C-3 | 79,68 |
| B-3 x C-3 | 41,87 |

Tab. **10**: Faktory podobnosti mezi jednotlivými disolučními profily šarží A, B a C připravených mikročástic po 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8 ºC

| **Porovnávané vzorky** | **Faktor podobnosti $f_2$** |
|---|---|
| A-6 x B-6 | 76,22 |
| A-6 x C-6 | 47,74 |
| B-6 x C-6 | 47,23 |

**Faktory podobnosti - porovnávání v rámci šarže**

Tab. **11**: Faktory podobnosti mezi jednotlivými disolučními profily šarže A připravených mikročástic po 0, 3 a 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8 ºC

| **Porovnávané vzorky** | **Faktor podobnosti $f_2$** |
|---|---|
| A-0 x A-3 | 49,27 |
| A-0 x A-6 | 43,99 |
| A-3 x A-6 | 70,99 |

Tab. **12**: Faktory podobnosti mezi jednotlivými disolučními profily šarže B připravených mikročástic po 0, 3 a 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8 ºC

| **Porovnávané vzorky** | **Faktor podobnosti $f_2$** |
|---|---|
| B-0 x B-3 | 37,50 |
| B-0 x B-6 | 42,18 |
| B-3 x B-6 | 41,07 |

Tab. **13**: Faktory podobnosti mezi jednotlivými disolučními profily šarže C připravených mikročástic po 0, 3 a 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8 ºC

| **Porovnávané vzorky** | **Faktor podobnosti $f_2$** |
|---|---|
| C-0 x C-3 | 52,38 |
| C-0 x C-6 | 56,86 |
| C-3 x C-6 | 46,52 |

## 5.7 Vstupní disoluční data pro jednotlivé vzorky

Tab. **14**: Vstupní disoluční data pro vzorky A-0, B-0 a C-0

| **čas** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku A-0 [%]** | **SD** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku B-0 [%]** | **SD** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku C-0 [%]** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **2** | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **4** | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **6** | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **8** | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **10** | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **12** | 2,05 | 0,494 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| **18** | 13,95 | 1,390 | 2,59 | 3,663 | 6,12 | 3,585 |
| **24** | 26,68 | 2,092 | 16,07 | 6,377 | 22,92 | 2,743 |
| **30** | 41,34 | 2,559 | 34,88 | 9,070 | 39,41 | 2,165 |
| **36** | 58,98 | 3,536 | 54,55 | 10,799 | 49,71 | 1,451 |
| **42** | 68,96 | 3,872 | 67,31 | 12,489 | 58,34 | 1,358 |
| **48** | 76,29 | 3,995 | 78,39 | 13,914 | 65,73 | 1,466 |
| **54** | 81,43 | 4,081 | 84,91 | 14,109 | 72,12 | 1,346 |
| **60** | 85,44 | 4,582 | 91,26 | 9,847 | 76,92 | 1,783 |
| **66** | 88,96 | 4,753 | 92,83 | 9,848 | 81,19 | 1,966 |
| **72** | 91,66 | 4,774 | 94,83 | 7,307 | 84,88 | 1,862 |

Tab. **15:** Vstupní disoluční data pro vzorky A-3, B-3 a C-3

| **čas** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku A-3 [%]** | **SD** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku B-3 [%]** | **SD** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku C-3 [%]** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **2** | 6,95 | 1,368 | 5,73 | 1,660 | 4,94 | 1,329 |
| **4** | 14,26 | 1,752 | 14,47 | 2,710 | 10,65 | 3,294 |
| **6** | 16,62 | 1,533 | 20,46 | 2,080 | 12,18 | 4,057 |
| **8** | 16,67 | 1,881 | 20,85 | 2,965 | 14,43 | 5,016 |
| **10** | 17,24 | 0,706 | 21,11 | 2,485 | 14,76 | 4,637 |
| **12** | 17,68 | 2,657 | 23,11 | 2,410 | 17,02 | 5,426 |
| **18** | 25,39 | 4,319 | 34,25 | 2,120 | 26,94 | 6,981 |
| **24** | 37,97 | 5,643 | 50,41 | 2,455 | 36,41 | 8,505 |
| **30** | 47,05 | 6,554 | 61,85 | 2,890 | 44,93 | 9,889 |
| **36** | 55,63 | 7,201 | 71,24 | 3,155 | 52,13 | 11,014 |
| **42** | 62,00 | 8,071 | 79,08 | 3,380 | 58,99 | 11,611 |
| **48** | 67,12 | 8,394 | 85,87 | 3,550 | 65,13 | 11,842 |
| **54** | 71,32 | 8,294 | 90,23 | 3,655 | 71,14 | 11,681 |
| **60** | 74,09 | 8,139 | 92,95 | 3,835 | 75,91 | 11,643 |
| **66** | 76,32 | 7,894 | 95,82 | 3,700 | 79,50 | 11,632 |
| **72** | 79,09 | 7,786 | 97,73 | 2,275 | 82,46 | 11,214 |

Tab. **16:** Vstupní disoluční data pro vzorky A-6, B-6 a C-6

| **čas** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku A-6 [%]** | **SD** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku B-6 [%]** | **SD** | **Množství uvolněného mirtazapinu ze vzorku C-6 [%]** | **SD** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **2** | 8,24 | 1,584 | 6,25 | 0,750 | 0,00 | 0,00 |
| **4** | 14,36 | 1,587 | 11,87 | 1,155 | 0,00 | 0,00 |
| **6** | 17,58 | 1,410 | 14,86 | 2,040 | 0,00 | 0,00 |
| **8** | 19,28 | 1,087 | 16,37 | 2,505 | 0,00 | 0,00 |
| **10** | 20,59 | 0,472 | 17,89 | 2,440 | 0,00 | 0,00 |
| **12** | 22,67 | 0,436 | 19,93 | 2,615 | 0,00 | 0,00 |
| **18** | 29,90 | 0,863 | 27,45 | 2,835 | 4,37 | 0,475 |
| **24** | 36,79 | 1,667 | 35,85 | 3,080 | 17,62 | 0,825 |
| **30** | 43,580 | 2,339 | 43,70 | 3,265 | 35,64 | 0,810 |
| **36** | 50,33 | 2,338 | 50,87 | 3,115 | 48,75 | 1,430 |
| **42** | 56,68 | 2,254 | 58,01 | 3,440 | 54,62 | 2,575 |
| **48** | 62,54 | 2,524 | 64,55 | 4,005 | 59,14 | 3,000 |
| **54** | 66,55 | 2,614 | 69,65 | 4,075 | 62,83 | 3,915 |
| **60** | 70,40 | 2,189 | 74,95 | 3,470 | 67,16 | 4,845 |
| **66** | 74,24 | 2,088 | 79,16 | 2,585 | 71,07 | 5,600 |
| **72** | 78,08 | 1,701 | 84,63 | 2,635 | 72,08 | 2,820 |

## 5.8 Stanovení kinetiky uvolňování mirtazapinu

Tab**. 17:** Hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ pro šarže A, B a C v čase 0 měsíců

| Vzorek | Higuchi | Korsmeyer –Peppas | *n* | 1. řád | 0. řád | Hixson – Crowell | Baker-Lonsdsale |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A- 0** | 0,972 | 0,879 | 1,70 | 0,705 | 0,933 | 0,990 | 0,981 |
| **B- 0** | 0,964 | 0,817 | 2,41 | 0,656 | 0,927 | 0,992 | 0,974 |
| **C- 0** | 0,979 | 0,789 | 2,01 | 0,616 | 0,942 | 0,992 | 0,984 |

Tab**. 18:** Hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ pro šarže A, B a C po uplynutí 3 měsíců

| Vzorek | Higuchi | Korsmeyer –Peppas | *n* | 1. řád | 0. řád | Hixson – Crowel | Baker-Lonsdsale |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A- 3** | 0,975 | 0,960 | 0,93 | 0,611 | 0,962 | 0,988 | 0,969 |
| **B- 3** | 0,978 | 0,976 | 0,96 | 0,631 | 0,951 | 0,995 | 0,958 |
| **C- 3** | 0,979 | 0,980 | 0,98 | 0,640 | 0,983 | 0,998 | 0,947 |

Tab**. 19:** Hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ pro šarže A, B a C po uplynutí 6 měsíců

| Vzorek | Higuchi | Korsmeyer –Peppas | *n* | 1. řád | 0. řád | Hixson – Crowell | Baker-Lonsdsale |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A- 6** | 0,991 | 0,942 | 0,82 | 0,617 | 0,975 | 0,997 | 0,964 |
| **B- 6** | 0,982 | 0,914 | 0,99 | 0,581 | 0,987 | 0,997 | 0,938 |
| **C- 6** | 0,942 | 0,716 | 2,07 | 0,556 | 0,893 | 0,948 | 0,990 |

## 5.9 Stanovení hodnot parametrů $t_{15\%}$ a $t_{50\%}$

Tab**. 20:** Hodnoty parametru $t_{15\%}$ pro jednotlivé šarže

| vzorek | $t_{15\%}$ (min) | vzorek | $t_{15\%}$ (min) | vzorek | $t_{15\%}$ (min) |
|---|---|---|---|---|---|
| **A-0** | 1161 | **A-3** | 252 | **A-6** | 251 |
| **B-0** | 1344 | **B-3** | 249 | **B-6** | 363 |
| **C-0** | 1196 | **C-3** | 610 | **C-6** | 1550 |

Tab. **21:** Hodnoty parametru $t_{50\%}$ pro jednotlivé šarže

| vzorek | $t_{50\%}$ (min) | vzorek | $t_{50\%}$ (min) | vzorek | $t_{50\%}$ (min) |
|---|---|---|---|---|---|
| **A-0** | 2021 | **A-3** | 1933 | **A-6** | 2146 |
| **B-0** | 2102 | **B-3** | 1429 | **B-6** | 2123 |
| **C-0** | 2172 | **C-3** | 2047 | **C-6** | 2235 |

# 6. DISKUZE

Mikročástice byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla z jednoduché emulze typu o/v. Celkem byly připraveny 3 šarže mikročástic. Každá jednotlivá šarže byla připravena ve čtyřech cyklech. Podmínky přípravy jednotlivých šarží jsou shrnuty v části **4.3**, tabulka **3**. Připravené mikročástice byly podrobeny stabilitní zkoušce. Vzorky každé šarže byly umístěny do lednice s nastavenou teplotou 8 ± 0,5 ºC a do stabilitního boxu, kde byla teplota temperována na 25 ± 0,5 ºC s relativní vlhkostí 60 %. Disoluční zkouška provedena v čase 0 měsíců a po 3 a 6 ti měsících skladování. Disoluční profil a kinetika uvolňování mirtazapinu byly stanoveny před a po provedení vlastní stabilitní zkoušky. U připravených mikročástic byl stanoven ekvivalentní průměr a sfericita pomocí optického mikroskopu na Ústavu technologie léků VFU Brno. Dále byla hodnocena morfologie mikročástic a topografie povrchu pomocí elektronového skenovacího mikroskopu na pracovišti Tescan. Byl také stanoven obsah mirtazapinu v mikročásticích, enkapsulační účinnost a výtěžek procesu.

## Optická a skenovací elektronová mikroskopie

Pomocí optického mikroskopu byl stanoven ekvivalentní průměr a sfericita připravených mikročástic. Jak je možné vidět na obrázcích **14**, **16** a **18,** hodnota sfericity mikročástic šarže A se pohybovala v rozmezí 0,966 – 1,0, přičemž nejvíce částic (12 %) dosahovalo hodnoty sfericity 0,982 – 0,984. Hodnoty sfericity mikročástic šarže B se pohybovaly v rozmezí 0,870 – 1,0, nejvíce částic (41 %) mělo hodnoty sfericity 0,99 – 1,0. Pouze 1 % mikročástic mělo hodnoty sfericity v rozmezí 0,87 – 0,88. Hodnoty sfericity mikročástic šarže C se pohybovaly v rozmezí 0,972 – 1,0. Nejvíce částic šarže C (13 %) dosahovalo hodnoty sfericity 0,986 – 0,988. Pokud je hodnota sfericity rovna 1, jedná se o dokonale kulovitou částici (Deasy a Law 1997). Z uvedených hodnot vyplývá, že připravené mikročástice měly velmi pravidelný a kulovitý tvar. Pravidelný tvar připravených mikročástic je patrný i ze snímků z optického mikroskopu (obr. **9**, **10** a **11**). Tyto výsledky korelují s literárními daty (Vysloužil a kol. 2013[2], Lamprecht a kol. 2000). Obrázky **15**, **17** a **19** znázorňují

procentuální zastoupení pro daná rozmezí ekvivalentního průměru mikročástic. Je zřejmé, že šarže B měla širší distribuci velikostí mikročástic, šarže A a C měly distribuci velikostí užší (16 % mikročástic šarže A mělo ekvivalentní průměr v rozmezí 120 – 140 μm, 69 % mikročástic šarže B mělo ekvivalentní průměr v rozmezí 140 – 260 μm a 12 % mikročástic šarže C mělo ekvivalentní průměr v rozmezí 280 – 300 μm). Pro srovnání lze uvést práci Vysloužila a kol., kdy za identických podmínek přípravy dosahovaly hodnoty střední velikosti mikročástic 152,5 – 174,6 μm (Vysloužil a kol. 2013[2])

Koncentrace PVA ve vnější fázi byla při přípravě všech šarží 0,1 %. Přítomnost PVA ve vnější fázi stabilizuje emulzi a zabraňuje koalescenci zformovaných kapek, tento efekt je však výraznější při vyšších koncentracích PVA. PVA je navíc vysokomolekulární látka, a proto její přítomnost ve vnější fázi zvyšuje viskozitu. Ve viskózním prostředí jsou obtížněji zformovány drobnější kapky (Yang a kol. 2001). Statisticky významné zvětšení průměru mikročástic šarže C bylo pravděpodobně způsobeno koalescencí kapek v průběhu přípravy. Tento jev byl pozorován pouze u vzorků šarže C.

Pomocí elektronového skenovacího mikroskopu byla stanovena morfologie mikročástic. Jak je zřejmé z obrázku **13,** připravené mikročástice měly velmi hladký a kompaktní povrch bez viditelných pórů. Poměr vnitřní a vnější fáze byl při přípravě mikročástic 1:160. Charakter povrchu mikročástic závisí na poměru objemů vnitřní a vnější fáze. Čím je tento poměr větší, tím vznikají méně pórovité mikročástice a naopak. (Yang a kol. 2000).

Stanovení obsahu mirtazapinu a enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost a obsah mirtazapinu v mikročásticích byl stanoven před provedením stabilitní zkoušky. Praktický obsah mirtazapinu byl vyjádřen jako množství mirtazapinu v miligramech na 5 miligramů vzorku mikročástic. Praktický obsah u vzorku šarže A byl 0,933 mg, šarže B 0,847 mg a šarže C 0,953 mg (tab. **6**). Pro šarže A, B a C byla stanovena enkapsulační účinnost 61,07 %, 44,67% a 56,60 % (tab. **6**). Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky publikovanými v práci Heslinga a kol., který v experimetu použil stejný polymer, surfaktant a rozpouštědlo v modifikaci se

systémem o/v. Průměrná enkapsulační účinnost dosahovala hodnot 50,7 ± 4,2 % (Heslinga a kol. 2009).

Stanovení výtěžku procesu

Výtěžek procesu se pohyboval v rozmezí 58,62 % - 74,11 %, jak ukazuje tabulka **7**. Výtěžnost procesu je srovnatelná s výsledky získanými v práci Vysloužila a kol., kde za identických podmínek přípravy mikročástic byl výtěžek 64,9 % (Vysloužil a kol. 2013[2]). Výtěžek mikročástic je ovlivněn rychlostí míchání. Větší rychlost míchání vede k menšímu výtěžku mikročástic. Při přípravě mikročástic všech tří šarží byla rychlost míchání vždy jen 600 otáček za minutu. Rychlost míchání v průběhu přípravy tedy pravděpodobně ovlivnila výtěžek procesu (Yang a kol. 2001).

Disoluční zkouška, stanovení faktoru podobnosti a mechanismus uvolňování

Při disoluční zkoušce je dané množství přípravku vpraveno do disolučního média a poté jsou v určených časových intervalech odebrány vzorky, ve kterých je stanoveno množství uvolněné účinné látky. Na základě získaných hodnot je stanoven disoluční profil léčiva a rychlost uvolňování. Aby byly výsledky standartní, musí být podmínky zkoušky přesně dodrženy (Komárek a kol. 2006).

Disoluční zkouška v čase 0 měsíců před provedením stabilitní zkoušky

Disoluční zkouška byla provedena v tlumivém fosforečnanovém médiu o pH 7,2 a probíhala 72 hodin. Disoluční profily vzorků A-0, B-0 a C-0 jsou na obrázku **20**. Vstupní disoluční data jsou uvedena v tabulce **14**.V šechny tři křivky mají patrný tzv. *lag time*, čas zpoždění (Kao a kol. 1997). Ze vzorku A-0 byl mirtazapin poprvé uvolněn po 12 hodinách, ze vzorku B-0 došlo k prvnímu uvolnění po 16 hodinách a ze vzorku C-0 po 14 hodinách. Z uvedených hodnot vyplývá, že uvolňování mirtazapinu před

provedeném stabilitní zkoušky bylo zpožděné, což je jedna z variant řízeného uvolňování léčiva (Rabišková a Fričová 2008).

Maximum uvolněného mirtazapinu ze vzorků A-0, B-0 a C-0 během 72 hodin bylo 91,66 %, 94, 80% a 84,88 % (tab. **14**).

Hodnoty parametrů $t_{15\%}$ a $t_{50\%}$ jsou zobrazeny v tab. **20** a **21**. Ze vzorku A-0 bylo 15 % mirtazapinu uvolněno po 1161 minutách, ze vzorku B-0 po 1344 minutách a ze vzorku C-0 po 1196 minutách. 50 % mirtazapinu bylo ze vzorku A-0 uvolněno po 2021 minutách, ze vzorku B-0 po 2102 minutách a ze vzorku C-0 po 2172 minutách. Uvedené hodnoty naznačují pomalé uvolňování mirtazapinu, které mohlo být způsobeno kompaktním povrchem mikročástic bez přítomností pórů. Předpokládá se, že pórovité částice uvolňují léčivo rychleji (Yang a kol. 2001).

Dále byly stanoveny faktory podobnosti $f_2$ mezi jednotlivými disolučními profily vzorků A-0, B-0 a C-0 (tab. **8**). Hodnoty faktoru podobnosti se pohybovaly v rozmezí 51,28 – 60,75. Hodnoty byly vyšší než 50, což znamená, že disoluční profily porovnávaných vzorků byly vzájemně podobné a výsledky byly reprodukovatelné (Lu a kol. 2007).

Pro určení mechanismu uvolňování mirtazapinu z mikročástic byly disoluční profily vzorků A-0, B-0 a C-0 porovnávány s kinetickými modely popsanými v kapitole **4.4.6.** Byly zjišťovány hodnoty determinačních koeficientů $R^2$(tab. **17**). Vzorky A-0, B-0 a C-0 vykazovaly nejvyšší korelaci s Hixson-Crowellovým erozním modelem (pro A-0 je $R^2$ = 0,990, pro B-0 je $R^2$ = 0,992 a pro C-0 je $R^2$ = 0,992). Poměrně dobrá korelace disolučních proflilů uvedených vzorků byla také s Baker-Lonsdsaleovým modelem (pro A-0 je $R^2$=0,981, pro B-0 je $R^2$=0,974 a pro C-0 je $R^2$= 0,984) a s Higuchiho difuzním modelem (pro A-0 je $R^2$= 0,972, pro B-0 je $R^2$= 0,964 a pro C-0 je $R^2$= 0,979). Hodnoty determinačních koeficientů Korsmeyer-Peppasovy rovnice byly velmi nízké, pohybovaly se v rozmezí 0,789 - 0,879. Korelace s modely kinetiky nultého a prvního řádu byla také nízká. Hodnoty determinačního koeficientu kinetiky nultého řádu se pohybovaly v rozmezí 0,927 – 0,942, hodnoty pro kinetiku prvního řádu v rozmezí 0,616 – 0,705. Z uvedených hodnot determinačních koeficientů vyplývá, že převažujícím mechanismem uvolňování mirtazapinu u vzorků v čase 0 byla eroze povrchu v kombinaci s difuzí, což koreluje s literárními daty (Fredenberg a kol. 2011, Makadia a Siegel 2011).

Disoluční zkouška po 3 měsících skladování

Vzorky připravených mikročástic byly umístěny do lednice s nastavenou teplotou 8 ± 0,5 ºC a do stabilitního boxu, kde byla teplota temperována na 25 ± 0,5 ºC s relativní vlhkostí 60 %. Skladování v režimu 25 ºC/60 % RV se ukázalo jako nevhodné. Vzorky, které byly skladovány v klimatické komoře, byly již po 3 měsících vlivem působení nastavených podmínek nevratně poškozeny a nebylo možné je podrobit disoluční zkoušce (viz obr. **12**). Disoluční zkouška byla proto provedena po 3 a 6 ti měsících pouze u vzorků skladovaných v lednici. Ideální teplota skladování částic založených na PLGA se pohybuje kolem 4 ºC (De a Robinson 2004).

Disoluční profily vzorků A-3, B-3 a C-3 jsou zobrazeny na obrázku **21**. Vstupní disoluční data jsou uvedeny v tabulce **15**. Na křivkách již není patrný výrazný *lag time*. Zpožděné uvolňování po stabilitní zkoušce nebylo zachováno. Rychlejší uvolňování mirtazapinu naznačují i hodnoty parametrů $t_{15\%}$ a $t_{50\%}$ (tab. **20** a **21**). U vzorků A-3, B-3 a C-3 bylo 15 % mirtazapinu uvolněno již po 252, 249 a 610 minutách. Hodnoty parametru $t_{50\%}$ jsou nižší než u vzorků v čase 0 měsíců. 50 % mirtazapinu bylo u vzorků A-3, B-3 a C-3 uvolněno po 1933, 1429 a 2047 minutách. Maximum uvolněného mirtazapinu ze vzorků A-3, B-3 a C-3 během 72 hodin bylo 79,09 %, 97,73 % a 82,46 %, což je o něco méně v porovnání se vzorky A-0, B-0 a C-0 (tab. **15**).

Hodnoty faktoru podobnosti $f_2$ mezi jednotlivými disolučními profily vzorků A-3, B-3 a C-3 jsou shrnuty v tabulce **9**. Hodnoty $f_2$ v čase 3 měsíce byly nižší než 50 s výjimkou vzorků A-3 a C-3 (faktor podobnosti $f_2$ mezi disolučním profilem vzorku A-3 a B-3 byl 42,58, mezi disolučním profilem vzorku A-3 a C-3 79,68 a mezi disolučním profilem vzorku C-3 a B-3 41,87). Z uvedených hodnot faktorů podobnosti vyplývá, že disoluční profily vzorků po 3 měsících stabilitního testování nejsou převážně vzájemně podobné (Lu a kol. 2007). Získané hodnoty ukazují, že po 3 měsících stabilitního testování došlo ke změně disolučních profilů vzorků a stabilita nebyla zachována.

Disoluční profily vzorků po provedení stabilitní zkoušky byly také porovnány s kinetickými modely popsanými v kapitole **4.4.6**, aby mohlo být určeno, zda se mechanismus uvolňování mirtazapinu vlivem podmínek stabilitní zkoušky změnil. Hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ jsou uvedeny v tabulce **18**. Nejvyšší korelace vzorků A-3, B-3, C-3 byla stále s Hixson-Crowelovým erozním modelem (hodnoty

determinačních koeficientů $R^2$ vzorků A-3, B-3 a C-3 se pohybovaly v rozmezí 0,988 – 0,998). Poměrně dobrá korelace byla i s Higuchiho difuzním modelem (hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ vzorků A-3, B-3 a C-3 se pohybovaly v rozmezí 0,975 – 0,979). Korelace s Baker-Lonsdsaleovým modelem byla v porovnání s hodnotami vzorků v čase 0 měsíců o něco nižší (hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ vzorků A-3, B-3 a C-3 se pohybovaly v rozmezí 0,947 – 0,969). Naopak korelace s modelem Korsmeyer-Peppas byla u vzorků A-3, B-3 a C-3 vyšší než u hodnot vzorků v čase 0 měsíců (hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ se pohybovaly v rozmezí 0,960 – 0,980). Rozdíl byl zaznamenán i v případě koeficinetu *n* Korsmeyer-Peppasovy rovnice, jehož hodnoty byly v rozmezí 0,82 – 0,98. Takové hodnoty potvrzují kombinaci eroze a difuze. Hodnoty determinačních koeficientů pro kinetiku nultého řádu byly vyšší v porovnání se vzorky A-0, B-0 a C-0 (pro vzorky A-3, B-3 a C-3 se pohybovaly v rozmezí 0,951 – 0,983), lze tedy konstatovat, že mirtazapin se uvolňoval kinetikou 0. řádu. Korelace s modelem kinetiky prvního řádu byla stále velmi nízká (pro vzorky A-3, B-3 a C-3 se pohybovaly hodnoty determinačních koeficientů v rozmezí 0,611 – 0,640). Získané hodnoty potvrzují, že po 3 měsících stabilitního testování nedošlo k zásadním změnám mechanismu uvolňování a mirtazapin byl uvolňován stále kombinací eroze a difuze.

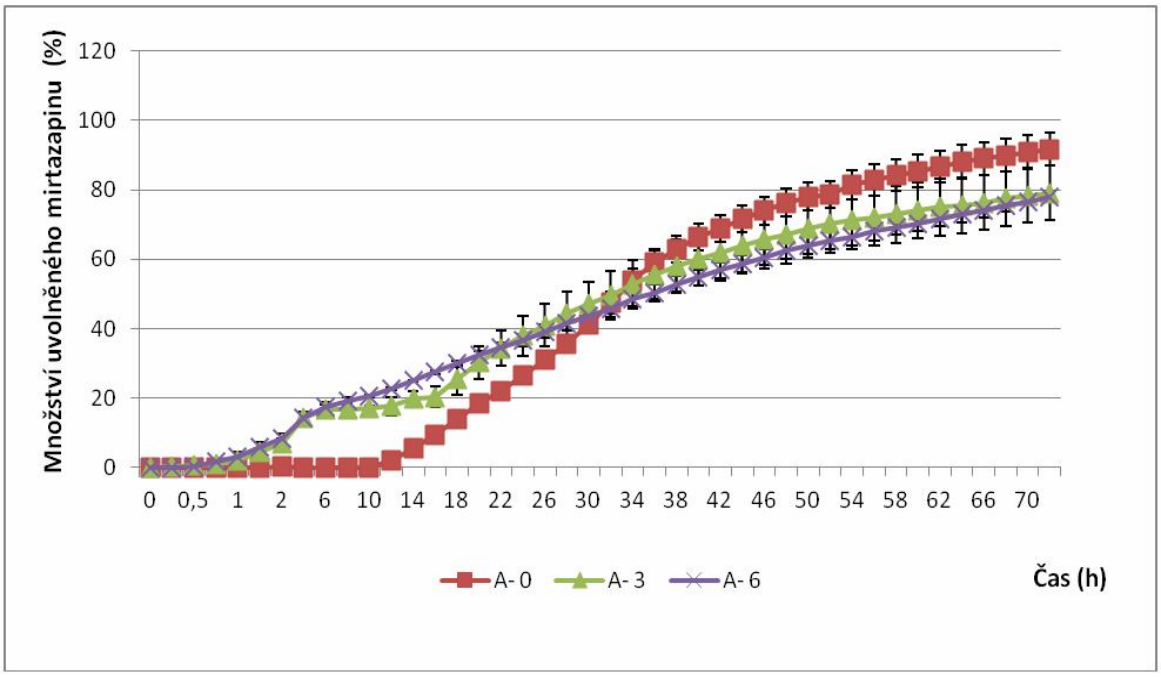
Disoluční zkouška po 6 ti měsících skladování

Disoluční profily vzorků A-6, B-6 a C-6 na obrázku **22**. Vstupní disoluční data jsou uvedeny v tabulce **16**. Ani po 6 ti měsících již není na křivkách patrný *lag time*, výjimku představuje pouze vzorek C-6. Hodnoty parametru $t_{15\%}$ jsou uvedeny v tabulce **20**. Ze vzorků A-6, B-6 a C-6 bylo 15 % mirtazapinu uvolněno po 251, 363 a 1550 minutách. S výjimkou vzorku C-6 docházelo k rychlejšímu uvolňování mirtazapinu. Hodnoty parametru $t_{50\%}$ se od hodnot v čase 0 a 3 měsíce výrazně nelišily. Ze vzorku A-6, B-6 a C-6 bylo 50 % mirtazapinu uvolněno po 2146, 2123 a 2235 minutách (tab. **21**). Maximum uvolněného mirtazapinu ze vzorků A-6, B-6 a C-6 během 72 hodin bylo 78,08 %, 84,63 % a 72,08 %, což je méně v porovnání se vzorky v čase 0 a 3 měsíce (tab.**16**). Léčivo zůstalo pravděpodobně ještě enkapsulováno v hlubších vrstvách polymeru zbylého v disolučních nádobách. Po 6 ti měsících stabilitní zkoušky došlo

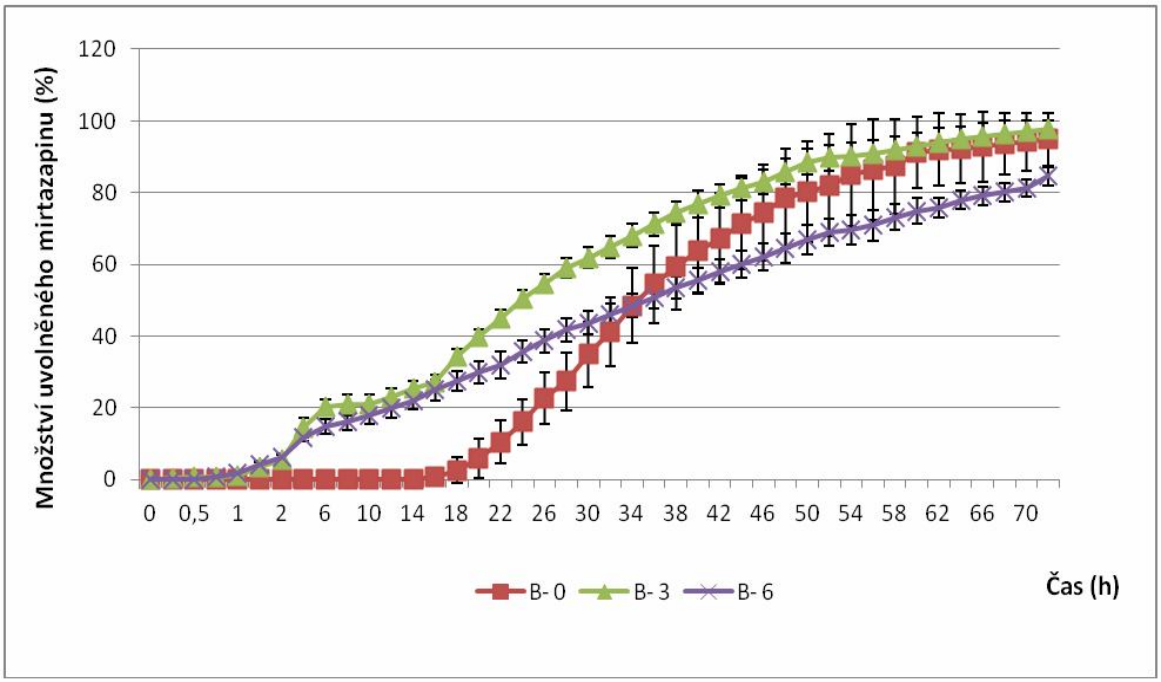
pravděpodobně ke změně lokace mirtazapinu v polymerní matrici a mirtazapin byl soustředěn v hlubších vrstvách matrice (Fredenberg a kol. 2011).

Hodnoty faktoru podobnosti $f_2$ mezi jednotlivými disolučními profily vzorků A-6, B-6 a C-6 jsou uvedeny v tabulce **10**. Faktor podobnosti $f_2$ mezi disolučním profilem vzorku A-6 a B-6 byl 76,22, mezi disolučním profilem vzorku A-6 a C-6 47,74 a mezi disolučním profilem vzorku B-6 a C-6 47,23. Faktory podobnosti mezi disolučními profily vzorků A-6/C-6 a B-6/C-6 jsou menší než 50, což znamená, že disoluční profily nejsou vzájemně podobné (Lu a kol. 2007). Získané hodnoty ukazují, že po 6 měsících stabilitního testování došlo ke změně disolučních profilů vzorků a stabilita nebyla zachována.

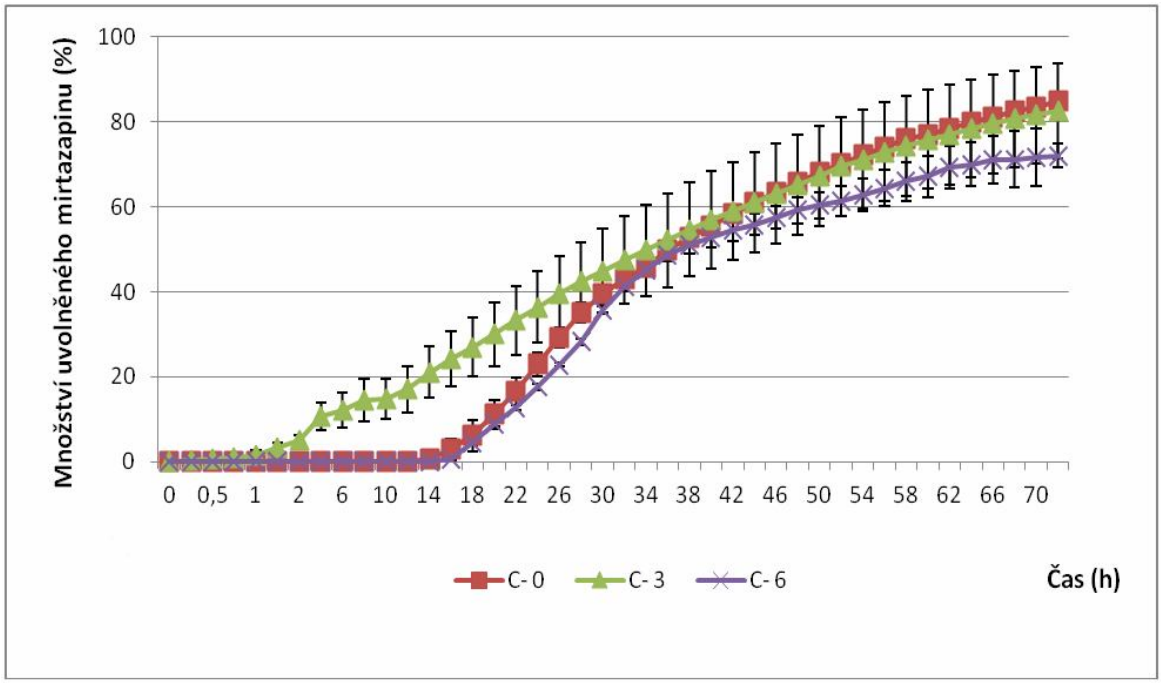
Faktory podobnosti byly stanoveny i v rámci jednotlivých šarží. Disoluční profily šarže A v čase 0 a 3 měsíce a v čase 0 a 6 měsíců nebyly vzájemně podobné, hodnoty faktoru podobnosti byly 49,27 a 43,99. Vzájemně podobné byly pouze disoluční profily v čase 3 a 6 měsíců s hodnotou faktoru podobnosti 70,99 (tab. **11**). Disoluční profily šarže B v čase 0, 3 a 6 měsíců podobné nebyly, hodnoty faktoru podobnosti mezi porovnávanými profily se pohybovaly v rozmezí 37,50 – 42,18 (tab. **12**). Výjimku představovaly disoluční profily šarže C. Hodnoty faktoru podobnosti mezi disolučními profily v čase 0 a 3 měsíce a v čase 0 a 6 měsíců byly 52,38 a 56,86, hodnoty faktoru podobnosti mezi disolučními profily v čase 3 a 6 měsíců byly 46,52 (tab. **13**). U vzorku C-6 bylo i po provedení stabilitní zkoušky zachováno zpožděné uvolňování mirtazapinu, proto byl jeho disoluční profil podobný profilu vzorku C-0. Hodnoty faktorů podobnosti stanovených v rámci jednotlivých šarží byly pro většinu porovnávaných disolučních profilů nižší než 50, což znamená, že vzájemně podobné nebyly (tab. **11**, **12** a **13**). Po provedení stabilitní zkoušky nebylo u vzorků mikročástic zachováno zpožděné uvolňování mirtazapinu (s výjimkou vzorku C-6), proto byly disoluční profily odlišné. Tato zjištění potvrzují obrázky **23**, **24** a **25**, kde jsou srovnávány křivky uvolňování mirtazapinu vždy v rámci jedné šarže v čase 0, 3 a 6 měsíců. Z hodnot faktorů podobnosti stanovených v rámci času a šarže vyplývá, že došlo ke změně disolučních profilů vzorků v průběhu stabilitního testování a stabilita připravených mikročástic nebyla po 3 a 6 ti měsících stabilitního testování zachována.




Obr. **23**: Závislost množství uvolněného léčiva z mikročástic šarže A po 0, 3 a 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8ºC




Obr. **24**: Závislost množství uvolněného léčiva z mikročástic šarže B po 0, 3 a 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8ºC




Obr. **25**: Závislost množství uvolněného léčiva z mikročástic šarže C po 0, 3 a 6 měsících skladování v lednici při teplotě 8 ºC

Disoluční profily vzorků v čase 6 měsíců byly rovněž porovnány s kinetickými modely, popsanými v kapitole **4.4.6**. Hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ jsou uvedeny v tabulce **19**. Vzorky A-6, B-6 a C-6 stále nejvíce korelovaly s Hixson-Crowelovým erozním modelem (hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ se pohybovaly v rozmezí 0,948 -0,997). Korelace s Higuchiho difuzním modelem byla také zachována (hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ vzorků A-6, B-6 a C-6 se pohybovaly v rozmezí 0,942 -0,991). Podobně jako vzorky v čase 0 a 3 měsíce vykazovaly vzorky v čase 6 měsíců relativně dobrou korelaci s Baker-Lonsdsaleovým modelem (hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ vzorků A-6, B-6 a C-6 se pohybovaly v rozmezí 0,938 - 0,990). Hodnoty determinačních koeficientů $R^2$ vzorků A-6, B-6 a C-6 pro Korsmeyer-Peppasův model byly nízké, pohybovaly se v rozmezí 0,716 – 0,942, což znamená, že korelace s tímto modelem byla nízká. Hodnoty determinačních koeficientů pro kinetiku nultého řádu se v porovnání se vzorky v čase 3 měsíce výrazně nezměnily (pro vzorky A-6, B-6 a C-6 se pohybovaly v rozmezí 0,893 – 0,987). Korelace s modelem kinetiky prvního řádu byla ještě nižší než u vzorků v čase 0 a 3 měsíce (hodnoty determinačních

koeficientů se pohybovaly v rozmezí 0,556 – 0,617). Z výše uvedených hodnot je zřejmé, že ani po 6 ti měsících stabilitního testování nebyl mechanismus uvolňování mirtazapinu zásadně změněn (Zolnik a kol. 2006).

# 7. ZÁVĚR

Metodou odpaření rozpouštědla z jednoduché emulze typu o/v byly připraveny mikročástice s obsahem mirtazapinu, které byly následně podrobeny stabilitnímu testování. Vzorky, které byly umístěny ve stabilitním boxu při režimu 25 ºC/60 % RV, byly již po 3 měsících nevratně poškozeny, tento režim skladování se ukázal jako nevhodný. Porovnávány byly pouze vzorky před provedením stabilitního testování v čase 0 měsíců a vzorky, které byly umístěné v lednici při 8 ºC po dobu 3 a 6 ti měsíců. V čase 0 měsíců vykazovaly vzorky zpožděné uvolňování mirtazapinu až o 16 hodin, na křivkách uvolňování byl patrný výrazný *lag time*. Porovnáním disolučních profilů vzorků v čase 0 měsíců s kinetickými modely se ukázalo, že převažujícím mechanismem uvolňování mirtazapinu byla eroze povrchu mikročástic v kombinaci s difuzí. Vzorky po 3 a 6 ti měsících již neuvolňovaly mirtazapin zpožděně, řízené uvolňování zachováno nebylo. Mechanismus uvolňování však změněn nebyl, mirtazapin byl i po provedení stabilitní zkoušky uvolňován převážně erozí povrchu v kombinaci s difuzí. Po 3 a 6 ti měsících stabilitního testování nebyla u připravených mikročástic zachována stabilita.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY


1. **Andrianov K. A, Payne G. L.:** Polymeric Carriers for Oral Uptake of Microparticulates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998, 34, 155-170.

2. **Bajerová M., Dvořáčková K., Gajdziok J., Masteiková R., Rabišková M.:** Metody přípravy mikročástic ve farmaceutické technologii. Česká a slovenská farmacie 2009, 58, 191-199.

3. **Berchane N. S., Jebrail F. F., Carson K. H., Rice-Ficht A. C., Andrews M. J.:** About mean diameter and size distributions of poly(lactide-co-glycolide) (PLG) microspheres. *Journal of Microencapsulation* 2006, 23, 5, 539-552.

4. **Bettencourt A., Almeida A. J.:** Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. *Journal of Microencapsulation* 2012, 29, 4, 353-367.

5. **Blessy M., Patel R. D., Prajapati P. N., Agrawal Y. K.:** Development of forced degradation and stability indicating studie sof drugs - A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis 2013,* http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003.

6. **Cabezas L. I, Mazarro R., Gracia I., de Lucas A., Rodriguez J. F.:** Optimizing the Bulk Copolymerization of D,L-lactide and glycolide by Response Surface Methodology. *eXPRESS Polymer Letters* 2013, 11, 7, 886-894.

7. **Campos E., Branquinho J., Carreira S. A., Carvalho A., Coimbra P., Ferreira P., Gil M. H.:** Designing Polymeric Microparticles for Biomedical and Industrial Applications. *European Polymer Journal* 2013, 49, 2005-2021.

8. **Capan I., Woo B. H. Gebrekidan S., Ahmed S., DeLuca P. P.:** Influence of formulation parameters on the characteristic of poly(D,L-lactide-co glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *Journal of Controlled Release* 1999, 60, 279-286.

9. **Costa P., Lobo J. M. S.:** Modeling and comparison of dissolution profiles. European *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 13, 123-133.

10. **Cserháti T., Forgács E., Oros G.:** Biological aktivity and enviromental impact of anionic surfactants. *Environment International* 2002, 28, 337-348.

11. **Dabbagh M. A., Ford J. L., Rubinstein M. H., Hogan J. E.:** Effects of polymer particle size, compaction pressure and hydrophilic polymers on drug release from matrices containing ethycellulose. *International Journal of Pharmaceutics* 1996, 140, 85-95.

12. **Dalmoro A., Barba A. A., Lamberti G., Amore M.:** Intensitying the Microencapsulation Process: Ultrasonic Atomization as an Innovative Approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, 80, 471-477.

13. **Dash S., Murthy P. N., Nath L., Chowdhury P.:** Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 2010, 67, 3, 217-223.

14. **De S., Robinson D. H.:** Particle Size and Temperature Effect on the Physical Stability of PLGA Nanospheres and Microspheres Containing Bodipy. *AAPS PharmSciTech* 2004, 5, 4.

15. **Deasy P. B., Law M. F. L.:** Use of extrusion-spheronisation to develop an improved oral dosage form of indomethacin. *International Journal of Pharmaceuticals* 1997, 148, 201-209.

16. **Dvořáčková K., Škrabáková G., Rabišková M.:** Vliv technologie přípravy na uvolňování theofylinu z pelet s chitosanem. *Česká a slovenská farmacie* 2009, 58, 216-224.

17. **Elkharraz K., Ahmed R. A., Dashevsky A., Bodmeier R.:** Encapsulation of Water-soluble Drugs by an o/o/o Solvent Evaporation Method. *Internatinal Journal of Pharmaceutics* 2011, 409, 89-95.

18. **Fredenberg S., Wahlgren M., Reslow M., Axelsson A.:** The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 415, 34–52.

19. **Genta I., Perugini P., Conti B., Pavanetto F.:** A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 1997, 152, 237-246.

20. **Gibaud S., Bonneville A., Astier A.:** Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics* 2002, 242, 197-201

21. **Giri T. K., Choudhary Ch., Aleander A. A., Badwaik H., Tripathi D. K.:** Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technice for controlled delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2013, 21, 125-141.

22. **Görög S.:** Aims, forms and conditions of drug stability testing. Progress in *Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, 4, 477-479.

23. **Gowda D. W., Gowrav M. P., Ghangadharappa H. V., Khan M. S.:** Preparation and Evaluation of Mixture of Eudragit and Ethylcellulose Microparticles Loaded with Ranolazine for Controlled Release. *Journal of Young Pharmacist* 2011, 3, 3, 189-196.

24. **Guichard J. P., Blouquin P., Qing Y.:** A New Formulation of Fenofibrate: Suprabioavailable Tablets. *Current Medical Research and Opinion* 2000, 16, 2, 134-138.

25. **Hamishehkar H., Emami J., Najafabadi A. R., Gilani K., Minaiyan M., Mahdavi H., Nokhodchi A.:** The effect of formulation variables on the characteristic of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil evaporation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009, 74, 340-349.

26. **Heiskanen H., Denifl P., Pitkänen P., Hurme M.:** Effect of preparation conditions on the properties of microspheres prepared using an emulsion-solvent extraction process. *Chemical Engineering Research and Design* 2012, 90, 1517-1526.

27. **Herrmann J., Bodmeier R.:** Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by variol aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1998, 45, 75-82.

28. **Heslinga M. J., Mastria E. M., Eniola-Adefeso O.:** Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* 2009, 138, 235-242.

29. **Chalabala M.:** *Technologie léků*: galenika. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, c2001, 408 s. ISBN 80-7262-128-9.

30. **Chandra R., Rustgi R.:** Biodegradable polymers. *Progress in Polymers Science* 1998, 23, 1273-1335.

31. **Chung T. W., Huang Y. Y., Liu Y. Z.:** Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 212, 161-169.

32. **Imsombut T., Srisuwan Y., Srihanam P., Baimark Y.:** Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Powder Technology* 2010, 203, 603–608.

33. **Jain R. A.:** The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradace poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000, 21, 2475-2490.

34. **Jeyanthi R., Thanoo B. C., Metha R. C., DeLuca P. P.:** Effect of solvent removal technice on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery. *Journal of Controlled Release* 1996, 38, 235-244.

35. **Kao Ch. Ch., Chen S. Ch., Sheu M. T.:** Lag time method to delay drug release to various sites in the gastrointestinal tract. *Journal of Controlled Release* 1997, 44, 263-270.

36. **Komárek P., Rabišková M. a kol.:** Technologie léků, Galén, Praha, 2006, 399 s.

37. **Kormanová V., Vladovičová B., Bezáková Ž., Vítková M., Škodová J., Zoričák J., Hubinová V., Rabišková M., Dvořáčková K.:** Štúdium disolučných profilov tramadoliumchloridu z liekových foriem s riadeným uvoľňovaním matricového a zásobníkového typu. *Česká a slovenská farmacie* 2010, 59, 210-218.

38. **Lai M. K., Tsiang C. C.:** Microencapsulation of acetaminophen into poly(L-lactide) by three different emulsion solvent-evaporation methods. *Journal of Microencapsulation* 2005, 22, 3, 261-274.

39. **Lam P. L., Gambari R.:** Advanced progress of microencapsulation technologies: *In vivo* and *in vitro* models for studying oral and transdermal drug deliveries. *Journal of Controlled Release* 2013.

40. **Lamprecht A., Torres H. R., Schäfer U., Lehr C. M.:** Biodegradable microparticles as two-drug controlled repase formulation: a potential treatment of inflammatory bowel dinase. *Journal of Controlled Release* 2000, 69, 445-454.

41. **Lee S. Ch., Oh J. T., Jang M. H., Chung I. S.:** Quantitative analysis of polyvinyl alkohol on the surface of poly(D,L-lactide-co-glycolide) micropraticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *Journal of Controlled Release* 1999, 59, 123-132.

42. **Lee Y. S., Johnson P. J., Robbins P. T., Bridson R. H.:** Production of nanoparticles-in-microparticles by a double emulsion method: A comprehensive study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2013, 83, 168-173.

43. **Li M., Rouaud O., Poncelet D.:** Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 363, 26-39.

44. **Lida K., Yonezawa T., Choi S. S., Nagai K., Woo J. T:** Sodium dodechl sulfate and sodium dodecyl benzenesulfonate are ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ. *The Journal of Toxicological Science* 2013, 38, 5, 697-702.

45. **Lincová D., Farghali H.:** Základní a aplikovaná farmakologie, Galen, Praha, 2007, 672 s.

46. **Lu Ch., Lu Y., Chen J., Zhang W., Wu W.:** Synchronized and sustained release of multiple components in silymarin from erodible glyceryl monostearate matrix systém. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2007, 66, 210-219.

47. **Makadia H. K., Siegel S. J.:** Poly Lactic-*co*-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011, 3, 1377-1397.

48. **Mao S., Shi Y., Li L., Xu J., Schaper A., Kissel T.:** Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morfology of poly(D,L-lactide-co-glycolide microspheres formed by the solvent evaporation method. *European Journal of Pharmaceutics ond Biopharmaceutics* 2008, 68, 214-223.

49. **Mehta R. C., Thanoo B. C., DeLuca P. P.:** Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(*d,l*-lactide-co-glycolide). *Journal of Controlled Release* 1996, 41, 249-257.

50. **Mekala N. K., Baadhe R. R., Parcha S. R.:** Review on engineering biomaterials in tissue engineering application. *Recent Research in Science and Technology* 2012, 4, 12, 5-11

51. **Meng F. T., Ma G. H., Liu Y. D., Qiu W., Su Z. G.:** Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2004, 33, 177-183.

52. **Meng F. T., Ma G. H., Qiu W., Su Z. G.:** W/O/W double emulsion technice using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of Controlled Release* 2003, 91, 407-416.

53. **Miyazaki Y., Onuki Y., Yakou S., Takayama K.:** Effect of temperature-increase rate on drug repase characteristics of dextran microspheres prepared by emulsion solvent evaporation process. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 324, 144-151.

54. **Muthu M. S:** Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics* 2009, 3, 4, 266-273.

55. **Nageswari A., Reddy Krishna K. V. S. R., Mukkanti K.:** Stability-indicating UPLC method for determination of Imatinb Mesylate and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012, 66, 109-115.

56. **Nair L. S., Laurencin C. T.:** Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007, 32, 762-798.

57. **O´Donnel P. B., McGinity J. W.:** Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997, 28, 25-42.

58. **Park J. H., Ye M., Park K.:** Biodegradable Polymers for Microencapsulation of Drugs. *Molecules* 2005, 10, 146-161.

59. **Patel B., Chakraborty S.:** Biodegradable polymers: emerging excipients for the pharmaceutical and medical device industries. *Journal of Excipients and Food Chemistry* 2013, 4, 4, 126-157.

60. **Pèan J. M., Julienne-Venier M. C., Boury F., Menei P., Denizot B., Benoit J. P.:** NGF release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability. *Journal of Controlled Release* 1998, 56, 175-187.

61. **Pliszczak D., Bourgeois S., Bordes C., Valour J. P., Mazoyer M. A., Orecchioni A. M., Nakache E., Lantéri P.:** Improvement of an encapsulation process for the preparation of pro- and prebiotics-loaded bioadhesive microparticles by using experimental design. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 44, 83-92.

62. **Rabišková M.:** Částicové lékové formy. *Praktické lékárenství* 2005, 1, 29-30.

63. **Rabišková M., Fričová V.:** Perorální formy s řízeným uvolňováním léčiv. *Praktické lékárenství* 2008, 4, 4, 186-190.

64. **Rao D. D., Satyanarayana N. V., Reddy A. M., Sait S. S., Chakole D., Mukkanti K.:** A validated stability indicating UPLC method for desloratadine and its impurities in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 51, 736-742.

65. **Ré M. I., Biscans B.:** Preparation of microspheres of ketoprofen with acrylic polymers by a quasi-emulsion solvent diffusion method. *Powder Technology* 1999, 101, 120-133.

66. **Reithmeier H., Herrmann J., Göpferich A.:** Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *Journal of Controlled Release* 2001, 73, 339-350.

67. **Rowe R. C., Sheskey P. S., Owen S. C.:** Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, London, 2006, 945 s.

68. **Sah H.:** Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction on the characteristics of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* 1997, 47, 233-245.

69. **Sah H.:** Ethyl formate – alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 2000, 195, 103-113.

70. **Sahoo N. G., Kakran M., Li Lin., Judeh Z.:** Fabrication of composite microparticles of artemisin for dissolution enhancement. *Powder Technology* 2010, 203, 277-287.

71. **Singh S., Junwal M., Modhe G., Tiwari H., Kurmi M., Parashar N., Sidduri P.:** Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *TrAc Trends in Analytical Chemistry* 2013, 49, 71-88.

72. **Sinha V. R, Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A.:** Poly-ε-capronolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 278, 1-23.

73. **Sinha V. R., Trehan A.:** Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release* 2003, 90, 261-280.

74. **Song M., Li N., Sun S., Tiedt L. R., Liebenberg W., de Villiers M. M.:** Effect of Viscosity and Concentration of Wall Fromer, Emulsifier and Pore-Inducer on the properties of Amoxicillin Microcapsules Prepared by Emulsion Solvent Evaporation. *Il Farmaco* 2005, 60, 261-267.

75. **Šnejdrová E., Ditrich M.:** Poly(α-hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické Listy* 2011, 105, 27-33.

76. **Suchopár J., Valentová Š. a kol.:** Remedia compendium 4. vydání, Panax, Praha, 2009, 1000 s.

77. **Thies C.:** Microcapsules. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* 2003, 3892-3903.

78. **Vysloužil J., Dvořáčková K., Kejdušová M., Rabišková M.:** Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy* 2013[1], 107, 16-23.

79. **Vysloužil J., Kejdušová M., Dvořáčková K., Vetchý D.:** Influence of formulation and process parameters on the characteristics of PLGA-based microparticles with controlled drug release. *Česká a slovenská farmacie* 2013[2], 62, 120-126.

80. **Wischke Ch., Schwendeman S. P:** Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. International Journal of Pharmaceutics 2008, 364, 298-327.

81. **Yang Y. Y., Chung T. S., Bai X. L., Chan W. K.:** Effect of preparation conditions on morfology and release profile sof biodegradace polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science* 2000, 55, 2223-2236.

82. **Yang Y. Y., Chung T. S., Ng N. P.:** Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradace polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. Biomaterials 2001, 22, 231-241.

83. **Zolnik B. S., Leary P. E., Burgess D. J.:** Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* 2006, 112, 293-300.

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|---|---|
| 5-$HT_{1a\ ,\ 2a,\ 1c,3}$ | jednotlivé podtypy serotoninového receptoru a specificky serotoninergní antidepresivum |
| Da | dalton - atomová hmotnostní jednotka |
| EE | enkapsulační účinnost |
| FDA | Food and Drug Administration – Americký úřad pro léčiva a potraviny |
| $H_1$ | podtyp histaminového receptoru H |
| HLR | hydrofilně lipofilní rovnováha |
| HPLC | vyoce účinná kapalinová chromatografie |
| kPa | kilopascal – jednotka tlaku |
| kV | kilovolt - jednotka elektrického napětí |
| NaSSA | noradrenergic and specific serotonergic antidepressant, noradrenergní |
| NIMs | nanoparticles-in-microparticles – mikročástice s enkapsulovanými nanočásticemi |
| o/v | emulze olej ve vodě |
| o/v/o | dvojitá emulze olej-voda-olej |
| PAL | povrchově aktivní látka |
| PGA | polymer kyseliny glykolové |

| | |
|---|---|
| PLA | polymer kyseliny mléčné |
| PLGA | kopolymer kyseliny mléčné a glykolové |
| PPARγ | jaderný receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory |
| PVA | polyvinylalkohol |
| $R^2$ | determinační koeficient |
| RP-HPLC | vysoce účinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech |
| RP-UPLC | ultra účinná kapalinová chromatografie na nepolárních absorbentech |
| s/o/o | dvojitá emulze pevná látka-olej-olej |
| s/o/v | dvojitá emulze pevná látka-olej-voda |
| SD | směrodatná odchylka |
| SSRI | inhibitor zpětného vychytávání serotoninu |
| v/o | emulze voda v oleji |
| v/o/o | dvojitá emulze voda-olej-olej |
| v/o/o/o | trojitá emulze voda-olej-olej-olej |
| v/o/v | dvojitá emulze voda-olej-voda |
| $\alpha_2$ | podtyp adrenergního receptoru α |