

PŘÍPRAVA LÉČIVÝCH MIKROČÁSTIC METODOU ODPAŘOVÁNÍ ROZPOUŠTĚDLA

JAKUB VYSLOUŽIL, KATEŘINA
DVOŘÁČKOVÁ, MARTINA KEJDUŠOVÁ
a MILOSLAVA RABIŠKOVÁ

*Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinár-
ní a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42
Brno*

Jakub.vyslouzil@gmail.com

Došlo 16.9.11, přepracováno 23.2.12, přijato 29.3.12.

Klíčová slova: mikročástice, odpaření rozpouštědla,
PLGA, formulační proměnné, procesní proměnné

Obsah

1. Úvod
2. Princip a modifikace metody odpaření rozpouštědla
3. Pomocné látky využívané při přípravě mikročástic
 - 3.1. Polymery
 - 3.2. Vnitřní fáze emulzního systému
 - 3.3. Vnější fáze emulzního systému
4. Proměnné ovlivňující vlastnosti mikročástic
 - 4.1. Formulační proměnné
 - 4.2. Procesní proměnné
5. Závěr

1. Úvod

Mikročástice jsou v současné době intenzivně studovaným a perspektivním typem lékové formy. Jsou definovány jako pevné částice přibližně kulovitého tvaru s velikostí v řádech jednotek až stovek μm . Částice s podobnou charakteristikou menší než $1\ \mu\text{m}$ se nazývají nanočástice. Částice větší než mikročástice jsou pelety, jejichž velikost se pohybuje nejčastěji mezi $0,5\text{--}2\ \text{mm}$ (cit.¹). Hranice tohoto rozdělení však nejsou ostré. Mikročástice lze rozdělit na mikrotobolky (složené z jádra v pevné, kapalné či plyné podobě, na které těsně přiléhá polymerní obal) a mikrosféry (nerozlišujeme u nich jádro a obal, léčivo je rozptýleno v matici mikrosféry v pevné formě nebo je přítomné ve formě suspenze či emulze). Ve farmacii se mikročástice používají k maskování chuti léčiv, k ochraně léčiva před nežádoucími vlivy okolního prostředí či zapracování těžkých léčiv, např. silic. Nejcennější vlastností je pak možnost řízeného uvolňování léčiva^{1–3}.

V současné farmakoterapii lze stále nalézt velké množství léků první generace, ze kterých se léčivo uvolňu-

je kinetikou prvního řádu. Po podání dosáhne koncentrace léčiva v plazmě svého maxima a poté klesá. K udržení terapeutické hladiny léčiva je proto zapotřebí opakovaného dávkování, jinak hrozí pokles plazmatické koncentrace léčiva pod terapeutickou hladinu¹. Úkolem moderní farmaceutické technologie je v současnosti vývoj a výroba takových lékových forem, které zajistí uvolňování léčiv v požadované dávce a po stanovený čas. Díky tomu je možné udržet požadovanou terapeutickou hladinu léčiva v krevní plazmě. Zvyšuje se tak účinnost léčiva, snižuje se výskyt nežádoucích účinků a celková dávka léčiva potřebná k terapii je menší. Výhodou je také vyšší compliance (ochota a schopnost pacienta přizpůsobit se terapeutickému režimu stanovenému lékařem) a convenience pacienta (míra informovanosti a spolupráce pacienta). Mikročásticové lékové formy k prodloužení účinku léčiv významně přispívají.

Další nespornou výhodou mikročástic je jejich násobný charakter, tj. dávka z mikročásticového systému se skládá z většího počtu jednotek. Po perorálním podání se mikročástice díky peristaltice rovnoměrně rozmístí v trávicím traktu na rozdíl od jednotkových lékových forem. Tím se snižuje riziko lokálních nežádoucích účinků, což je výhodné například u léčiv dráždivých trávicí systém. Výhodný je také průchod mikročástic žaludkem nezávisle na příjmu potravy^{3–5}.

Mikročástice mají i několik nevýhod. U parenterálních lékových forem na bázi mikročástic je před aplikací nutná rekonstituce suspenze. Při degradaci matrice některých polymerů dochází uvnitř mikročástice ke změně pH, což může narušit stabilitu některých léčiv, především léčiv peptidického původu. Příkladem může být degradace PLGA na kyselinu mléčnou a glykolovou. Navíc organická rozpouštědla používaná u metody odpařování rozpouštědla mohou peptidická léčiva denaturovat⁶. Určitý problém představuje také likvidace organických rozpouštědel.

Vznik mikročástic byl popsán již v roce 1931 při přípravě želatinových částic metodou koacervace^{7,8}. První mikročástice pro farmaceutické využití se objevily v souvislosti s experimentálními pracemi zabývajícími se vstřebatelnými filmy vyrobenými z kyseliny mléčné, které se po přípravě rozdrobnily v mixéru na drobné částice⁹. Se vzrůstající potřebou inkorporovat léčiva do polymerních materiálů se postupně vyvinuly i další metody, které se dělí podle mechanismu vzniku mikročástic na chemické a fyzikálně mechanické. Mezi chemické patří zmíněná koacervace, dále pak mezifázová polymerizace a polykondenzace, síťovací metody. Mezi fyzikálně mechanické metody pak patří např. extruze a sferonizace, sprejové sušení a chlazení či formování a obalování mikročástic ve fluidní vrstvě. Jednou z nejpoužívanějších fyzikálně mechanických metod je pak metoda odpaření rozpouštědla, která je v laboratorních podmínkách oblíbená pro svou

přístrojovou nenáročnost. Produktem jsou mikrosféry.

V současné době je na trhu již několik přípravků, jejichž základem jsou mikročástice tvořené kopolymerem kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) nebo kyselinou polymlečnou (PLA). Obsahují především léčiva povahy peptidů: leuprolid (Lupron Depot[®], Enantone Depot[®], Trenantone[®], Enantone Gyn[®] – léčba rakoviny prostaty, endometria), triptorelin (Trelstar Depot[®], Decapeptyl Depot[®] – léčba rakoviny endometria), octreotid (Sandostatin LAR[®] – terapie akromegalie), somatropin (Nutropin Depot[®], terapie růstové deficience), buserelin (Suprecur MP[®] – léčba endometriózy), lanreotid (Somatuline LA[®] – léčba akromegalie). K léčbě parkinsonismu je pak k dispozici mikročásticová léčivá forma bromokriptinu (Parlodel LAR[®])¹⁰. Cena přípravků obsahujících mikročásticovou léčivou formu se pohybuje v řádech desetitisíců korun. Z tohoto důvodu byla například prozatím pozastavena výroba mikročásticového léčivého systému Nutropin Depot[®], který byl nahrazen klasickou roztokovou injekcí Nutropin AQ[®]. V České republice jsou registrovány přípravky Decapeptyl Depot[®], Sandostatin LAR[®] (dle číselníku PDK).

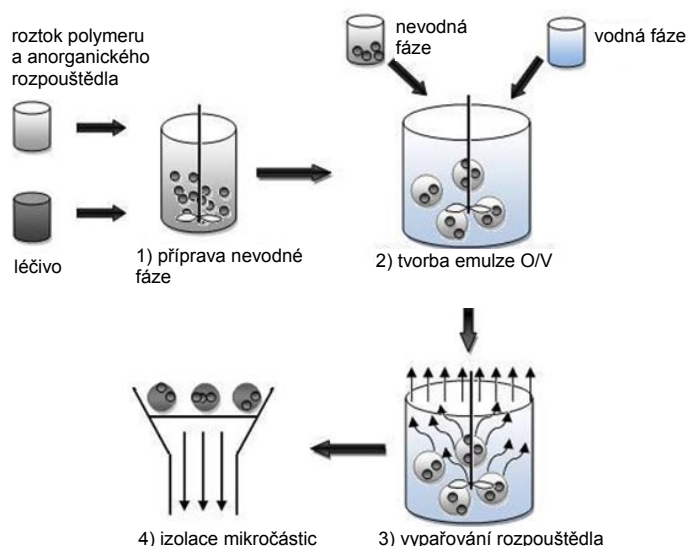
2. Princip a modifikace metody odpaření rozpouštědla

Základním principem této metody je odpařování té části emulze, která obsahuje rozpouštěné nebo dispergované léčivo a polymer. V průběhu odpařování se z rozpouštěného polymeru formuje pevná matrice, která do své struktury uzavírá léčivo. Přípravu mikročástic základní variantou této metody je možné rozdělit do několika kroků (obr. 1). V první fázi je polymer rozpouštěn v rozpouštědle nemisi-

telném s vodou. Následně je v roztoku polymeru rozpouštěno nebo dispergováno léčivo. Vzniklá lipofilní fáze je poté zpravidla za pomoci tenzidů emulgována do kontinuální vodné fáze za vzniku jemné emulze O/V (O je označení olejové fáze, V je označení vodné fáze). K dosažení požadovaného stupně emulze se používá např. vrtulové míchadlo s nastavitelnými otáčkami, homogenizační zařízení nebo ultrazvuková lázeň¹¹. Organické rozpouštědlo následně difunduje do vodné fáze a v posledním kroku se odpařuje na rozhraní voda/vzduch. Úbytkem rozpouštědla vnitřní fáze a vlivem míchání se z polymeru formují mikročástice. Vzniklé mikročástice suspendované v kontinuální fázi se poté zfiltrují, promyjí a následně se suší¹².

Systém O/V

Původní metodou odpařování rozpouštědla je enkapsulace¹³. Smísením dvou nemísitelných složek, kontinuální vodné fáze (V) a s vodou nemísitelného roztoku polymeru (O), vzniká emulze O/V. Tato metoda je vhodná především pro přípravu mikročástic s léčivy obtížně rozpustnými ve vodě. Rozpustná léčiva nejsou pro modifikaci O/V vhodná, protože ve zvýšené míře unikají z roztoku polymeru, tj. vnitřní fáze, do vodné kontinuální fáze, čímž se snižuje obsah léčiva v mikročásticích. K vyřešení tohoto problému lze emulzi upravit několika způsoby. Prvním je snížení hydrofilního charakteru léčiva buď tvorbou lipofilních proléčiv¹⁴ nebo použitím neionizovaných forem ve vodě rozpustných léčiv, které mají obvykle vyšší lipofilitu. Další možností je použití hydrofilních kosolventů, které zvyšují rozpustnost léčiva v organickém rozpouštědle, čímž se sníží únik léčiva do vodné fáze. Snížení rozpustnosti léčiva ve vnější kontinuální fázi lze také dosáhnout



Obr. 1. Schéma přípravy mikročástic metodou odpaření rozpouštědla

úpravou složení vnější fáze přidavkem anorganické soli. Jako perspektivní se ukázaly soli NaH_2PO_4 a KH_2PO_4 . Při nasycení kontinuální fáze solí KH_2PO_4 bylo popsáno zvýšení enkapsulační účinnosti za vzniku pravidelných sférických mikročástic¹⁵. Kontinuální fázi je také možné nasýtit samotným léčivem, což je ale problematické u drahých léčiv. Metodou O/V byly připraveny například mikročástice s obsahem cytostatik temozolomidu¹⁶ a cisplatiny¹⁵ nebo s obsahem steroidních sloučenin¹³.

Systém O/O

Další alternativou je modifikace O/O, u které je vodná kontinuální fáze nahrazena lipofilní fází, ve které se léčivo nerozpouští. Metoda eliminuje únik léčiva do vodné kontinuální fáze u systému O/V¹⁷. Vnější i vnitřní fáze emulzního systému jsou vzájemně zcela nemísitelné. Jako kontinuální fáze se používají netěkavé kapaliny lipofilní nebo organické povahy, např. minerální oleje, rostlinné oleje nebo netěkavá organická rozpouštědla. Příkladem této metody může být příprava PLGA mikročástic s obsahem timolol maleinátu rozpuštěném v acetonitrilu jako vnitřní fázi emulgované v sezamovém oleji jako fázi kontinuální. Odpařením rozpouštědla se získaly mikročástice s trojfázovým uvolňováním léčiva. Nejprve se rychle uvolnila dávka léčiva na povrchu mikročástice, poté následovala fáze pomalého uvolňování, během které pronikala voda do matrice. Po ukončení eroze matrice a jejím rozpadu se rychle uvolnila další dávka léčiva¹⁸. Vnější fáze tvořená perfluorhexanem se ukázala vhodná k formování mikročástic založených na hydrofobních i hydrofilních polymerech s obsahem lipofilního léčiva. Vnitřní fází byl dichlormethan¹⁹. Při srovnání popsané metody s dalšími metodami O/O a O/V vykazovaly připravené mikročástice podobnou kinetiku a rychlost uvolňování jako částice připravené metodou O/V.

Systém V/O/V

Další modifikací původní metody je metoda V/O/V navržená Ogawou a spol.²⁰ pro enkapsulaci leuporelinu acetátu. Při této metodě se využívá násobné emulze. Nejprve vzniká primární V/O emulze, která se dále zapracovává do vnější vodné fáze za vzniku dvojité emulze. Prostřední, olejová fáze působí jako bariéra proti úniku léčiva z vnitřní vodné fáze do vnější vodné fáze. Metoda je vhodná pro nižší dávky léčiv s vysokou rozpustností ve vodě. Metodou V/O/V se připravily například mikročástice s bisfosfonáty²¹, peptidy²², antibiotiky²³, ale i s makromolekulárními sloučeninami jako např. s FITC-dextranem (dextran s navázaným fluorescein isothiokyanátem), který se používá především ke studiu mikrovaskulární permeability tkání za fyziologických i patologických podmínek²⁴.

Systém O/V/O

Modifikace O/V/O je lipofilní alternativou k modifikaci V/O/V. Prostřední vodná fáze brání úniku léčiva do kontinuální olejové fáze. Metodu lze využít

k formování mikročástic obsahujících léčiva lipofilní povahy²⁵; je však využitelná i v potravinářském průmyslu^{26,27}. Systémem O/V/O byly připraveny např. chitosanové mikročástice s lipofilním léčivem ketoprofenem²⁵ nebo mikročástice se stejným nosným polymerem obsahující karotenoid astaxanthin, používaný v potravinářství jako barvivo²⁶.

Systém V/O/O, V/O/O/O

Systém V/O/O využívá jako vnější kontinuální fázi lipofilní látku, volenou tak, aby v ní byly polymer i léčivo co nejméně rozpustné. Hydrofilní léčivo pak nemá tendenci uniknout do vnější kontinuální fáze. Příkladem mikročástic připravených touto metodou mohou být akrylátové mikročástice s obsahem takrinu k terapii demence a s obsahem antihypertenziva propranololu²⁸. Je-li násobná emulze typu V/O/O dispergována do další lipofilní látky, vzniká emulze V/O/O/O. Vytvořené mikročástice obsahují ve své struktuře dutiny, ve kterých se nachází emulze typu V/O. Takové mikročástice jsou označovány jako multifázické²⁹. Metodou V/O/O/O se připravily například mikročástice s neuroleptikem thioridazinem³⁰.

3. Pomocné látky využívané při přípravě mikročástic

3.1. Polymery

Na látky tvořící základ mikročástic jsou vzhledem k perorální i parenterální aplikaci kladeny vysoké nároky. Polymery tvořící základ mikročástic by měly být biodegradovatelné a/nebo biokompatibilní. Biodegradovatelné polymery lze definovat jako látky, které se v těle rozkládají na neškodné produkty. Biokompatibilní polymery jsou materiály bez negativního vlivu na zdraví, které nepůsobí v organismu žádné lokální nebo systémové nežádoucí účinky³¹. Tabulka I shrnuje seznam používaných polymerů pro přípravu mikročástic metodou odpaření rozpouštědla.

Jedním z prvních používaných materiálů byla kyselina polymlečná (PLA), která je biodegradovatelná a biokompatibilní. Americkým úřadem pro léky a potraviny (FDA) je považována za bezpečnou³². Je rozpustná ve většině běžně používaných rozpouštědel. V experimentech se často používá jak směs stereoisomerů D,L-PLA, tak i levotočivý stereoisomer L-PLA. Tuto pomocnou látku lze použít i ve formě kopolymeru s makrogolem. Obsah makrogolu zvyšuje hydrofilitu a kopolymer tak rychleji uvolňuje léčivo³³. Pro prodloužené uvolňování léčiva v řádu dnů je výhodné použít amorfní modifikace polymerů, což platí i pro PLA. Semikrystalické modifikace uvolní léčivo zpravidla již během několika hodin³⁴.

Nejpoužívanějším polymerem pro tvorbu mikročástic metodou odpaření rozpouštědla je kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Kopolymer PLGA je biokompatibilní, biodegradovatelný a je schválený FDA k použití v humánní farmakoterapii. V těle se degraduje až

Tabulka I
Přehled nejvýznamnějších polymerů a jejich použití

Polymer	Léčivo	Vnitřní fáze	Vnější fáze	Metoda	Lit.
D, L - PLA	oligonukleotid	dichlormethan, ethyl-acetát	voda	V/O/V, O/V	57
PLGA	nervový růstový faktor	dichlormethan/aceton 3:1	voda	V/O/V	66
PLGA	nifedipin	dichlormethan	voda	O/V	62
PLGA	bisfosfonát	dichlormethan	voda	V/O/V	23
PLGA	temozolomid	dichlormethan	voda	O/V	16
PHB	tetracyklin	chloroform	voda	V/O/V	71
PHB	rifampicin	chloroform	voda	O/V	72
PHB	piroxikam/ketoprofen	dichlormethan	voda	O/V	73

na soli kyseliny mléčné a glykolové. Degradace PLGA probíhá hydrolýzou esterových vazeb. Kopolymery mohou mít různé poměrné zastoupení jednotlivých monomerů, např. 85:15, 75:25, 50:50 (cit.³⁵). Vyšší obsah glykolové kyseliny vede obvykle k rychlejší degradaci související s vyšší rozpustností kopolymeru. Obsah kyseliny glykolové má vliv i na strukturu kopolymeru. Při jejím obsahu 25 až 70 % je kopolymer amorfni, což je pro zisk mikročásteček s prodlouženým uvolňováním léčiva výhodnější³⁶.

K tvorbě mikročásteček lze použít také poly(3-hydroxybutyrát) (PHB), který je produktem bakteriálního metabolismu, např. bakterii *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii* či rekombinantní *Escherichia coli*³⁷. Jeho degradace v lidském organismu je velmi pomalá. Je dobře rozpustný v dimethylformamidu, chloroformu, kyselině octové. Potlačení krystalinity a zvýšení amorfního podílu je možné dosáhnout kopolymerací s 3-hydroxyvalérovou kyselinou³⁸.

Jednotlivé typy polymerů mohou mít ještě další podtypy, které se mezi sebou dále liší. Například podtypy polymeru PLGA, jak již bylo zmíněno, se mohou lišit různými poměry zastoupení jednotlivých polymerů. Vliv má také počet a typ substituentů, především volných karboxylových skupin. S jejich snižujícím se množstvím se zvyšuje hydrofobní charakter polymeru a snižuje se rozpustnost ve vodě. PLGA mikročástečky připravené z hydrofilnějších typů PLGA se vyznačují schopností pojmout vyšší množství účinné látky³⁹.

Kromě zmíněných polymerů a kopolymerů se zkoumají i kopolymery složené z několika typů polymerů, např. blokové kopolymery složené z PLA, PLGA a makrogolu, vyznačující se velkou proměnlivostí větvení řetězce. Blokové polymery jsou vhodné např. pro enkapsulaci erythropoetinu. Významně prodlužují dobu jeho uvolňování ve srovnání s klasickým kopolymerem PLGA⁴⁰.

Je možné používat také polymery, které nejsou přímo biodegradovatelné, ale jsou alespoň biokompatibilní. Příkladem může být polymethylmethakrylát. Jedná se o biokompatibilní polymer, schválený FDA, který není v organismu degradován na monomery. Polymethylmethakrylát se použil např. při přípravě mikročásteček s obsa-

hem gentamycinu určených k léčbě kostních infekcí. Po ukončení terapie bylo nutné mikročástečky chirurgicky odstranit⁴¹. Dalším vhodným polymerem k přípravě mikročásteček je ethylcelulosa, schválená FDA jako biokompatibilní materiál pro použití v organismu. Ethylcelulosové mikročástečky lze užívat i perorálně³¹.

K přípravě mikročásteček metodou odpaření rozpouštědla lze využít i jiné polymery jako např. deacetylovaný derivát chitinu chitosan⁴², želatinu⁴³ či dextran⁴⁴. V případě metody odpaření rozpouštědla však zůstává středem zájmu především PLGA.

Při uvolňování léčiva z polymerní matrice biodegradovatelných mikročásteček, popř. stěny mikrotobolek, se uplatňuje proces difuze molekul léčiva póry vyplněnými vodou (nezávisí na velikosti molekuly léčiva), difuze hydratovaným polymerem (závisí na velikosti léčiv), eroze polymeru nebo působení osmotického tlaku⁴⁵.

Difuze léčiva póry je nejvýznamnější složkou uvolňování, která je velmi závislá na pórovitosti matrice, a proto i na procesech, které ovlivňují vznik pórů (eroze a bobtnání), případně i jejich uzavírání (pohyblivost polymerového řetězce)⁴⁵. Efektivní difuzní koeficient je závislý na difuzním koeficientu dané kapaliny nacházející se v pórech, pórovitosti a tortuozitě⁴⁶.

Difuzi léčiva hydratovaným polymerem lze pozorovat u léčiv s malou hydrofobní molekulou⁴⁷. Tento typ difuze není závislý na pórovitosti polymeru⁴⁸, může se však zvýšit o několik řádů při přechodu polymeru ze sklovité formy na plastickou, např. vlivem teploty⁴⁹. Difuze léčiva hydratovaným polymerem je také vyšší u polymerů s nižší molekulovou hmotností z důvodu jejich vyšší flexibility⁴⁷.

Při hydrataci vody částic může vzniknout osmotický tlak, který následně umožní uvolnění léčiva z matrice na principu osmotické pumpy. Tento proces uvolnění léčiva je mnohem méně častý než difuze, ale může se objevit i u biodegradovatelných polymerů na bázi PLA, či PLGA (cit.^{50,51}). Čím větší je délka kanálků (kontinuálně propojených pórů) v matici, tím vyšších hodnot dosahuje osmotický transport⁵⁰.

Existují dva základní typy eroze matrice, při kterých následně dochází k uvolnění léčiva. První se týká polymere-

rů, které jsou ve vodě rozpustné, ale jsou po určitou dobu stabilizovány hydrolyticky nestabilními můstky. Po hydrolyze můstků dochází k postupnému rozpouštění matrice a uvolnění léčiva. Mikročástice tvořené rozpustnými polymery jsou vhodné pro léčiva s nižší rozpustností ve vodě. Léčiva dobře rozpustná ve vodě jsou z tohoto typu matrice rychle uvolněna difuzí nezávisle na době rozpouštění polymeru v mikročástici. Příkladem rozpustného polymeru je želatina s řetězci příčně zesíťovanými působením formaldehydu, kterou lze použít i k přípravě mikročástic⁵². Mezi polymery s druhým typem eroze matrice patří PLA, PLGA, ε-kaprolakton aj. Nerozpustný hlavní řetězec je u těchto polymerů hydrolyticky štěpen na malé, ve vodě rozpustné fragmenty. Existuje ještě třetí typ eroze polymeru, který se vyskytuje u polymerů nerozpustných ve vodě, které hydrolyzou, ionizací nebo protonací postranních funkčních skupin nabývají hydrofilní charakter. Tyto polymery se častěji než k přípravě matricových mikročástic používají k enterosolventním obalům tablet, pelet apod., např. celulosy acetát ftalát nebo celulosy acetát sukcinát⁵³.

Degradace matrice může probíhat dvěma způsoby: homogenně nebo heterogenně. Homogenní degradace nastává poté, co se celý objem matrice nasytí vodou. Léčivo se zpravidla uvolňuje kombinací eroze a difuze. Druhým typem je heterogenní degradace, která probíhá pouze na povrchu mikročástice. Výsledkem je optimální uvolňování léčiva kinetikou nultého řádu, kdy se léčivo uvolňuje nezávisle na jeho koncentraci v lékové formě. Heterogenního typu degradace lze dosáhnout pouze u vysoce hydrofobních polymerů, které se používají pro formování mikročástic zřídka, např. kopolymer methyl(vinyl) etheru a anhydridu kyseliny maleinové. Ve většině případů však probíhá degradace homogenním i heterogenním způsobem najednou⁵³.

Z mikročástic vyrobených z nebiodegradovatelných polymerů jako např. ethylcelulosa či polymethylmethakrylát, se léčivo uvolňuje pouze difuzí^{54–56}.

Existuje celá řada faktorů, které mohou ovlivnit rychlost uvolnění léčiva, např. tvorba pórů, autokatalýza, krystalizace či plastifikace oligomerů, hodnota pH, interakce mezi léčivem, interakce mezi léčivem a polymerem, pohyblivost polymerových řetězců aj.⁴⁵. Je tedy patrné, že uvolnění léčiva z polymerových matic je vysoce komplexní proces závislý na daných podmínkách a vlastnostech experimentu.

3.2. Vnitřní fáze emulzního systému

Ideální rozpouštědlo vnitřní fáze pro výrobu mikročástic metodou odpařování rozpouštědla by mělo splňovat několik základních předpokladů: nemělo by se mísit s vnější fází, mělo by co nejvíce rozpouštět daný polymer mikročástic, mělo by být těkavé a netoxické.

Mezi nejpoužívanější zástupce vnitřní fáze patří dichlormethan (ČL 2009). Je vysoce těkavý, chemicky stálý a je téměř nemísitelný s vodou. Jeho nevýhodou je ale toxicita. Patří mezi karcinogeny.

Ethyl-acetát (ČL 2009) je méně toxický než dichlormethan. Mezi karcinogeny nepatří. Je však mísitelnější s vodou než dichlormethan, proto při smíchání obou fází nemusí dojít k optimálnímu formování mikročástic. Tento problém je možné řešit předmícháním dispergované fáze s malým množstvím kontinuální fáze. Po vytvoření koncentrované emulze se doplní zbytek kontinuální fáze a vzniklou emulzi je poté možné použít pro přípravu mikročástic⁵⁷.

Jako další příklady rozpouštědel vnitřní fáze lze uvést dimethylformamid, aceton (ČL 2009) nebo chloroform, od kterého se ale upouští pro značnou toxicitu.

Nevýhodou mikročástic připravených metodou odpaření rozpouštědla je přítomnost zbytkového množství rozpouštědla v izolovaných částicích. Skutečnost, že nejpoužívanějším rozpouštědlem je toxický dichlormethan, představuje určitou nevýhodu vůči ostatním metodám. Lékopis Spojených států amerických (USP) v současnosti stanovuje limit pro dichlormethan na 600 ppm. Limity se zpravidla kontrolují plynovou chromatografií⁴⁰.

3.3. Vnější fáze emulzního systému

U většiny modifikací metody odpaření rozpouštědla bývá vnější kontinuální fáze vodná. Voda je nejdostupnější a nejlevnější možné rozpouštědlo, které má navíc řadu výhodných vlastností. Není toxická, je stálá, má výrazně vyšší teplotu varu než používaná organická rozpouštědla. U některých podtypů metody, např. O/O, O/V/O, bývá kontinuální fáze olejová. Používají se např. minerální oleje, rostlinné oleje, popř. netěkavé organické sloučeniny. Volba vnější fáze je individuální dle polarit obou fází. Do kontinuální fáze se zpravidla přidávají také povrchově aktivní látky, popř. látky zvyšující viskozitu vnější fáze. Slouží ke stabilizaci emulze a zajišťují rovnoměrné rozptýlení vnitřní fáze ve fázi kontinuální. Působení těchto látek napomáhá vzniku mikročástic stejné velikosti. Mezi nejpoužívanější povrchově aktivní látky patří aniontové tenzidy natrium-oleát⁵⁸ a natrium-dodecyl-sulfát⁵⁹, amfoterní tenzid želatina²⁰, z látek zvyšujících viskozitu vnější fáze to jsou polyvinylalkohol⁶⁰, povidon⁶¹, nebo hypromelosa⁶².

4. Proměnné parametry ovlivňující vlastnosti mikročástic

Vlastnosti mikročástic, např. velikost, povrch, pórovitost či enkapsulační účinnost lze ovlivnit volbou různých parametrů. Proměnné, vztahující se k použitým pomocným látkám, se označují jako formulační proměnné (např. koncentrace a typ polymeru, koncentrace a typ emulgátoru, objemy fází, apod.). Druhým typem jsou procesní proměnné, které zahrnují podmínky, při kterých proces přípravy probíhá (teplota, tlak, rychlost míchání). U metody odpaření rozpouštědla prozatím chybí celistvý obraz vlivu jednotlivých proměnných na připravené mikročástice, protože ovlivnění metody je multifaktoriální a velký význam má také výběr modifikace metody.

4.1. Formulační proměnné parametry

Koncentrace polymeru

Významným faktorem při formování mikročastic je koncentrace polymeru. S rostoucím množstvím použitého polymeru se zpravidla zvětšuje velikost připravených mikročastic^{15,63,64}. Vyšší koncentrace polymeru vede ke zvýšení enkapsulační účinnosti. Při jeho nízkých koncentracích vznikají zase mikročastice s pórovitější strukturou^{63,64}, které rychleji uvolňují léčivo⁶³.

Molekulová hmotnost polymeru

Komerčně dostupné polymery se liší délkou řetězce, a tudíž i molekulovou hmotností, která také ovlivňuje vlastnosti připravených mikročastic. Při přípravě PLGA mikročastic se se snižující molekulovou hmotností polymeru snižuje velikost mikročastic i pórovitost a zvyšuje se jejich hustota. Příčinou je vyšší rozpustnost polymerů s nižší molekulovou hmotností v rozpouštědle³⁹. Naproti tomu při přípravě PLA mikročastic se se zvyšující molekulovou hmotností velikost mikročastic snižuje při metodě V/O/V i O/V, jak bylo popsáno Belbellou a Zambauxem^{59,65}.

Objem kontinuální a vnitřní fáze

Zvyšující se poměr kontinuální/vnitřní fáze nemá vliv na velikost připravených částic^{62,63}. Může se však zvýšit enkapsulační účinnost. Povrch mikročastic je hladší, patrně díky rychlejšímu formování mikročastic⁶³. Snižuje-li se pouze objem vnitřní fáze, vznikají větší mikročastice, neboť se snižujícím se objemem vnitřní fáze se zvyšuje její viskozita⁶². Podobný efekt má také snížení objemu olejové fáze u modifikace V/O/V⁶⁴.

Přídavek anorganické soli

Jak již bylo uvedeno, určitá koncentrace soli může omezit únik léčiva z vnitřní fáze¹⁵. Kromě toho ale může mít přídavek soli vliv i na výsledné vlastnosti mikročastic. Přidá-li se při přípravě PLGA mikročastic metodou V/O/V do externí fáze NaCl, vznikají menší mikročastice s větší hustotou a hladším povrchem. Přídavek NaCl do vnější fáze vyvolá únik vody z vnitřní vodné fáze do fáze vnější vlivem osmotického tlaku. Organická fáze pak slouží jako difuzní bariéra. Díky tomu se při formování mikročastice uzavírá do matrice menší množství vody a její hustota je proto vyšší⁶⁶.

Typ a koncentrace emulgátoru

Významným faktorem je nejen typ použitého emulgátoru, ale také jeho koncentrace. Optimální koncentrace emulgátoru vede k vyhovujícímu rozdělení fází emulze a zároveň k její stabilizaci. Snižuje se i nežádoucí agregace částic. Se vzrůstající koncentrací emulgátoru vzniká jemnější emulze, ze které se formují menší mikročastice^{61,62}. Stabilizaci emulze se zvýší také enkapsulační účinnost, ale pouze do určité limitní koncentrace emulgátoru. Další zvýšení koncentrace emulgátoru má většinou za následek její pokles^{61,63}. Proto je nezbytné koncentraci emulgátoru nejprve optimalizovat. Díky většímu povrchu menších

mikročastic vede vzrůstající koncentrace emulgátoru zpravidla k rychlejšímu uvolňování léčiva^{61,63}. Byl však pozorován i opačný jev, kdy měla vyšší koncentrace emulgátoru polyvinylalkoholu za následek pomalejší uvolňování léčiva z mikročastice. Vysvětlením může být skutečnost, že vyšší koncentrace emulgátoru zvýší viskozitu vnější fáze a sniží se tak únik roztoku léčiva difúzí do vnější fáze. Navíc vzniká stabilnější emulze, tudíž je léčivo inkorporováno v nosném polymeru rovnoměrně, na rozdíl od emulzí stabilizovaných nižší koncentrací emulgátoru, kdy se léčivo ve velké míře ukládá při povrchu mikročastice⁶⁴.

4.2. Procesní proměnné parametry

Teplota

Volba teploty může mít při přípravě mikročastic vliv hned na několik vlastností lékové formy. Se zvyšující se teplotou se rozpouštědlo rychleji odpařuje, urychlí se tak celý proces přípravy mikročastic. S měnící se teplotou lze pozorovat změny ve velikostech částic, struktuře jejich povrchu a pórovitosti. Například se zvyšující se teplotou se snižuje pórovitost mikročastic. Rychlejším odpařením rozpouštědla se stěna mikročastice rychleji formuje, což omezuje vytvoření pórovité struktury. Díky tomu se také sniží rychlost uvolňování léčiva^{60,67}. Za určitých podmínek mohou při postupném zvyšování teploty vznikat i mikročastice s dutými jádry, především jako důsledek rychlého nárůstu teploty během krátkého času⁵⁸. Někdy však vliv teploty na změnu vlastností mikročastic nelze předem odhadnout, protože vliv teploty závisí pravděpodobně i na použité modifikaci metody. Například u mikročastic z PLGA připravených modifikací V/O/V se velikost částic se vzrůstající teplotou zvyšuje, a povrch se stává nepravidelným⁶⁰. Opačný trend však byl pozorován u dextranových částic připravených v systému aceton/tekutý parafin⁶⁷.

Tlak

Snížením tlaku je možné významně urychlit proces odpaření rozpouštědla, a tím i tvorbu mikročastic. Teplota varu se snižuje, těkavost rozpouštědla a tím i rychlost jeho odpaření se zvyšuje. Při nižším tlaku se proto mikročastice formují několikanásobně rychleji⁶⁸.

Při přípravě mikročastic může tlak ovlivňovat také povrch částic a jejich velikost, enkapsulační účinnost či uvolňování léčiva. Také v tomto případě však nelze změnu vlastností předem odhadnout, protože vliv tlaku je s vysokou pravděpodobností závislý na volbě metody přípravy, typu použitého léčiva, typu polymeru a použitých rozpouštědlech^{69,70}.

Míchání

Míchání systému je významnou částí přípravy mikročastic. Jeho parametry jako jsou rychlost míchání, typ míchadla nebo styl míchání mohou také významně ovlivňovat vlastnosti připravených mikročastic. Prokázal se vliv rychlosti míchání na velikost mikročastic: vyšší otáčky míchadla vedou k formování jemnější emulze a tak i mikročastic s menší velikostí^{62,64}. Při vyšších otáčkách se

však snižuje výtěžnost procesu, a proto je rychlost míchání potřeba nejprve optimalizovat s ohledem na vlastnosti mikročástic⁶⁴.

5. Závěr

Metoda odpaření rozpouštědla představuje moderní přípravu mikročástic, která je široce využívána ve farmaceutickém výzkumu a své uplatnění našla již také v průmyslu. Touto technikou lze enkapsulovat celou řadu hydrofilních i lipofilních léčiv v závislosti na typu použité modifikace metody. Výsledné vlastnosti připravených mikročástic pak lze ovlivnit celou řadou formulačních a procesních proměnných. Díky tomu lze například kontrolovat velikost částic a připravit částice o velmi malých rozměrech. Výhodou této metody je také možnost přípravy mikročástic za laboratorní teploty, což je výhodné především při enkapsulaci termolabilních léčiv, popř. rekombinantních produktů. Nevýhodou metody je možná přítomnost reziduálního množství organického rozpouštědla. Obecně je výroba mikročásticové lékové formy dražší v porovnání s tradičními lékovými formami. Další intenzivní výzkum metody odpaření rozpouštědla by mohl přinést nové poznatky, případně také snížit náklady na průmyslovou výrobu. Tento příspěvek je přehledem výsledků dosažených v této oblasti.

Tato práce byla realizovaná za finanční podpory grantové agentury IGA VFU Brno 15/2010/FAF.

Použité zkratky

ČL 2009	Český lékopis 2009
FDA	Americký úřad pro léky a potraviny
PEG	polyetylen glykol
PHB	poly-3-hydroxybutyrát
PLA	polylaktát
PLGA	kopolymer polylaktátu a polyglykolidu
O	lipofilní fáze
USP	Lékopis Spojených států Amerických
V	vodná fáze

LITERATURA

- Komárek P., Rabišková M. (ed.): *Technologie léků*, třetí vydání. Galén, Praha 2006.
- Rabišková M.: *Remedia* 16, 427 (2006).
- Rabišková M.: *Remedia* 16, 605 (2006).
- Rabišková M.: *Remedia* 17, 495 (2007).
- Hickey T., Kreutzer D., Burgess D. J., Moussy F.: *J. Biomed. Mater. Res.* 23, 1649 (2002).
- van der Lubben I. M., Verhoef J. C., Borchard G., Junginger H. E.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 201 (2001).
- Bungenberg de Jong H. G.: *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 32, 849 (1929).
- Bungenberg de Jong H. G., v knize: *Colloid Science* (Kruyt H. R., ed.), str. 232. Elsevier, Amsterdam 1949.
- Woodland J. H. R., Yolles S., Blake D. A., Helrich M., Meyer F. J.: *J. Med. Chem.* 16, 897 (1973).
- Talmivanan S. (ed.): *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, první vydání. J. Wiley, New Jersey 2008.
- Tabata Y., Gutta S., Langer R.: *Pharmaceut. Res.* 10, 487 (1993).
- Freitas S., Merkle H. P., Gander B.: *J. Controlled Release* 102, 313 (2005).
- Beck L. R., Cowsar D. R., Lewis D. H.: *Fertil. Steril.* 31, 545 (1979).
- Seki T.: *J. Pharm. Sci.* 79, 985 (1990).
- Mestiri M., Puisieux F., Benoit J. P.: *Int. J. Pharm.* 89, 229 (1993).
- Zhang H., Gao S.: *Int. J. Pharm.* 329, 122 (2006).
- Hyon S., Ikada Y.: *United States Patent* 5,100,669.
- Sturesson C., Carlfors J., Edsman K., Anderson M.: *Int. J. Pharm.* 89, 235 (1993).
- Mana Z., Pellequer Y., Lamprecht A.: *Int. J. Pharm.* 338, 231 (2007).
- Ogawa Y., Yamamoto M., Okada H., Yashiki T., Shimamoto T.: *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1095 (1988).
- Billon A., Chabaud L., Gouyette A., Merle C., Bouler J. M.: *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 21, 1599 (2010).
- Stashevskaya K., Markvicheva E., Strukova S., Prudchenko I., Zubov V., Grandfils C.: *J. Microencapsul.* 24, 129 (2007).
- Billon A., Chabaud L., Gouyette A., Bouler J. M., Merle C.: *J. Microencapsul.* 22, 841 (2005).
- Cai C., Mao S., Germershaus O., Schaper A., Rytting E., Chen D., Kissel T.: *J. Microencapsul.* 26, 334 (2009).
- Genta I., Perugini P., Conti B., Pavanetto F.: *Int. J. Pharm.* 152, 237 (1997).
- Ciagara I. H., Valenzuela L. F., Goycoolea F. M., Monal W. A.: *Carbohydr. Polym.* 56, 41 (2004).
- Cho Y. H., Park J.: *J. Food Sci.* 68, 534 (2003).
- Lee J. H., Park T. G., Choi H. K.: *Int. J. Pharm.* 196, 75 (2000).
- Iwata M., McGinity J. W.: *J. Microencapsul.* 9, 201 (1992).
- O'Donnell P. B., McGinity J. W.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 83 (1998).
- Li M., Rouaud O., Poncelet D.: *Int. J. Pharm.* 363, 26 (2008).
- Pistner H., Gutwald R., Ordnung R., Reuther J., Muhling J.: *Biomaterials* 14, 671 (1993).
- Rashkov I., Manolova N., Li S. M., Espartero J. L., Vert M.: *Macromolecules* 29, 50 (1996).
- Peppas L. B.: *Int. J. Pharm.* 116, 1 (1995).
- Edlund U., Albertsson A. C.: *Adv. Polym. Sci.* 157, 68 (2000).
- Reed A. M., Gilding D. K.: *Polymer* 22, 494 (1981).
- Choi J., Lee S. Y.: *Bioprocess Eng.* 17, 335 (1997).
- Pouton C., Saghir A.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 18, 133 (1996).
- Mehta R. C., Thanoo B. C., DeLuca P. P.: *J. Controlled Release* 41, 249 (1996).

40. Pistel K., Bittner B., Koll H., Winter G., Kissel T.: J. Controlled Release 59, 309 (1999).
41. Stallmann H. P., Faber C., Bronckers A. L., Nieuw Amerongen A. V., Wuisman P. I.: BMC Musculoskeletal Disord. 7, 1 (2006).
42. Lim S. T., Martin G. P., Berry D. J., Brown M. B.: J. Controlled Release 66, 281 (2000).
43. Cascone M. G., Lazzeri L., Carmignani C.: J. Mater. Sci.: Mater. Med. 13, 523 (2002).
44. Miyazaki Y., Onuki Y., Yakou S., Takayama, K.: Int. J. Pharm. 324, 144 (2006).
45. Fredenberg S., Wahlgren M., Reslow M., Axelsson A.: Int. J. Pharm. 415, 34 (2011).
46. Cussler E. L. (ed.): *Diffusion-Mass Transfer in Fluid System*, druhé vydání. Cambridge University Press 1997.
47. Wischke Ch., Schwendeman S. P.: Int. J. Pharm. 364, 298 (2008).
48. Kang J., Schwendeman S. P.: Macromolecules 36, 1324 (2003).
49. Karlsson O. J., Stubbs J. M., Karlsson L. E., Sundberg D. C.: Polymer 42, 4915 (2001).
50. Jonnalagadda S., Robinson D. H.: AAPS PharmSci-Tech 1, 29 (2000).
51. Ryu W., Huang Z., Prinz F. B., Goodman S. B., Fashing R.: J. Controlled Release 124, 98 (2007).
52. Lu B., Zhang J. Q., Yang H.: Int. J. Pharm. 265, 1 (2003).
53. Heller J.: Biomaterials 1, 51 (1980).
54. Das M. K., Rao K. R.: Indian J. Pharm. Sci. 69, 244 (2007).
55. Crowley M. M., Schroeder B., Fredersdorf A., Obara S., Talarico M., Kucera S., McGinity J. W.: Int. J. Pharm. 269, 509 (2004).
56. Neut D., van de Belt H., van Horn J. R., van der Mei H. C., Busscher H. J.: Biomaterials 24, 1829 (2003).
57. Freytag T., Dashevsky A., Tillman L., Hardee G. E., Bodmeier R.: J. Controlled Release 69, 197 (2000).
58. Jeyanthi R., Thanoo B. C., Mehta R. C., DeLuca P. P.: J. Controlled Release 38, 235 (1996).
59. Belbella A., Vauthier C., Fessi H., Defissagnet J. P., Puisieux F.: Int. J. Pharm. 129, 95 (1996).
60. Yang Y. Y., Chia H. H., Chung T. S.: J. Controlled Release 69, 81 (2000).
61. Capan Y., Woo B. H., Gebrekidan S., Ahmed S., DeLuca P. P.: J. Controlled Release 60, 279 (1999).
62. Sansdrap P., Moes A. J.: Int. J. Pharm. 98, 157 (1993).
63. Mao S., Shi Y., Li L., Xu J., Schaper A., Kissel T.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 68, 214 (2008).
64. Yang Y. Y., Chung T. S., Ng N. P.: Biomaterials 22, 231 (2001).
65. Zambaux M. F., Bonneaux F., Gref R., Maincent P., Dellacherie E., Alonso M. J., Labrude P., Vigneron C.: J. Controlled Release 50, 31 (1998).
66. Péan J. M., Venier-Julienne M. C., Boury F., Menei P., Denizot B., Benoit J. P.: J. Controlled Release 56, 175 (1998).
67. Miyazaki Y., Onuki Y., Yakou S., Takayama, K.: Int. J. Pharm. 324, 144 (2006).
68. Meng F. T., Ma G. H., Liu Y. D.: Colloids Surf., B 33, 177 (2004).
69. Chung T. W., Huang Y. Y., Liu Y. Z.: Int. J. Pharm. 212, 161 (2001).
70. Chung T. W., Huang Y. Y., Tsai Y. L., Liu Y. Z.: J. Microencapsul. 19, 463 (2002).
71. Sendil D., Gursel I., Wise D. L., Hasirci V.: J. Controlled Release 59, 207 (1999).
72. Durán N., Alvarenga M. A., Da Silva E. C., Melo P. S., Marcato P. D.: Arch. Pharm. Res. 31, 1509 (2008).
73. Bazzo G. C., Lemos-Senna E., Pires A. T. N.: Carbohydr. Polym. 77, 839 (2009).

J. Vysloužil, K. Dvořáková, M. Kejdušová, and M. Rabišková (*Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Preparation of Medicinal Microparticles by Solvent Evaporation Method**

Microparticles prepared from biodegradable and biocompatible polymers are a modern dosage form which has a high potential to fulfil requirements for controlled drug release. The solvent evaporation method is one of the most common methods used for preparation of microparticles. This method is cheap, fast and simple, especially in laboratory conditions. Its modifications allow to encapsulate many hydrophilic and hydrophobic pharmaceuticals including peptides, proteins and cytostatics. The method is based on emulsification of the polymer and drug in the continuous phase. The process then involves evaporation of the continuous phase and formation of a solid polymer matrix in which the drug is entrapped. The solid microparticles are collected and dried. The properties of the microparticles can be influenced by modification of the method, process variables or by formulation. Optimization of the process parameters is envisaged.