

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce

Studijní obor: Farmacie

Akademický rok: 2018/2019

Jméno: Jakub Jaworski

Granulometrická charakterizace nanočástic metodou PCS

Granulometric characterisation of nanoparticles by the PCS method

Jakub Jaworski

Diplomová práce
2018/2019

Školitel: doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

ABSTRAKT

V teoretické části prezentované diplomové práce je pojednáno o různých nanočásticích, jako jsou micely a liposomy, pevné lipidové nanočástice a polymerní nanočástice. Zvláštní pozornost je věnována kopolymeru PLGA. Jsou charakterizovány různé postupy přípravy nanočástic. Z přístupů k hodnocení nanočástic je vybráno měření jejich velikosti metodou PCS a měření zeta potenciálu. Experiment byl téměř jednoznačně zaměřen na studium vlivů různých faktorů na velikost a distribuci velikosti nanočástic z lineární PLGA a PLGA použité k větvení tripentarythritolu a kyseliny polyakrylové.

Klíčová slova: nanočástice, velikost, distribuce velikosti, zeta potenciál, monomer, zeta potenciál, interakce nanočástic

ABSTRACT

In the theoretical section of presented diploma thesis are discussed various nanoparticles such as micelles and liposomes, solid lipid nanoparticles and polymeric nanoparticles. Special attention was focused on copolymer PLGA. There are characterized different procedures in the preparation of nanoparticles. From the approaches for nanoparticles evaluation are chosen measuring size of nanoparticles and their zeta potential. The experiment was almost unambiguously focused on study of effect of different factors on nanoparticles size and distribution from linear PLGA and PLGA used for branching of tripentaerythritol and polyacrylic acid.

Keywords: nanoparticles, size, size distribution, zeta potential, interactions of nanoparticles

Prohlášení

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem psal samostatně pod odborným vedením svého školitele. Všechny použité zdroje nebo literaturu jsem řádným způsobem citoval. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 11. 5. 2019

Jakub Jaworski

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Milanu Dittrichovi, CSc. za trpělivost, čas a odborné vedení jak v oblasti teoretické, tak i při provádění experimentální části této práce.

Děkuji rodině za psychickou podporu během celého studia.

OBSAH

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÚVOD | 8 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 1 NANOČÁSTICE | 10 |
| 1.1 MICELY A LIPOSOMY | 10 |
| 1.2 PEVNÉ LIPIDOVÉ NANOČÁSTICE | 10 |
| 1.3 POLYMERNÍ NANOČÁSTICE | 11 |
| 1.3.1 PLGA..... | 11 |
| 1.4 VÝHODY PŘÍPRAVY NANOČÁSTIC..... | 12 |
| 2 LABORATORNÍ PŘÍPRAVA | 13 |
| 2.1 METODA DISPERZE PŘEDEM PŘIPRAVENÉHO POLYMERU..... | 13 |
| 2.2 METODA KOACERVACE | 14 |
| 2.3 POLYMERIZACE Z MONOMERŮ | 15 |
| 2.4 PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC – SUPERKRITICKÁ KAPALINOVÁ TECHNOLOGIE | 15 |
| 2.4.1 Rapid expansion of supercritical solution (RESS) | 16 |
| 2.4.2 Rapid expansion of supercritical solution into liquid solvent (RESOLV) | 16 |
| 2.4.3 Supercritical antisolvent (SAS)..... | 16 |
| 2.5 HODNOCENÍ NANOČÁSTIC..... | 16 |
| 2.5.1 Velikost částic | 17 |
| 2.5.2 Efektivita zachycování léčiv | 18 |
| 2.5.3 Zeta potenciál | 18 |
| II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 20 |
| 3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ | 21 |
| 4 PŘÍPRAVA FÁZÍ A NANOČÁSTIC | 22 |
| 4.1 VNITŘNÍ FÁZE | 22 |
| 4.2 VNĚJŠÍ FÁZE..... | 22 |
| 4.3 PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC..... | 22 |
| 5 VÝSLEDKY, TABULKY A GRAFY | 23 |
| 6 DISKUZE | 92 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.1 | OBECNÉ POZNÁMKY | 92 |
| 6.2 | NANOČÁSTICE PŘIPRAVENÉ Z POLYESTERŮ S RŮZNOU ARCHITEKTUROU MOLEKULY..... | 92 |
| 6.3 | STABILITA VELIKOSTI NANOČÁSTIC PŘIPRAVENÝCH Z POLYESTERŮ S RŮZNOU ARCHITEKTUROU MOLEKULY..... | 92 |
| 6.4 | VLIV POLYMERU A KONCENTRACE TENZIDU NA VELIKOST NANOČÁSTIC..... | 93 |
| 6.5 | VLIV POLYMERU A JEHO KONCENTRACE NA VELIKOST NANOČÁSTIC..... | 93 |
| 6.6 | VLIV KONCENTRACE EMULZE A CETRIMIDU NA VELIKOST A STABILITU VELIKOSTI NANOČÁSTIC PŘIPRAVENÝCH V HOMOGENIZÁTORU..... | 93 |
| 6.7 | VLIV LECITHINU V NANOČÁSTICÍCH NA JEJICH VELIKOST | 94 |
| 6.8 | VLIV INTENZITY DISPERGACE ULTRAZVUKEM NA VELIKOST NANOČÁSTIC | 94 |
| 6.9 | VLIV MAXIMÁLNÍ INTENZITY ULTRAZVUKU NA VELIKOST NANOČÁSTIC..... | 94 |
| 6.10 | VLIV KONCENTRACE EMULZE NA VELIKOST NANOČÁSTIC PŘIPRAVENÝCH DISPERGACÍ V HOMOGENIZÁTORU | 95 |
| 6.11 | VLIV SLOŽENÍ ROZPOUŠTĚDLA NA VELIKOST NANOČÁSTIC..... | 95 |
| 6.12 | VLIV INTENZITY HOMOGENIZACE A KONCENTRACE TERBINAFINU NA VELIKOST NANOČÁSTIC..... | 95 |
| 6.13 | VLIV POLYMERU ZALOŽENÉHO NA VĚTVENÍ KYSELINY POLYAKRYLOVÉ NA VELIKOST NANOČÁSTIC..... | 96 |
| 6.14 | VLIV KONCENTRACE EMULGÁTORU EDA NA VELIKOST A ZETA POTENCIÁL NANOČÁSTIC Z NOSIČŮ PLGA A A4 | 96 |
| 6.15 | VLIV KONCENTRACE EMULGÁTORU EDA NA VELIKOST A ZETA POTENCIÁL NANOČÁSTIC | 96 |
| 7 | ZÁVĚRY | 97 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 98 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A ZKRATEK | 102 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 103 |
| | SEZNAM TABULEK | 104 |
| | SEZNAM GRAFŮ..... | 105 |

ÚVOD

Nanotechnologie je relativně mladou disciplínou, ale zároveň jednou z nejrychleji se rozvíjejících odvětví moderního průmyslu. Zasahuje velkou měrou do lidské pracovní a výrobní činnosti. Má využití v praxi od medicíny, farmacie, přes textilní průmysl až po armádní materiály a aplikace. Právě zde se setkáváme se strukturami a částicemi o velikosti ne větší, než 10^{-7} a v oblasti medicíny a farmacie pak 10^{-6} metru.

U nanotechnologií nelze zapomenout na jejich současný i budoucí význam pro medicínu, farmaceutický průmysl a výzkum. Ve farmacii je možné využití nanočástic k transportu léčiv, s velkým interakčním potenciálem či vysokým počtem hlášených nežádoucích účinků. Potenciální význam mohou mít nanočástice při diagnostice a genové terapii. Velmi nadějně se ukazuje i použití tzv. cíleně naváděných nanočástic, které díky specifické povrchové úpravě jsou schopny navázat se na specifické receptory či struktury cílených buněk (28).

Rychle se vyvíjející moderní technologie s sebou nesou i celou řadu problémů a rizik. Tak tomu je např. i u nanotechnologií, kdy během zpracování a výroby je člověk vystaven nadměrnému počtu těchto částic, které mohou být rizikem pro jeho zdraví. Nejčastěji zasaženým orgánem jsou plíce, kde nanočástice mohou vyvolat akutní exacerbaci u nemocných s astmatem či CHOPN (31).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NANOČÁSTICE

Specifickou definici nanočástic lze nalézt nejčastěji v biologických a lékařských vědách, z jejichž pohledu se jedná o částicové disperze či pevné částice s velikostí od 10 do 1.000 nanometrů. (1) Nejčastějšími nanočásticemi jsou dle Westa (28):

- Micely
- Liposomy
- Pevné lipidové nanočástice
- Polymerní nanočástice
- Dendrimery
- Krystalové nanočástice

1.1 Micely a liposomy

Micely a liposomy jsou tvořeny fosfolipidy a rozdíl mezi těmito dvěma nanočásticemi je v počtu fosfolipidových vrstev. Jednou vrstvou fosfolipidů je tvořena micela, u které se nachází hydrofilní část na vnějším okraji, zatímco hydrofobní část je umístěna ve vnitřní části této nanočástice. Díky tomu je možné micely využít jako nosiče pro lipofilní léčivo. (5)

Naopak liposomy jsou tvořeny dvojvrstvami fosfolipidů a na vnější i vnitřní hranici se nachází hydrofilní část. Uvnitř nanočástice nalezneme vodné prostředí, kterého lze využít pro transport hydrofilních léčiv. Pro lipofilní léčivo lze liposom také využít, protože v jeho dvojvrstvě se nachází lipofilní prostor, který je právě pro toto léčivo vhodný. (5)

1.2 Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové nanočástice jsou specifické fosfolipidovým obalem, který obaluje pevné lipidové jádro této nanočástice. Z toho vyplývá, že je možné je využít jen pro lipofilní léčiva. Jejich vlastnosti – vyšší stabilita a menší toxicita než jiné polymerové nanočástice znamenají pro pevné lipidové nanočástice výhody z hlediska využití. (20) Pevné lipidové nanočástice lze rozdělit dle typu modifikovaných pevných částic takto:

Amorfní typ – vyšší stabilita transportovaného léčiva díky kombinaci pevných triglyceridů s tekutými triglyceridy středně dlouhých řetězců.

Imperfektní typ – inkorporace většího množství léčiva vzhledem k prostorově rozdílným tukům.

Složený typ – lepší rozpustnost léčiv díky obsahu kapalné olejové příměsi. (24)

1.3 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice je možné rozlišit dle systému uložení léčiva na dva typy, a to nanosféry a nanokapsule. Nanosféra přenáší látku částicí, která je dispergována v celém objemu polymerní sítě. Nanokapsule uzavřou přenášenou látku ve svém vnitřním jádru, tím dochází k oddělení látky od vnějšího prostředí. (11) Polymery, které jsou využívány nejčastěji, jsou: PCL, PEG, PLA, PLGA, T3 a chitosan.

Z výše vyjmenovaných je nejvyužívanější PLGA.

1.3.1 PLGA

Jedná se o kopolymer skládající se ze dvou α -hydroxykyselin:

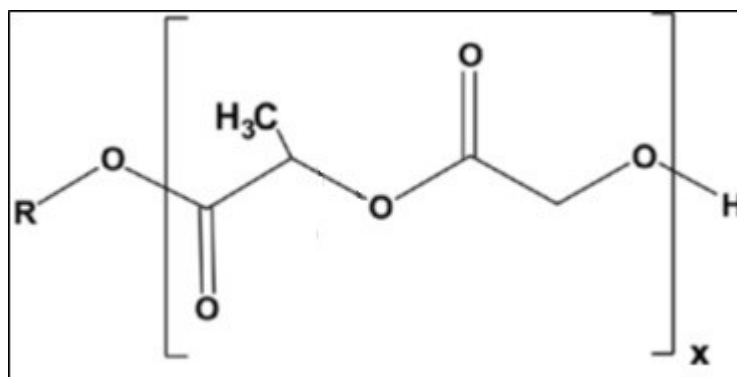
- kyselina mléčná
 - obsahuje chirální uhlíkový atom,
 - dvě formy kyseliny D-forma a L-forma,
 - L- forma obecně krystalická
 - D-forma amorfní
- kyselina glykolová
 - vysoce krystalická struktura

V kopolymeru PLGA se nachází obě formy kyseliny mléčné ve stejném poměru. (9)

Použitím racemické směsi kyseliny mléčné a glykolové dochází k syntéze PLGA. V průběhu polymerace dochází mezi monomery k tvorbě esterové vazby, a tak vzniká lineární, amorfní polyester. Formy PLGA se liší poměrem monomerů, kdy PLGA 40:60 značí 40% obsah kyseliny mléčné a 60% obsah kyseliny glykolové. Ovšem čím více je zastoupena kyselina mléčná, tím nižší stupeň krystalinity kopolymeru. (26)

V případě, že má PLGA poměr kyselin 50:50, pak je teplota skleného přechodu 45°C, což je nad fyziologickou teplotou, která je 37°C. Teplota skleného přechodu klesá s poklesem obsahu kyseliny mléčné. Mechanickou pevnost PLGA ovlivňuje molekulová hmotnost a index polydisperzity. Výhodou tohoto poměru je nejrychlejší hydrolyza vůbec. (12)

Znázornění struktury PLGA se nachází na obrázku:



Obrázek 1 Struktura PLGA (25)

Výhodou PLGA je dobrá odbouratelnost a biokompatibilita, a je také snadno komerčně dostupný. Jako nosič léčiv je vhodný pro antipsychotika, anestetika, antibiotika, antiparazitika, hormony a protinádorové látky. (25)

1.4 Výhody přípravy nanočástic

Nanočástice jako nosiče léčiv mohou mnohdy zjednodušit přípravu přípravku na léčení, protože do nich lze inkorporovat léčiva hydrofilní a také hydrofobní. Cílenou distribucí léčiva na specifické místo v lidském těle může dojít k přispění k redukci podávané dávky, čímž se sníží vedlejší a nežádoucí účinky léčiva. (9)

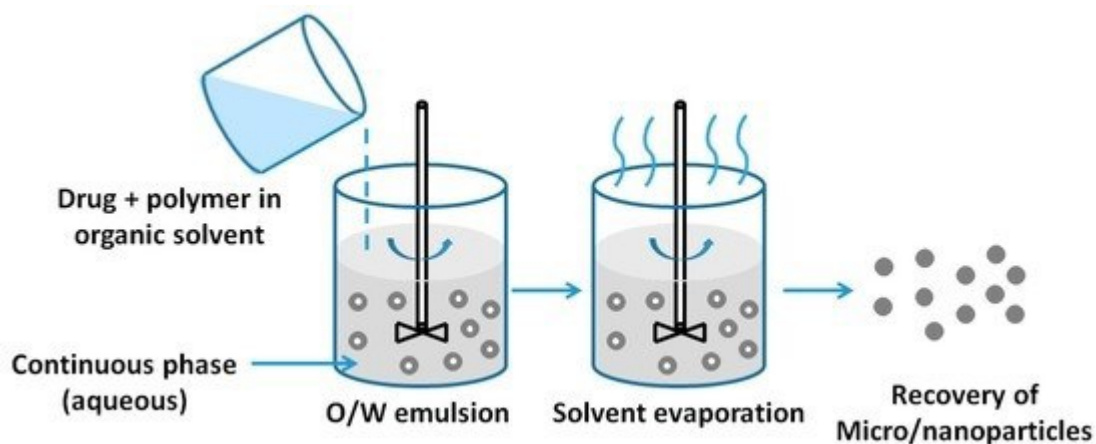
2 LABORATORNÍ PŘÍPRAVA

Z látek přírodního původu, ale také látek z chemické syntézy lze připravit nanočástice, je ovšem nutné zvolit vhodnou surovinu na základě vlastností a kritérií, které jsou vyžadovány. Musí se tedy řídit dle požadovaných výsledných velikostí částic, povrchových vlastností a také schopnosti rozpouštět se ve vodě, dále dle míry toxicity a kompatibility s živým organismem, a nutné je znát i biologickou odbouratelnost. Také schopnost působit jako antigen a schopnost pozvolného uvolňování léčiva je jedním z kritérií výběru vhodné suroviny k vytvoření požadované nanočástice. K získání nanočástice je možné využít tři nejčastějších postupů, a to disperze předem připraveného polymeru, metoda koacervace, a polymerizace z monomerů. (20)

2.1 Metoda disperze předem připraveného polymeru

Při volbě metody disperze předem připraveného polymeru existují dva postupy přípravy – odpařování rozpouštědla nebo spontánní emulgace.

První metoda znamená, že se polymer nechá rozpustit v rozpouštědle, které by mělo být těkavé a také organické, může se jednat o ethylacetát nebo ethylmethyleketon. Kapalina, která je dokonale rozpuštěna, se přidá do vodného roztoku s příměsí emulgátoru (o/v). Tím dojde k homogenizaci emulze s cílem vytvoření co nejjemnější disperze. Použitím magnetické míchačky dojde při míchání k postupnému odpařování daného rozpouštědla. (18) Poté dojde pomocí ultracentrifugace k extrahování vzniklé částice. Postup je často využíván při zpracování biologicky odbouratelných polymerů: PCA, PLA, PLGA, PLG a T3. Metoda je možné také pro zpracování lipofilního léčiva do vzniklé částice, kdy je nutné léčivo přidat k rozpouštěnému polymeru, který obsahuje organické rozpouštědlo, a tím se vytvoří emulze o/v. Tento postup již není možné ale využít pro hydrofilní léčiva, u těch je potřeba připravit složenou emulzi v/o/v, pro obsah léčiva ve vnitřní vodné fázi. Postup pro tvorbu hydrofilního léčiva je následovný: do organického rozpouštědla s emulgátorem v/o se přidá vodný roztok s léčivem, a do této vzniklé emulze se přidá vodný roztok s emulgátorem o/v, čímž vznikne složená emulze v/o/v. Výsledkem metody jsou kvalitní produkty, nevýhodou ovšem je náročnost z hlediska času, kdy je nutné čekat na odpařování rozpouštědla. (19)



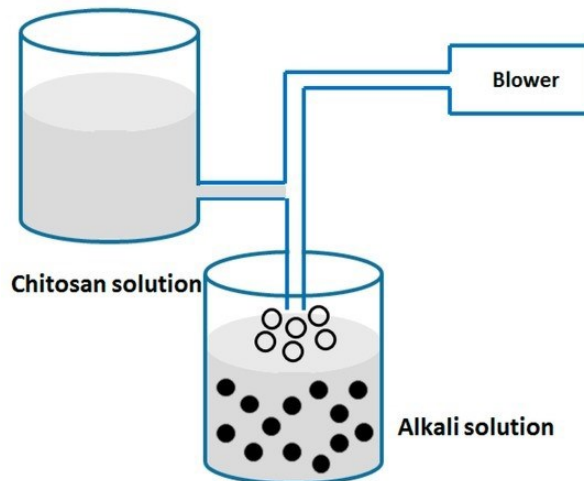
Obrázek 2 Metoda odpařování rozpouštědla (26)

Spontánní emulpace představuje metodu modifikovanou z metody odpařování rozpouštědla, kdy je využíváno mezipovrchových turbuletních proudů, které vznikají mezi hydrofilní a hydrofobní fází a to při vzájemném smíchání. V hydrofobní fázi je použito léčivo, polymer, organické rozpouštědlo (mísitelné s vodou) a malé množství rozpouštědla, které není mísitelné s vodou. Oproti předchozí metodě je tento způsob získávání nanočástic časově nenáročný. (16)

2.2 Metoda koacervace

Při této metodě je využíváno přírodních odbouratelných polymerů, které mohou být získány z mořských řas (alginát sodný), krunýřů korýšů (chitosan) a zbytků zvířat z jatek (želatina). (6)

Metoda je při tvorbě nanočástic na bázi chitosanu úspěšná, spočívá v interakci mezi pozitivně nabitými molekulami chitosanu ve vodném roztoku s negativně nabitými skupinami vodného roztoku tripolyfosfátu sodného. (29) Chitosan se do roztoku přidává již na začátku přípravy v případě, že chceme do nanočástice zapracovat léčivo.



Obrázek 3 Metoda koacervace (26)

2.3 Polymerizace z monomerů

Metoda polymerizace je oblíbená z důvodů rychlosti získání požadovaného výsledku. Využívání organické fáze jako vnější fáze se kvůli použití velkého množství potenciálně toxických chemikálií jako organických rozpouštědel, povrchově aktivních látek a emulgátorů netěší takové oblibě. Metoda byla používána pro přípravu polyakryamidové nanosféry. Ovšem použitím vody jako vnější fáze je možné rozdělení na dvě metody – konvenční a bez použití emulgátoru. (4)

Konvenční metoda využívá málo rozpuštěného polymeru, který se disperguje ve vodném prostředí za přítomnosti emulgátoru a také radikálového iniciátoru. Polymerizace probíhá v micelách, které vznikají solubilizováním molekul monomeru. Takto vzniklé částice je nutné oddělit centrifugací a vyčistit. Velikost nanočástice je po vyčištění přibližně stejné velikosti, což je výhodou této metody. (19)

Metoda bez použití emulgátoru je metoda, kdy se rozpustí monomer ve vnější fázi. Použitím iniciačního činidla, iontu nebo radikálu dojde k polymerizaci, kterou lze vyvolat i použitím vysokoenergetického záření. K separaci a formování částic při této metodě může dojít před polymerizací nebo až po ní. Nevýhodou metody bez použití emulgátoru je polydisperzita nanočástic, které tímto procesem vznikly. (19)

2.4 Příprava nanočástic – superkritická kapalinová technologie

Výše popsané metody využívají pro získání nanočástic organická rozpouštědla, ta ovšem nemusí být vždy bezpečná a mohou představovat ekologická i fyziologická rizika.

Metoda využití technologie superkritických kapalin však tato rizika nenese. Za superkritickou kapalinu lze považovat látku, která má teplotu i tlak nad kritickou hodnotou a má vlastnosti, které jsou typické pro plyn i kapalinu. Může se jednat o superkritický CO₂, jež se vyznačuje těmito vlastnostmi: absence toxicity, nehořlavost, nízká cena. (30)

Existují tři techniky zpracování: RESS, RESOLV a SAS.

2.4.1 Rapid expansion of supercritical solution (RESS)

Jedná se o techniku, při které je využíváno rozpouštění polymeru v superkritické kapalině, která je následně rozprašována tryskou do vzduchu v okolí. K homogenní nukleaci a tvorbě částic dochází díky vysokému stupni nasycení a velmi rychlému snížení tlaku při rozptylu. Takto vzniklé částice jsou v řádech mikro a nanometrů. (27)

2.4.2 Rapid expansion of supercritical solution into liquid solvent (RESOLV)

Technika je založena na podobném principu jako technika RESS, ovšem nedochází k rozprašování tryskou do okolního vzduchu, ale je rozprašováno do tekutého média, čímž se omezí tvorba větších částic a tak vznikají primárně nanočástice. (15)

2.4.3 Supercritical antisolvent (SAS)

Při využití této techniky je nutné používat kapalné rozpouštědlo, kterým bývá nejčastěji metanol. Tekuté rozpouštědlo se mísí se superkritickou tekutinou a zároveň dochází k rozpouštění polymeru, který by se pouze v superkritické kapalině nerozpustil. Tímto spojením dochází k okamžité precipitaci a tvorbě nanočástic. (10)

2.5 Hodnocení nanočástic

Pro hodnocení kvality nanočástic a jejich suspenze je možné zvolit několik kritérií:

- Velikost částic
- Tvar částic
- Efektivita inkorporace léčiva
- Zeta potenciál

Na základě těchto kritérií může dojít k vyhodnocení predikce chování částice v lidském těle, určení stability vzniklého systému nebo schopnosti navázání látek na sebe. (17)

2.5.1 Velikost částic

Nejdůležitějším kritériem pro výrobu nanočástic je právě jejich velikost, protože díky ní je možné určit toxicitu, distribuci léčivé látky v organismu a schopnost cílení na vybrané struktury nacházející se v lidském organismu. (17) Velikost a tvar nanočástice můžou ovlivňovat efektivitu enkapsulace, a také vedlejší účinky. Optimální profil uvolňování je dosažen pomocí mikrosfér s rozměry od 10–200 μm . U menších částic je riziko fagocytování imunitními buňkami. U částic nad hranicí optimálních rozměrů může dojít k odpovědi imunitního systému a vznikne zánět. Delší účinek léčiva se nachází u částic větší velikosti, protože v sobě mají vyšší množství léčiva. (3, 9, 13, 14)

Velikost nanočástic je možné měřit pomocí optické metody dynamického rozptylu světla, kdy emitor generuje laserový paprsek, který prochází kyvetou a je rozptylován povrchem částic uvnitř měřeného kapalného vzorku. Díky Brownovu pohybu částic během měření dochází k zeslabování a zintenzivňování rozptylu. Rychlost pohybu nanočástic ovlivňuje jejich velikost, čím je nanočástice menší, tím rychleji se bude pohybovat a bude docházet také k větším změnám intenzity, což je zachyceno na detekčním zařízení, které je umístěno v 90 a 173 stupních oproti laserovému paprsku. Naměřené hodnoty se zpracovávají dosazením do Stokes-Einsteinovy rovnice (23):

Rovnice 1 Stokes-Einsteinova rovnice (23)

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d} \rightarrow d = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

D- translační difuzní koeficient

k- Boltzmannova konstanta

T - absolutní teplota

d- hydrodynamický průměr částice

H- viskozita disperzního prostředí

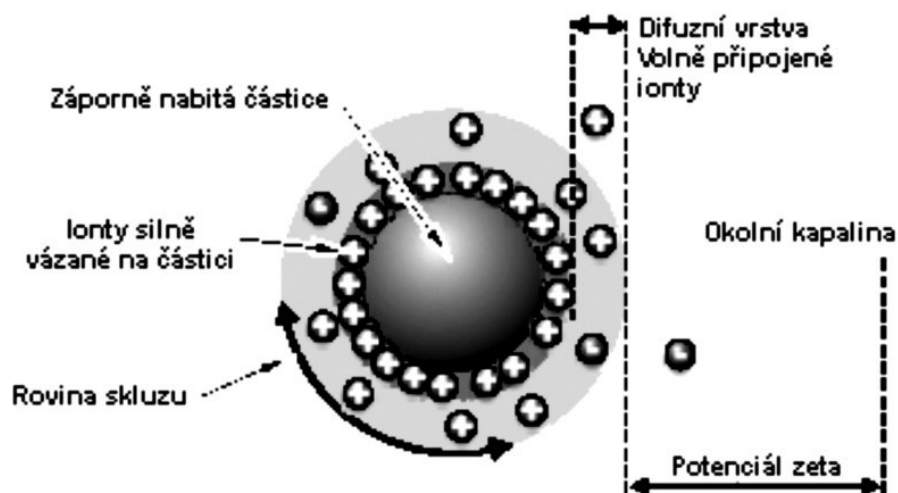
Výhodou optické metody dynamického rozptylu světla je snadná ovladatelnost a obsluha zařízení, rychlost měření v řádech minut a není také nutné před každým měřením přístroj kalibrovat. (23) K tomuto měření je využíváno přístroje Zetasizer nano ZS firmy Malvern.

2.5.2 Efektivita zachycování léčiv

Použitím ultracentrifugace dochází k separaci nanočástic od vnější vodné fáze. K roztoku fosfátového pufru s pH hodnotou 7,4 je přidána dekantovaná kapalina, která se utvořila nad sedimentem, a tento postup se několikrát opakuje. Množství léčiva, které je obsaženo ve vodné fázi, se určí pomocí analytických metod, a srovnává se s množstvím léčiva, které se použilo při přípravě. Výsledkem je procentuální hodnota efektivit zachycení. (21)

2.5.3 Zeta potenciál

Zeta potenciál je nutné znát z technologického hlediska kvůli míře stability pro připravenou disperzi nanočástic ve vodném prostředí. Parametr vykazuje hodnoty v milivoltech (mV) a může být v kladných i záporných hodnotách. Jedná se o potenciál na tzv. rovině skluzu. (8)



Obrázek 4 Záporně nabitá částice ponořená do kapaliny (14)

Nanočástici s kladným či záporným nábojem obklopuje vrstva iontů, které jsou náboje opačného, a tato vrstva, označovaná jako Sternova vrstva, povrch částice pevně obklopuje. Kolem Sternovy vrstvy se pohybují širší vrstvy iontů, které již nejsou tak silně k částici přitahovány, ale stále ji následují v případě pohybu. Překročením určité hranice nazývané rovinou skluzu se však stane, že ionty částici následovat nebudou. Elektrický potenciál, který se v této hranici nachází je potenciál zeta. (2) Za stabilní potenciál zeta označujeme hodnoty méně než -30mV a nebo více než 30mV , v těchto hodnotách nehrozí nežádoucí shluky. (7) K měření zeta potenciálu je využívána laserová dopplerova velocimetrie, která je vhodná k měření rychlosti přesunu iontů v elektrodě, která má opačný náboj, a to pomocí rozptylu

laserového světla procházejícího speciální celou. Získanou hodnotu je nutné opět dosadit do vzorce pro výpočet zeta potenciálu (22):

Rovnice 2 Výpočet pohyblivosti částic (22)

$$U = \frac{\lambda * Vd}{2 * E * n * \sin(\frac{\theta}{2})}$$

U - pohyblivost částic

Vd - frekvenční posun

λ - vlnová délka

E - síla elektrického pole

n - index lomu prostředí

θ - úhel rozptylu světla

Rovnice 3 Výpočet zeta potenciálu (22)

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon} U$$

ζ - zeta potenciál

η - viskozita prostředí

ε - permitivita

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ

- Magnetická míchačka IKA – WERKE RT, 100 – 1000 ot./min



Obrázek 5 Magnetická míchačka (32)

- Homogenizátor Diax 900 Heidolph, 8000- 26000 ot. / min., 6 pásem
- Zetasizer ZS, Malvern Instruments, UK Zetasizer ZS 90
- Váhy Kern 440-35N, max 400 g, d = 0,01 g
- Analytické váhy Kern, max 220 g, d = 0,0001 g



Obrázek 6 Analytická váha Kern (33)

- Stopky DS 35 ZPA PRAGOTRON

4 PŘÍPRAVA FÁZÍ A NANOČÁSTIC

Fáze je rozdělena na dvě části – vnitřní fázi a vnější fázi.

4.1 Vnitřní fáze

Potřeby:

- kádinka 25ml
- polymer (T3, PLGA)
- organické rozpouštědlo

Do kádinky je navážen připravený polymer, který se rozpustí v organickém rozpouštědle (DMSO, EMK, ACET, EtAC). Koncentrace vzniklých roztoků je 1% nebo 3% polymeru. Pro přípravu 20% emulze je potřeba 10g vnitřní fáze, u 10% emulze je množství vnitřní fáze stanoveno na 5g. U vzorků, které obsahovaly léčivé látky, se ve vnitřní fázi rozpustila předem vytvořená volná báze terbinafinu.

4.2 Vnější fáze

Potřeby:

- Emulgátor
- Čištěná voda
- Homogenizátor
- Magnetická míchačka

Potřebný emulgátor o koncentraci 2%, 1%; 0,6%; 0,3%; 0,2%; 0,1% se naváží do 100ml. Tento emulgátor se rozpustí ve vodě, a pro 20% emulzi je množství vnější fáze 40g, u 10% emulze 45g.

4.3 Příprava nanočástic

V této části postupu je využit homogenizátor, kdy do kádinky s vnější fází je umístěna hlavice jeho turbíny asi 0,5cm pod hladinu. Poté se homogenizátor spustí a stupeň otáček se stanoví na nejmenší. Následuje přidání vnitřní fáze a spuštění přístroje na maximální výkon po dobu 30 vteřin. Tímto procesem vznikne směs, kterou je potřeba 2 hodiny míchat na magnetické míchačce. Až poté je možné změřit velikost vzniklých částic a jejich zeta potenciál.

5 VÝSLEDKY, TABULKY A GRAFY

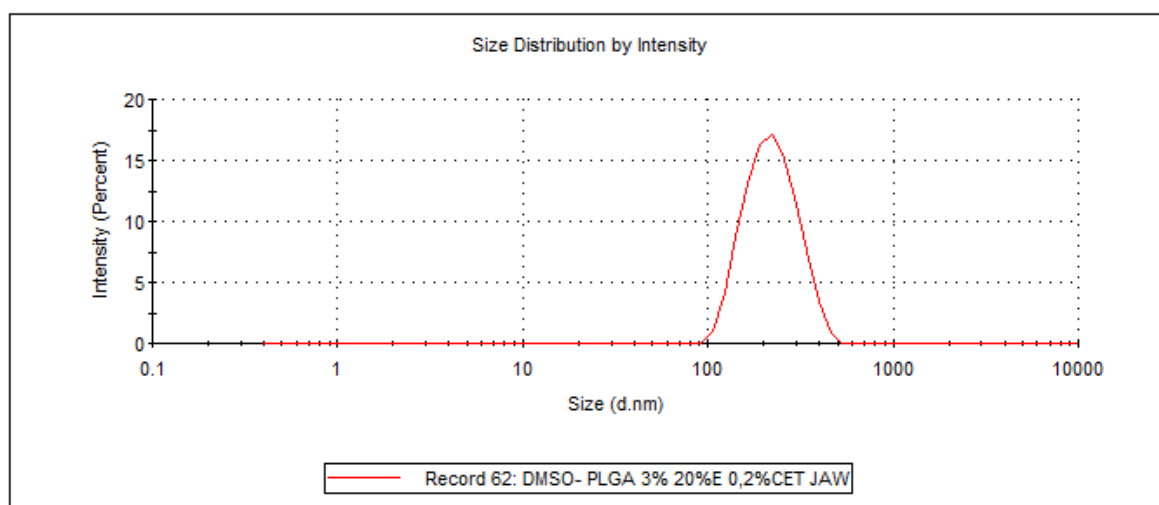
V následující části diplomové práce jsou uvedeny výsledky experimentální části, obsahující tabulky s výsledky testů a grafy s průběhy křivek vzorků.

Tabulka 1 Výsledky ukazatele Z-Ave u vzorků 1-4

| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 1. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 227,6 | 0 | 206,6 |
| 2. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 194,6 | 0 | 180,9 |
| 3. | PLGA 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 187,2 | 0 | 169 |
| 4. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 138,2 | 0 | 125,2 |

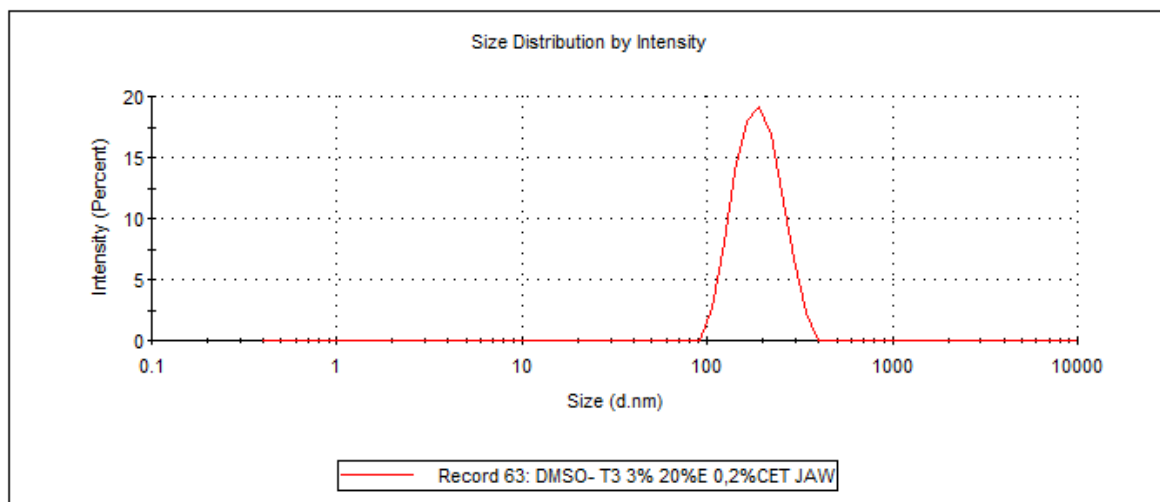
Frekvenční křivka vzorek č. 1

Vzorek číslo 1 dosáhl nejvyšší hodnoty ze 4 zkoumaných vzorků, jeho průběh je znázorněn na grafu:



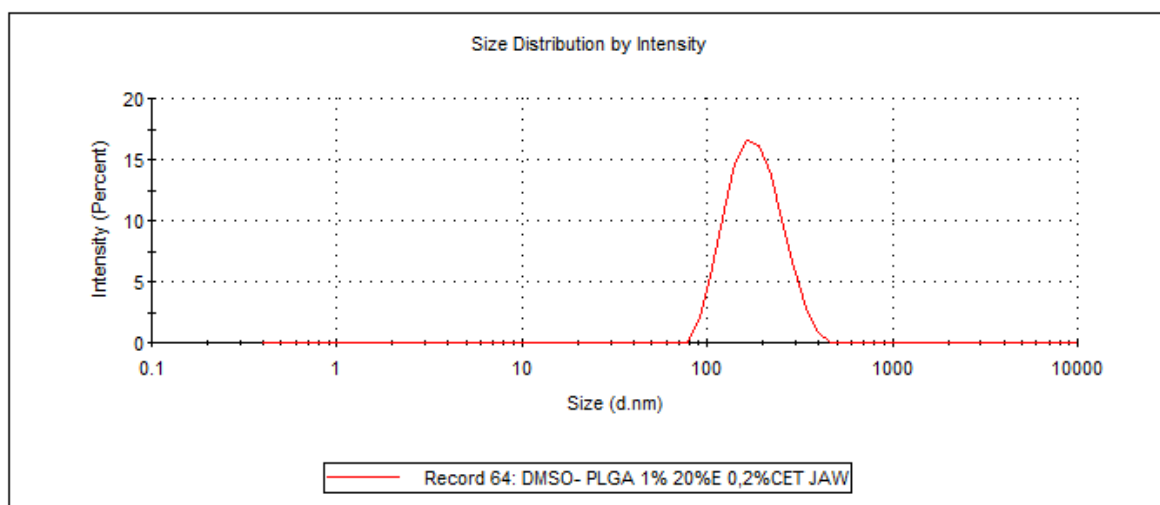
Graf 1 Frekvenční křivka vzorek č. 1

Frekvenční křivka vzorek č. 2



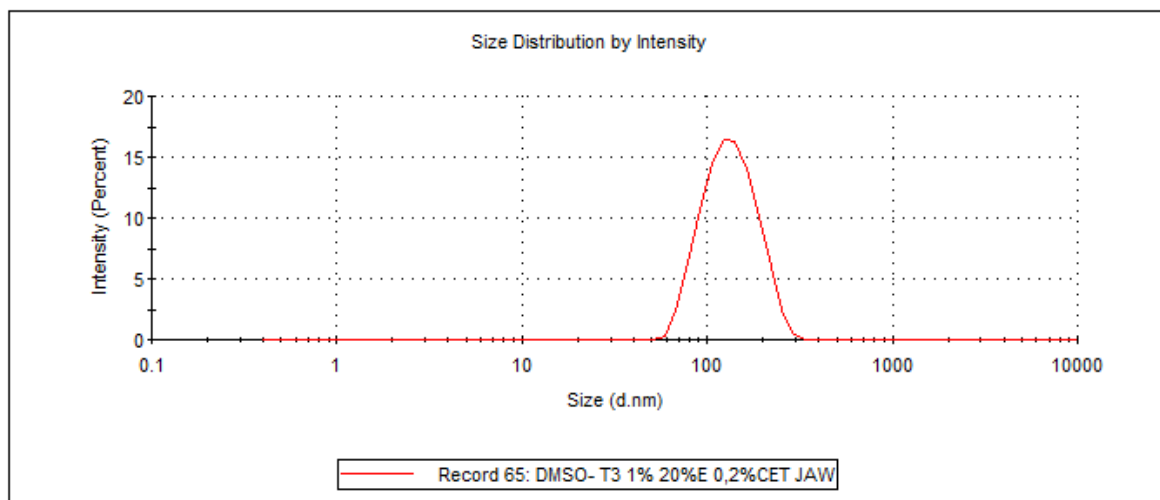
Graf 2 Frekvenční křivka vzorek č. 2

Frekvenční křivka vzorek č. 3



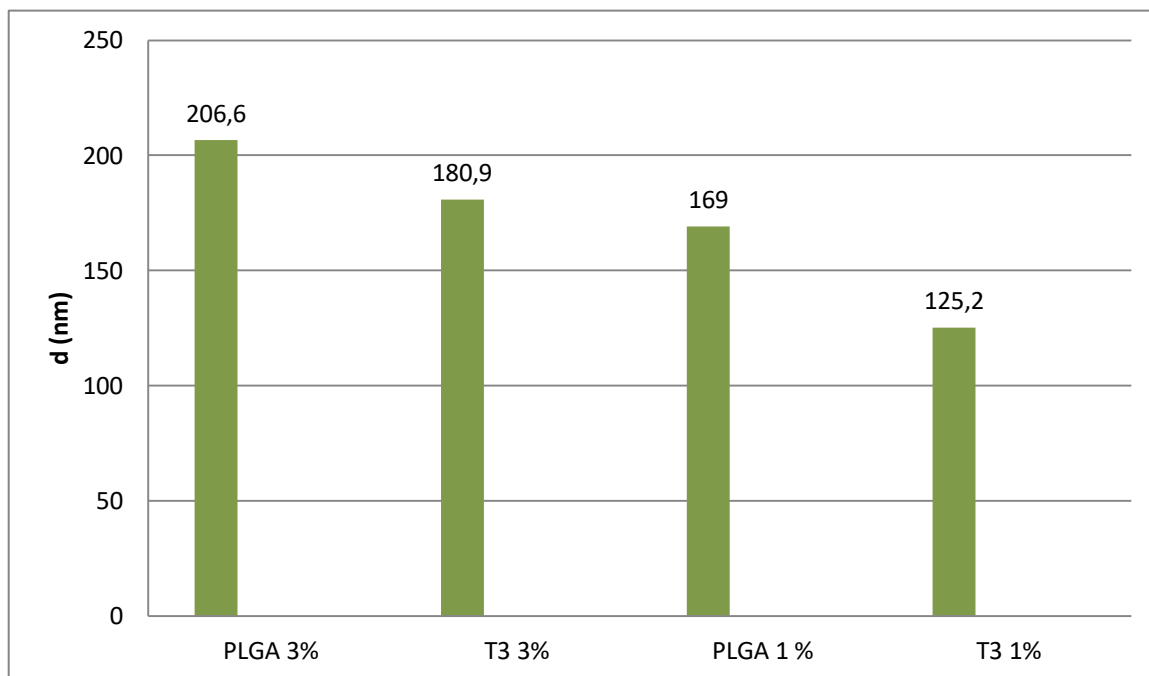
Graf 3 Frekvenční křivka vzorek č. 3

Frekvenční křivka vzorek č. 4



Graf 4 Frekvenční křivka vzorek č. 4

Vliv koncentrace polymeru (PLGA a T3) na velikost částic

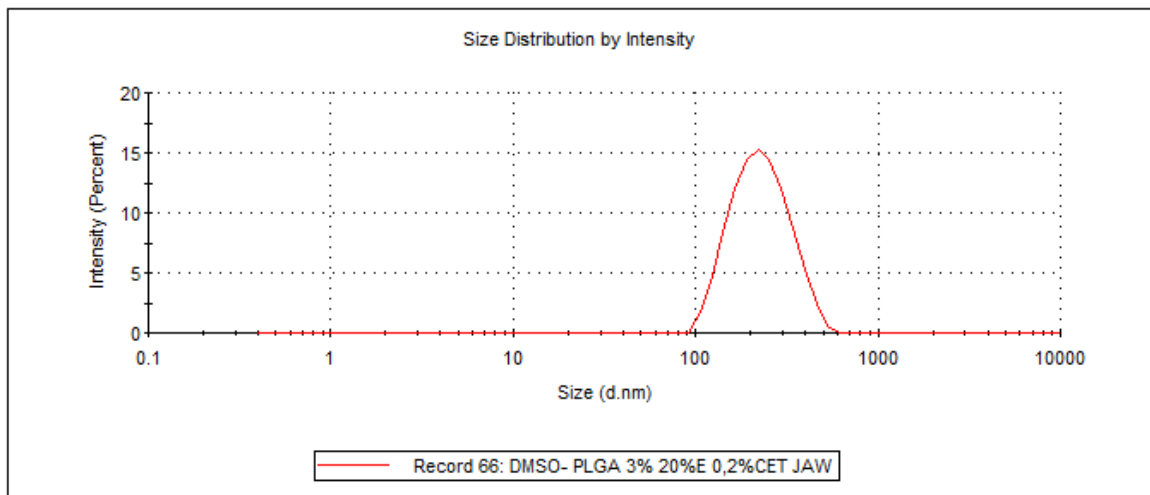


Graf 5 Vliv koncentrace PLGA a T3 na velikost částic

Tabulka 2 Výsledky ukazatele Z-Ave na vzorku 5-8

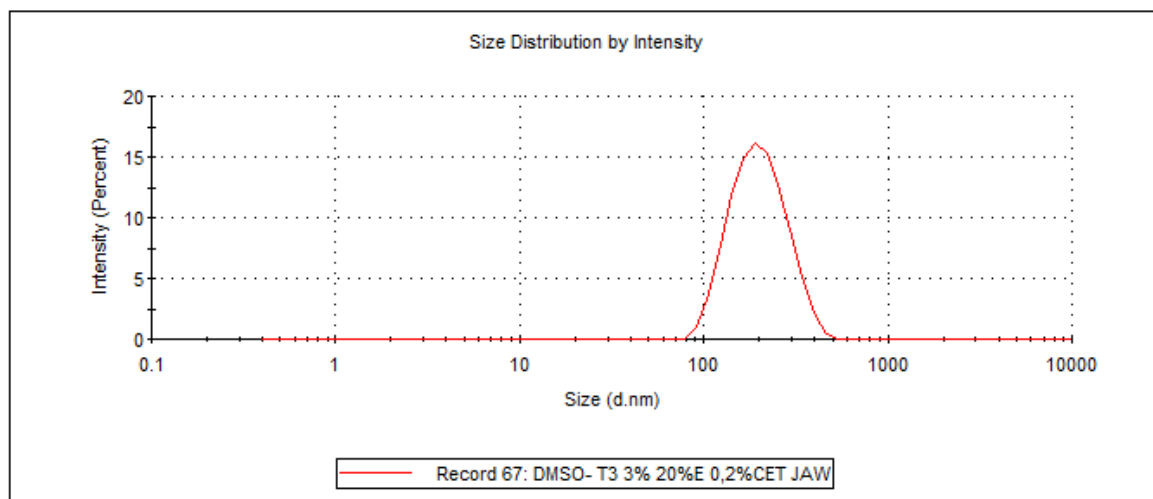
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 5. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 237,5 | 0 | 211,5 |
| 6. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 207,1 | 0 | 186,1 |
| 7. | PLGA 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 190,5 | 0 | 174,7 |
| 8. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 143 | 0 | 129,1 |

Frekvenční křivka vzorek č. 5



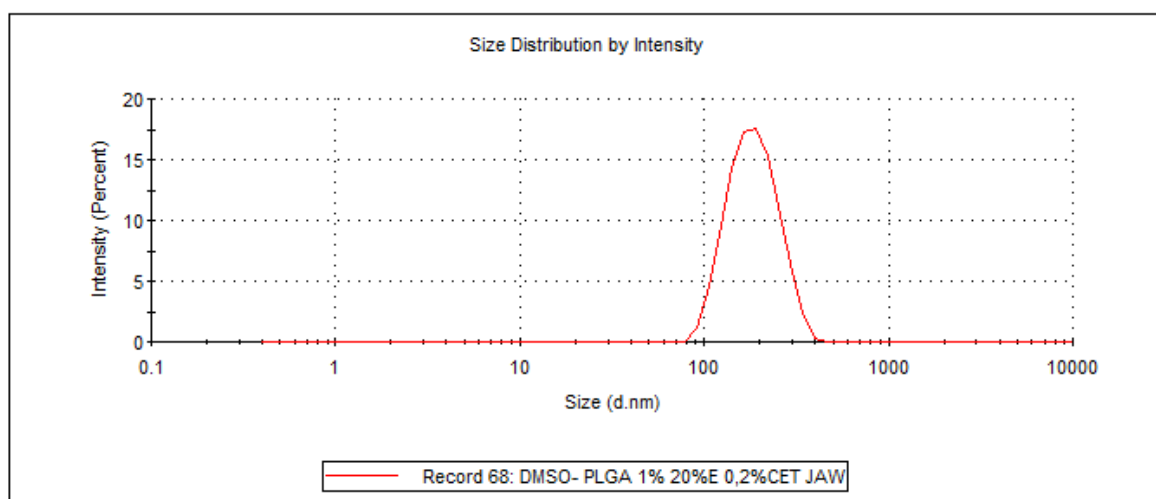
Graf 6 Frekvenční křivka vzorku č. 5

Frekvenční křivka vzorek č. 6



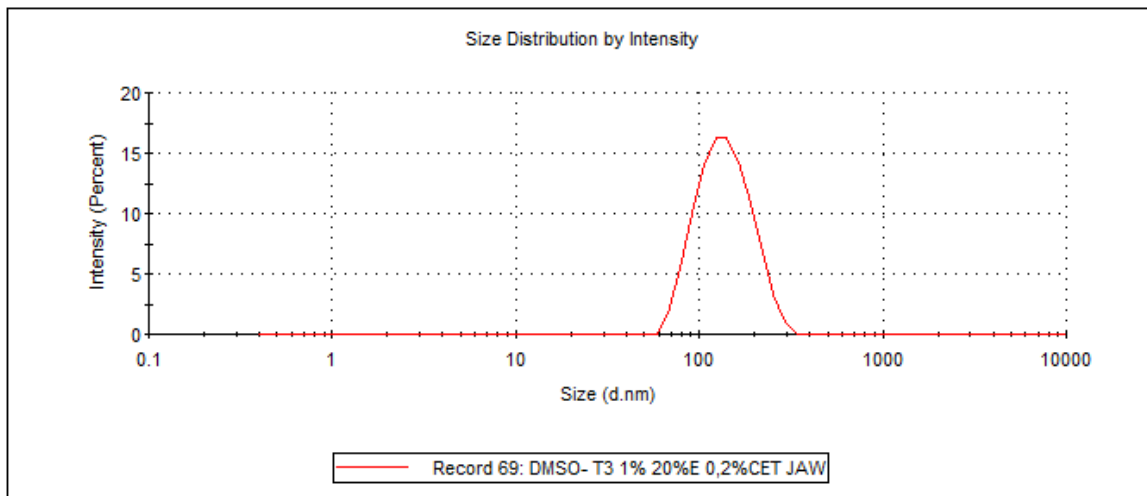
Graf 7 Frekvenční křivka vzorku č. 6

Frekvenční křivka vzorek č. 7



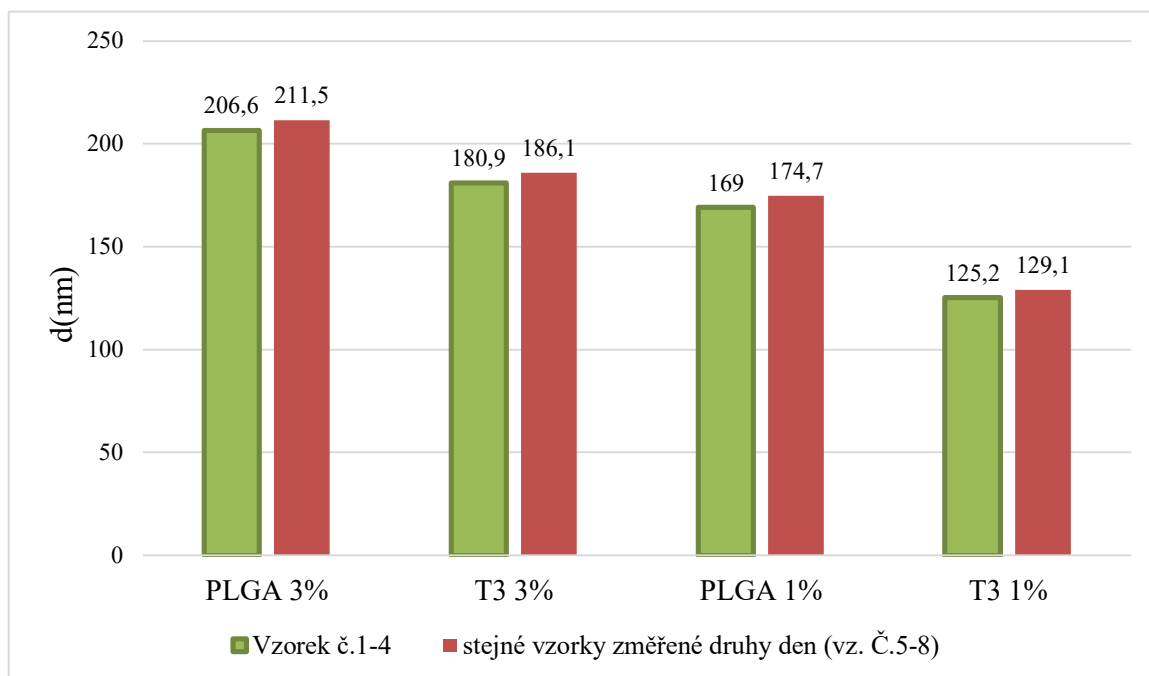
Graf 8 Frekvenční křivka vzorku č. 7

Frekvenční křivka vzorek č. 8



Graf 9 Frekvenční křivka vzorku č. 8

Porovnání velikostí částic vzorku (č. 1-4) se stejnými vzorky změřenými za 24 hodin (vzorky č. 5-8)

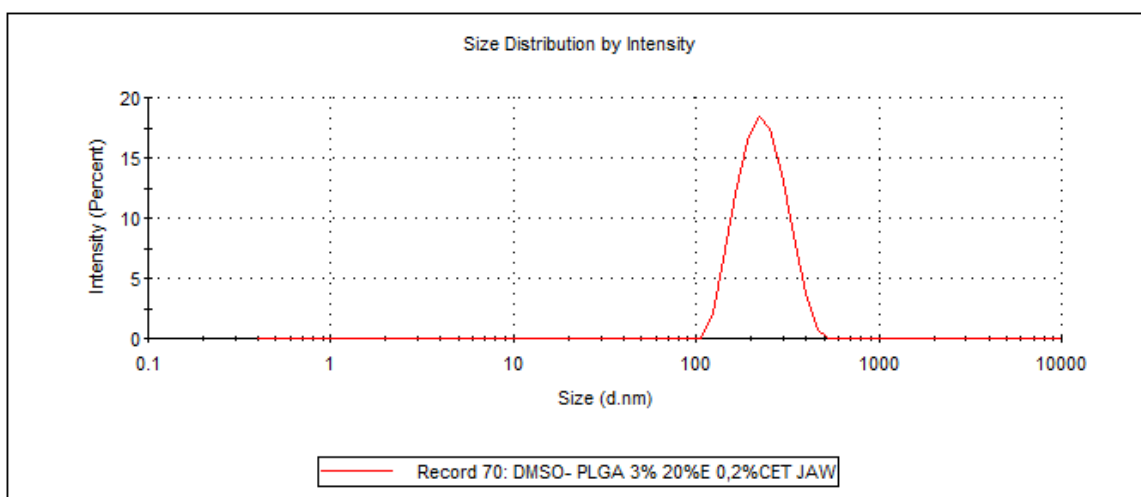


Graf 10 Srovnání velikosti částic vzorků 1-4 a vzorků 5-8

Tabulka 3 Výsledky ukazatele Z-Ave vzorků 9-14

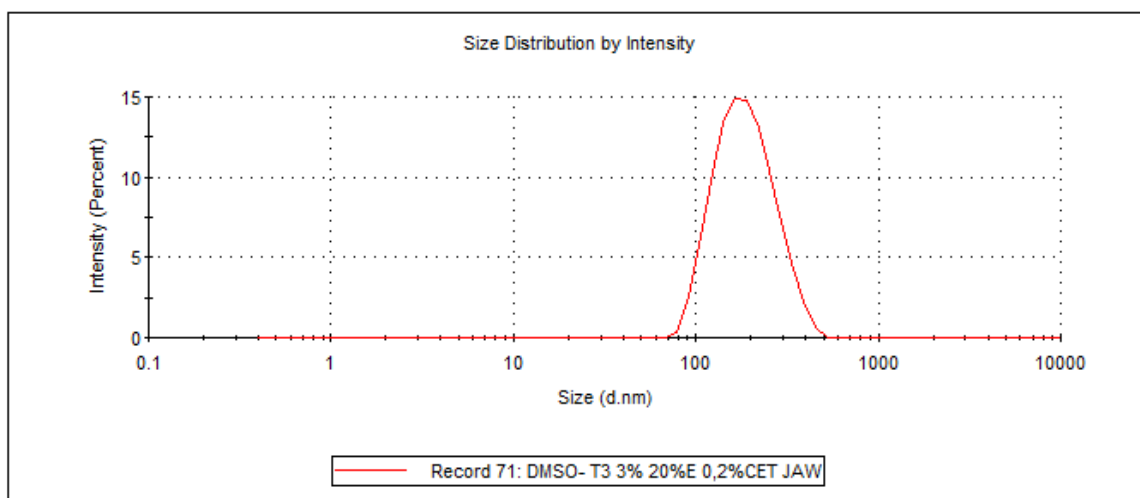
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 9. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 236,5 | 0 | 218,5 |
| 10. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 194,8 | 0 | 175,4 |
| 11. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 187,2 | 0 | 170,1 |
| 12. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 155,3 | 0 | 143,6 |
| 13. | PLGA 3% | DMSO | 0,1 % CET | 10% | 250,4 | 0 | 214,5 |
| 14. | T3 3% | DMSO | 0,1 % CET | 10% | 176,3 | 0 | 160 |

Frekvenční křivka vzorek č. 9



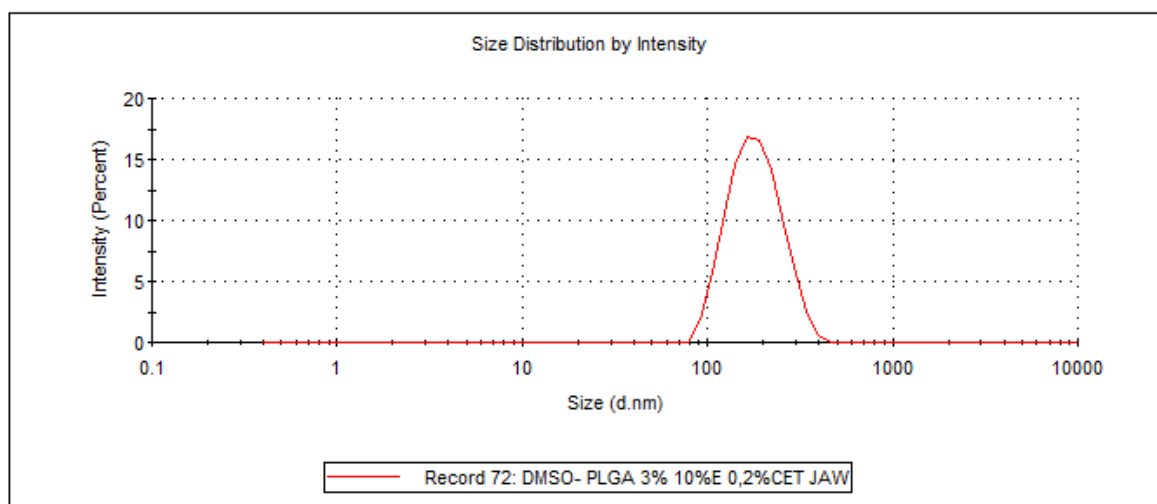
Graf 11 Frekvenční křivka vzorku č. 9

Frekvenční křivka vzorek č. 10



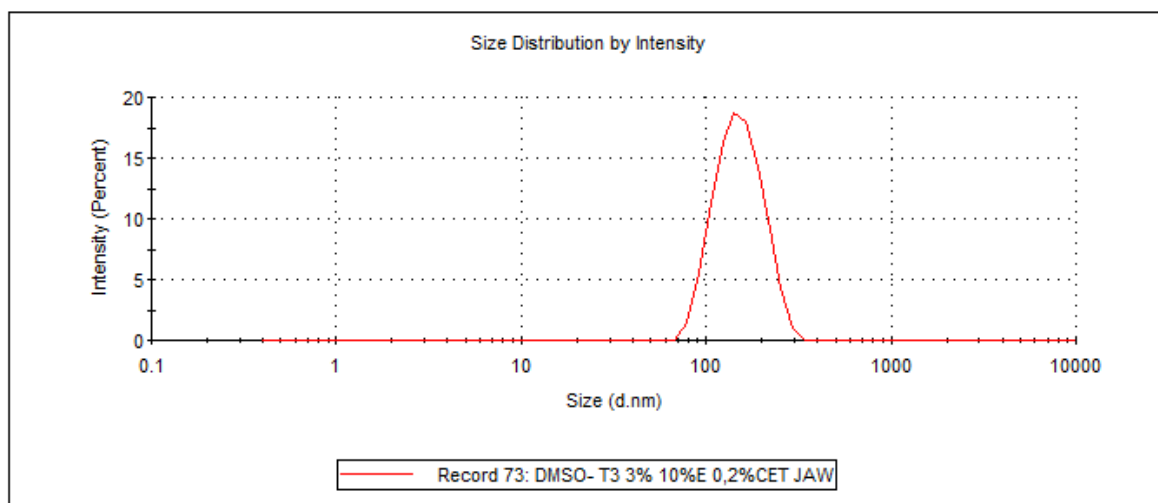
Graf 12 Frekvenční křivka vzorku č. 10

Frekvenční křivka vzorek č. 11



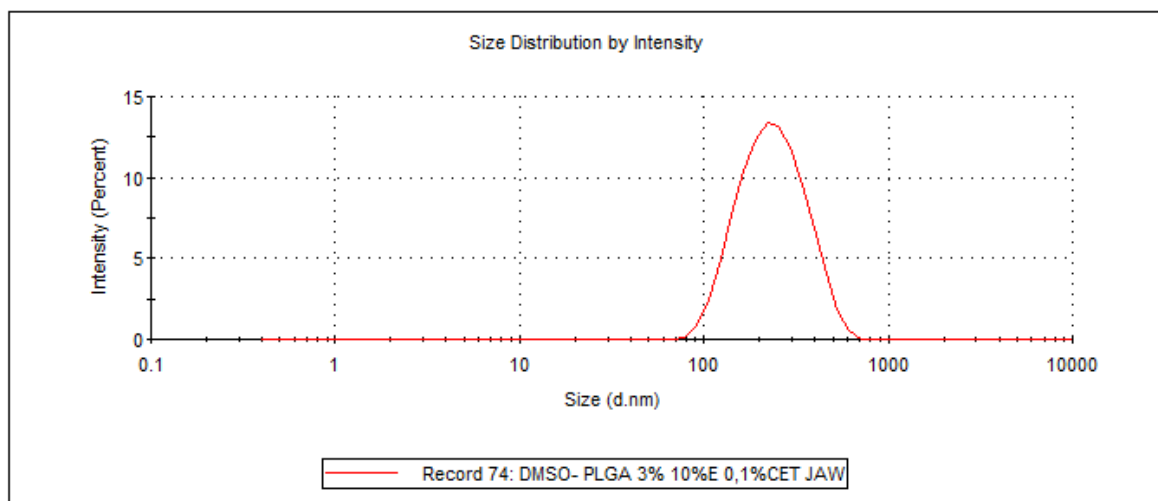
Graf 13 Frekvenční křivka vzorku č. 11

Frekvenční křivka vzorek č. 12



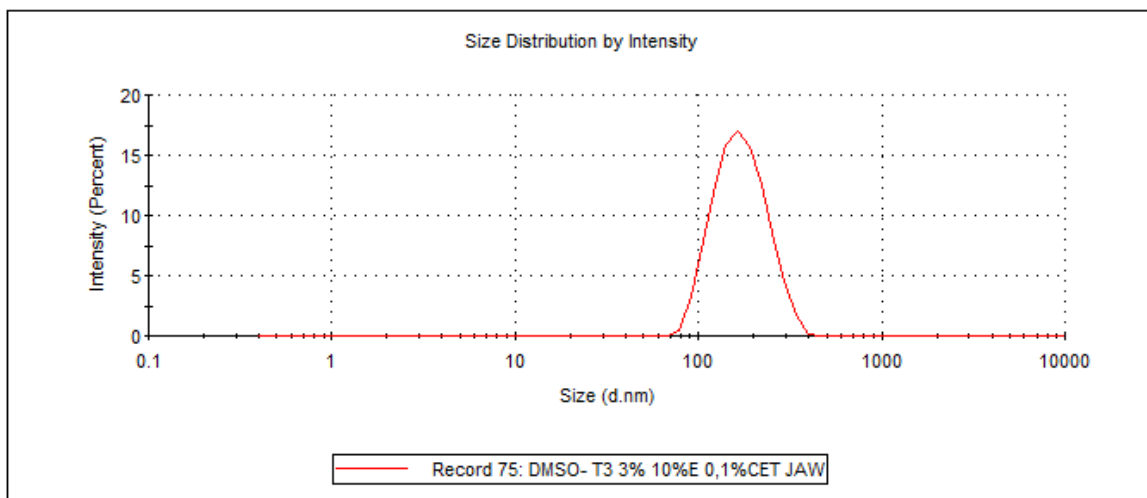
Graf 14 Frekvenční křivka vzorku č. 12

Frekvenční křivka vzorek č. 13



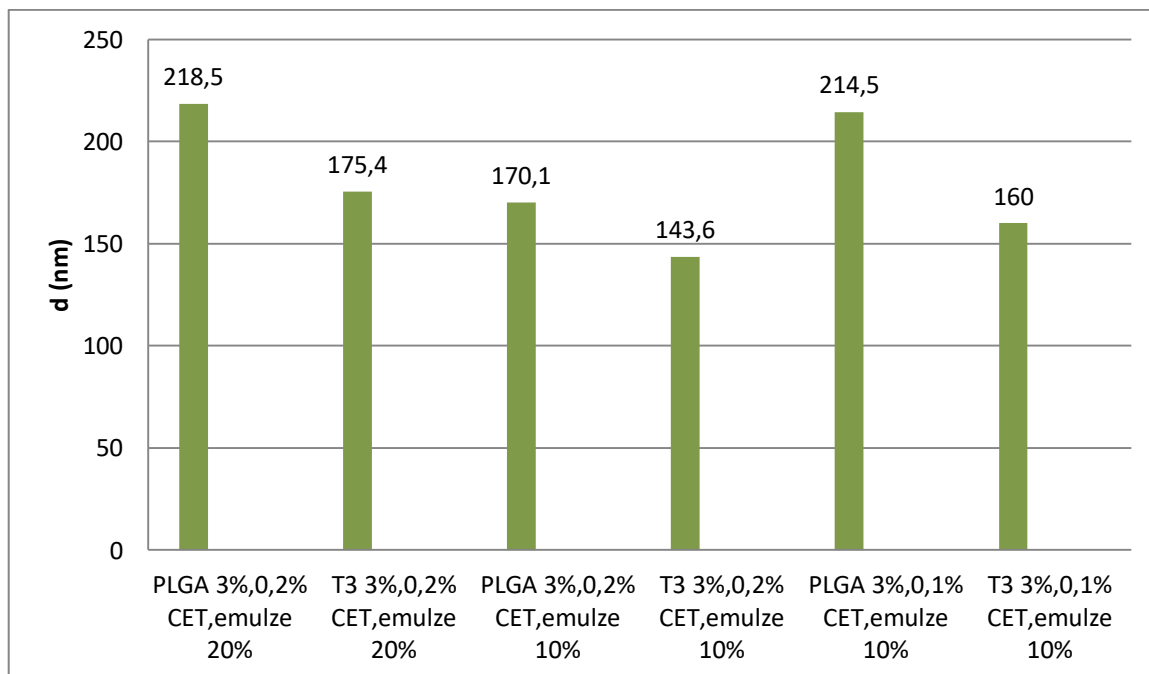
Graf 15 Frekvenční křivka vzorku č. 13

Frekvenční křivka vzorek č. 14



Graf 16 Frekvenční křivka vzorku č. 14

Vliv koncentrace emulgátoru (CET) a koncentrace emulze na velikost polymerních nanočástic

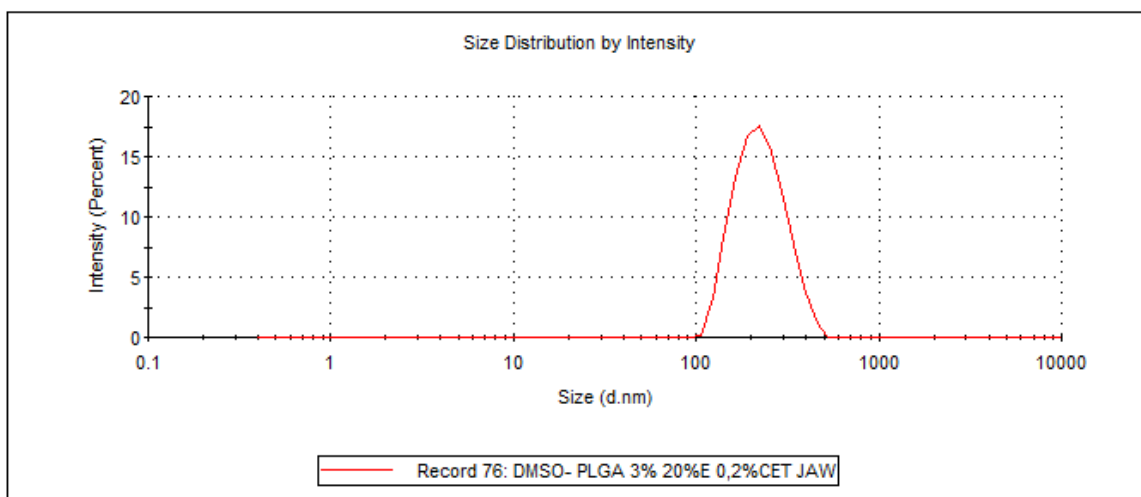


Graf 17 Vliv koncentrace CET a koncentrace emulze na velikost nanočástic

Tabulka 4 Výsledky ukazatele Z-Ave na vzorcích 15-18

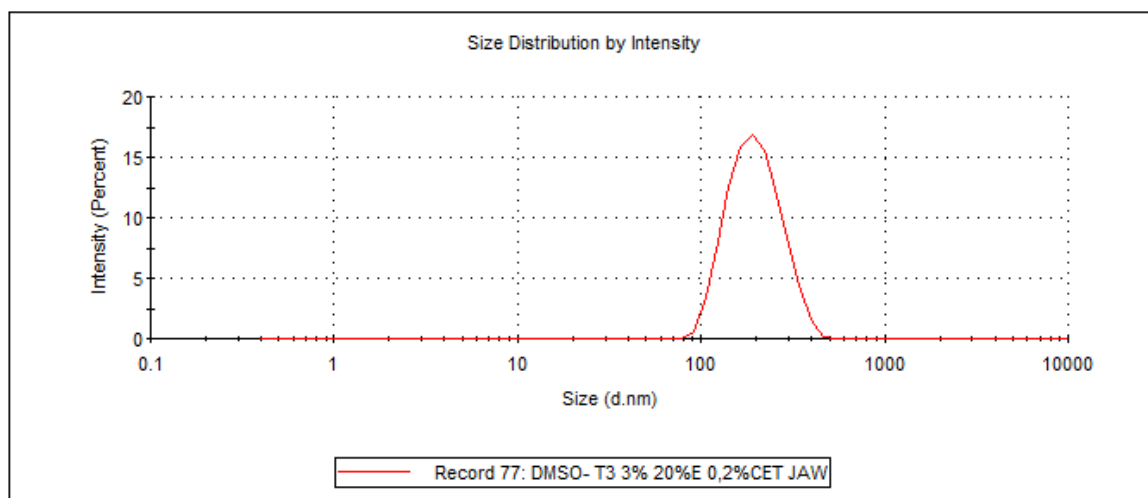
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 15. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 231,1 | 0 | 211,6 |
| 16. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 203,4 | 0 | 184,1 |
| 17. | PLGA 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 190,4 | 0 | 172,7 |
| 18. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 145 | 0 | 130,5 |

Frekvenční křivka vzorek č. 15



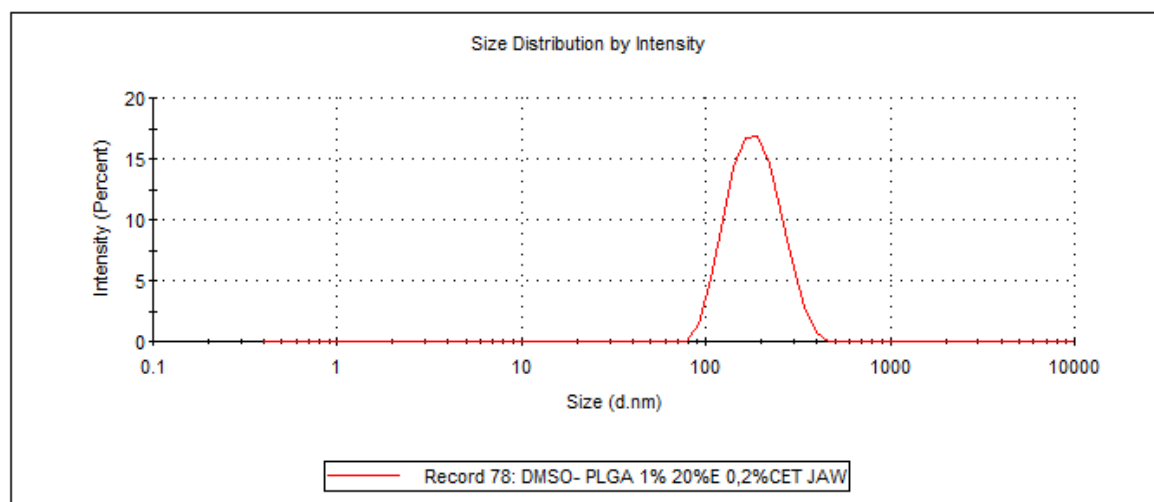
Graf 18 Frekvenční křivka vzorku č. 15

Frekvenční křivka vzorek č. 16



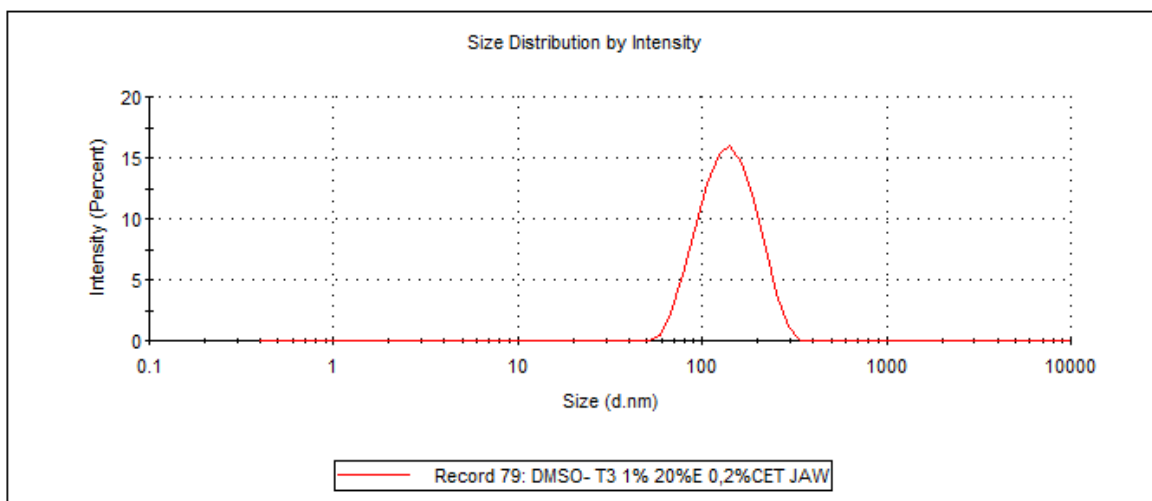
Graf 19 Frekvenční křivka vzorku č. 16

Frekvenční křivka vzorek č. 17



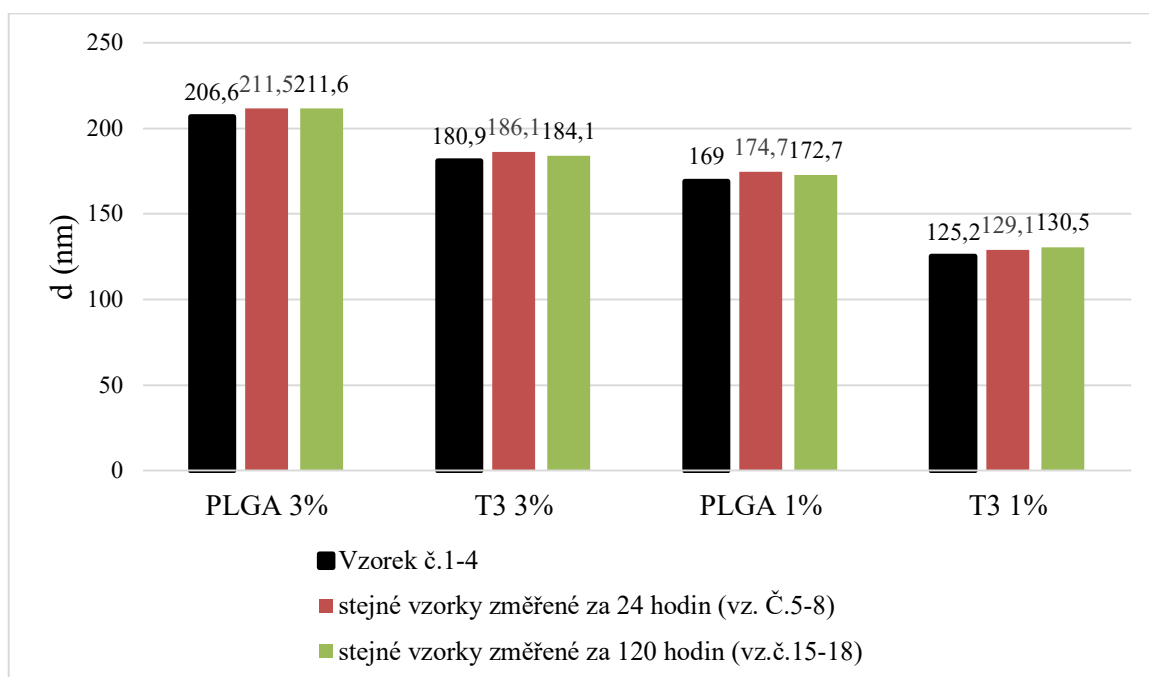
Graf 20 Frekvenční křivka vzorku č. 17

Frekvenční křivka vzorek č. 18



Graf 21 Frekvenční křivka vzorku č. 18

Porovnání velikostí částic vzorku (č. 1-4) se stejnými vzorky změřenými za 24 hodin (vzorky č. 5-8) a stejnými vzorky změřenými za 120 hodin (vzorky č. 15-18)



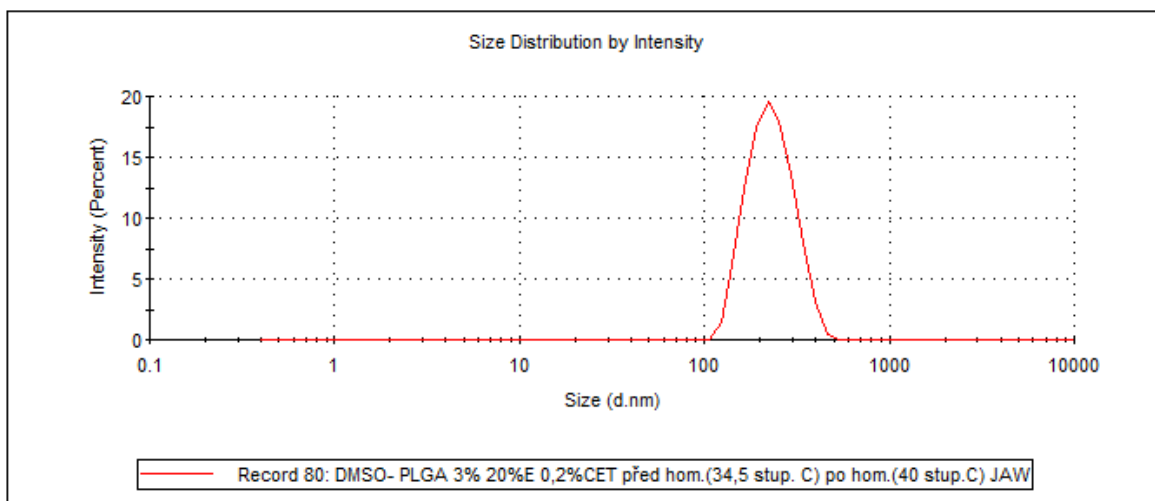
Graf 22 Porovnání velikosti částic s časovým odstupem

Tabulka 5 Výsledky ukazatele Z-Ave a teploty vzorků 19-24

| Vzo | Pol | yme | r | Roz | pou | Em | ulg | átor | Em | ulze | d (nm) | Teplota |
|-----|-----|-----|---|-----|-----|----|-----|------|----|------|--------|---------|
|-----|-----|-----|---|-----|-----|----|-----|------|----|------|--------|---------|

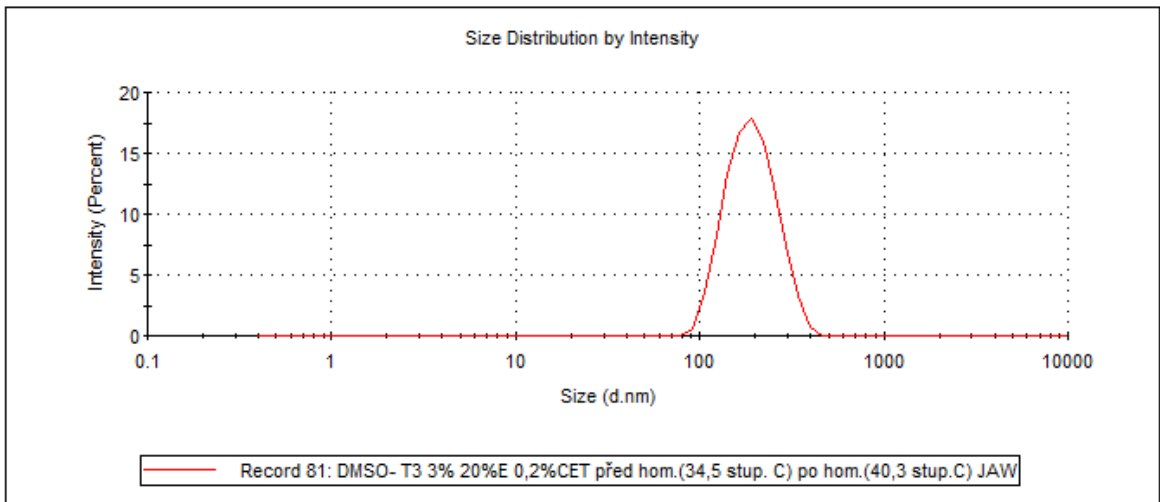
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | Z-Ave (nm) | Před homoge. | Po homoge. |
|-----|---------|------|-----------|-----|--------|--------|------------|--------------|------------|
| 19. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 234,2 | 0 | 216,3 | 34,5 | 40 |
| 20. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 197,1 | 0 | 180,3 | 34,5 | 40,3 |
| 21. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 186,7 | 0 | 172,8 | 35 | 38 |
| 22. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 154,4 | 0 | 142,7 | 34,9 | 37,5 |
| 23. | PLGA 3% | DMSO | 0,1 % CET | 10% | 209,2 | 0 | 191,3 | 35,6 | 38,1 |
| 24. | T3 3% | DMSO | 0,1 % CET | 10% | 179,8 | 0 | 163,5 | 35,7 | 38,6 |

Frekvenční křivka vzorek č. 19



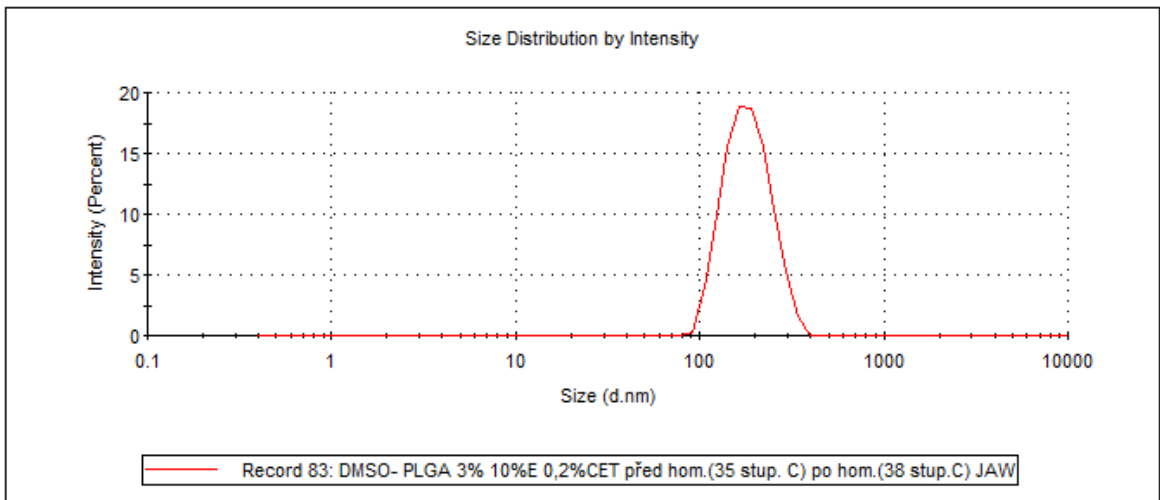
Graf 23 Frekvenční křivka vzorku č. 19

Frekvenční křivka vzorek č. 20



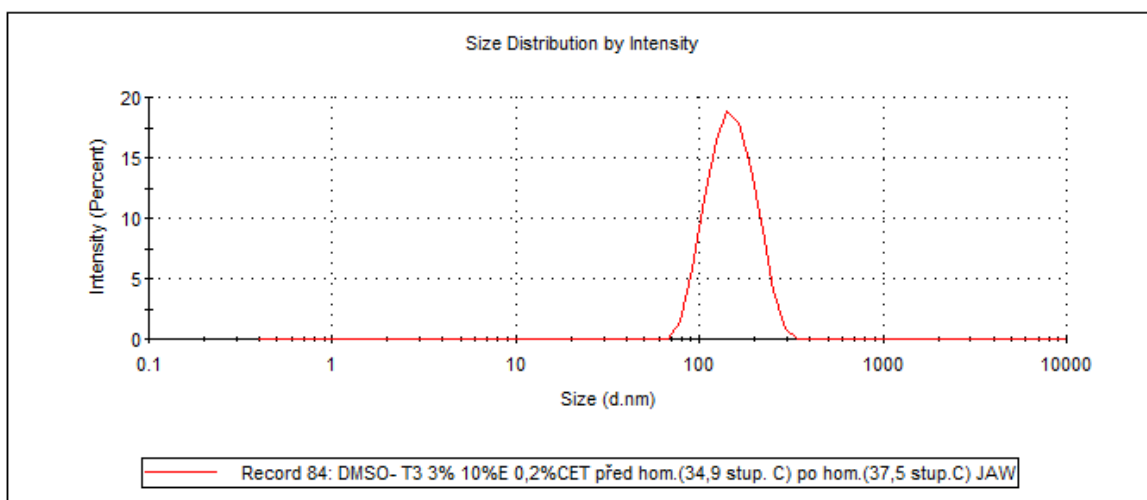
Graf 24 Frekvenční křivka vzorku č. 20

Frekvenční křivka vzorek č. 21



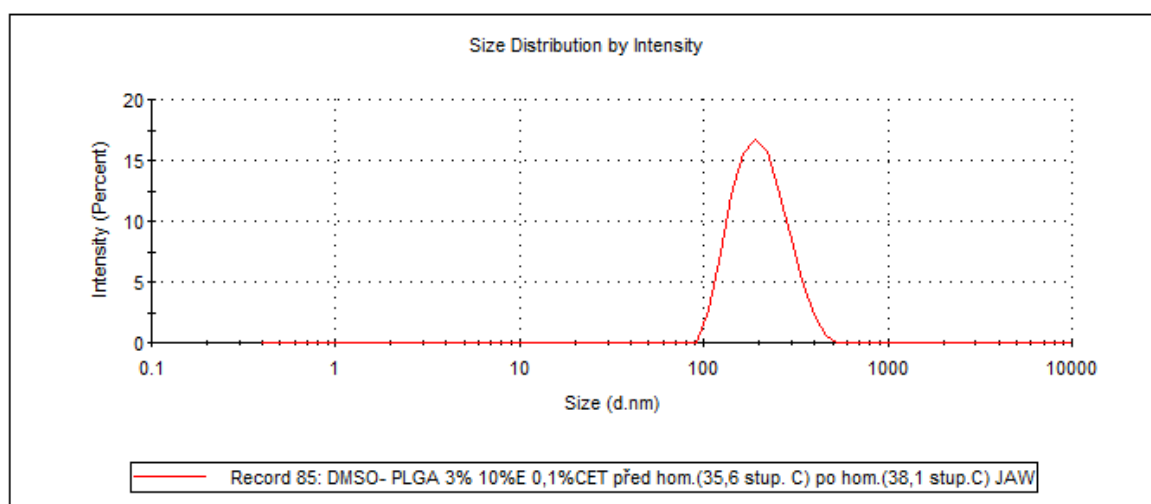
Graf 25 Frekvenční křivka vzorku č. 21

Frekvenční křivka vzorek č. 22



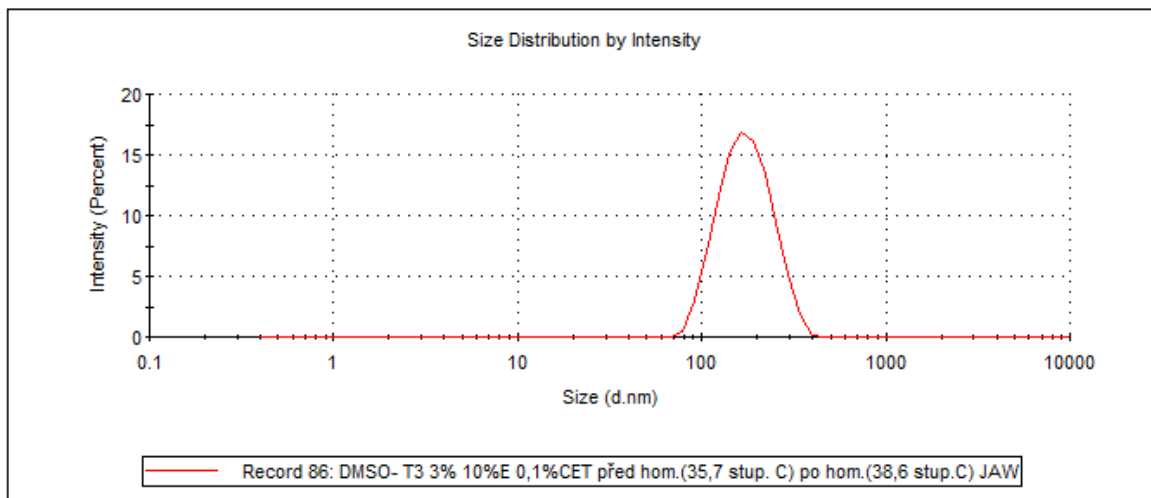
Graf 26 Frekvenční křivka vzorku č. 22

Frekvenční křivka vzorek č. 23



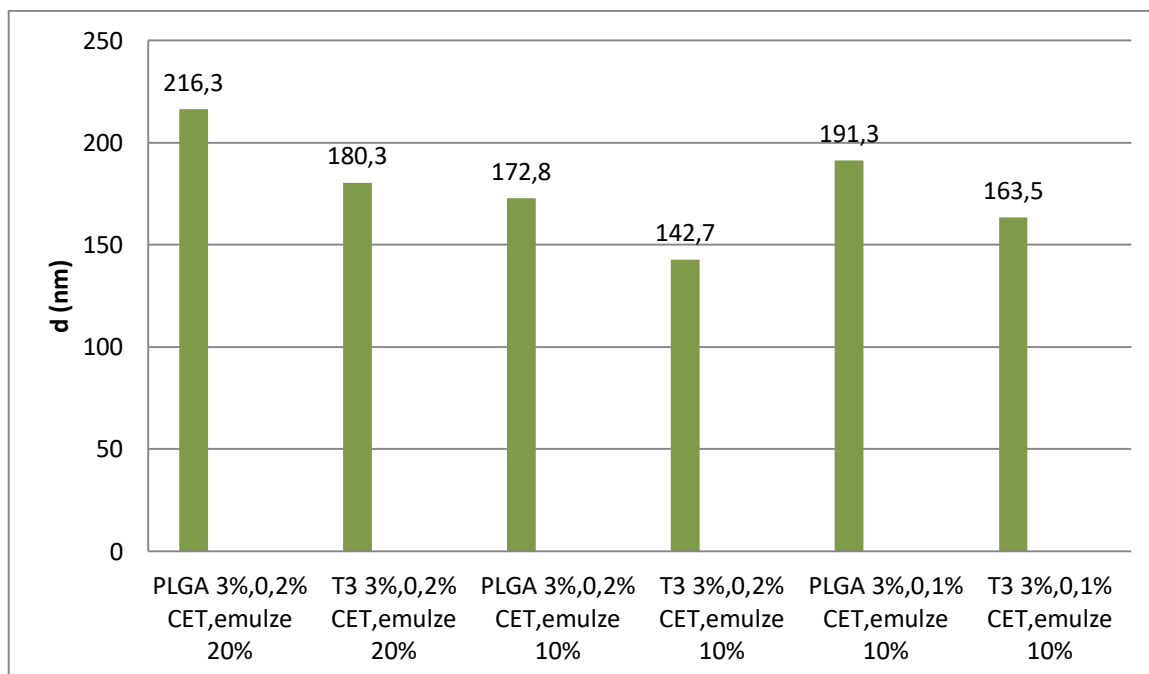
Graf 27 Frekvenční křivka vzorku č. 23

Frekvenční křivka vzorek č. 24



Graf 28 Frekvenční křivka vzorku č. 24

Vliv koncentrace emulgátoru (CET) a koncentrace emulze na velikost polymerních nanočástic

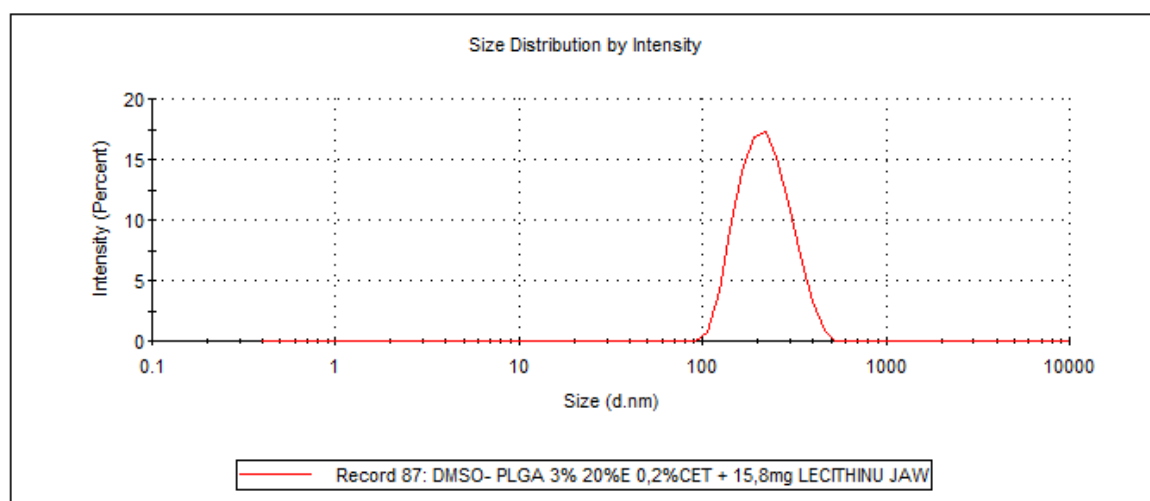


Graf 29 Vliv koncentrace CET a emulze na velikost nanočástic

Tabulka 6 Výsledky ukazatele Z-Ave a léčiva

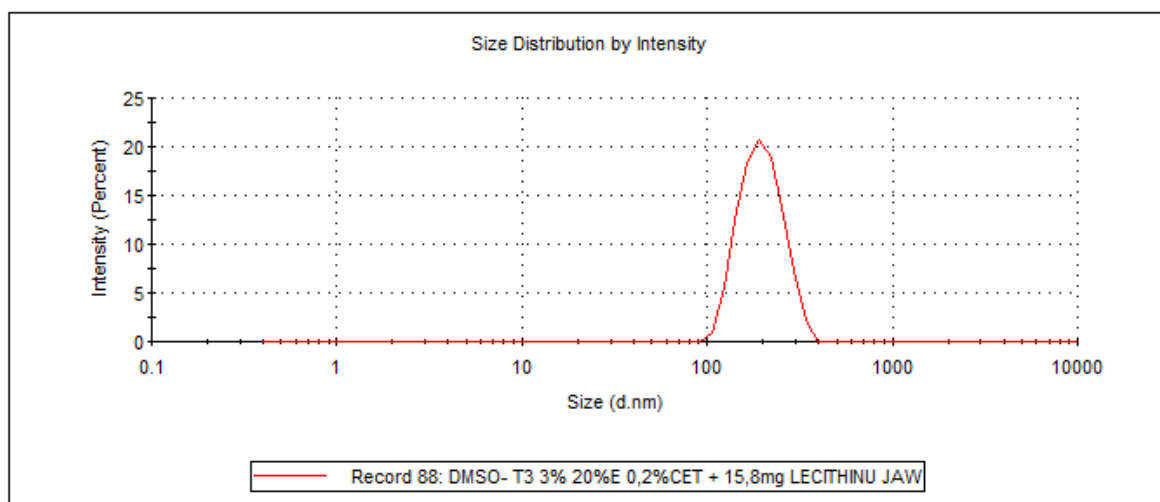
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) | Léčivo |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|---------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | | Lecithin (mg) |
| 25. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 225,4 | 0 | 205,8 | 15,8 |
| 26. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 200,4 | 0 | 188,4 | 15,8 |
| 27. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 250,7 | 0 | 229,8 | 33,3 |
| 28. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 217,2 | 0 | 199,2 | 33,3 |
| 29. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 263,6 | 0 | 223,2 | 130 |
| 30. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 230,2 | 0 | 204,5 | 130 |

Frekvenční křivka vzorek č. 25



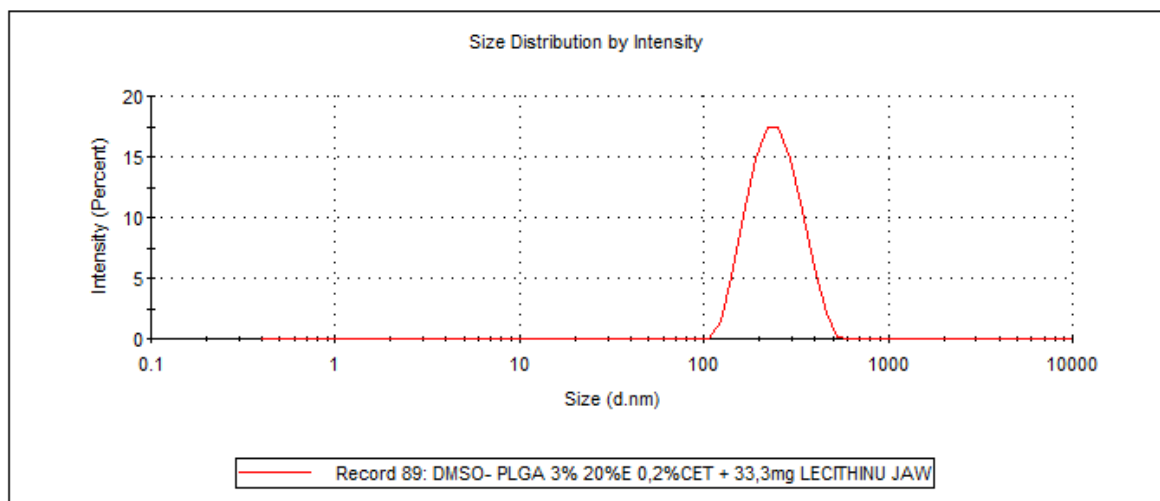
Graf 30 Frekvenční křivka vzorku č. 25

Frekvenční křivka vzorek č. 26



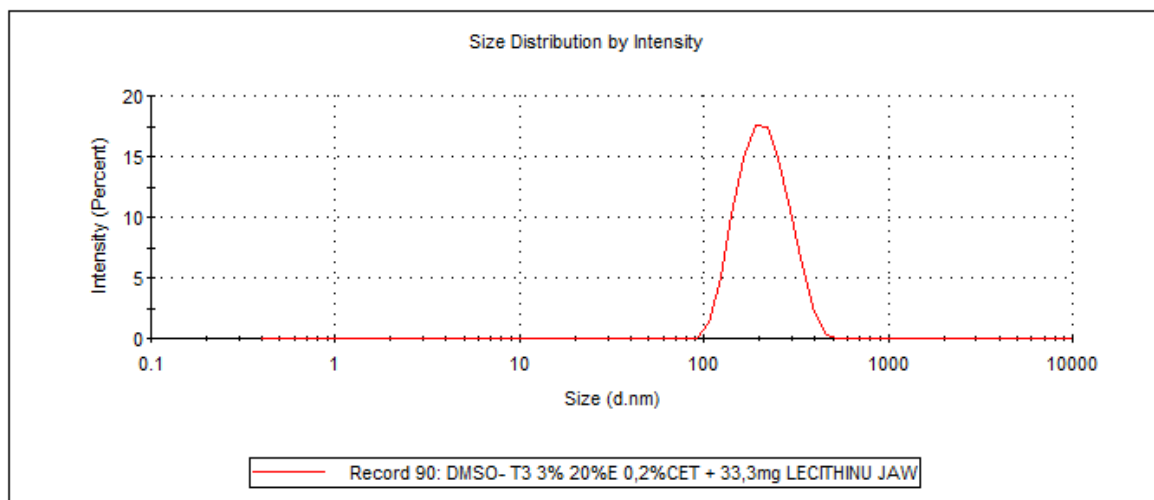
Graf 31 Frekvenční křivka vzorku č. 26

Frekvenční křivka vzorek č. 27



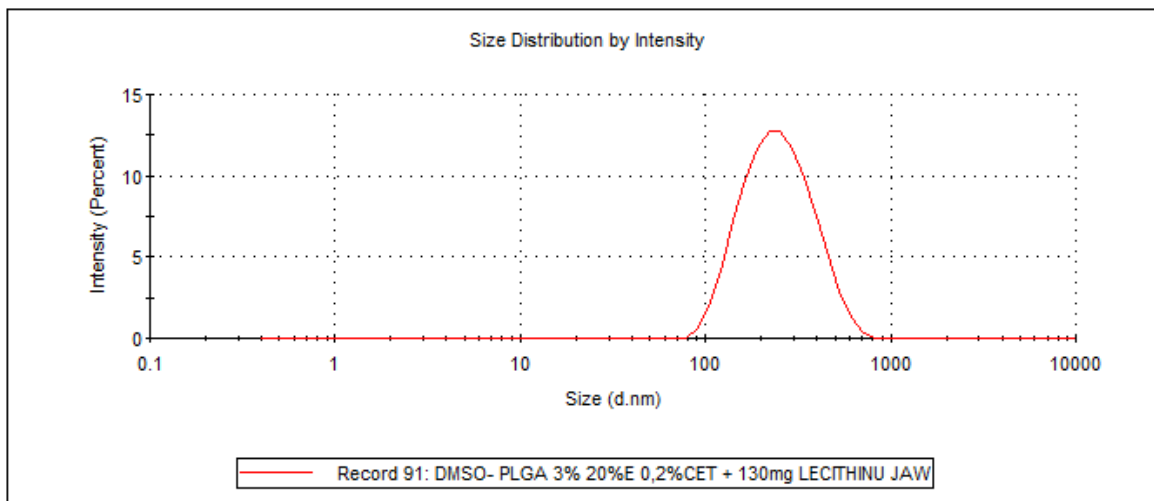
Graf 32 Frekvenční křivka vzorku č. 27

Frekvenční křivka vzorek č. 28



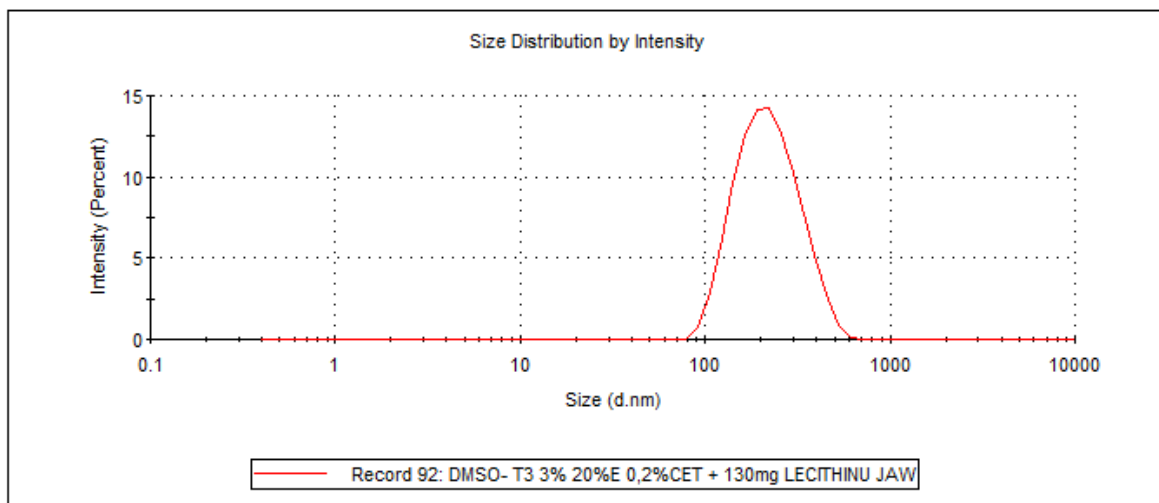
Graf 33 Frekvenční křivka vzorku č. 28

Frekvenční křivka vzorek č. 29



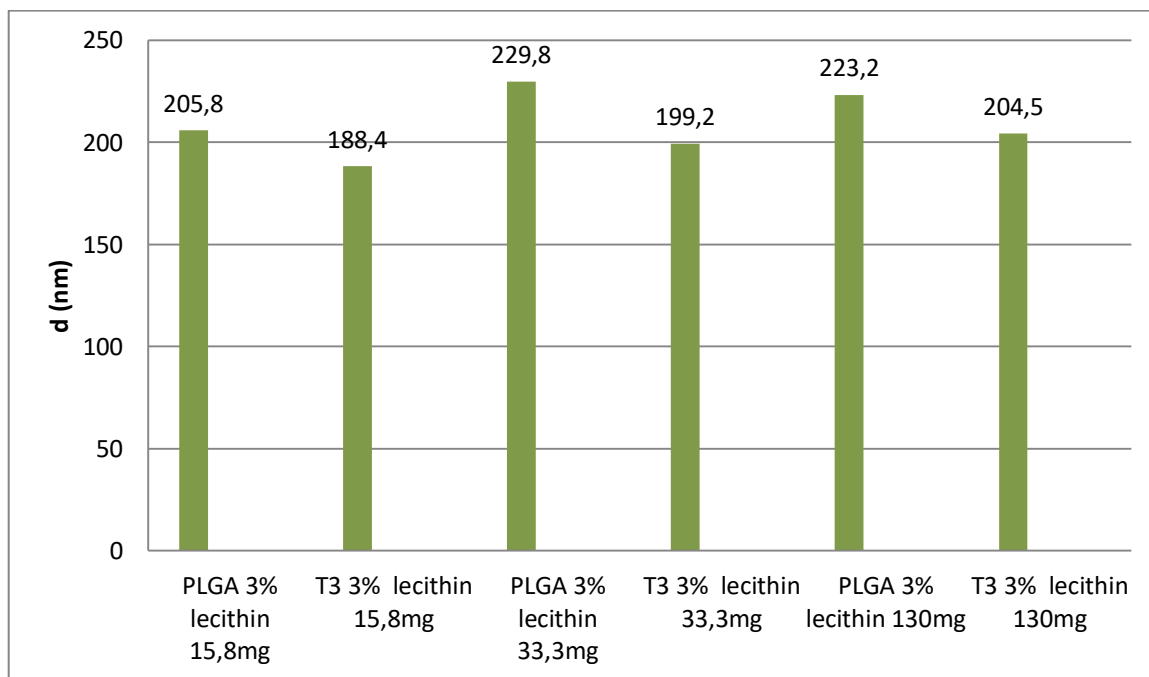
Graf 34 Frekvenční křivka vzorku č. 29

Frekvenční křivka vzorek č. 30



Graf 35 Frekvenční křivka vzorku č. 30

Vliv přidání lecitinů a jeho množství (mg) na velikost polymerních nanočástic

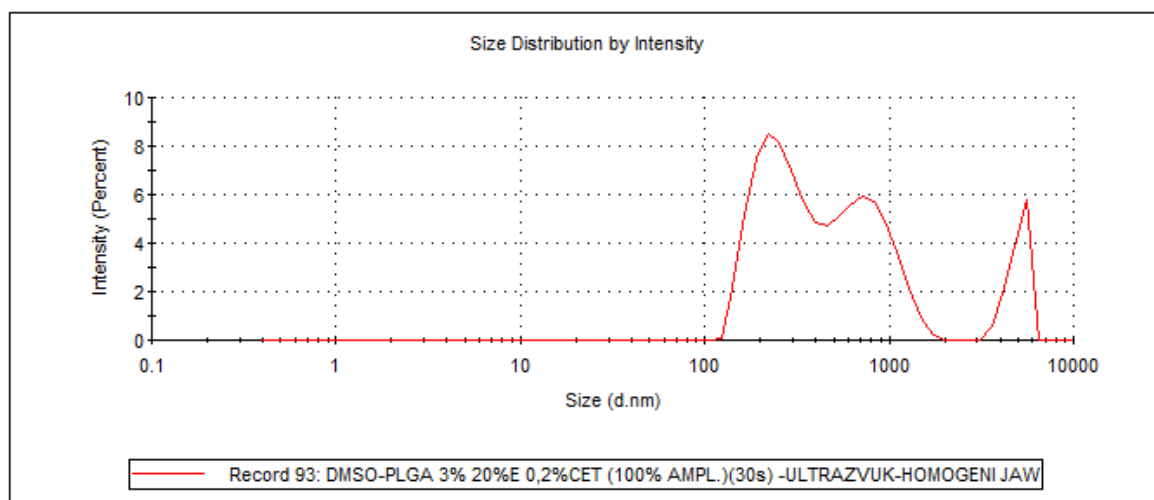


Graf 36 Vliv přidání lecitinů na velikost nanočástic

Tabulka 7 Výsledky ukazatele Z-Ave při různé homogenizaci

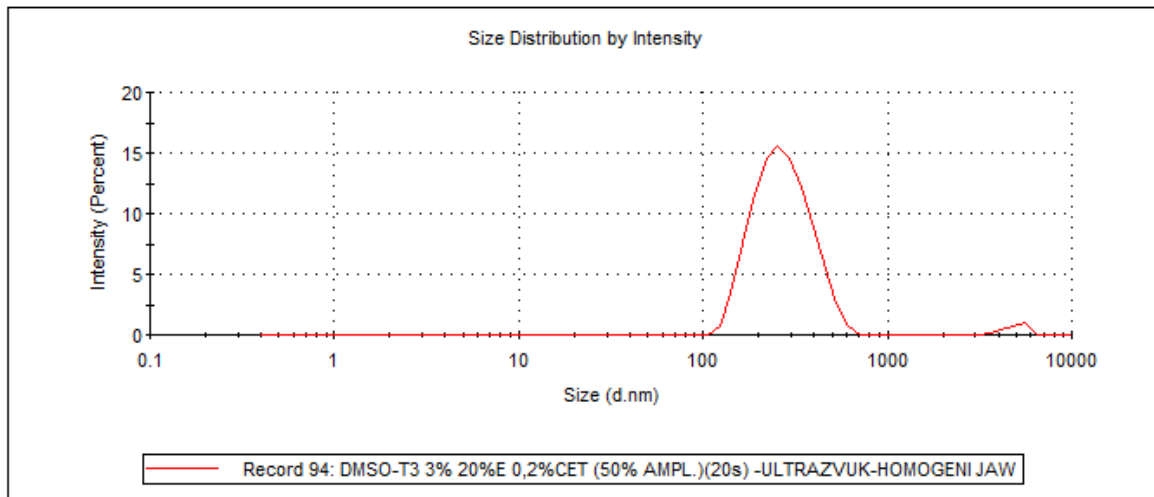
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) | Způsob homogenizace (amplituda (%) čas (s)) |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|---------------------------------------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | | |
| 31. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 272 | 783,4 | 459,9 | Ultrazvuk Homogenizátor (100%,30s) |
| 32. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 281,5 | 4911 | 264,4 | Ultrazvuk Homogenizátor (50%,20s) |
| 33. | PLGA 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 333,1 | 5288 | 312,9 | Ultrazvuk Homogenizátor (50%,20s) |
| 34. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 222 | 5044 | 208,3 | Ultrazvuk Homogenizátor (50%,20s) |
| 35. | PLGA 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 252,3 | 4794 | 210,2 | Ultrazvuk (50%,30s) |
| 36. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 155,1 | 4651 | 142,4 | Ultrazvuk (50%,30s) |

Frekvenční křivka vzorek č. 31



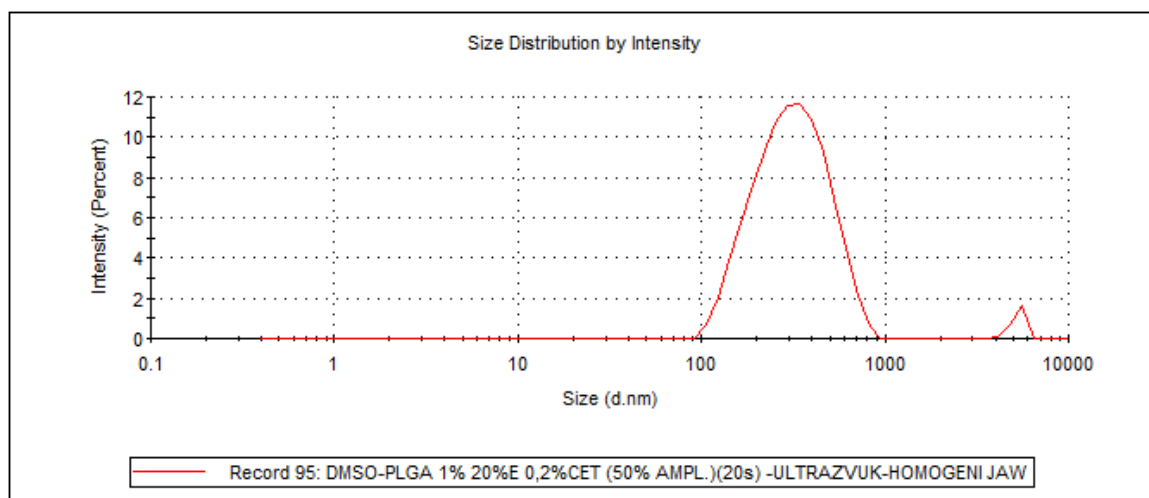
Graf 37 Frekvenční křivka vzorku č. 31

Frekvenční křivka vzorek č. 32



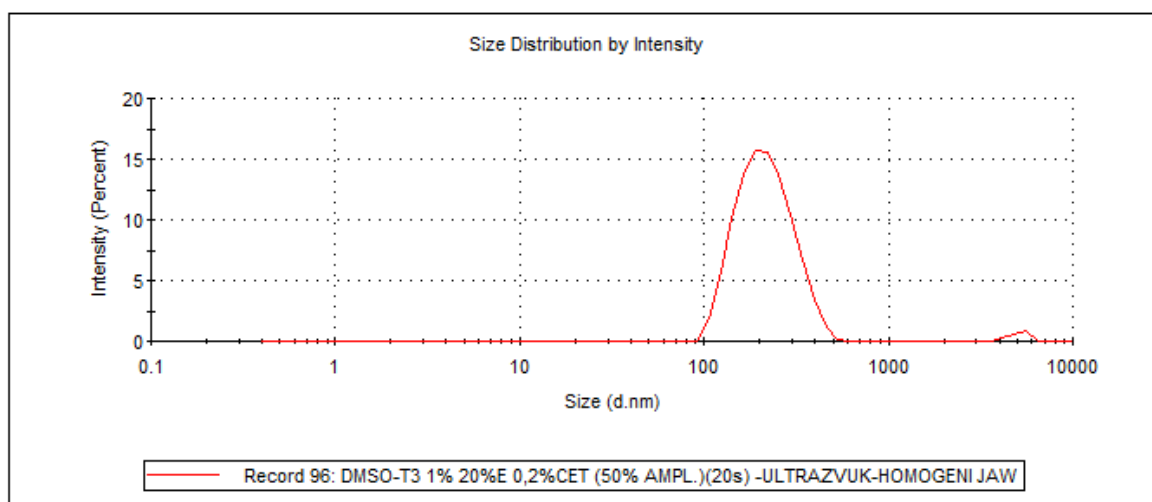
Graf 38 Frekvenční křivka vzorku č. 32

Frekvenční křivka vzorek č. 33



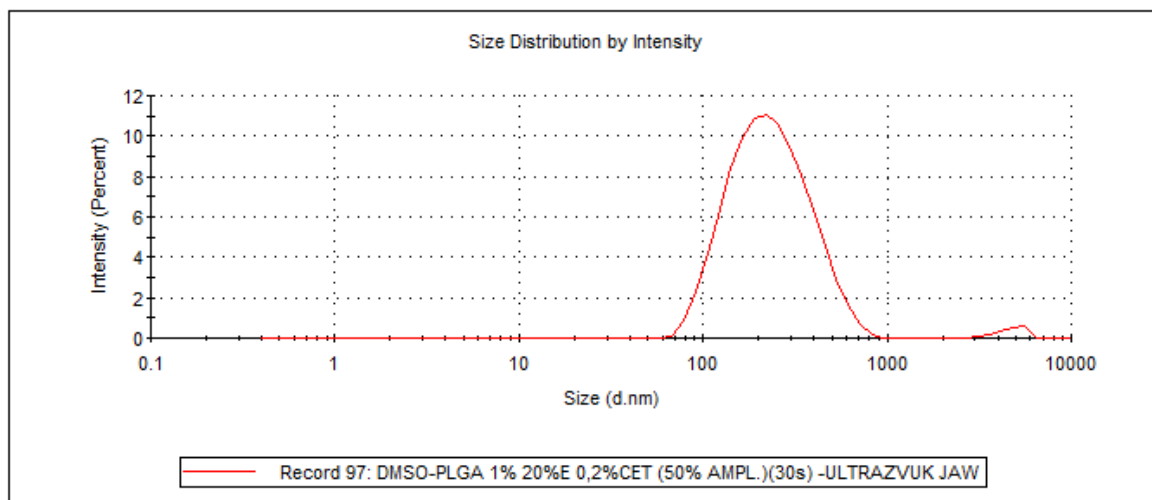
Graf 39 Frekvenční křivka vzorku č. 33

Frekvenční křivka vzorek č. 34



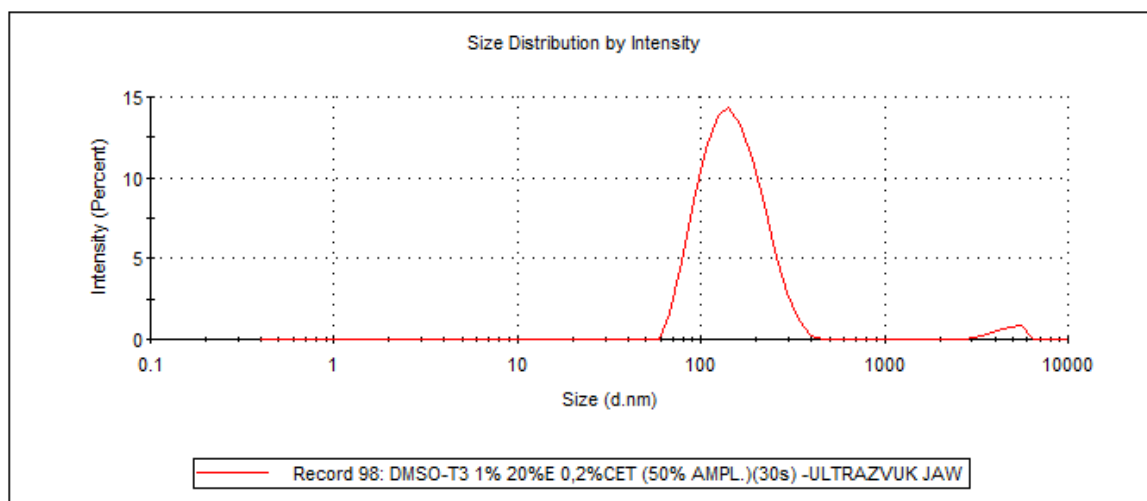
Graf 40 Frekvenční křivka vzorku č. 34

Frekvenční křivka vzorek č. 35



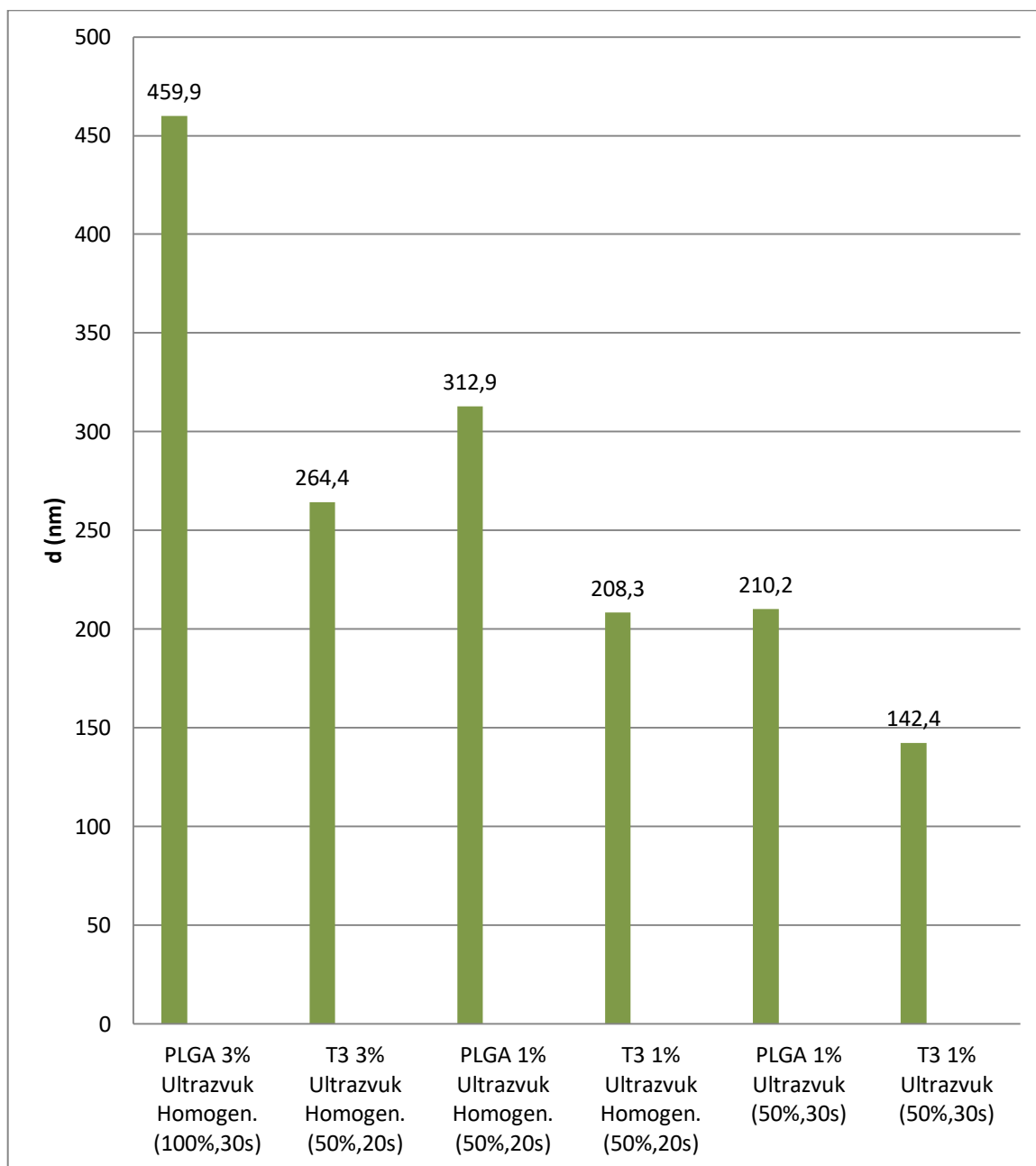
Graf 41 Frekvenční křivka vzorku č. 35

Frekvenční křivka vzorek č. 36



Graf 42 Frekvenční křivka vzorku č. 36

Vliv koncentrace polymerů, jeho způsobu homogenizace, času a amplitudy na velikost polymerních nanočástic

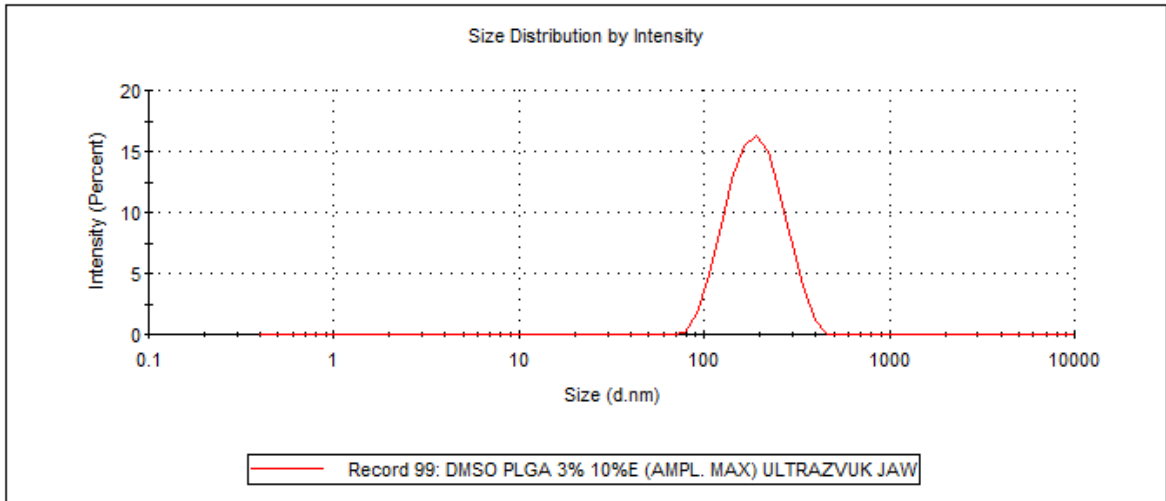


Graf 43 Vliv koncentrace polymerů a jeho způsobu homogenizace, času a amplitudy na velikost nanočástic

Tabulka 8 Výsledky ukazatele Z-Ave dle amplitudy u vzorků 37-44

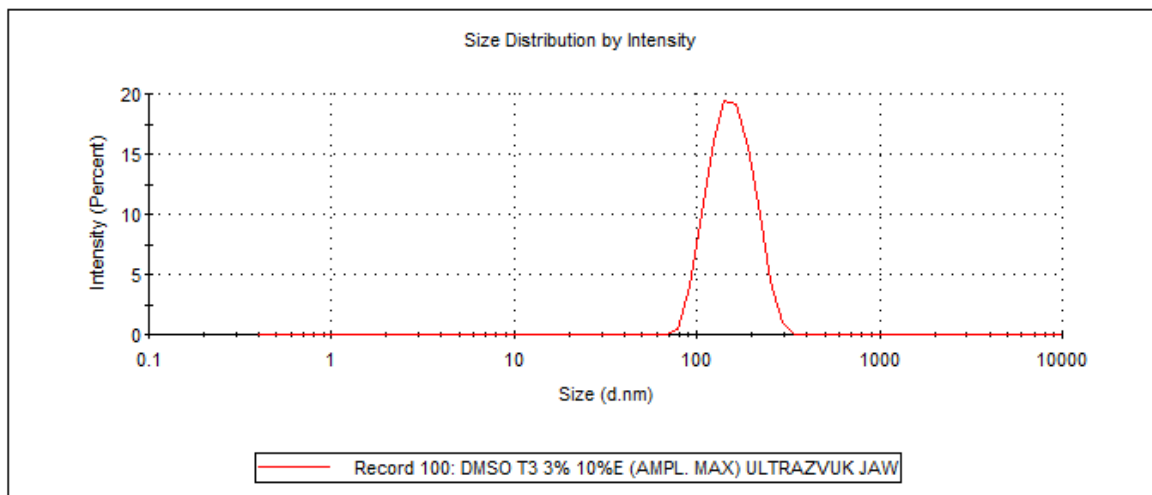
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) | Způsob homogenizace (amplituda) |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|---------------------------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | | |
| 37. | PLGA 3% | DMS O | 0,2 % CET | 10% | 197 | 0 | 176 | Ultrazvuk (maximální) |
| 38. | T3 3% | DMS O | 0,2 % CET | 10% | 159 | 0 | 148,2 | Ultrazvuk (maximální) |
| 39. | PLGA 3% | DMS O | 0,2 % CET | 5% | 180,1 | 0 | 161,6 | Ultrazvuk (maximální) |
| 40. | T3 3% | DMS O | 0,2 % CET | 5% | 140,6 | 0 | 129,6 | Ultrazvuk (maximální) |
| 41. | PLGA 1% | DMS O | 0,2 % CET | 10% | 140,7 | 0 | 127,6 | Ultrazvuk (maximální) |
| 42. | T3 1% | DMS O | 0,2 % CET | 10% | 114,8 | 0 | 102,1 | Ultrazvuk (maximální) |
| 43. | PLGA 1% | DMS O | 0,2 % CET | 5% | 137,6 | 0 | 119,3 | Ultrazvuk (maximální) |
| 44. | T3 1% | DMS O | 0,2 % CET | 5% | 108,8 | 0 | 98,74 | Ultrazvuk (maximální) |

Frekvenční křivka vzorek č. 37



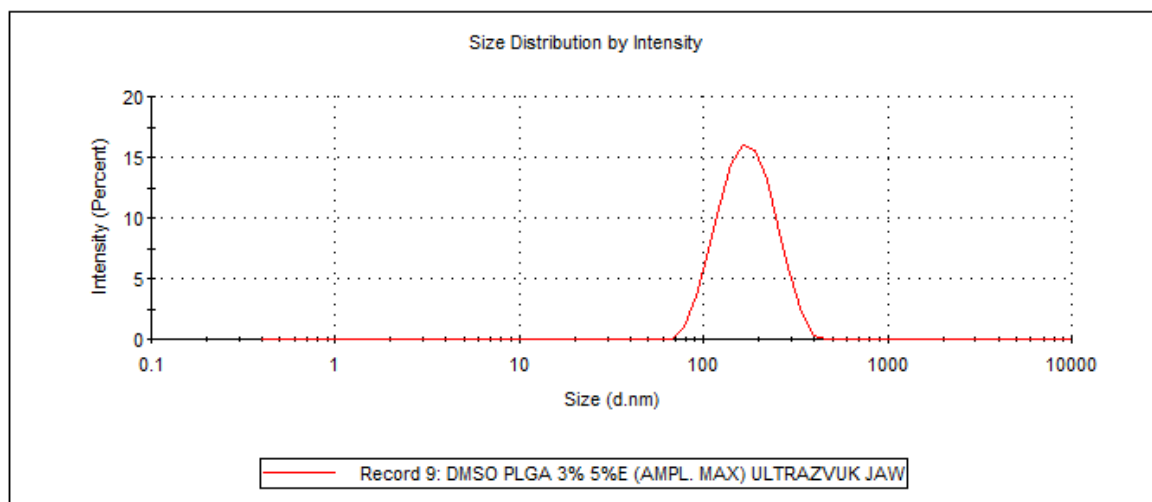
Graf 44 Frekvenční křivka vzorku č. 37

Frekvenční křivka vzorek č. 38



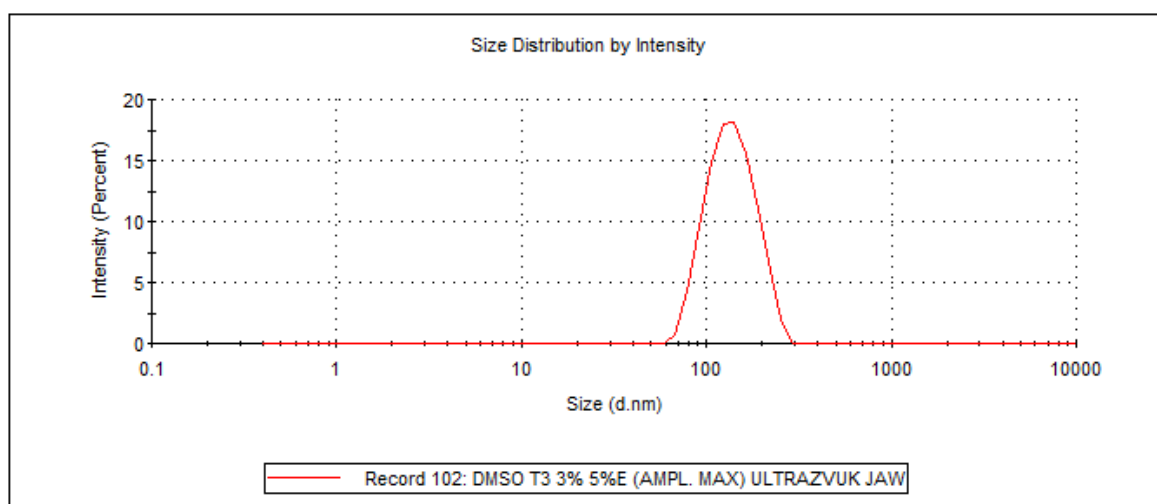
Graf 45 Frekvenční křivka vzorku č. 38

Frekvenční křivka vzorek č. 39



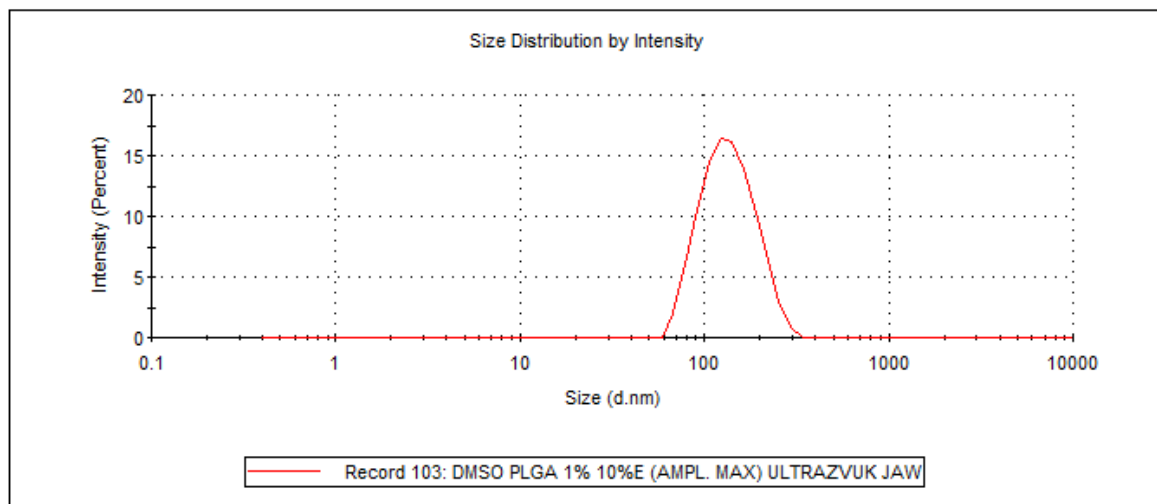
Graf 46 Frekvenční křivka vzorku č. 39

Frekvenční křivka vzorek č. 40



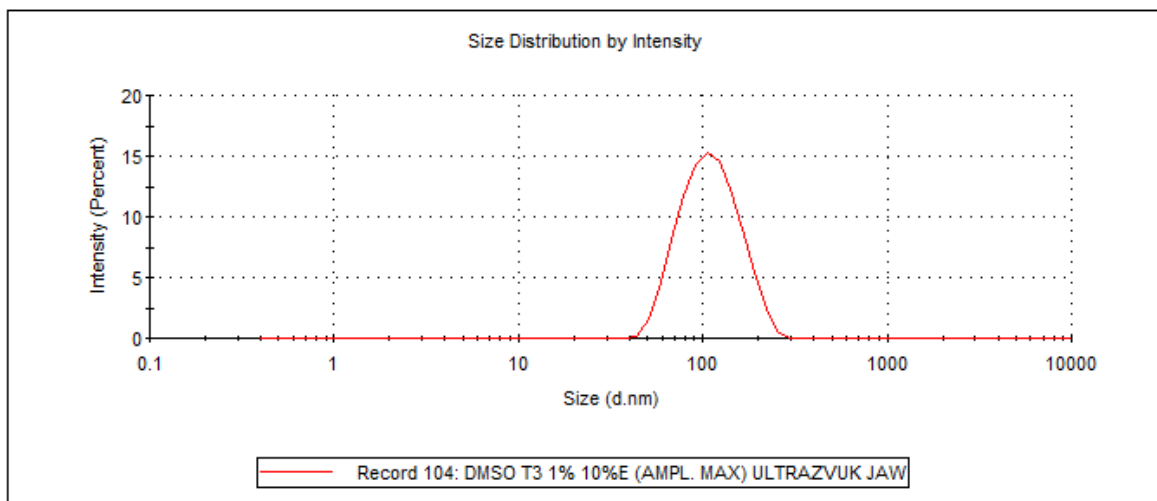
Graf 47 Frekvenční křivka vzorku č. 40

Frekvenční křivka vzorek č. 41



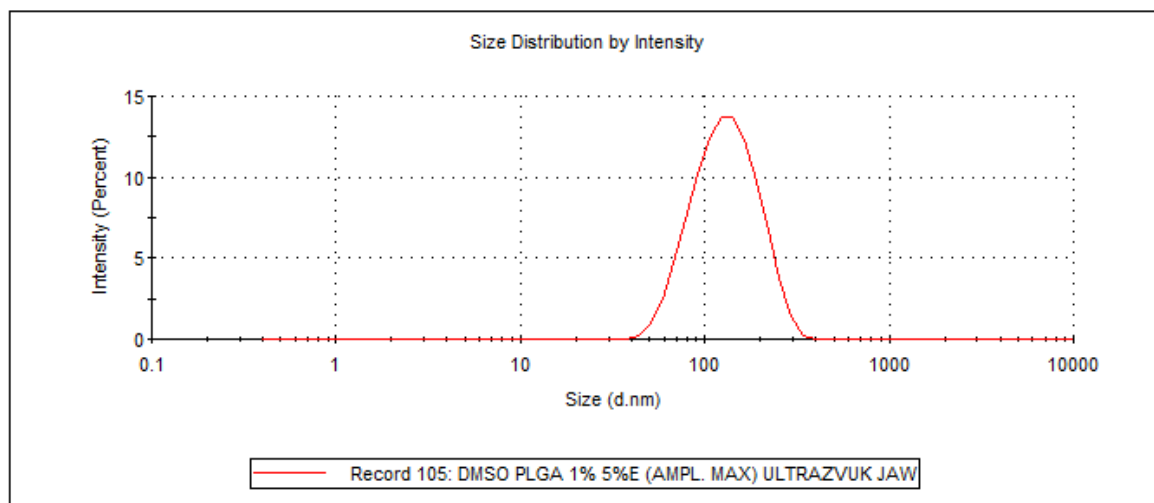
Graf 48 Frekvenční křivka vzorku č. 41

Frekvenční křivka vzorek č. 42



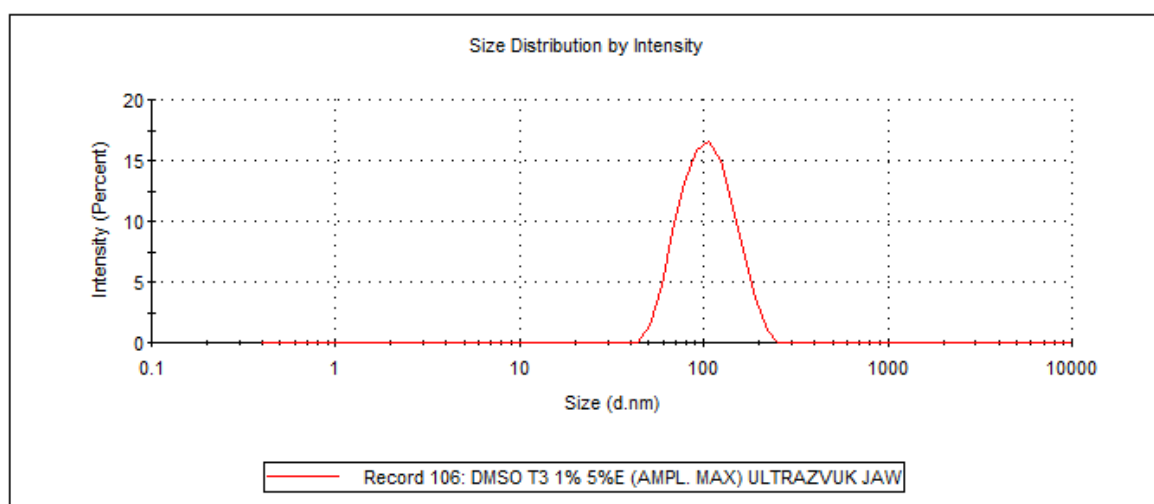
Graf 49 Frekvenční křivka vzorku č. 42

Frekvenční křivka vzorek č. 43



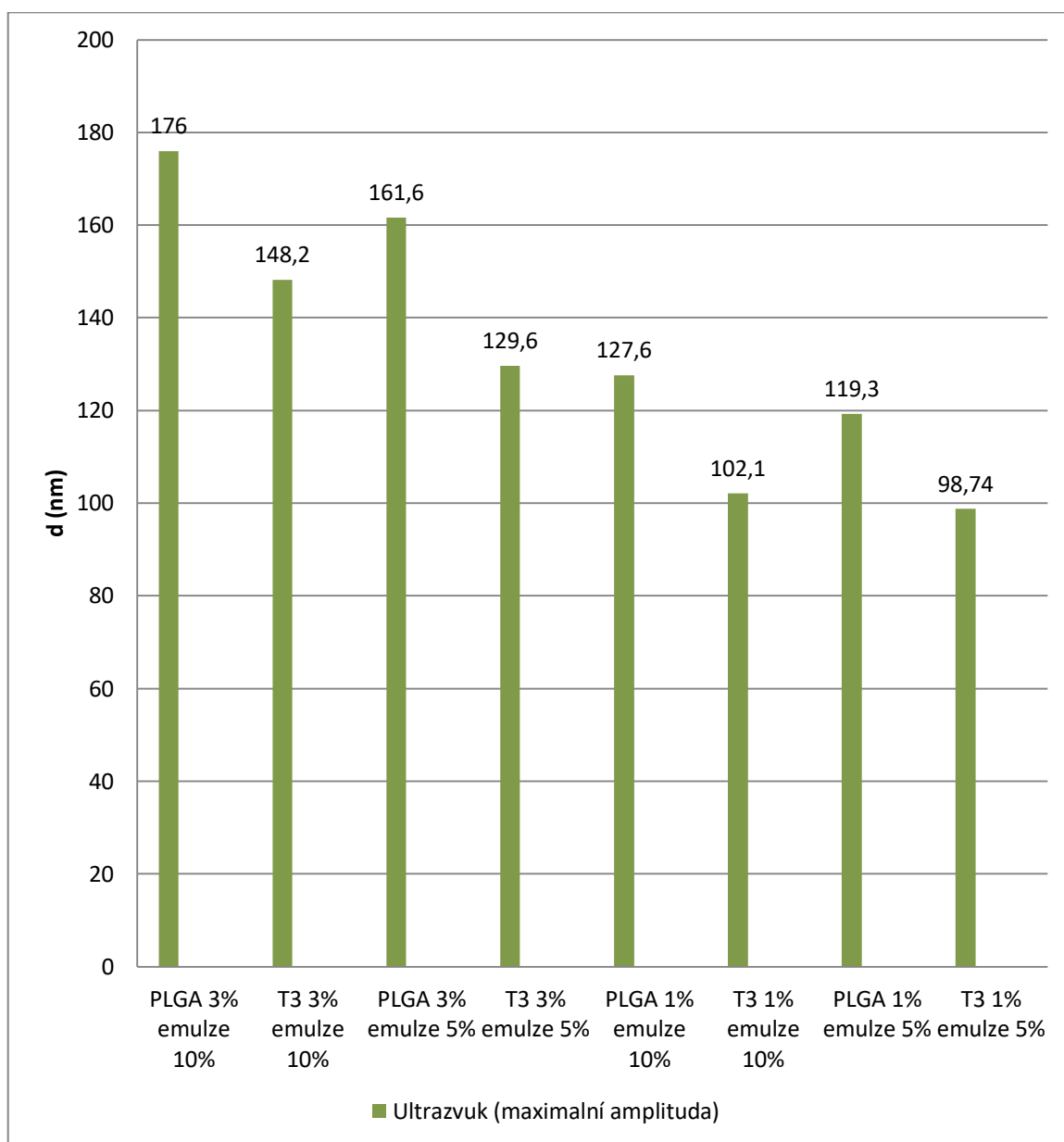
Graf 50 Frekvenční křivka vzorku č. 43

Frekvenční křivka vzorek č. 44



Graf 51 Frekvenční křivka vzorku č. 44

Vliv koncentrace polymeru a koncentrace emulze homogenizované ultrazvukem o maximální amplitudě na velikost polymerních nanočástic

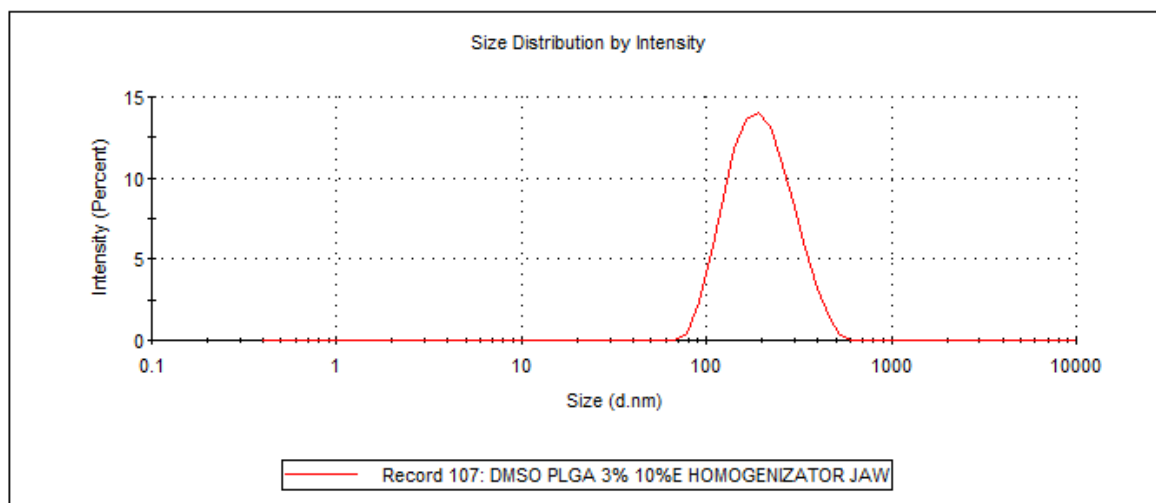


Graf 52 Vliv koncentrace polymeru a emulze homogenizované ultrazvukem na velikost nanočástic

Tabulka 9 Výsledky ukazatele Z-Ave dle způsobu homogenizace

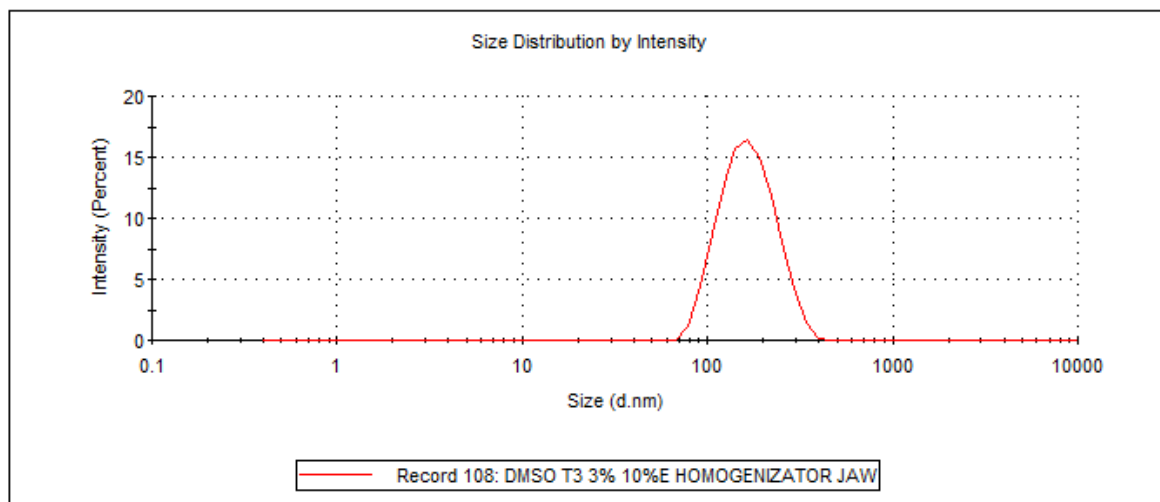
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) | Způsob homogenizace |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|---------------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | | |
| 45. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 207,9 | 0 | 183,4 | Homogenizátor |
| 46. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 172,3 | 0 | 155,2 | Homogenizátor |
| 47. | PLGA 3% | DMSO | 0,2 % CET | 5% | 183,8 | 0 | 170,1 | Homogenizátor |
| 48. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 5% | 150,9 | 0 | 137,6 | Homogenizátor |
| 49. | PLGA 1% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 152,9 | 0 | 136,1 | Homogenizátor |
| 50. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 10% | 106,9 | 0 | 96,72 | Homogenizátor |
| 51. | PLGA 1% | DMSO | 0,2 % CET | 5% | 146,9 | 0 | 128 | Homogenizátor |
| 52. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 5% | 106,4 | 0 | 95,4 | Homogenizátor |

Frekvenční křivka vzorek č. 45



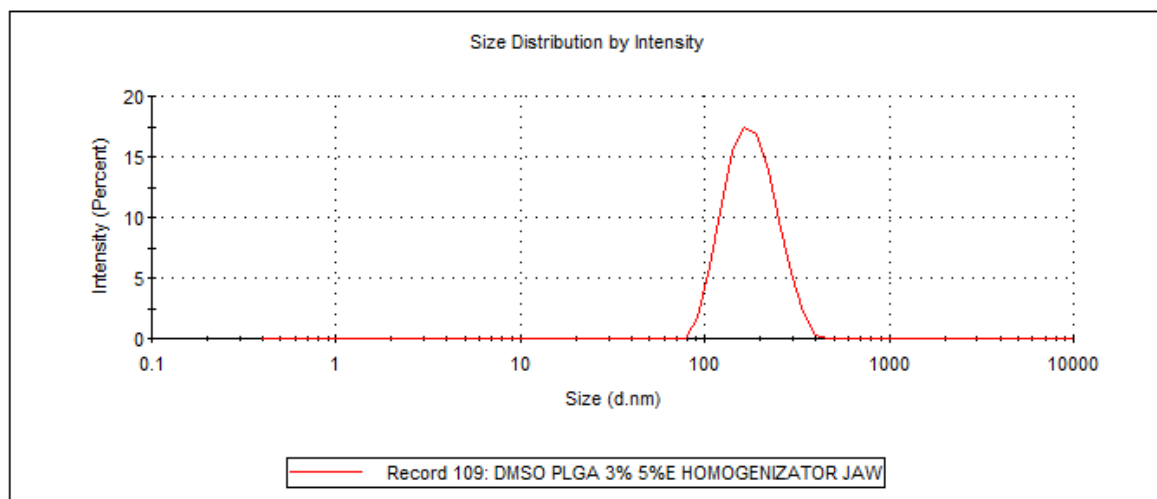
Graf 53 Frekvenční křivka vzorku č. 45

Frekvenční křivka vzorek č. 46



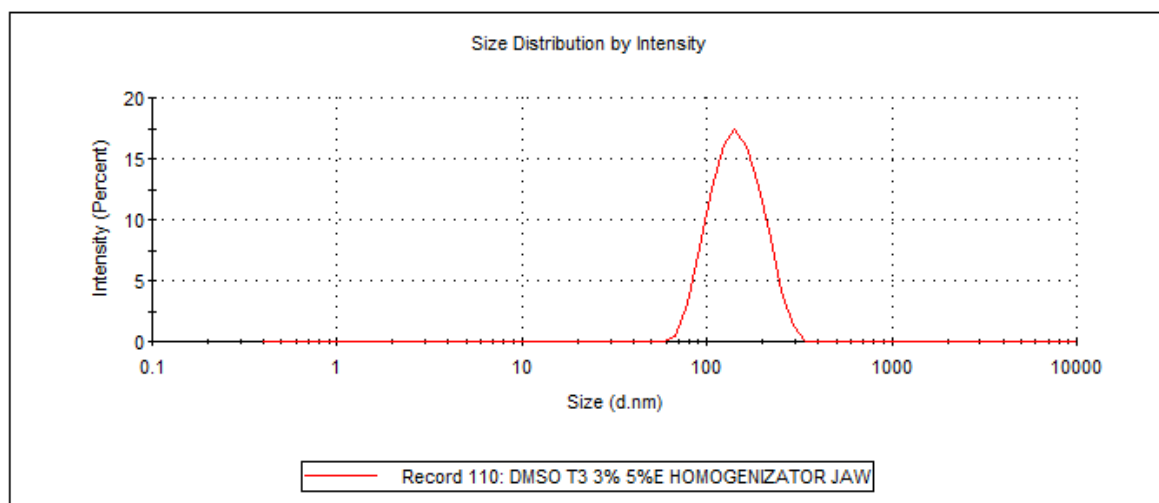
Graf 54 Frekvenční křivka vzorku č. 46

Frekvenční křivka vzorek č. 47



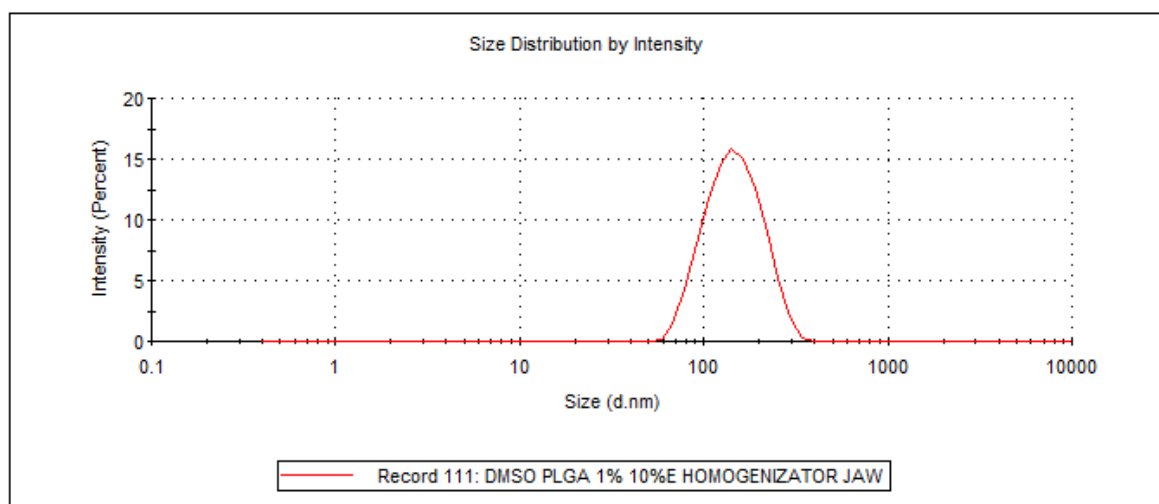
Graf 55 Frekvenční křivka vzorku č. 47

Frekvenční křivka vzorek č. 48



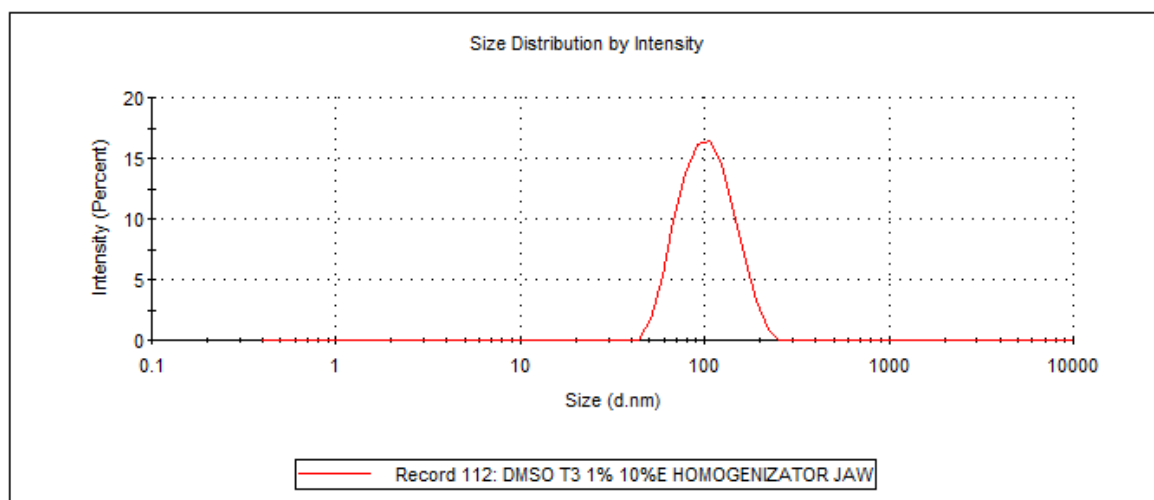
Graf 56 Frekvenční křivka vzorku č. 48

Frekvenční křivka vzorek č. 49



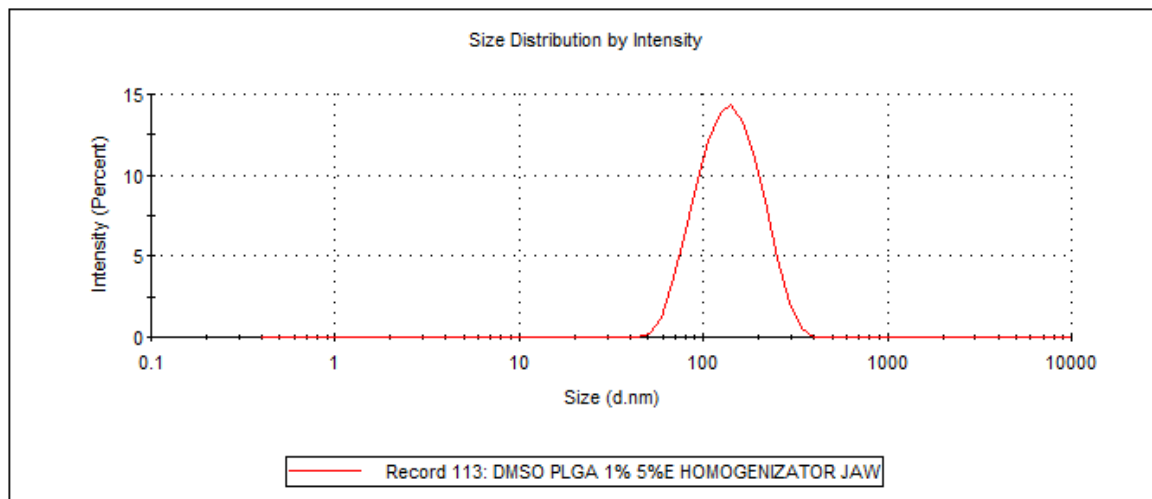
Graf 57 Frekvenční křivka vzorku č. 49

Frekvenční křivka vzorek č. 50



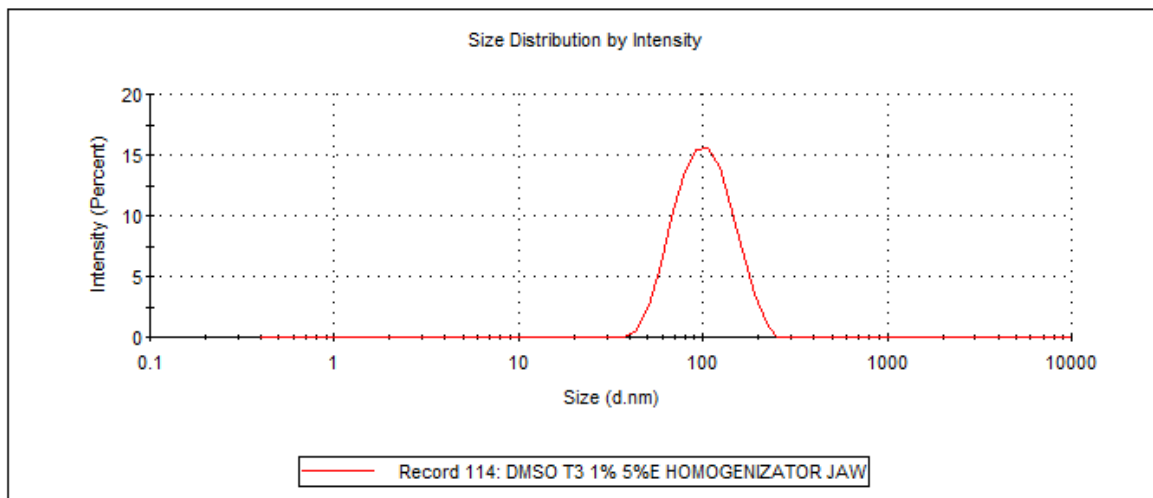
Graf 58 Frekvenční křivka vzorku č. 50

Frekvenční křivka vzorek č. 51



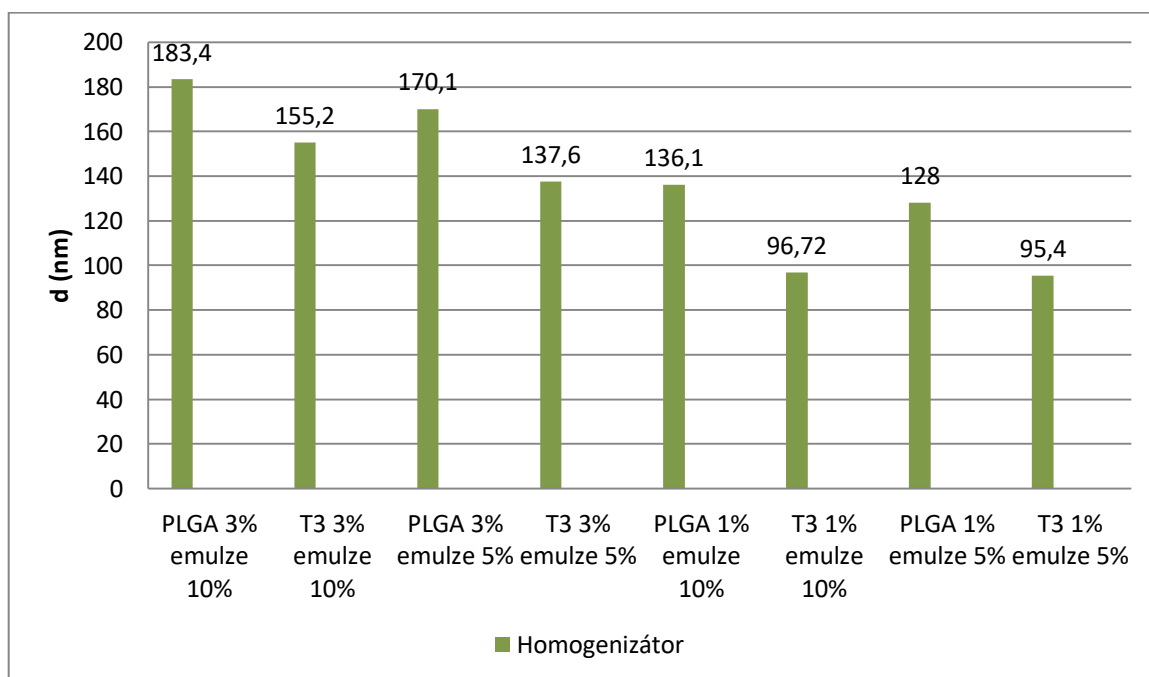
Graf 59 Frekvenční křivka vzorku č. 51

Frekvenční křivka vzorek č. 52



Graf 60 Frekvenční křivka vzorku č. 52

Vliv koncentrace polymeru a koncentrace emulze homogenizované homogenizátorem na velikost polymerních nanočástic



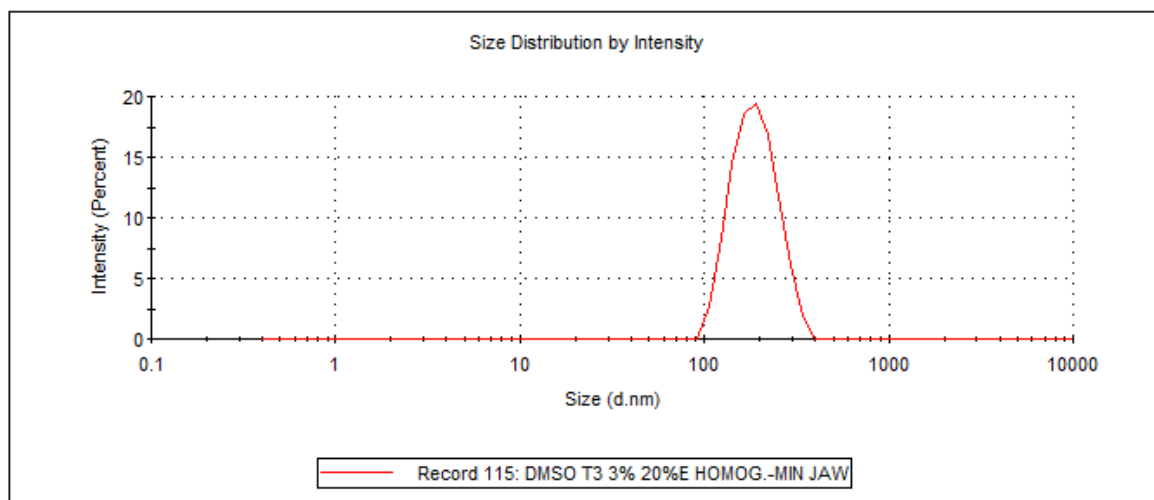
Graf 61 Vliv koncentrace polymeru a emulze homogenizované homogenizátorem na velikost nanočástic

Tabulka č.10

Tabulka 10 Výsledky ukazatele Z-Ave dle způsobu homogenizace vzorků 53-60

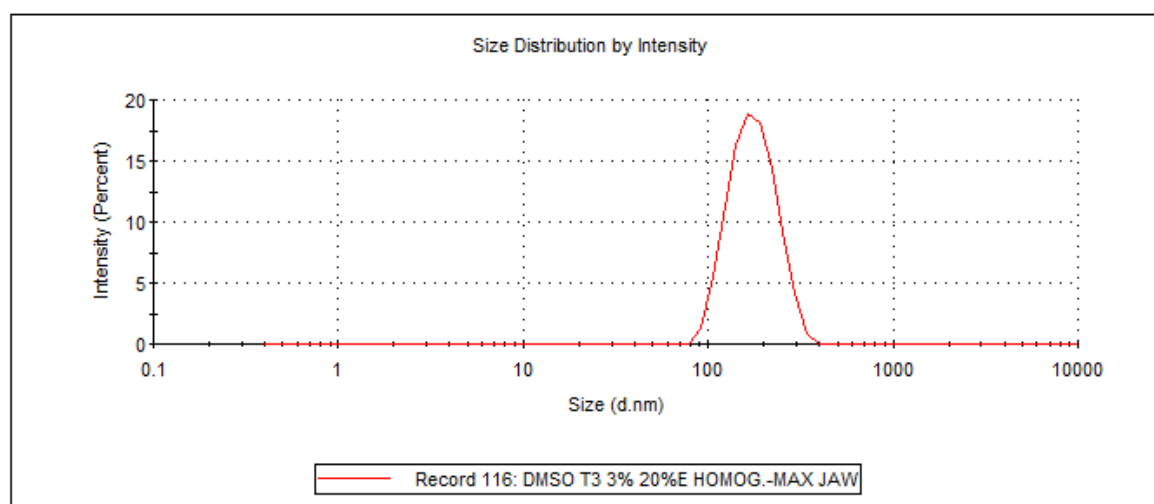
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) | Způsob homogenizace (rychlost) |
|--------|---------|--------------|-----------|--------|--------|--------|------------|--------------------------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | | |
| 53. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 192,3 | 0 | 178,8 | Homogenizátor (minimum) |
| 54. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 179,7 | 0 | 166,6 | Homogenizátor (maximum) |
| 55. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 139,6 | 0 | 129,3 | Homogenizátor (minimum) |
| 56. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 143,3 | 0 | 126,2 | Homogenizátor (maximum) |
| 57. | T3 3% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 291,1 | 0 | 278,7 | Homogenizátor (minimum) |
| 58. | T3 3% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 299,1 | 0 | 276,4 | Homogenizátor (maximum) |
| 59. | T3 1% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 232,0 | 0 | 223,4 | Homogenizátor (minimum) |
| 60. | T3 1% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 194,3 | 0 | 174,3 | Homogenizátor (maximum) |

Frekvenční křivka vzorek č. 53



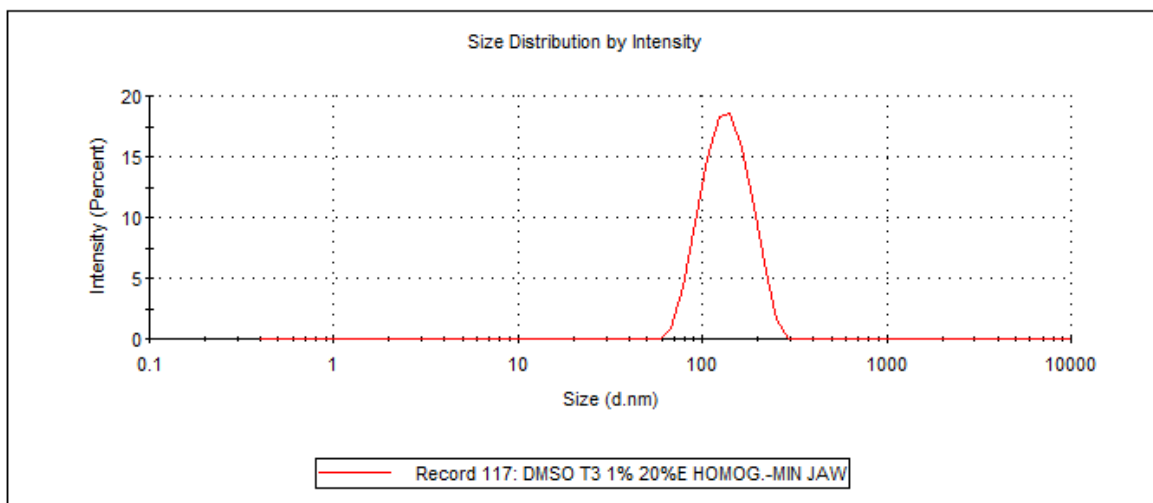
Graf 62 Frekvenční křivka vzorku č. 53

Frekvenční křivka vzorek č. 54



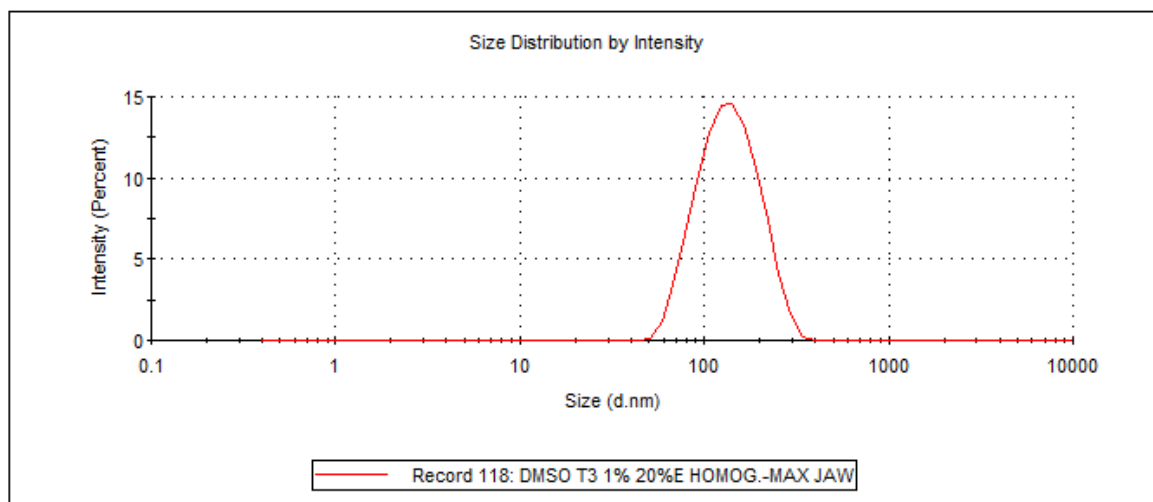
Graf 63 Frekvenční křivka vzorku č. 54

Frekvenční křivka vzorek č. 55



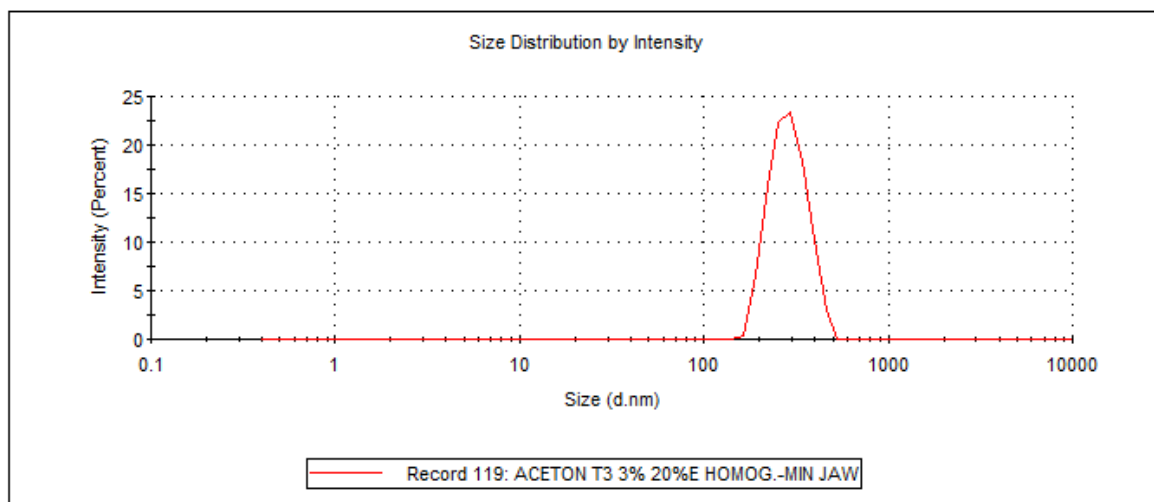
Graf 64 Frekvenční křivka vzorku č. 55

Frekvenční křivka vzorek č. 56



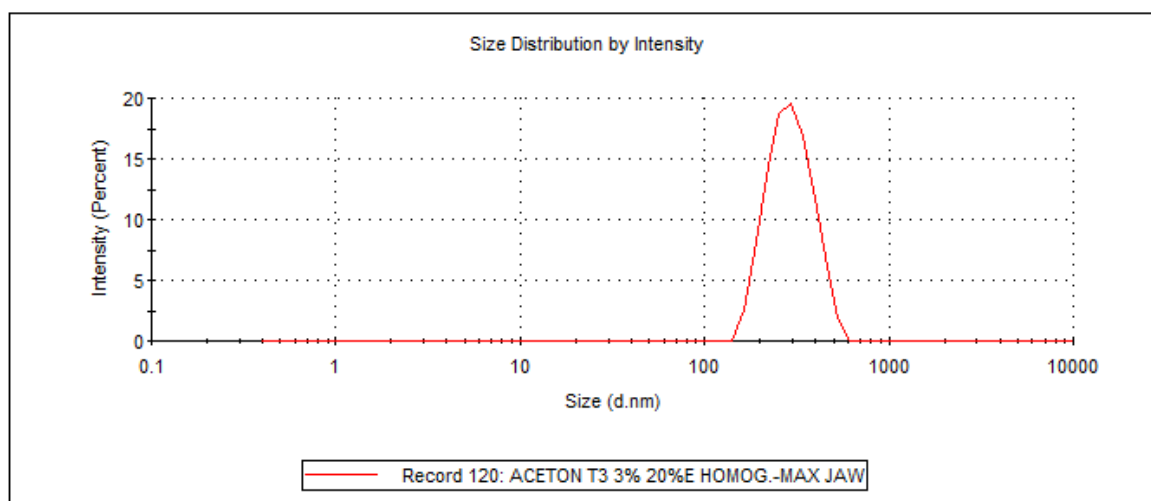
Graf 65 Frekvenční křivka vzorku č. 56

Frekvenční křivka vzorek č. 57



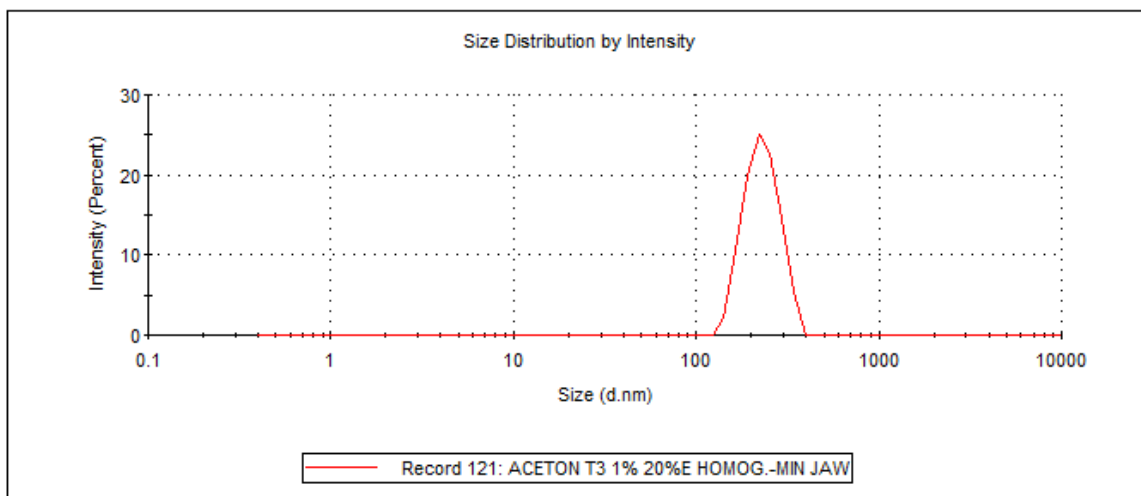
Graf 66 Frekvenční křivka vzorku č. 57

Frekvenční křivka vzorek č. 58



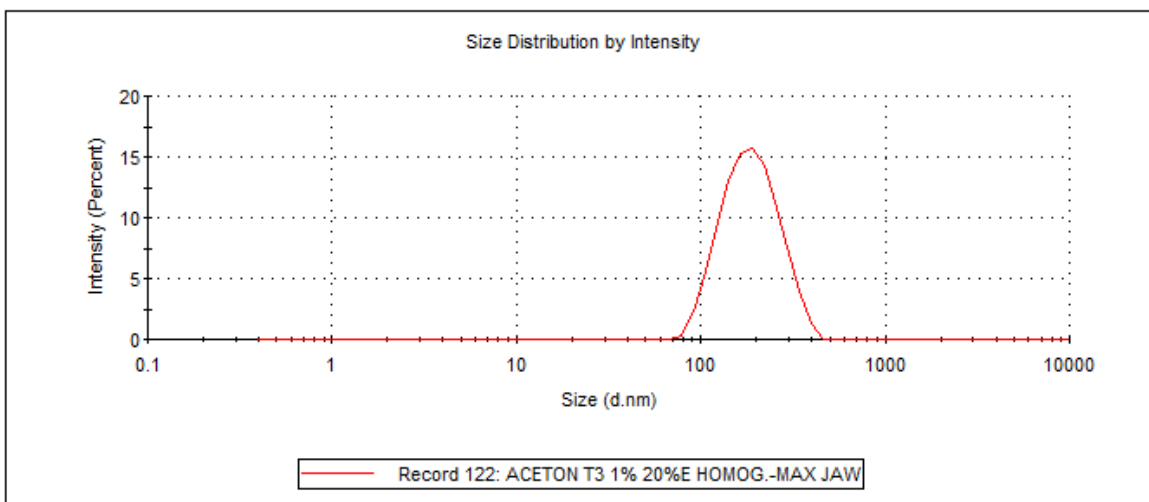
Graf 67 Frekvenční křivka vzorku č. 58

Frekvenční křivka vzorek č. 59



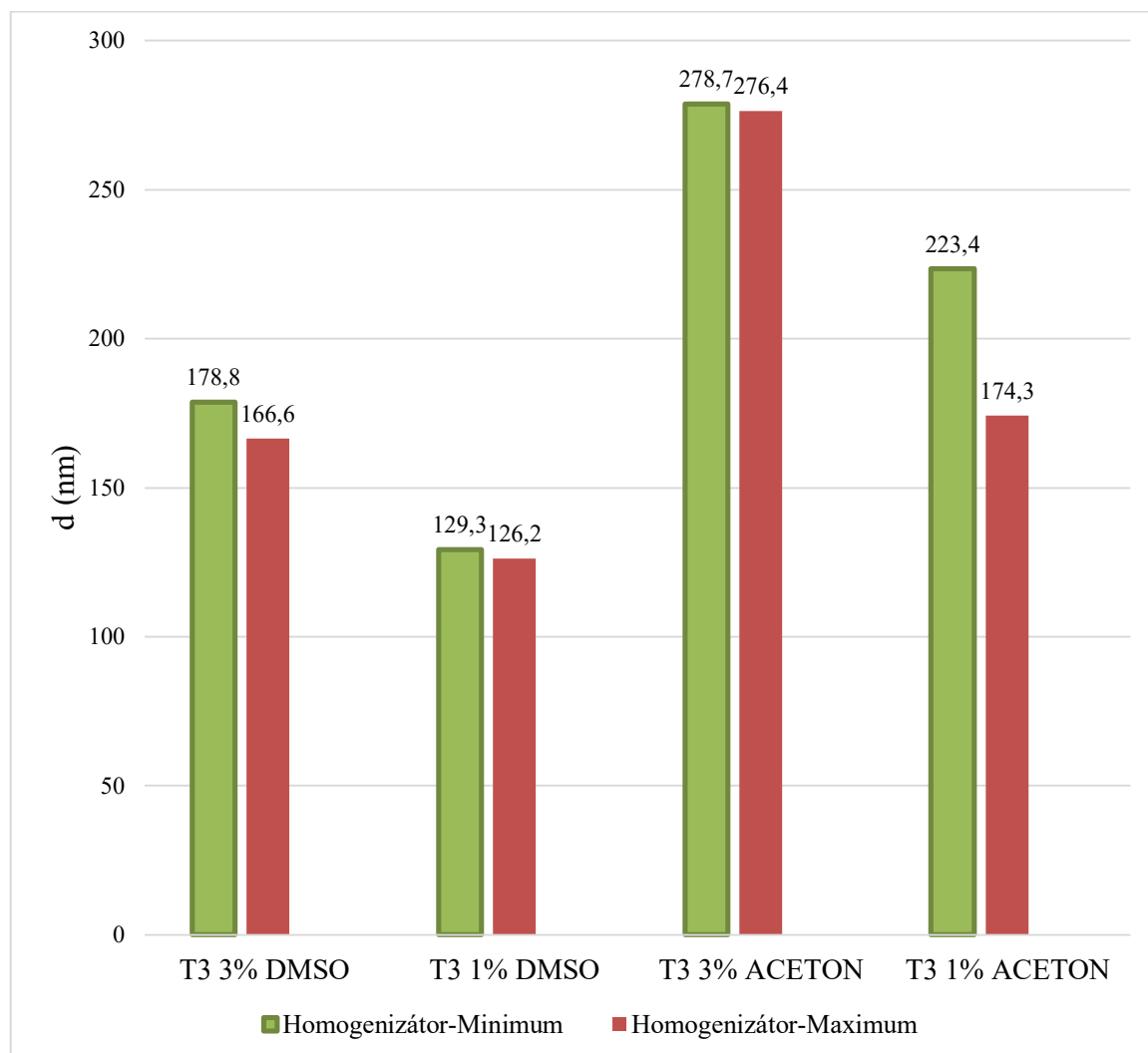
Graf 68 Frekvenční křivka vzorku č. 59

Frekvenční křivka vzorek č. 60



Graf 69 Frekvenční křivka vzorku č. 60

Porovnání vlivu koncentrace polymeru a druhu rozpouštědla (DMSO, Aceton) na velikost polymerních nanočástic při homogenizaci homogenizátorem při minimální a maximální rychlosti

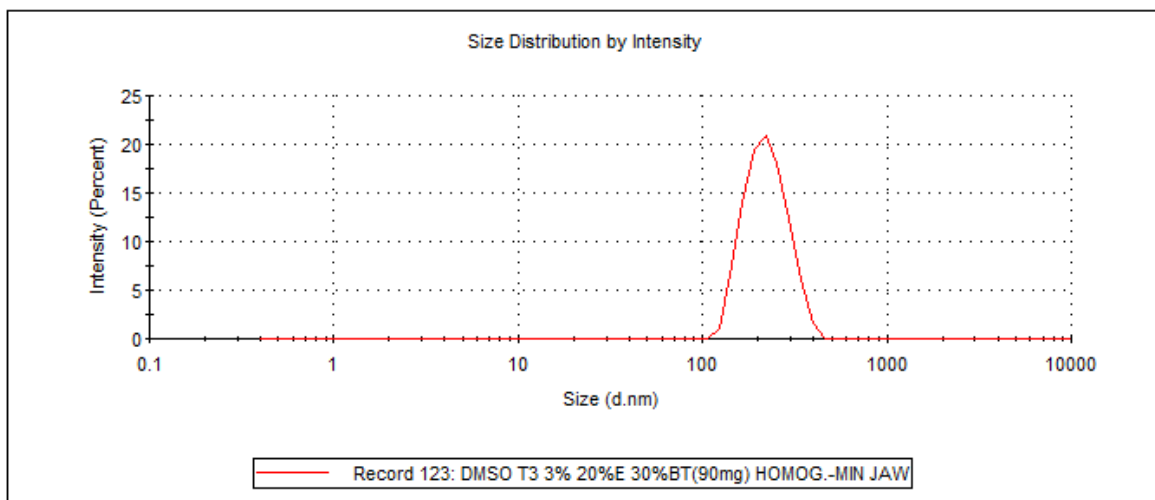


Graf 70 Vliv koncentrace polymeru a druhu rozpouštědla na velikost nanočástic

Tabulka 11 Výsledky ukazatele Z-Ave a léčiva při různém způsobu homogenizace

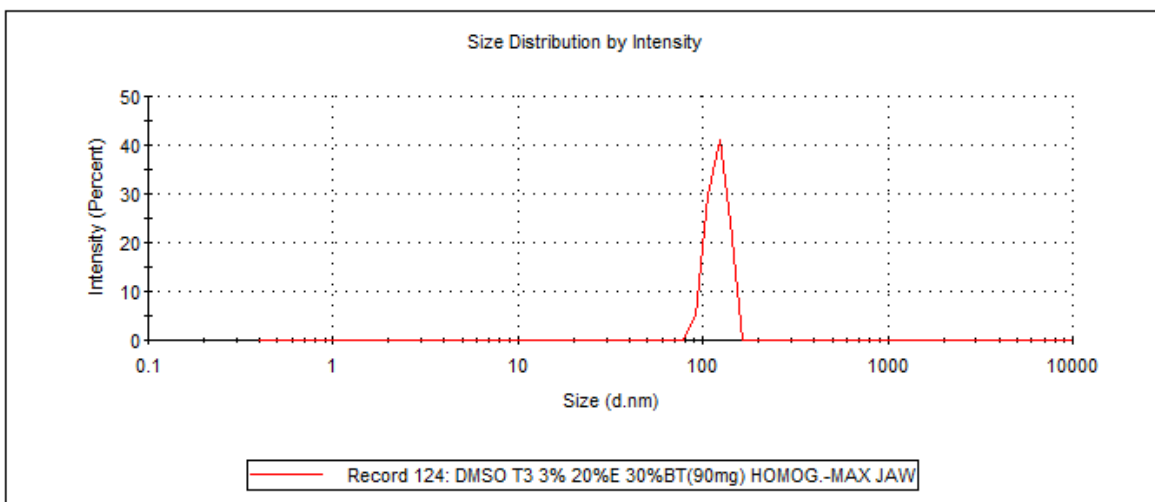
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) | Léčivo | Způsob homogenizace (rychlost) |
|--------|---------|--------------|--------------|--------|--------|--------|------------|----------|--------------------------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | | TER (mg) | |
| 61. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 226 | 0 | 230, 7 | 90 | Homog. (min.) |
| 62. | T3 3% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 120,6 | 0 | 472, 8 | 90 | Homog. (max.) |
| 63. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 246,8 | 0 | 227, 5 | 30 | Homog. (min.) |
| 64. | T3 1% | DMSO | 0,2 % CET | 20% | 141,1 | 0 | 285, 4 | 30 | Homog. (max.) |
| 65. | T3 3% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 453,7 | 0 | 405, 1 | 90 | Homog. (min.) |
| 66. | T3 3% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 269,4 | 1546 | 350, 3 | 90 | Homog. (max.) |
| 67. | T3 1% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 323,9 | 0 | 281, 9 | 30 | Homog. (min.) |
| 68. | T3 1% | ACETO N | 0,2 % CET | 20% | 272 | 0 | 252, 2 | 30 | Homog. (max.) |

Frekvenční křivka vzorek č. 61



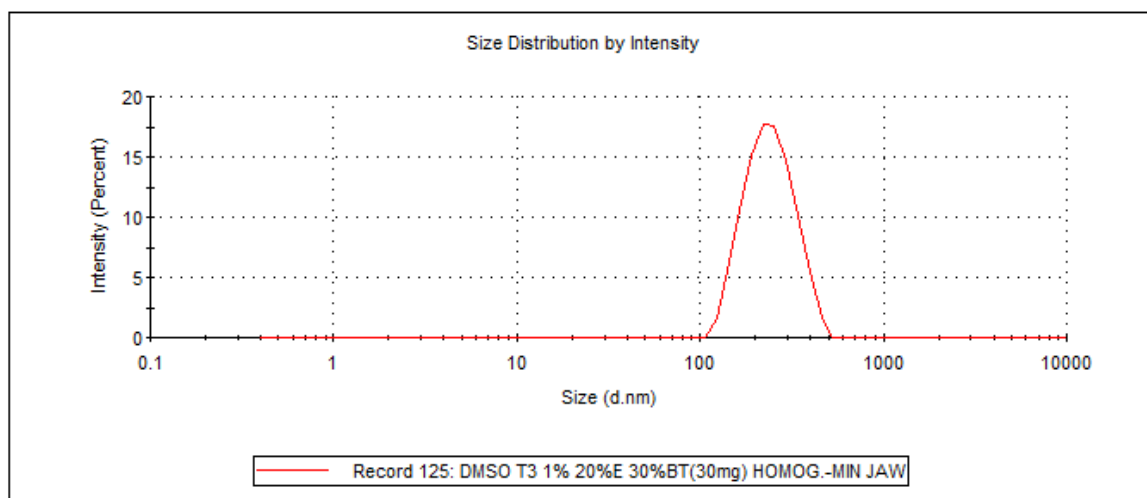
Graf 71 Frekvenční křivka vzorku č. 61

Frekvenční křivka vzorek č. 62



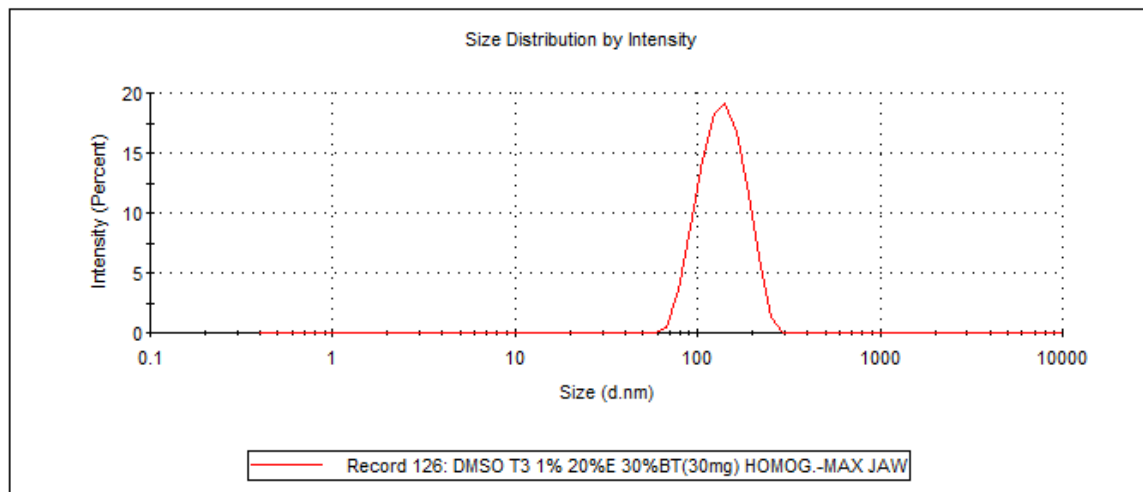
Graf 72 Frekvenční křivka vzorku č. 62

Frekvenční křivka vzorek č. 63



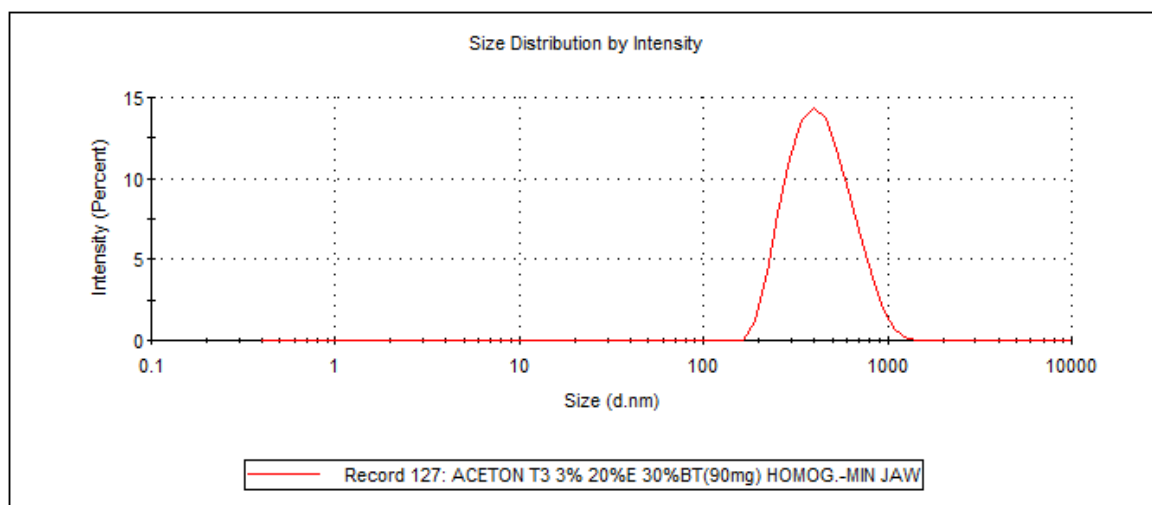
Graf 73 Frekvenční křivka vzorku č. 63

Frekvenční křivka vzorek č. 64



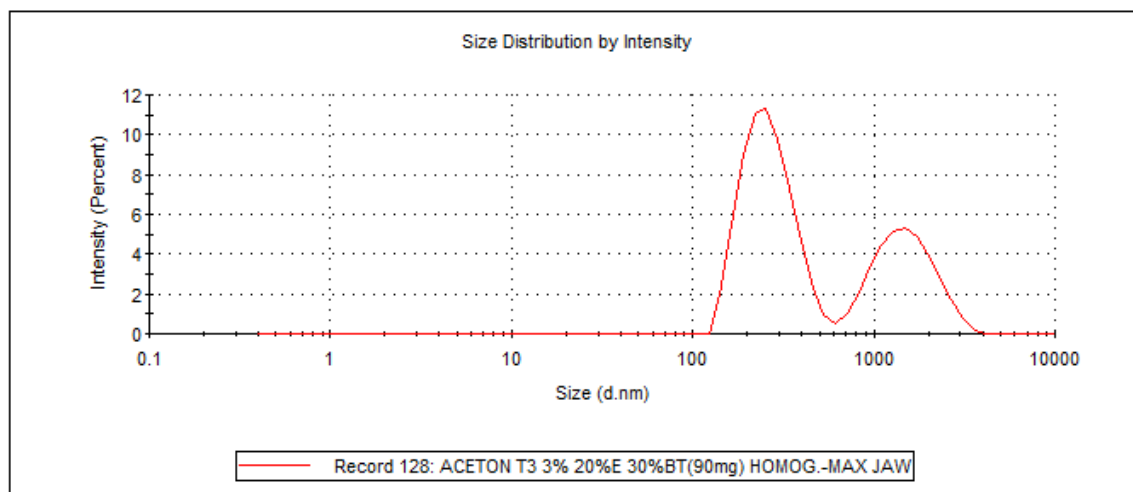
Graf 74 Frekvenční křivka vzorku č. 64

Frekvenční křivka vzorek č. 65



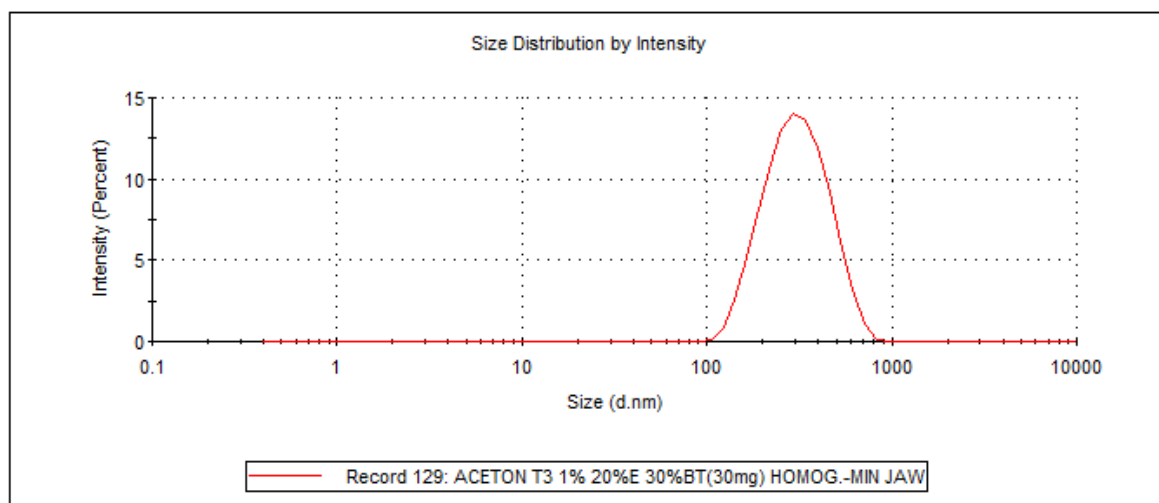
Graf 75 Frekvenční křivka vzorku č. 65

Frekvenční křivka vzorek č. 66



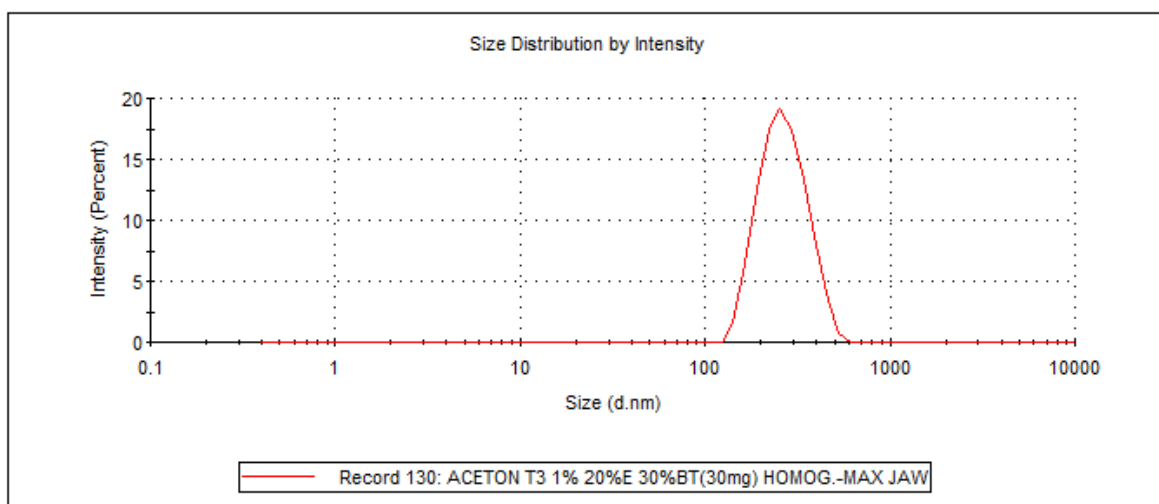
Graf 76 Frekvenční křivka vzorku č. 66

Frekvenční křivka vzorek č. 67



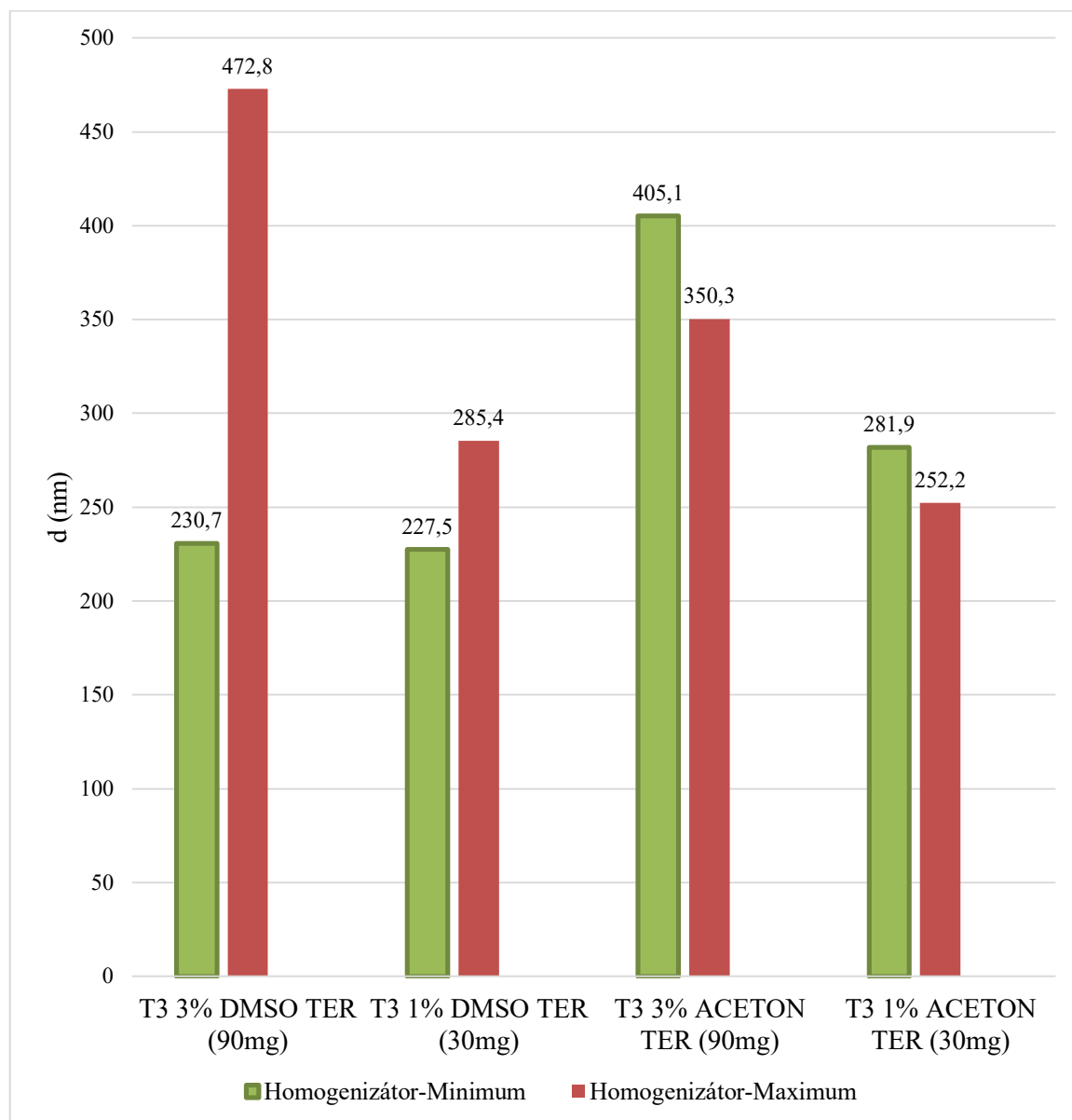
Graf 77 Frekvenční křivka vzorku č. 67

Frekvenční křivka vzorek č. 68



Graf 78 Frekvenční křivka vzorku č. 68

Porovnání vlivu koncentrace polymeru a druhu rozpouštědla (DMSO, Aceton) na velikost polymerních nanočástic při homogenizaci homogenizátorem při minimální a maximální rychlosti a přidání terbinafinu do směsi

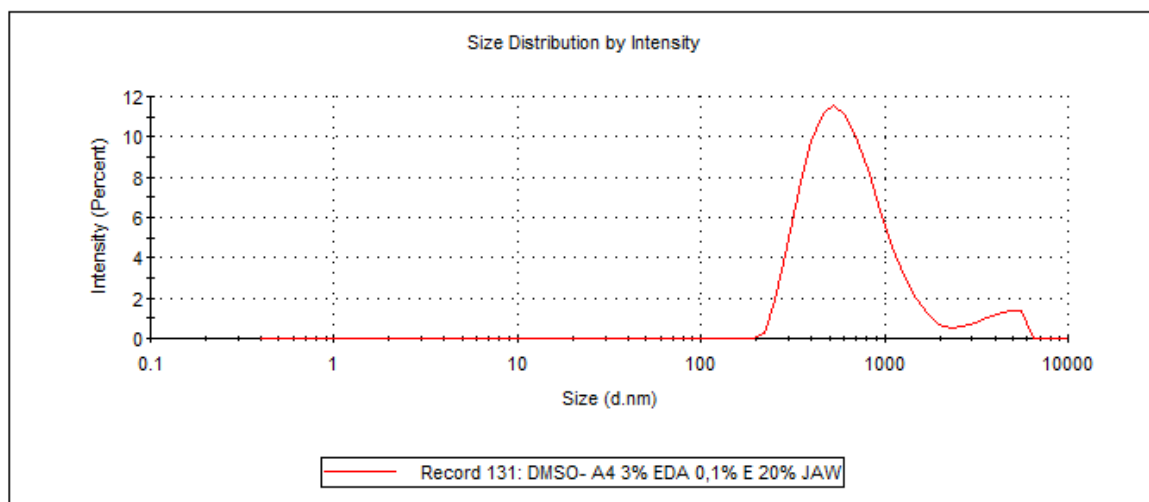


Graf 79 Porovnání vlivu koncentrace polymeru a druhu rozpouštědla na velikost nanočástic přidáním terbinafinu

Tabulka 12 Výsledky ukazatele Z-Ave vzorků 69-75

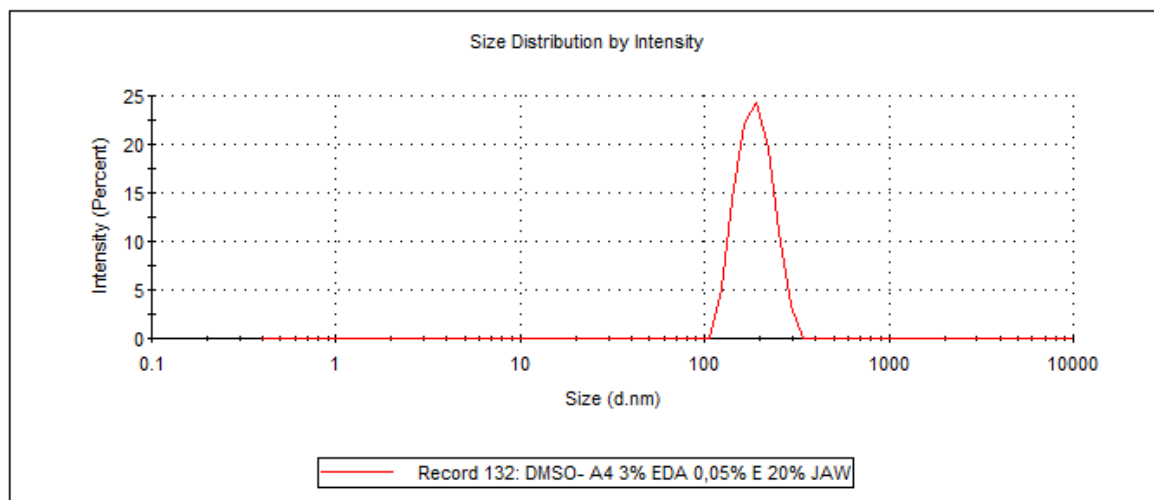
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | d (nm) | | Z-Ave (nm) |
|--------|---------|--------------|------------|--------|--------|--------|------------|
| | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 69. | A4 3% | DMSO | EDA 0,1% | 20% | 667,4 | 4078 | 591,9 |
| 70. | A4 3% | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 190,6 | 0 | 182,8 |
| 71. | A4 3% | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 127,8 | 0 | 121 |
| 72. | A4 3% | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 107,3 | 0 | 97,87 |
| 73. | PLGA 3% | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 416,3 | 5031 | 391,9 |
| 74. | PLGA 3% | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 272,8 | 0 | 252,6 |
| 75. | PLGA 3% | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 227,9 | 0 | 206,3 |

Frekvenční křivka vzorek č. 69



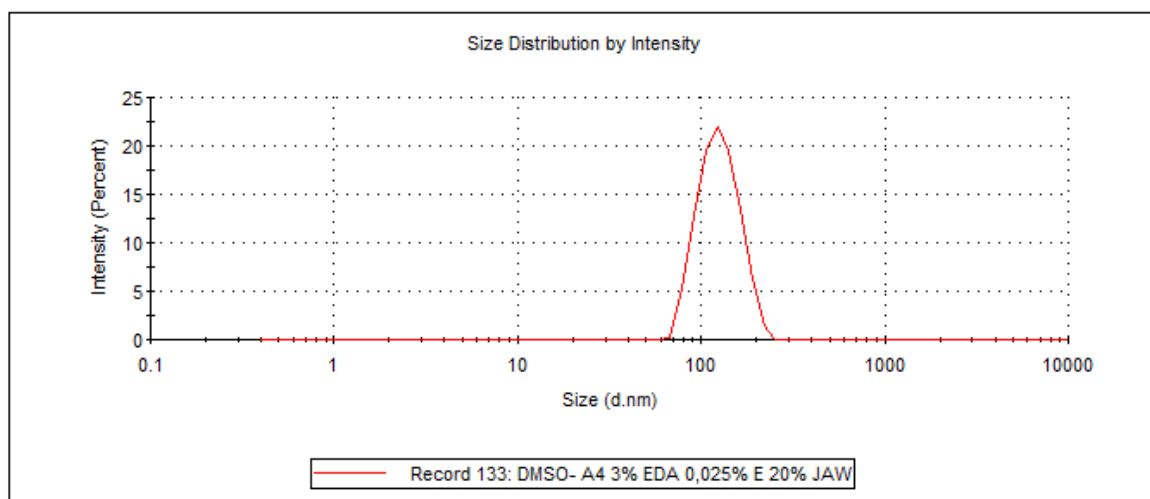
Graf 80 Frekvenční křivka vzorku č. 69

Frekvenční křivka vzorek č. 70



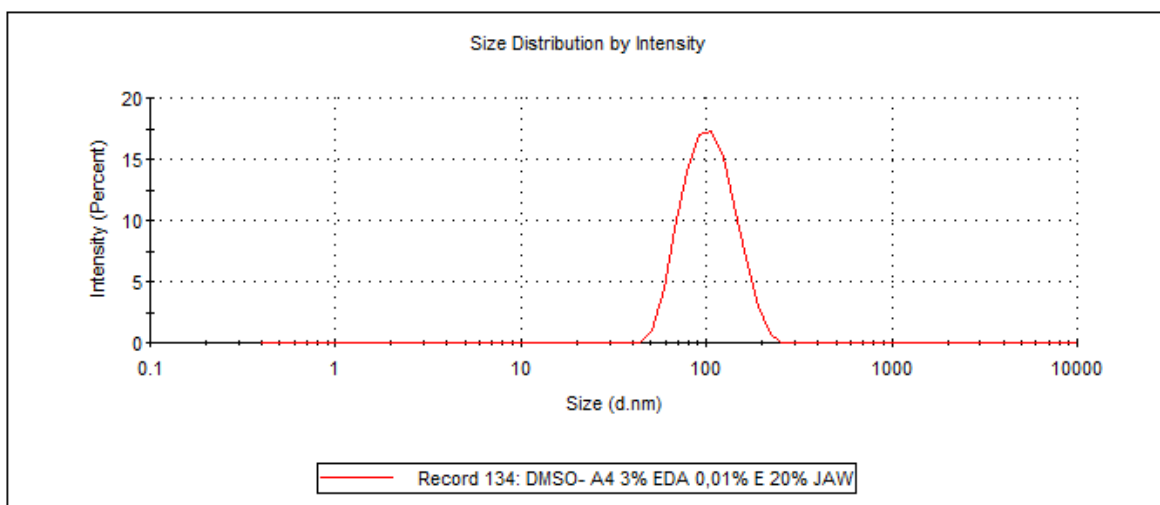
Graf 81 Frekvenční křivka vzorku č. 70

Frekvenční křivka vzorek č. 71



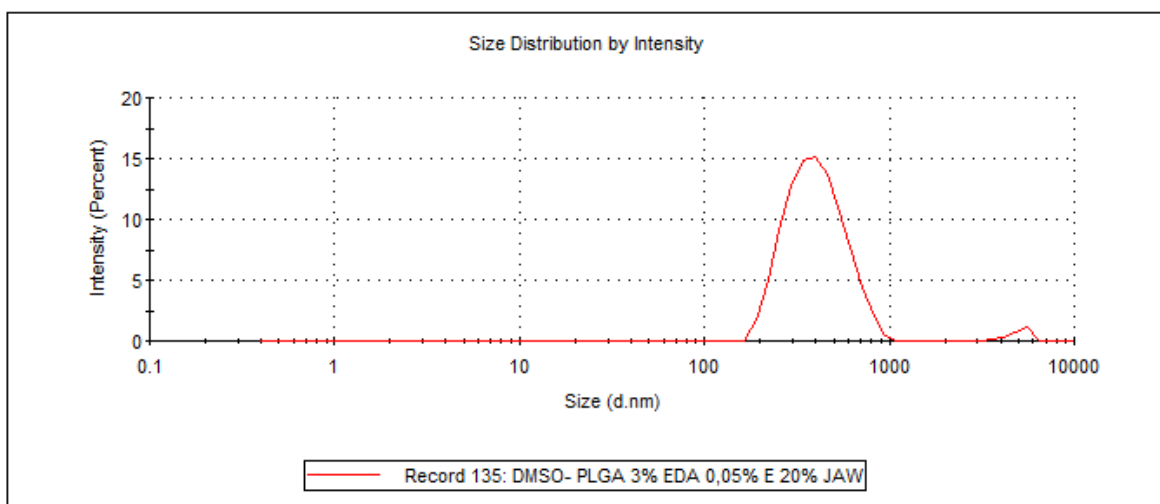
Graf 82 Frekvenční křivka vzorku č. 71

Frekvenční křivka vzorek č. 72



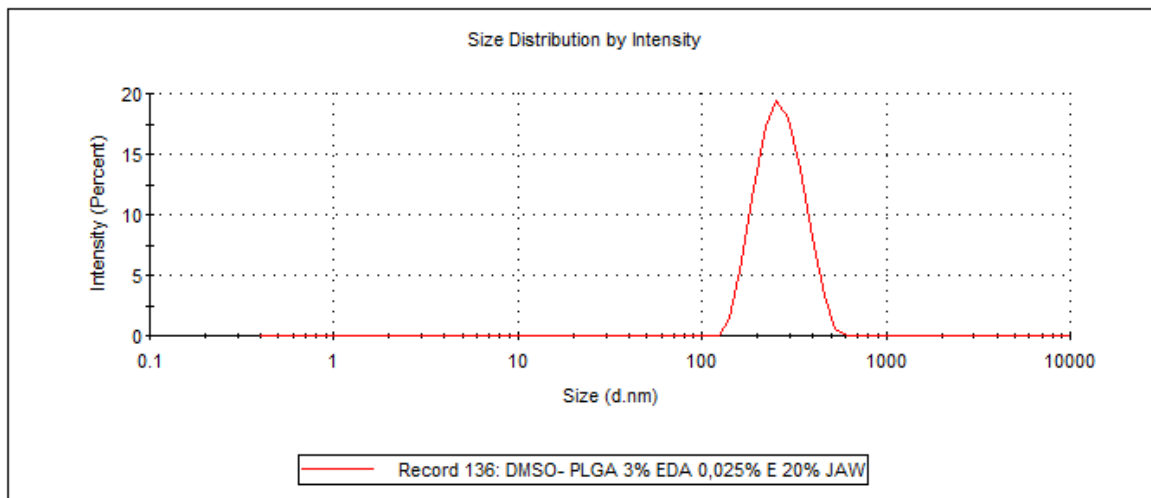
Graf 83 Frekvenční křivka vzorku č. 72

Frekvenční křivka vzorek č. 73



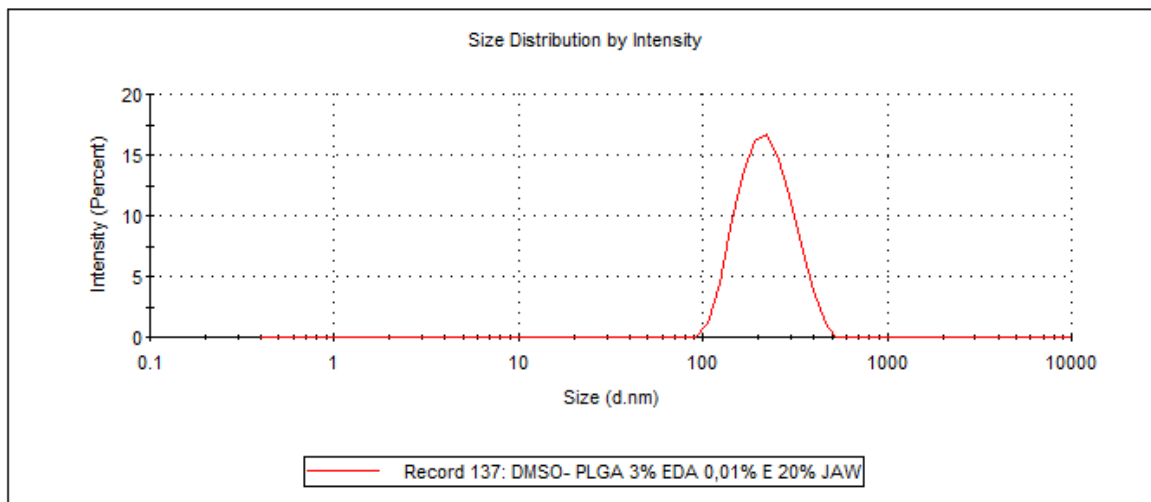
Graf 84 Frekvenční křivka vzorku č. 73

Frekvenční křivka vzorek č. 74



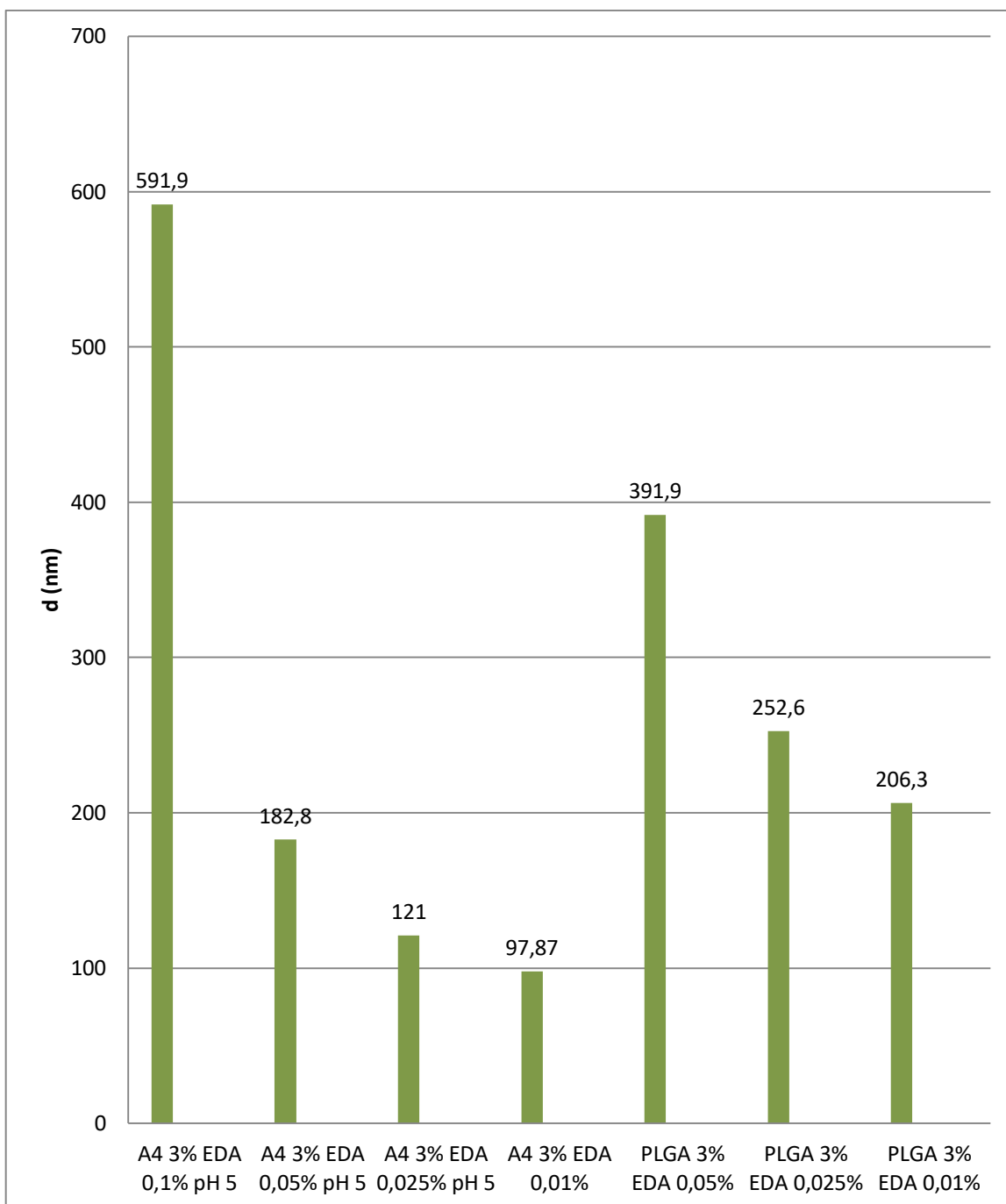
Graf 85 Frekvenční křivka vzorku č. 74

Frekvenční křivka vzorek č. 75



Graf 86 Frekvenční křivka vzorku č. 75

Porovnání vlivu druhu polymeru a koncentrace emulgátoru (EDA) na velikost polymerních nanočástic

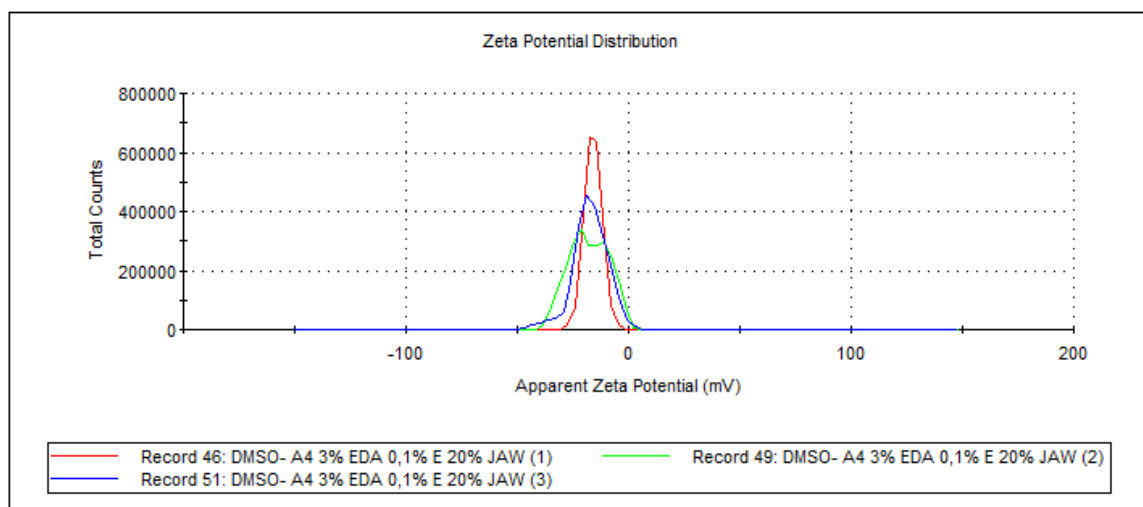


Graf 87 Vliv druhu polymeru a koncentrace EDA na velikost nanočástic

Tabulka 13 Výsledky ukazatele Z-Potential

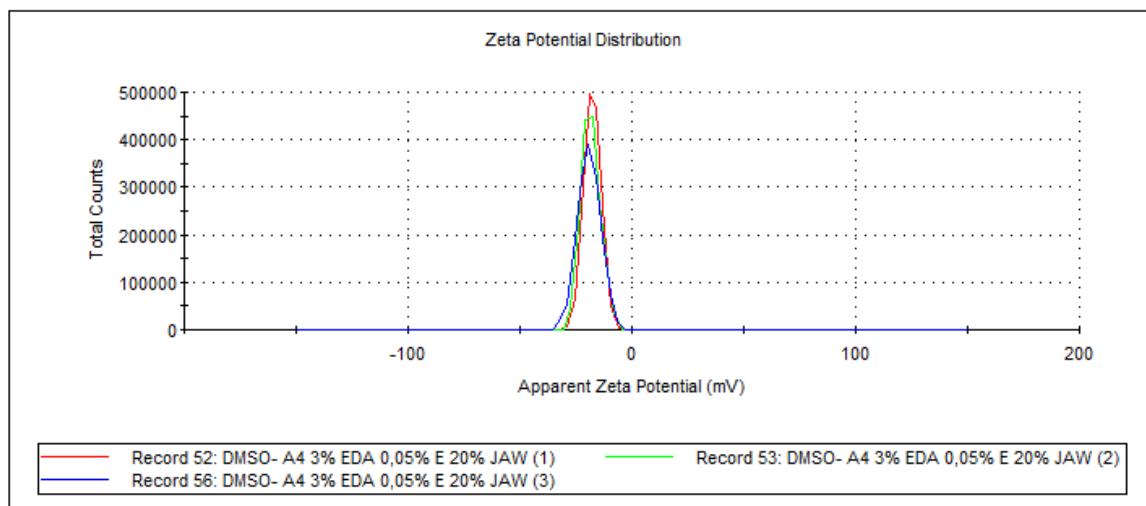
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | Vzorek | (mV) | | Z-Potential (mV) |
|--------|---------|--------------|------------|--------|--------|--------|--------|------------------|
| | | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 69. | A4 | DMSO | EDA 0,1% | 20% | 69(1) | -16,1 | 0 | -16,1 |
| | | | | | 69(2) | -22,7 | -9,42 | -17,9 |
| | | | | | 69(3) | -17,2 | 0 | -17,2 |
| 70. | A4 | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 70(1) | -17,6 | 0 | -17,6 |
| | | | | | 70(2) | -18,4 | 0 | -18,4 |
| | | | | | 70(3) | -19 | 0 | -19 |
| 71. | A4 | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 71(1) | -17,8 | 0 | -17,8 |
| | | | | | 71(2) | -17,4 | 0 | -17,4 |
| | | | | | 71(3) | -18 | 0 | -18 |
| 72. | A4 | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 72(1) | -19,3 | 0 | -19,3 |
| | | | | | 72(2) | -19,3 | 0 | -19,3 |
| | | | | | 72(3) | -19,6 | 0 | -19,6 |
| 73. | PLGA | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 73(1) | -12,6 | 0 | -12,6 |
| | | | | | 73(2) | -13 | 0 | -13 |
| | | | | | 73(3) | -13,2 | 0 | -13,2 |
| 74. | PLGA | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 74(1) | -13,1 | 0 | -13,1 |
| | | | | | 74(2) | -13,2 | 0 | -13,2 |
| | | | | | 74(3) | -13,5 | 0 | -13,5 |
| 75. | PLGA | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 75(1) | -14,9 | 0 | -14,9 |
| | | | | | 75(2) | -14,8 | 0 | -14,8 |
| | | | | | 75(3) | -15,1 | 0 | -15,1 |

Z-potenciál křivka vzorek č. 69



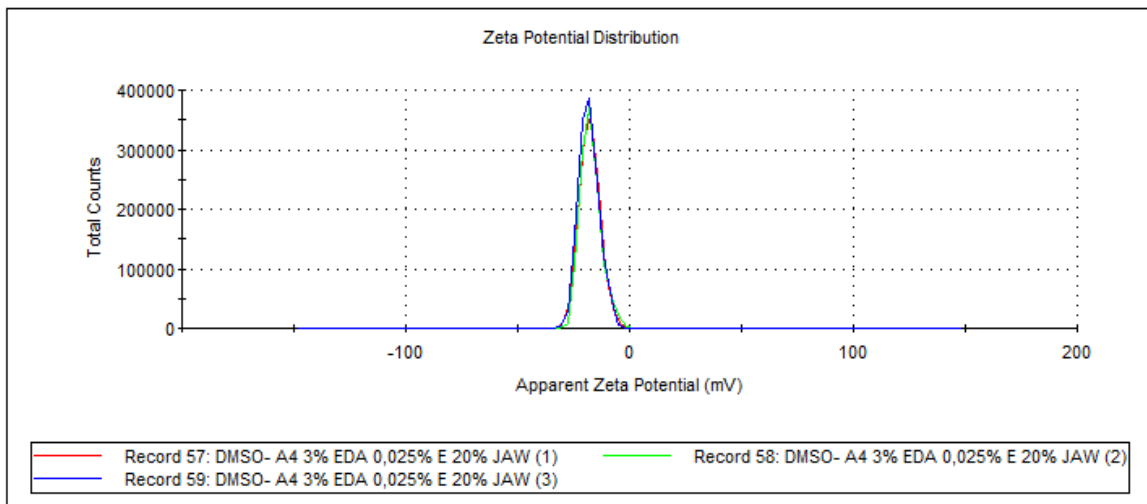
Graf 88 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 69

Z-potenciál křivka vzorek č. 70



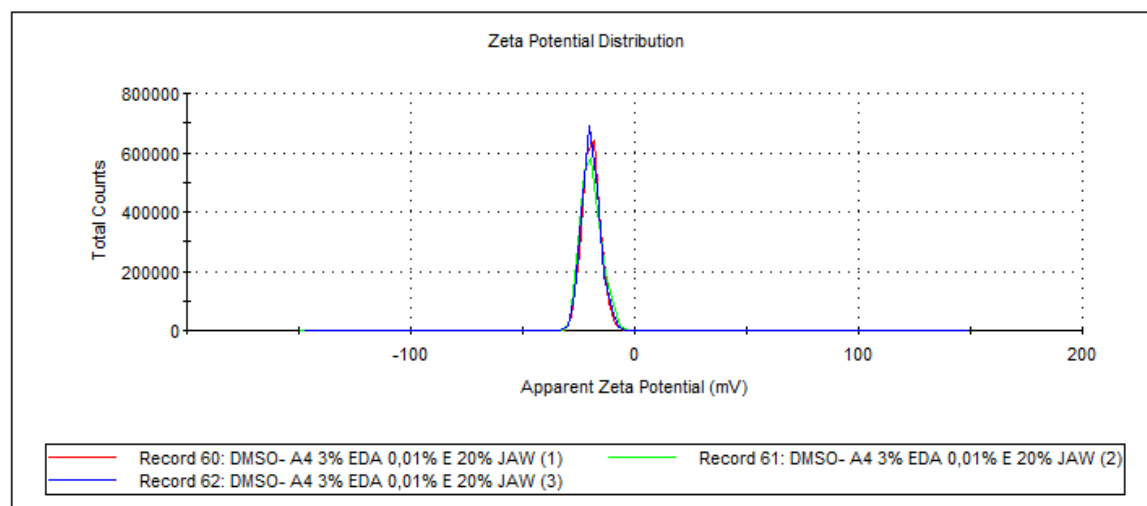
Graf 89 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 70

Z-potenciál křivka vzorek č. 71



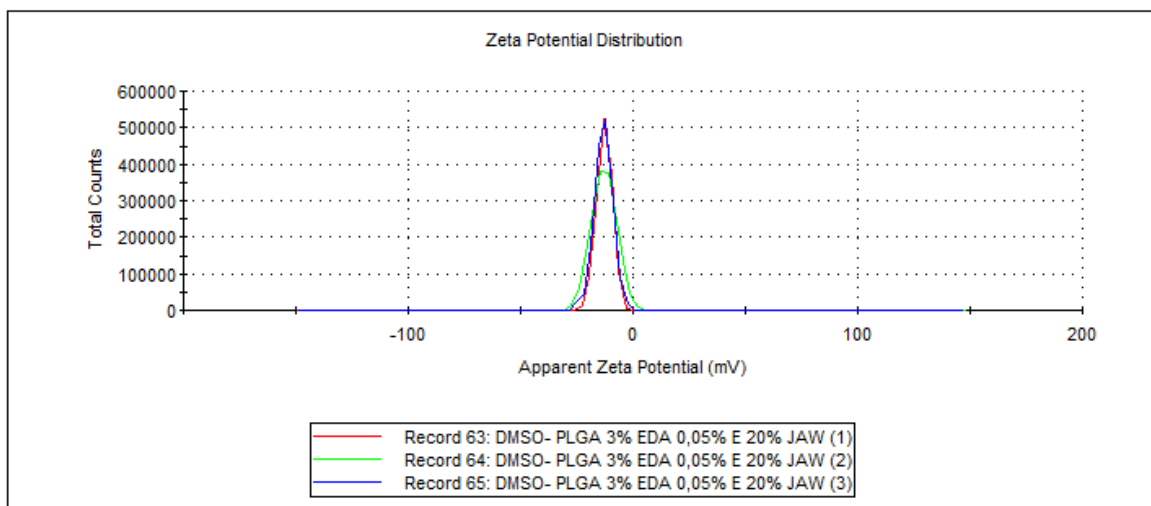
Graf 90 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 71

Z-potenciál křivka vzorek č. 72



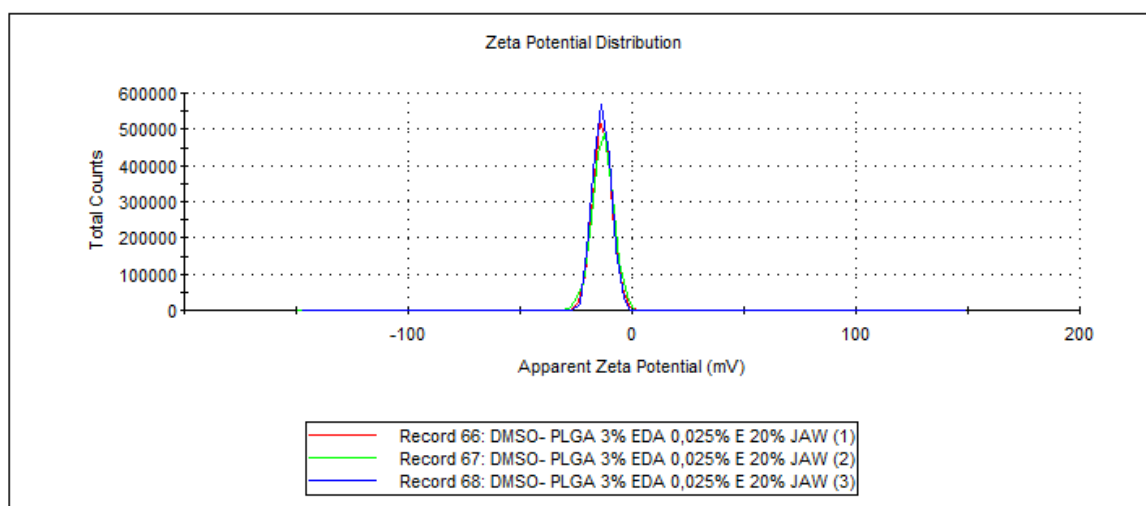
Graf 91 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 72

Z-potenciál křivka vzorek č. 73



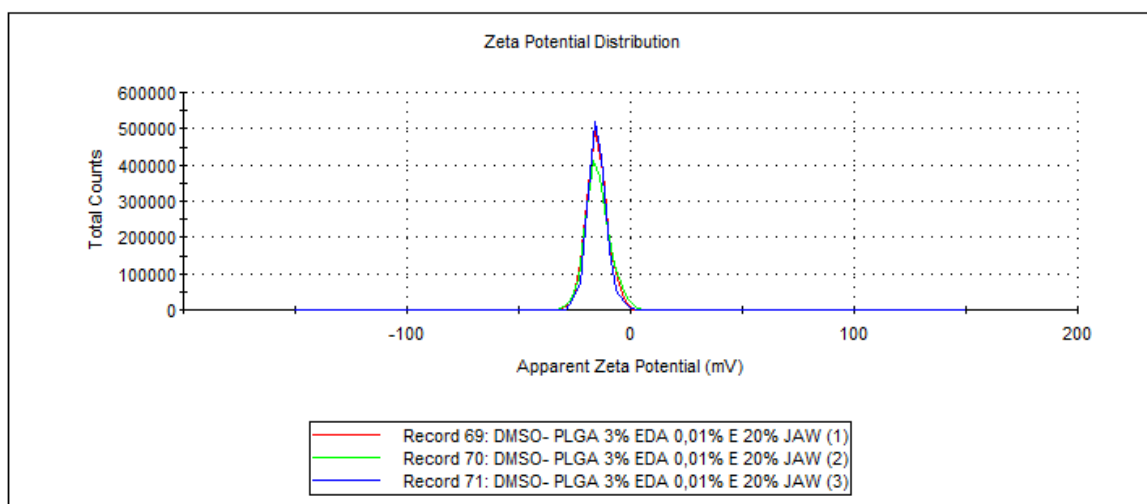
Graf 92 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 73

Z-potenciál křivka vzorek č. 74



Graf 93 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 74

Z-potenciál křivka vzorek č. 75

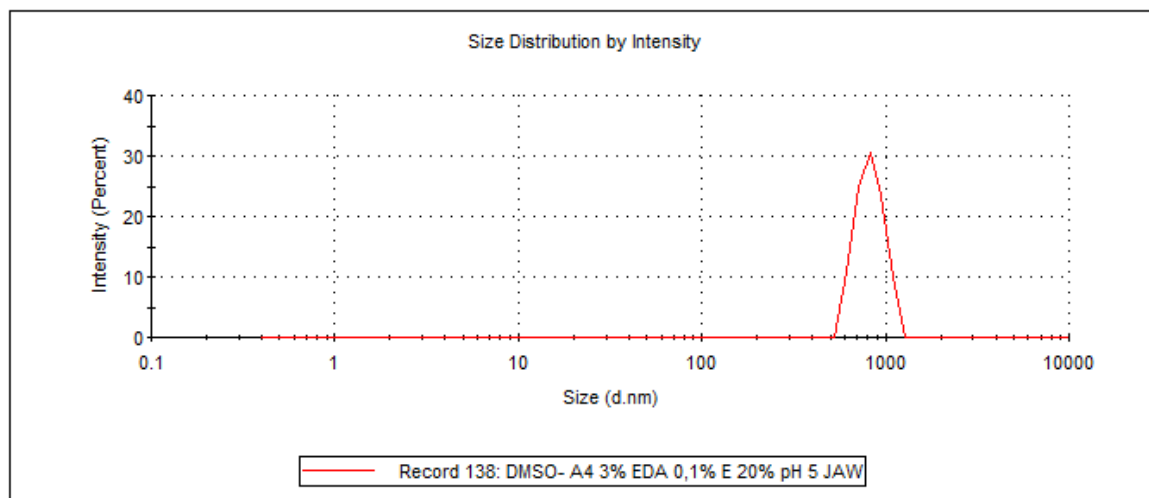


Graf 94 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 75

Tabulka 14 Výsledky ukazatele Z-Ave při daném pH na vzorcích 76-83

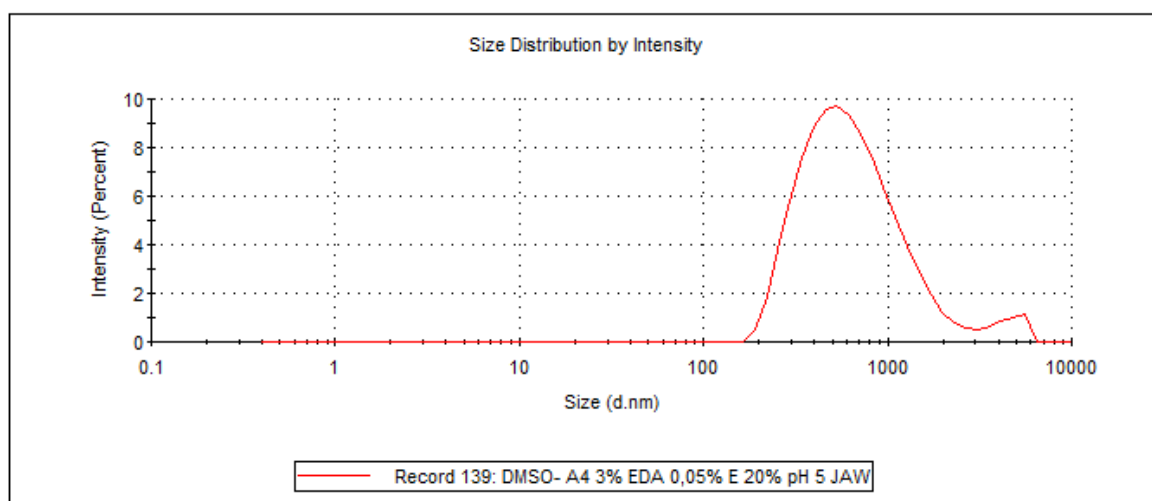
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | pH | d (nm) | | Z-Ave (nm) |
|--------|---------|--------------|------------|--------|----|--------|--------|------------|
| | | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 76. | A4 | DMSO | EDA 0,1% | 20% | 5 | 833,2 | 0 | 952,1 |
| 77. | A4 | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 5 | 711,5 | 4493 | 566,3 |
| 78. | A4 | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 5 | 164,9 | 0 | 152,7 |
| 79. | A4 | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 5 | 109,6 | 0 | 101,1 |
| 80. | PLGA | DMSO | EDA 0,1% | 20% | 5 | 565,2 | 0 | 612,4 |
| 81. | PLGA | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 5 | 449,6 | 5036 | 423,4 |
| 82. | PLGA | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 5 | 226,0 | 0 | 215,1 |
| 83. | PLGA | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 5 | 216,9 | 5006 | 196,6 |

Frekvenční křivka vzorek č. 76



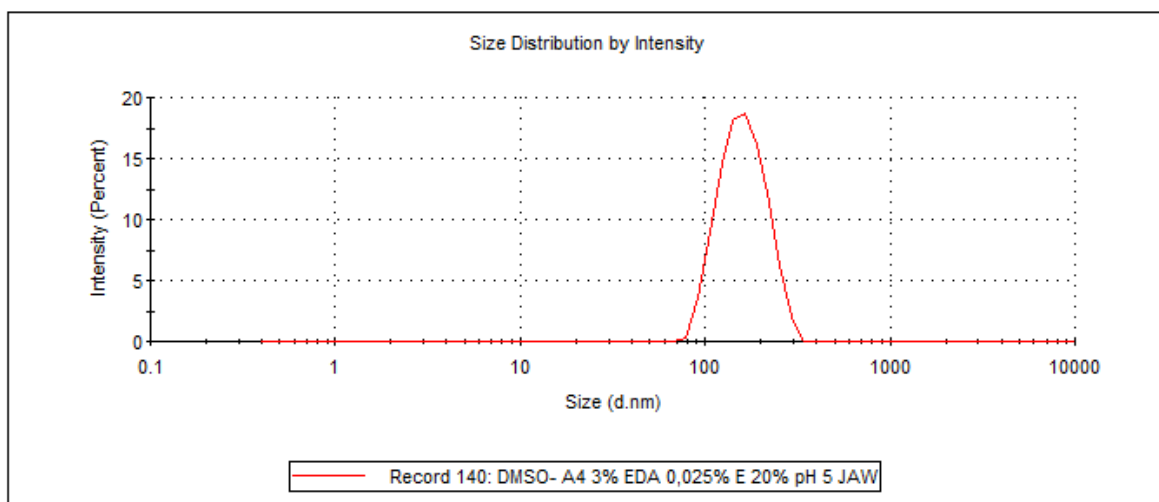
Graf 95 Frekvenční křivka vzorku č. 76

Frekvenční křivka vzorek č. 77



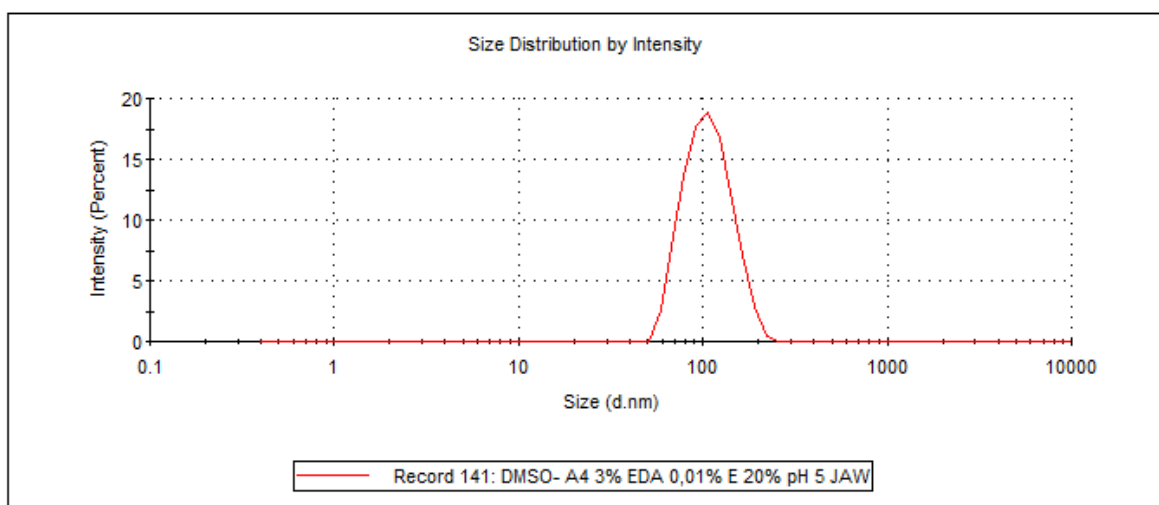
Graf 96 Frekvenční křivka vzorku č. 77

Frekvenční křivka vzorek č. 78



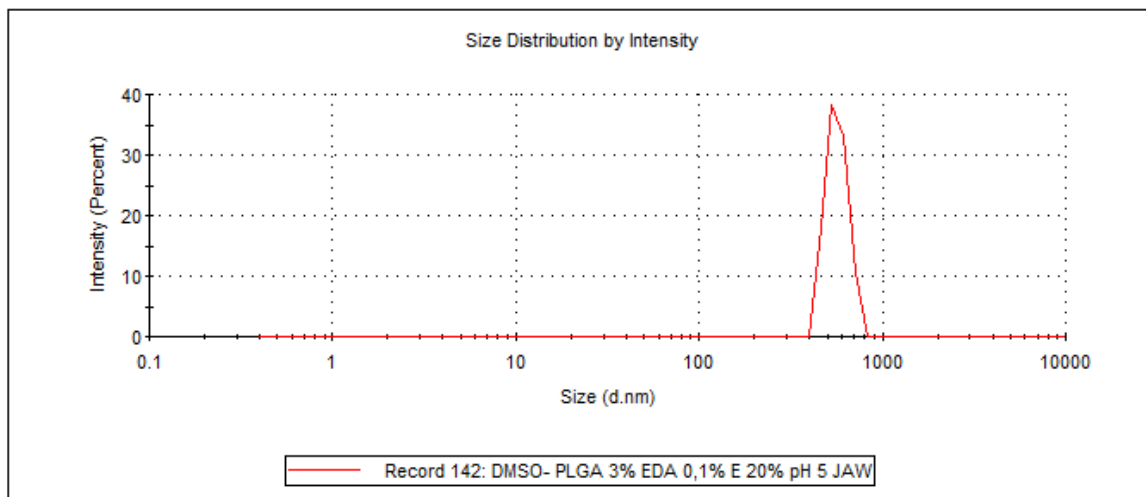
Graf 97 Frekvenční křivka vzorku č. 78

Frekvenční křivka vzorek č. 79



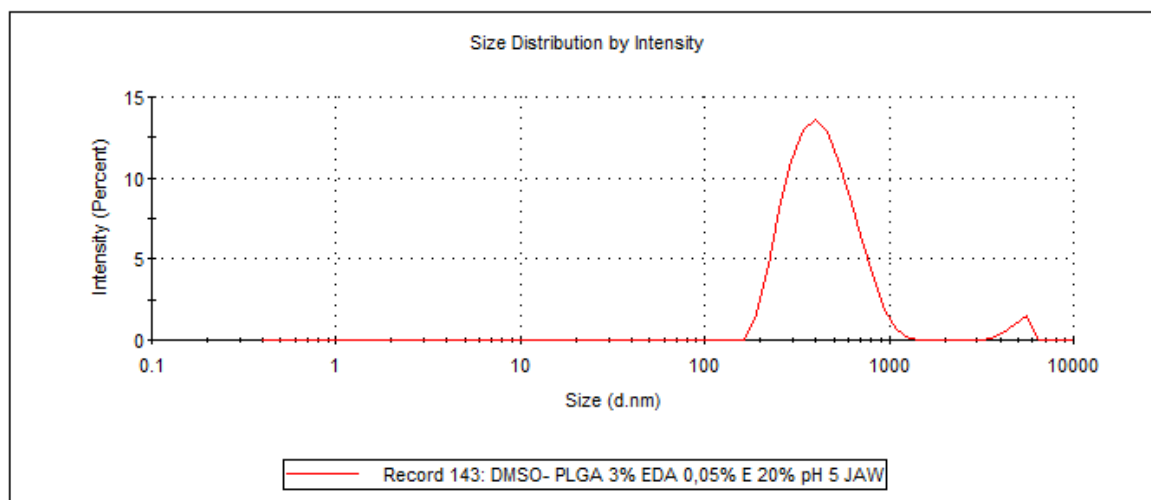
Graf 98 Frekvenční křivka vzorku č. 79

Frekvenční křivka vzorek č. 80



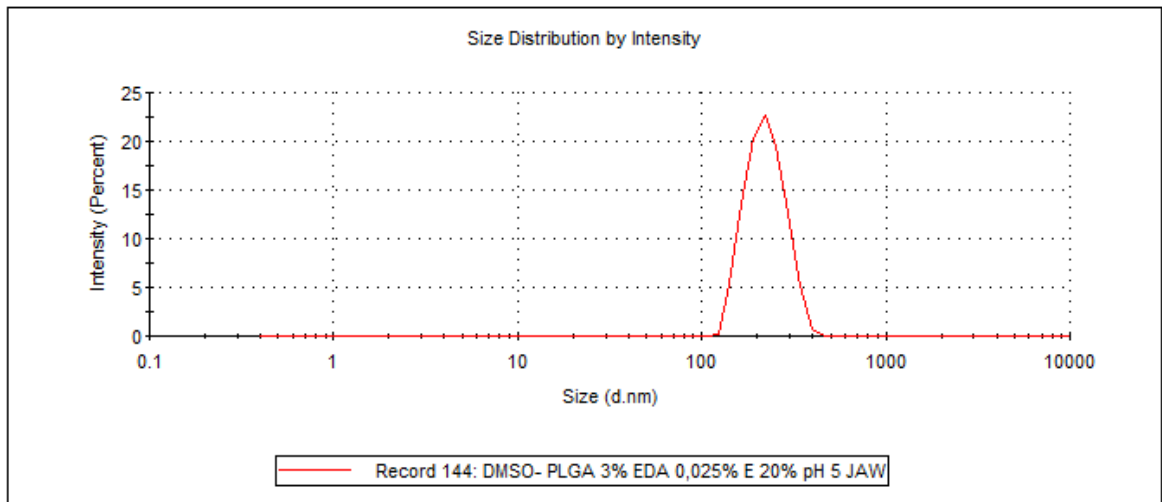
Graf 99 Frekvenční křivka vzorku č. 80

Frekvenční křivka vzorek č. 81



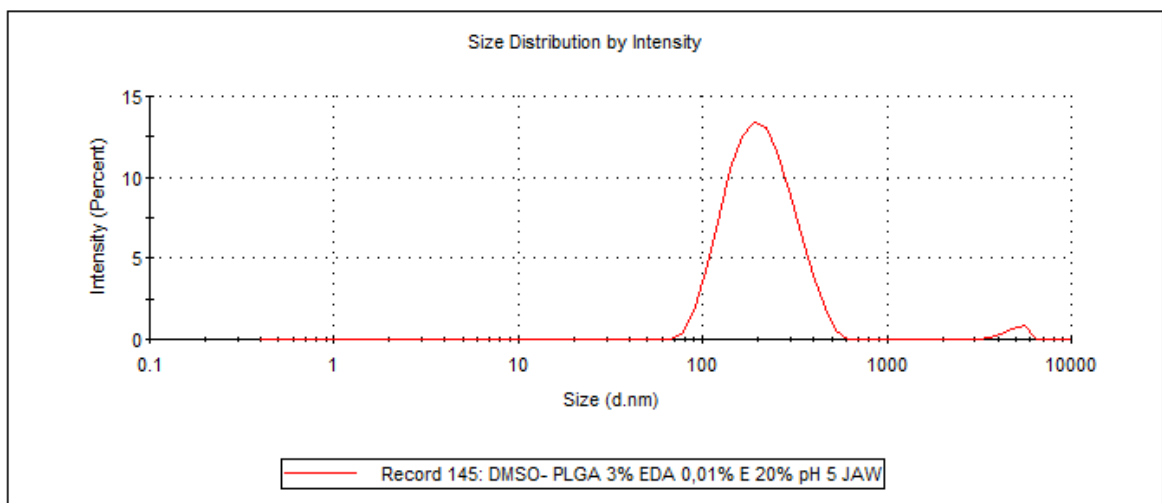
Graf 100 Frekvenční křivka vzorku č. 81

Frekvenční křivka vzorek č. 82



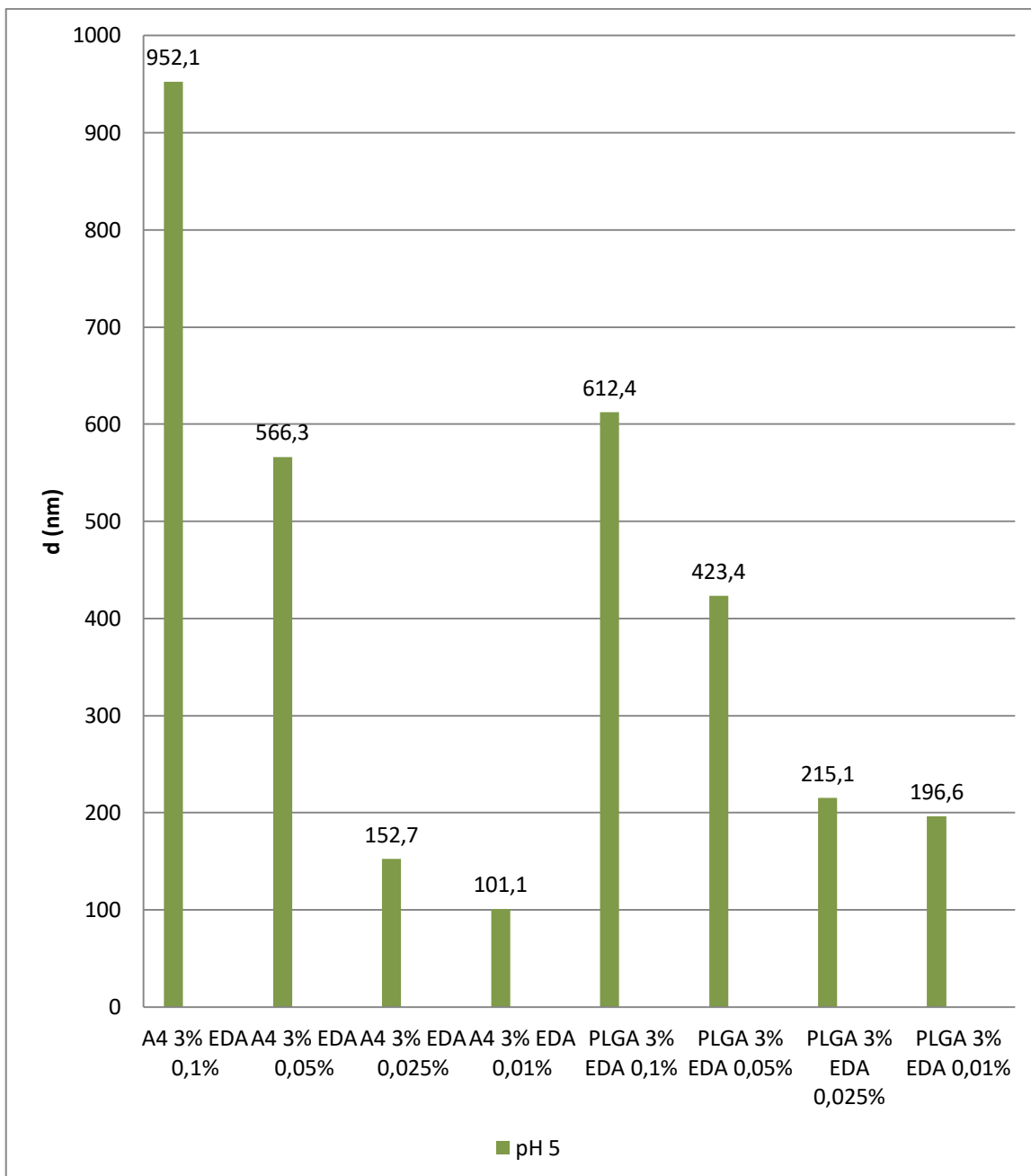
Graf 101 Frekvenční křivka vzorku č. 82

Frekvenční křivka vzorek č. 83



Graf 102 Frekvenční křivka vzorku č. 83

Porovnání vlivu druhu polymeru a koncentrace emulgátoru (EDA) na velikost polymerních nanočástic při pH roztoku 5

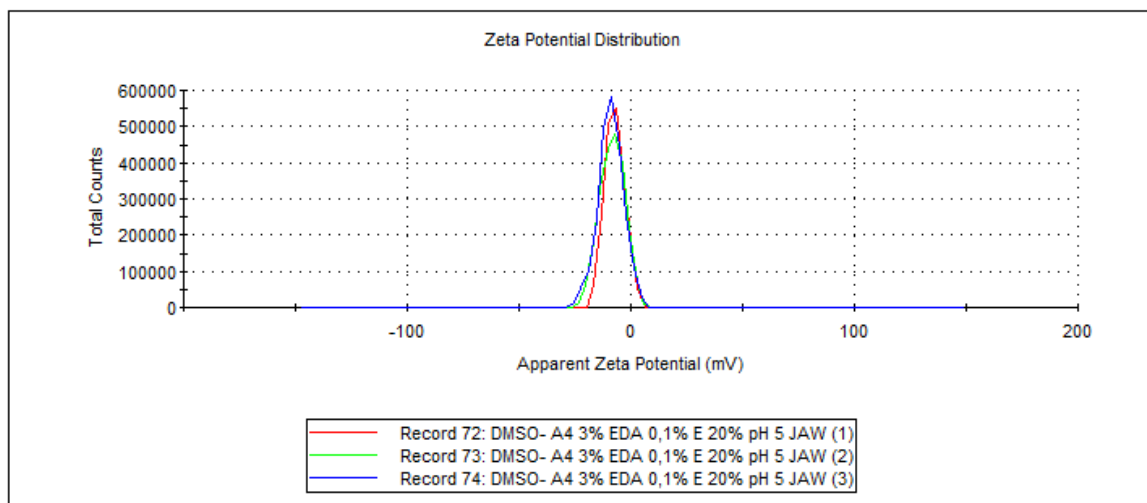


Graf 103 Vliv druhu polymeru a koncentrace EDA na velikost nanočástic při pH 5

Tabulka 15 Výsledky ukazatele Z-Potenciál při pH 5

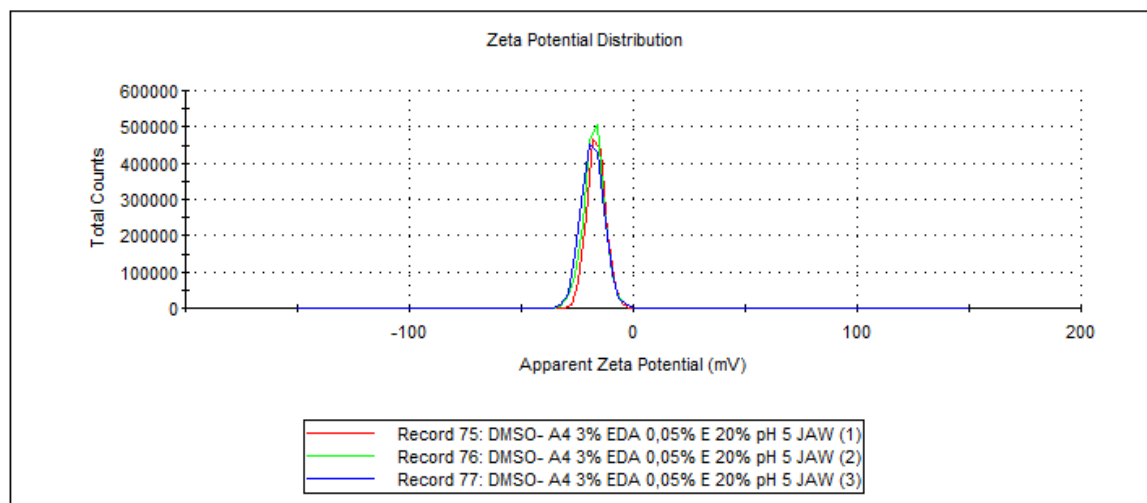
| Vzorek | Polymer | Rozpouštědlo | Emulgátor | Emulze | pH | Vzorek | (mV) | | Z-Potential (mV) |
|--------|---------|--------------|------------|--------|----|--------|--------|--------|------------------|
| | | | | | | | Peak 1 | Peak 2 | |
| 76. | A4 | DMSO | EDA 0,1% | 20% | 5 | 76(1) | -7,22 | 0 | -7,22 |
| | | | | | | 76(2) | -8,20 | 0 | -8,20 |
| | | | | | | 76(3) | -8,99 | 0 | -8,99 |
| 77. | A4 | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 5 | 77(1) | -16,7 | 0 | -16,7 |
| | | | | | | 77(2) | -17,6 | 0 | -17,6 |
| | | | | | | 77(3) | -18,3 | 0 | -18,3 |
| 78. | A4 | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 5 | 78(1) | -17,3 | 0 | -17,3 |
| | | | | | | 78(2) | -17,9 | 0 | -17,9 |
| | | | | | | 78(3) | -18,4 | 0 | -18,4 |
| 79. | A4 | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 5 | 79(1) | -17,1 | 0 | -17,1 |
| | | | | | | 79(2) | -17,2 | 0 | -17,2 |
| | | | | | | 79(3) | -17,0 | 0 | -17,0 |
| 80. | PLGA | DMSO | EDA 0,1% | 20% | 5 | 80(1) | -11,8 | 0 | -11,8 |
| | | | | | | 80(2) | -12,5 | 0 | -12,5 |
| | | | | | | 80(3) | -13,3 | 0 | -13,3 |
| 81. | PLGA | DMSO | EDA 0,05% | 20% | 5 | 81(1) | -12,7 | 0 | -12,7 |
| | | | | | | 81(2) | -13,5 | 0 | -13,5 |
| | | | | | | 81(3) | -13,6 | 0 | -13,6 |
| 82. | PLGA | DMSO | EDA 0,025% | 20% | 5 | 82(1) | -13,6 | 0 | -13,6 |
| | | | | | | 82(2) | -14,1 | 0 | -14,1 |
| | | | | | | 82(3) | -14,6 | 0 | -14,6 |
| 83. | PLGA | DMSO | EDA 0,01% | 20% | 5 | 83(1) | -15,7 | 0 | -15,7 |
| | | | | | | 83(2) | -15,6 | 0 | -15,6 |
| | | | | | | 83(3) | -15,9 | 0 | -15,9 |

Z-potenciál křivka vzorek č. 76



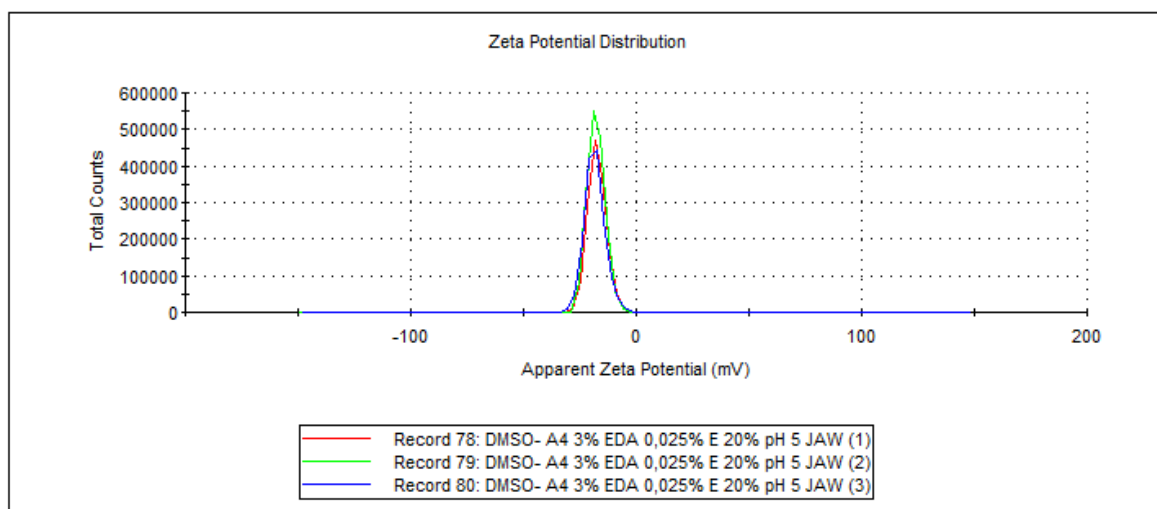
Graf 104 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 76

Z-potenciál křivka vzorek č. 77



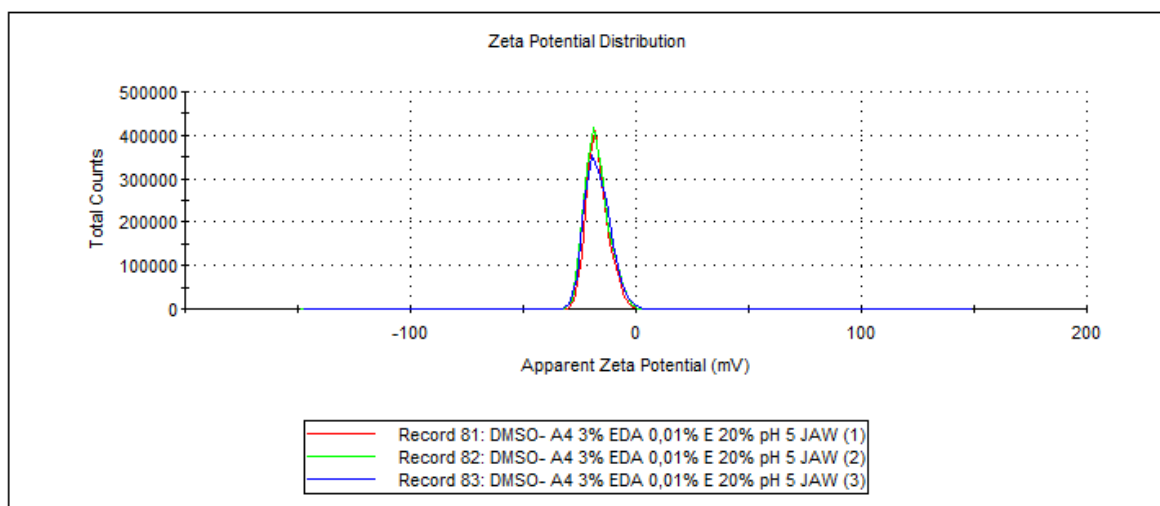
Graf 105 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 77

Z-potenciál křivka vzorek č. 78



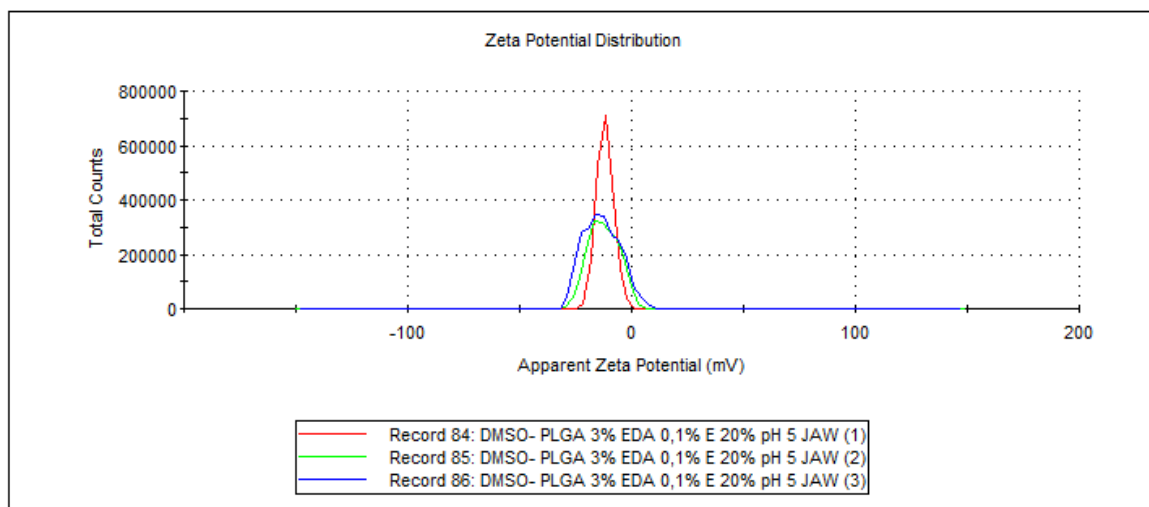
Graf 106 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 78

Z-potenciál křivka vzorek č. 79



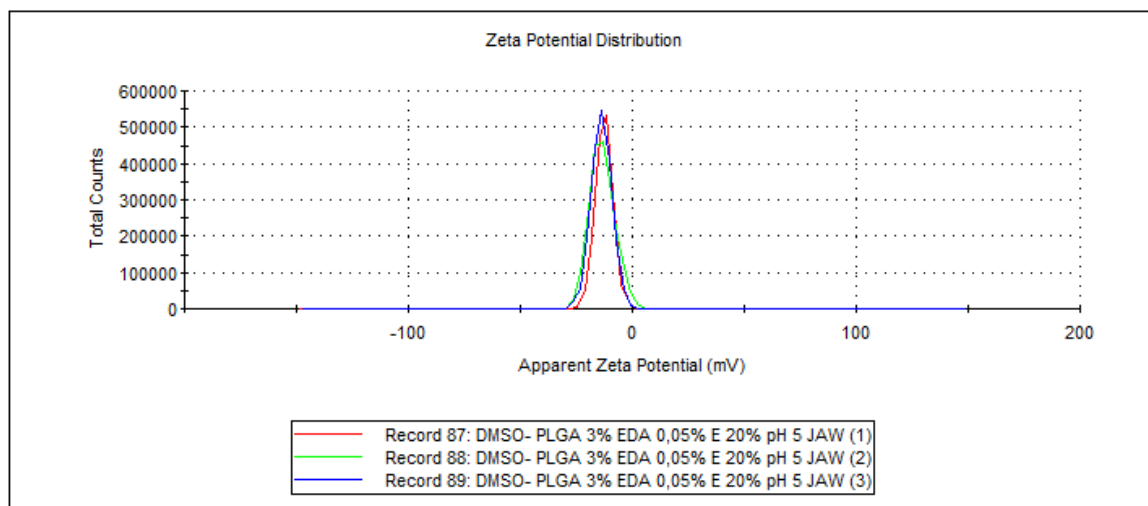
Graf 107 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 79

Z-potenciál křivka vzorek č. 80



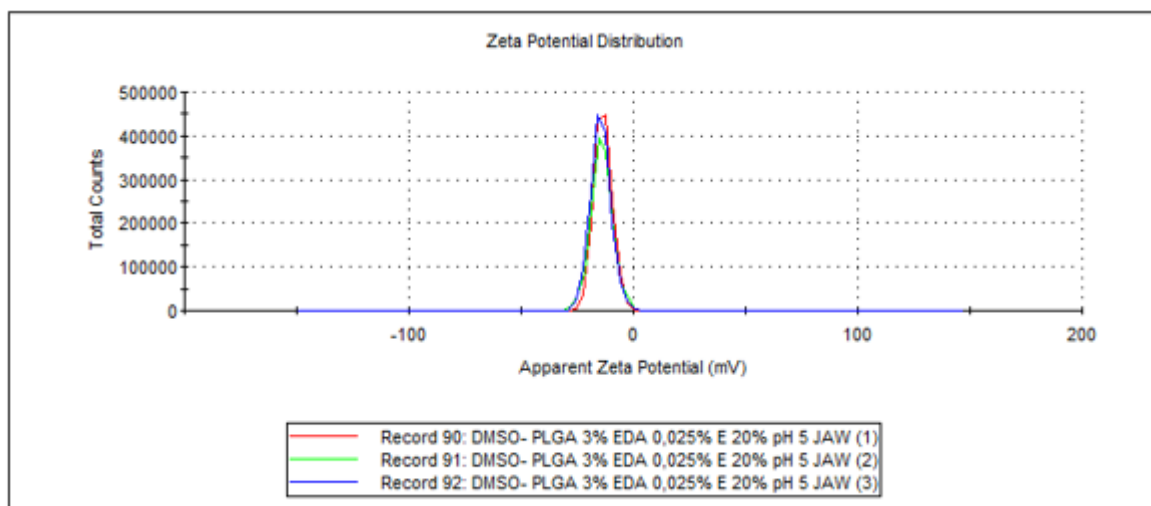
Graf 108 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 80

Z-potenciál křivka vzorek č. 81



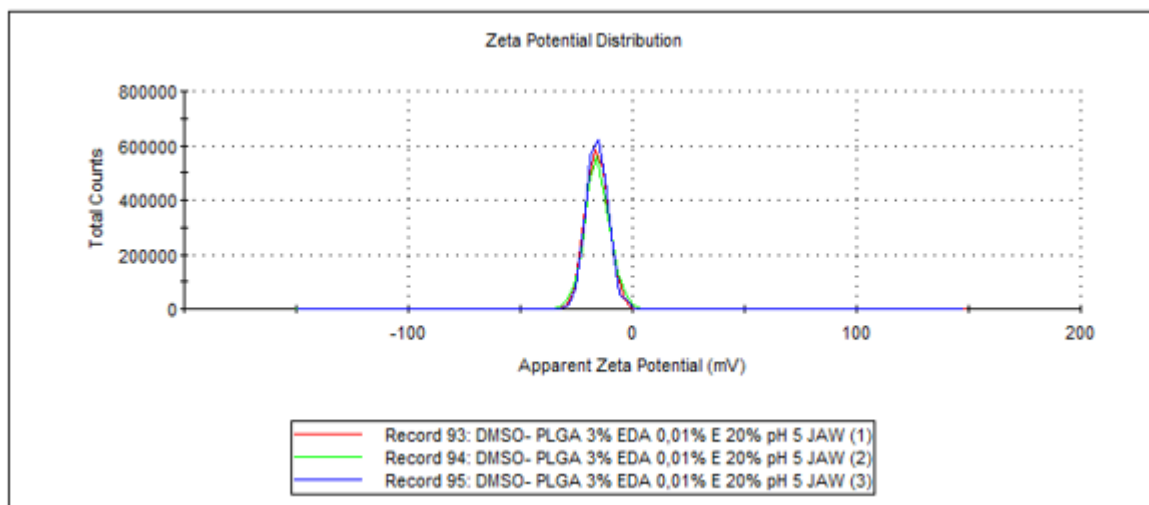
Graf 109 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 81

Z-potenciál křivka vzorek č. 82



Graf 110 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 82

Z-potenciál křivka vzorek č. 83



Graf 111 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 83

6 DISKUZE

6.1 Obecné poznámky

Lékovým formám založeným na struktuře nanočástic je věnována značná pozornost mnoha pracovišť zaměřených na výzkum a vývoj léků. Jejich výhodou je možnost cíleného selektivního směřování do míst, která souvisí s příčinou konkrétního problému. V mnoha biologicky zaměřených studiích je možno se setkat s jednostranným zájmem výzkumného týmu na studium a vyřešení biologického nebo terapeutického problému za použití nanočásticových systémů připravených podle údajů v odborné literatuře bez ohledu na specifické aspekty problematiky.

Cílem předložené práce je studium formulačních aspektů nanočásticových systémů bez léčivé látky nebo s terbinafinem připravených emulzní metodou. Výhodou emulzní metody je možnost škálování do podmínek výroby. Hlavním aspektem nanočástic je jejich velikost, polydisperzita velikosti a zeta potenciál.

Pozornost byla věnována také stabilitě základních parametrů po dobu 24 hodin, což je doba dostatečná na finalizaci přípravy nebo výroby.

6.2 Nanočástice připravené z polyesterů s různou architekturou molekuly

V souboru výsledků v diplomové části č. 5 jsou uvedeny údaje, které se týkají velikosti nanočástic z lineární PLGA a z tripentaerythritolu větveného osmi řetězci PLGA. V médiu byl přítomen cetrimid v koncentraci 0,2 %. Z hlediska velikosti a polydisperzity nanočástic se více osvědčily nanočástice z větveného kopolymeru označeného symbolem T3.

6.3 Stabilita velikosti nanočástic připravených z polyesterů s různou architekturou molekuly

Vzorky označené pořadovými čísly 5. až 8. představují stejný soubor jako vzorky 1. až 4, liší se uchováváním v prostředí roztoku tenzidu po dobu 24 hodin při teplotě 4°C. Z prezentovaných dat je patrné, že dochází k omezenému botnání nanočástic.

6.4 Vliv polymeru a koncentrace tenzidu na velikost nanočástic

Při syntéze nanočástic testovaných v této části práce byla zvolena stejná, 3% koncentrace polymerů, rozpouštědlem byl také universálně dimethylsulfoxid. Stejně jako u výše uvedeného experimentu byla prokázána menší velikost nanočástic z větveného kopolymeru T3. Nižší koncentrace emulze při přípravě emulzní metodou vedla k menším nanočásticím, snížení koncentrace cetrimidu na polovinu mělo opačný efekt.

6.5 Vliv polymeru a jeho koncentrace na velikost nanočástic

Z dat uvedených v této části práce je patrný výrazný vliv koncentrace polymeru při přípravě nanočástic na jejich velikost. Také se projevila silná závislost velikosti nanočástic na struktuře polymeru. I když má větvený polymer T3 téměř trojnásobnou hodnotu molekulové hmotnosti, nanočástice z něho připravené byly zdánlivě paradoxně významně menší. Vysvětlením může být hydrofilnější molekula vlivem vyššího počtu koncových hydroxylových skupin.

6.6 Vliv koncentrace emulze a cetrimidu na velikost a stabilitu velikosti nanočástic připravených v homogenizátoru

Z hodnot uvedených v příslušné tabulce je možno konstatovat obvyklý vliv nižší koncentrace emulze na dosažení souboru menších nanočástic. Očekávaný byl také menší rozměr nanočástic z větveného hydrofilnějšího kopolymeru. Při snížení koncentrace cetrimidu byly získány větší nanočástice bez ohledu na jejich strukturu. Je pravděpodobné částečné mísení cetrimidu s materiálem tvořících se nanočástic.

Ve stejném úseku 5 je připojeno srovnání velikostního parametru stejných vzorků uchovávaných po dobu 24 a 120 hodin v prostředí 0,2% cetrimidu při teplotě 4°C. Z příslušného grafického vyjádření je možno usoudit na postupnou degradaci, která byla značně rychlejší v případě větveného T3. Tato skutečnost podporuje domněnku o více hydrofilním charakteru tohoto polymeru.

Menší velikost nanočástic připravených z méně koncentrované emulze s vyšší koncentrací tenzidu byla potvrzena také v případě tohoto souboru vzorků.

6.7 Vliv lecithinu v nanočásticích na jejich velikost

Bylo prokázáno, že lecithin je mísitelný s použitými biodegradabilními polyestery. Tento tenzid vedl k získání větších nanočástic bez ohledu na typ polymeru. Vliv na velikost nanočástic se logicky snižuje se zvyšujícím se podílem lecithinu.

6.8 Vliv intenzity dispergace ultrazvukem na velikost nanočástic

Výše uvedené výsledky byly dosaženy v souborech vzorků připravených dispergací ve vysokobrátkovém homogenizátoru. Vzorky, které jsou prezentovány v tomto úseku, byly připraveny alternativně pomocí ultrazvukového pole kombinovaného s následným homogenizátorem nebo samotného působení ultrazvuku za stejných podmínek jako většina výše uvedených vzorků. Jak je patrné z prezentace v příslušné tabulce, uvedené přístupy se neosvědčily. Připravené částice byly příliš velké a polydisperzní. U všech vzorků byla prokázána nezanedbatelná frakce částic, jejichž velikost překračovala limit měřitelnosti. Výjimku by mohl tvořit vzorek č. 36 připravený působením ultrazvuku bez homogenizátoru se středním rozměrem 142 nm, i v něm však byly prokázány částice, které byly větší než 4600 nm.

6.9 Vliv maximální intenzity ultrazvuku na velikost nanočástic

Nadějně výsledky dosažené s níže koncentrovanou emulzí byly důvodem k vyzkoušení ultrazvuku s maximální amplitudou. Byly využity roztoky s nižší koncentrací nosiče PLGA a T3. Jak je patrné z tabulky, uvedený postup se osvědčil, protože byly takto získány relativně malé nanočástice. Stejně jako v případě dispergace rotačním pohybem byly nanočástice z polymeru T3 menší. Částice, které měly středním rozměr 100 nm, byly z roztoku tohoto větveného nosiče označeného symbolem T3 v nízké koncentraci 5 % a 10 %.

6.10 Vliv koncentrace emulze na velikost nanočástic připravených dispergací v homogenizátoru

Experimentální schéma zahrnuje velikostní parametry nanočástic připravených za stejných podmínek jako ve výše uvedené části s rozdílem volby jiného způsobu dispergace homogenizátorem. Uvedený postup může vést k poškození nativních nanočástic výraznými střihovými silami a nárazy na rotující ozubenou turbínu. Z hlediska velikosti je možno hodnotit velikost nanočástic velmi pozitivně. Podle koncentrace emulze při přípravě měly nanočástice z PLGA střední rozměr od 128 do 183 nm, nanočástice z T3 měly stejnou charakteristiku v rozmezí od 95 do 155 nm.

6.11 Vliv složení rozpouštědla na velikost nanočástic

V obvyklém schématu s polymerem T3 bylo provedeno srovnání velikostního parametru nanočástic, které byly připravené z roztoku tohoto polymeru v dimethylsulfoxidu a v acetonu. Vzorky byly připraveny dispergací v homogenizátoru, lišily se 1% a 3% koncentrací těchto rozpouštědel. Každý pokus se lišil kromě koncentrace roztoku intenzitou dispergace.

Nejmenší hodnota charakteristiky v daném schématu s dimethylsulfoxidem byla 126 nm, největší 179 nm. Ve stejném schématu vzorků s acetonovým roztokem měly nejmenší částice rozměr 174 nm, největší 279 nm. Velikostní rozdíl v takové míře pokládáme za překvapivý a pracovně vysvětlitelný intenzitou mísení roztoků polymerů s vnější vodnou fází s 0,2% cetrimidem. Dalším neočekávaným výsledkem je velmi malý vliv intenzity míchání na velikost nanočástic, což je také vysvětlitelné turbulentními spontánními toky rozpouštědel do vodného média.

6.12 Vliv intenzity homogenizace a koncentrace terbinafinu na velikost nanočástic

Homogenizace byla nastavena na maximální a minimální intenzitu míchání, terbinafin byl přidán do roztoku dimethylsulfoxidu nebo acetonu ve dvou různých koncentracích. Potvrdil se výše uvedený výsledek prokazující vyšší dispergační účinnost dimethylsulfoxidu. Nejmenší nanočástice měly při vyšší koncentraci léčivé látky průměr 120 nm, nanočástice připravené za použití acetonu za stejných podmínek byly více než dvojnásobné. Při minimálním míchání byla relace výsledků dispergace obdobná. Vliv terbinafinu nebyl

jednoznačný. Největší mikročástice v celém souboru měly 450 nm, byly připraveny při minimální intenzitě míchání s přísadou většího podílu léčiva.

6.13 Vliv polymeru založeného na větvení kyseliny polyakrylové na velikost nanočástic

Polymer označený symbolem A4 byl použit pro přípravu nanočástic a následně byl z tohoto aspektu porovnáván s kopolymerem PLGA. Jako tenzid byl použit místo cetrimidu ethylendiamin ethoxylát (EDA)

Z prezentovaného schématu je patrné, že velikost částic je do značné míry ovlivněna použitým tenzidem EDA. Nejmenší nanočástice byly připraveny z kopolymeru A4 v prostředí nejmenší, 0,01% koncentrace tenzidu. Jejich velikost byla těsně pod hranicí 100 nm. Podmínkami přípravy obdobné nanočástice z kopolymeru PLGA byly více než dvojnásobné.

6.14 Vliv koncentrace emulgátoru EDA na velikost a zeta potenciál nanočástic z nosičů PLGA a A4

Nanočástice z polymeru A4 mají oproti nanočásticím z PLGA mírně zvýšené hodnoty zeta potenciálu. Vliv koncentrace tenzidu na velikost nanočástic je značně výraznější v případě větveného A4. Zvýšená citlivost k mezipovrchovému napětí se projevila především při stopové koncentraci tenzidu 0,01 %.

6.15 Vliv koncentrace emulgátoru EDA na velikost a zeta potenciál nanočástic

Testování bylo realizováno v prostředí fosfátcitrátového pufru pH 5,0. nanočástice z polymeru A4 mají oproti nanočásticím z PLGA mírně zvýšené hodnoty zeta potenciálu.

Ve srovnání s 6.14 jsou patrné velmi obdobné relace v rozložení velikosti nanočástic.

Hodnoty zeta potenciálu mají záporné znaménko a pohybují se v rozmezí od minus 7,2 mV do minus 18,4 mV. Citlivější charakteristiku povrchového náboje měl nosič A4.

7 ZÁVĚRY

- A) Při srovnání lineární PLGA a větvených kopolymerů PLGA s tripentaerythritolem a kyselinou polyakrylovou se z hlediska velikosti částic, flexibility povrchového náboje a průběhu degradace projeví jako výhodnější větvené kopolymery.
- B) Dimethylsulfoxid použitý jako rozpouštědlo nosiče poskytoval výrazně menší nanočástice než aceton.
- C) Nižší koncentrace emulze vede k menším nanočásticím.
- D) Použitím kationického cetrimidu ve stoupající koncentraci se získají menší nanočástice, je pravděpodobné omezené mísení nosiče s tenzidem.
- E) Hydrogenovaný lecithin zvyšuje velikost nanočástic pozitivně s jeho koncentrací.
- F) Porovnáním velikosti nanočástic a jejich polydisperzity po jejich přípravě metodou dispergace v ultrazvukovém poli a metodou dispergace v rotačním homogenizátoru byl prokázán jako výhodnější druhý z uvedených přístupů.
- G) Jako vnější fáze se při přípravě nanočástic osvědčil fosfátcitrátový pufr s hodnotou pH vyšší než 5,0.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) AUFFAN M, ROSE J, BOTTERO JY, LOWRY GV, JOLIVET JP, WIESNER MR. *Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective*. Nat Nanotechnol. 2009;4(10):634–641.
- 2) BUKŠEK, H, LUXBACHER T, PETRINIĆ, I. *Zeta potential determination of polymeric materials using two differently designed measuring cells of an electrokinetic analyzer*. Acta Chimica Slovenica, 2010; 57(3), 700-706.
- 3) DAWES, G. J. S., FRATILA-APACHITEI, L. E., MULIA, K., APACHITEI, I., WITKAMP, G. J., AND DUSZCZYK, J. (2009). Size effect of PLGA spheres on drug loading efficiency and release profiles. *J. Mater. Sci. Mater. M.* 20, 1089–1094. doi: 10.1007/s10856-008-3666-0. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-008-3666-0>
- 4) EKMAN, B., SJFHOLM, I., 1978. *Improved stability of proteins immobilized in microparticles prepared by modified emulsion polymerization technique*. J. Pharm. Sci.1978; 67:693-6.
- 5) FAHR A, VAN HOOGEVEST P, MAY S, BERGSTRAND N, LEIGH ML. *Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: consequences for drug delivery*. Eur J Pharm Sci. 2005; 26(3–4):251–265.
- 6) FERNANDEZ-URRUSUNO R, CALVO P, REMUNAN-LOPEZ C, VILLA-JATO J.L, ALONSO M.J. *Enhancement of nasal absorbtion of insulin using chitosan nanoparticles*, Pharm Res 1999; (16): 1576-1581.
- 7) FREITAS, C, MÜLLER R H. *Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions*. International Journal Of Pharmaceutics,1998; 168, 221-229.
- 8) FURUSAWA, K., UCHIYAMA, K. *Collaborative studies of zeta-potential measurements and electrophoretic measurements using reference sample*. Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects,1998; 140(1-3), 217-226.
- 9) HAN, FELICITY Y.; THURECHT, KRISTOFER J.; WHITTAKER, ANDREW K. A KOL. *Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading* [online]. [cit.

31.7.2018]. Dostupný na WWW:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00185/full#B70>

- 10) KALANI M, YUNUS R. *Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. Intl J of Nanomedicine.* 2011;6:1429-1442. doi:10.2147/IJN.S19021.
- 11) LEONARDUZZI G, TESTA G, SOTTERO B, GAMBA P, POLI G. *Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids.* Curr Med Chem. 2010;17(1):74–95.
- 12) LI, S., MCCARTHY, S.P. *Influence of crystallinity and stereochemistry on the enzymatic degradation of poly(lactide)s.* Macromolecules. 1999, 32, 4454-4456.
- 13) MAHBOUBIAN, A., HASHEMEIN, S. K., MOGHADAM, S., ATYABI, F., AND DINARVAND, R. (2010). *Preparation and in-vitro evaluation of controlled release PLGA microparticles containing triptoreline.* Iran. J. Pharm. Res. 9, 369–378. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870060/>
- 14) MALVERN INSTRUMENTS. Zetasizer Nano Příručka pro uživatele. 3. 2007.
- 15) MEZIANI MJ, PATHAK P, HURUZEANU R, THIES MC, ENICK RM, SUN YP. *Supercritical fluid processing technique for nanoscale polymer particles.* Angew Chem Ind Ed2004;43:7047
- 16) NIWA T, TAKEUCHI H, HINO T, KUNOU N, KAWASHIMA Y. *Preparation of biodegradable control nanoparticles of water-soluble and insoluble drugs with D-Lactide /glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and drug release behavior.* J.Contro.Release 1993;(25):89-98.
- 17) PANYAM J, LABHASEWAR V; *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue.* Adv Drug Deliv Rev 2003; 55:329-47
- 18) PRASADRA OJ, KURTE.GECKELER *Polymer nanoparicles: Preparation techniques and size control parameters,* Progress in Polymer Science G Model. J Pharm Pharmaceuti Sci -674.
- 19) REIS C.P, NEUFELD R.J, RABIERO A.J, VEIGA F. *Nanocapsulation I. Methods of preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2 (2006) 8-21.

- 20) REVERCHON E AND ADAMI R. *Nanomaterial and supercritical fluids*, 2006;(37):1-22.
- 21) SONG X, BI Y, CAI Z, CHEN Q, LI Y, HOU S, ZHAO Y, WU W. *PLGA nanoparticles loaded within vicristin sulphate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency*; *Int J of Pharmaceutics*, 2008, 350(1-2):320-329
- 22) SZE A, ERICKSON D, REN L, LI D, *Zeta-Potential Measurement Using Smoluchowski Equation and the Slope of Current-Time Relationship in Electro-osmotic Flow*. *J Colloid Interface Sci*; 2003 (261), 402-410
- 23) ŠEVČÍKOVÁ P, KAŠPÁRKOVÁ V, KREJČÍ J, VLTAVSKÁ P; *Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů*. *Chem. Listy* 2014; 108, 479-482
- 24) ÜNER M, YENER G. *Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives*. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(3):289–300.
- 25) VERGER, M.L. ET AL. *Preparation and characterization of nanoparticles containing on antihypertensive agent*. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998, 46, 2, 137-143
- 26) WANG, YICHAO, PUWANG LI, THAO TRUONG DINH TRAN, JUAN ZHANG A LINGXUE KONG. *Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer* [online]. 2016 [cit. 31.7.2018]. DOI: 10.3390/nano6020026. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-4991/6/2/26/htm>
- 27) WEBER M, THIES MC. *Understanding the REES proces*. In: SunYP, editor. *Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties and applications*. New Yourk: Marcel Decker; 2002, 387-437
- 28) WEST JL AND HALAS NJ, *Applications of nanotechnology to biotechnology commentary*. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:215.
- 29) XU Y, DU Y, HUANG, R, GAO, L. *Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier*. *Biomaterials* 2003, (24): 5015–5022.
- 30) YORK P. *Strategies for particle desing using sepercritical fluid technologies*. *Pharm Sci Technol Today* 1999; 2:430-440

- 31) CLANCY L, GOODMAN P, SINCLAIR H, DOCKERY DW., *Effect of air-pollution control on deathrates in Dublin, Ireland: an intervention study*: Lancet 2002; 360: 1210-1214.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

- 32) Ilabo - *Laboratorní technika do Vaší laboratoře* [online]. Copyright ©9 [cit. 20.08.2018]. Dostupné z: http://www.ilabo.cz/UserFiles/Image/Produkty/IKA/rt_power_10.jpg
- 33) Analytické váhy KERN - *Labmet.cz. Prodej špičkové laboratorní techniky - Labmet.cz* [online]. Copyright © 2018 Labmet.cz [cit. 20.08.2018]. Dostupné z: <http://www.labmet.cz/merici-pristroje/vahy/analyticke-vahy>

SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A ZKRATEK

Rozpouštědla:

| | |
|------------------|-------------------------|
| ACET | Aceton, Sigma-Aldrich |
| DMSO | Dimethylsulfoxid, Merck |
| H ₂ O | Čištěná voda, FaF UK |

Emulgátory:

| | |
|-----|--------------------------------------------|
| CET | Cetrimid, Merck |
| | N- cetyl- N, N, N- trimethylammoniumbromid |
| EDA | Ethylendiamin ethoxylát, Merck |
| LEC | Lecithin, Merck |

Polymery:

| | |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PLGA | Poly (mléčná-co-glykolová kyselina), FaF UK |
| T3 | Terpolymer kyseliny DL- mléčné, kyseliny glykolové a tripentaerytritolu , FaF UK |
| A4 | kopolymer PLGA větvené na kyselině polyakrylové, 4 % kyseliny polyakrylové v kopolymeru, FaF UK |

Léčivé látky:

| | |
|-----|--------------------|
| TER | Terbinafin, Saneca |
|-----|--------------------|

Pufry:

fosfátcitrátový pufr

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Obrázek 1 Struktura PLGA (25) | 12 |
| Obrázek 2 Metoda odpařování rozpouštědla (26)..... | 14 |
| Obrázek 3 Metoda koacervace (26) | 15 |
| Obrázek 4 Záporně nabitá částice ponořená do kapaliny (14)..... | 18 |
| Obrázek 5 Magnetická míchačka (32)..... | 21 |
| Obrázek 6 Analytická váha Kern (33)..... | 21 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabulka 1 Výsledky ukazatele Z-Ave u vzorků 1-4 | 23 |
| Tabulka 2 Výsledky ukazatele Z-Ave na vzorku 5-8..... | 26 |
| Tabulka 3 Výsledky ukazatele Z-Ave vzorků 9-14 | 29 |
| Tabulka 4 Výsledky ukazatele Z-Ave na vzorcích 15-18 | 33 |
| Tabulka 5 Výsledky ukazatele Z-Ave a teploty vzorků 19-24 | 35 |
| Tabulka 6 Výsledky ukazatele Z-Ave a léčiva | 40 |
| Tabulka 7 Výsledky ukazatele Z-Ave při různé homogenizaci..... | 44 |
| Tabulka 8 Výsledky ukazatele Z-Ave dle amplitudy u vzorků 37-44 | 49 |
| Tabulka 9 Výsledky ukazatele Z-Ave dle způsobu homogenizace | 55 |
| Tabulka 10 Výsledky ukazatele Z-Ave dle způsobu homogenizace vzorků 53-60... | 60 |
| Tabulka 11 Výsledky ukazatele Z-Ave a léčiva při různém způsobu homogenizace | 66 |
| Tabulka 12 Výsledky ukazatele Z-Ave vzorků 69-75..... | 72 |
| Tabulka 13 Výsledky ukazatele Z-Potential..... | 77 |
| Tabulka 14 Výsledky ukazatele Z-Ave při daném pH na vzorcích 76-83 | 81 |
| Tabulka 15 Výsledky ukazatele Z-Potenciál při pH 5 | 87 |

SEZNAM GRAFŮ

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Graf 1 Frekvenční křivka vzorek č. 1..... | 23 |
| Graf 2 Frekvenční křivka vzorek č. 2..... | 24 |
| Graf 3 Frekvenční křivka vzorek č. 3..... | 24 |
| Graf 4 Frekvenční křivka vzorek č. 4..... | 25 |
| Graf 5 Vliv koncentrace PLGA a T3 na velikost částic | 25 |
| Graf 6 Frekvenční křivka vzorku č. 5..... | 26 |
| Graf 7 Frekvenční křivka vzorku č. 6..... | 27 |
| Graf 8 Frekvenční křivka vzorku č. 7..... | 27 |
| Graf 9 Frekvenční křivka vzorku č. 8..... | 28 |
| Graf 10 Srovnání velikosti částic vzorků 1-4 a vzorků 5-8..... | 28 |
| Graf 11 Frekvenční křivka vzorku č. 9..... | 29 |
| Graf 12 Frekvenční křivka vzorku č. 10..... | 30 |
| Graf 13 Frekvenční křivka vzorku č. 11..... | 30 |
| Graf 14 Frekvenční křivka vzorku č. 12..... | 31 |
| Graf 15 Frekvenční křivka vzorku č. 13..... | 31 |
| Graf 16 Frekvenční křivka vzorku č. 14..... | 32 |
| Graf 17 Vliv koncentrace CET a koncentrace emulze na velikost nanočástic | 32 |
| Graf 18 Frekvenční křivka vzorku č. 15..... | 33 |
| Graf 19 Frekvenční křivka vzorku č. 16..... | 34 |
| Graf 20 Frekvenční křivka vzorku č. 17..... | 34 |
| Graf 21 Frekvenční křivka vzorku č. 18..... | 35 |
| Graf 22 Porovnání velikosti částic s časovým odstupem | 35 |
| Graf 23 Frekvenční křivka vzorku č. 19..... | 36 |
| Graf 24 Frekvenční křivka vzorku č. 20..... | 37 |
| Graf 25 Frekvenční křivka vzorku č. 21..... | 37 |
| Graf 26 Frekvenční křivka vzorku č. 22..... | 38 |
| Graf 27 Frekvenční křivka vzorku č. 23..... | 38 |
| Graf 28 Frekvenční křivka vzorku č. 24..... | 39 |
| Graf 29 Vliv koncentrace CET a emulze na velikost nanočástic..... | 39 |
| Graf 30 Frekvenční křivka vzorku č. 25..... | 40 |
| Graf 31 Frekvenční křivka vzorku č. 26..... | 41 |
| Graf 32 Frekvenční křivka vzorku č. 27..... | 41 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Graf 33 Frekvenční křivka vzorku č. 28..... | 42 |
| Graf 34 Frekvenční křivka vzorku č. 29..... | 42 |
| Graf 35 Frekvenční křivka vzorku č. 30..... | 43 |
| Graf 36 Vliv přidání lecitinů na velikost nanočástic..... | 43 |
| Graf 37 Frekvenční křivka vzorku č. 31..... | 45 |
| Graf 38 Frekvenční křivka vzorku č. 32..... | 45 |
| Graf 39 Frekvenční křivka vzorku č. 33..... | 46 |
| Graf 40 Frekvenční křivka vzorku č. 34..... | 46 |
| Graf 41 Frekvenční křivka vzorku č. 35..... | 47 |
| Graf 42 Frekvenční křivka vzorku č. 36..... | 47 |
| Graf 43 Vliv koncentrace polymerů a jeho způsobu homogenizace, času a amplitudy na velikost nanočástic..... | 48 |
| Graf 44 Frekvenční křivka vzorku č. 37..... | 50 |
| Graf 45 Frekvenční křivka vzorku č. 38..... | 50 |
| Graf 46 Frekvenční křivka vzorku č. 39..... | 51 |
| Graf 47 Frekvenční křivka vzorku č. 40..... | 51 |
| Graf 48 Frekvenční křivka vzorku č. 41..... | 52 |
| Graf 49 Frekvenční křivka vzorku č. 42..... | 52 |
| Graf 50 Frekvenční křivka vzorku č. 43..... | 53 |
| Graf 51 Frekvenční křivka vzorku č. 44..... | 53 |
| Graf 52 Vliv koncentrace polymeru a emulze homogenizované ultrazvukem na velikost nanočástic | 54 |
| Graf 53 Frekvenční křivka vzorku č. 45..... | 55 |
| Graf 54 Frekvenční křivka vzorku č. 46..... | 56 |
| Graf 55 Frekvenční křivka vzorku č. 47..... | 56 |
| Graf 56 Frekvenční křivka vzorku č. 48..... | 57 |
| Graf 57 Frekvenční křivka vzorku č. 49..... | 57 |
| Graf 58 Frekvenční křivka vzorku č. 50..... | 58 |
| Graf 59 Frekvenční křivka vzorku č. 51..... | 58 |
| Graf 60 Frekvenční křivka vzorku č. 52..... | 59 |
| Graf 61 Vliv koncentrace polymeru a emulze homogenizované homogenizátorem na velikost nanočástic | 59 |
| Graf 62 Frekvenční křivka vzorku č. 53..... | 61 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Graf 63 Frekvenční křivka vzorku č. 54..... | 61 |
| Graf 64 Frekvenční křivka vzorku č. 55..... | 62 |
| Graf 65 Frekvenční křivka vzorku č. 56..... | 62 |
| Graf 66 Frekvenční křivka vzorku č. 57..... | 63 |
| Graf 67 Frekvenční křivka vzorku č. 58..... | 63 |
| Graf 68 Frekvenční křivka vzorku č. 59..... | 64 |
| Graf 69 Frekvenční křivka vzorku č. 60..... | 64 |
| Graf 70 Vliv koncentrace polymeru a druhu rozpouštědla na velikost nanočástic.... | 65 |
| Graf 71 Frekvenční křivka vzorku č. 61..... | 67 |
| Graf 72 Frekvenční křivka vzorku č. 62..... | 67 |
| Graf 73 Frekvenční křivka vzorku č. 63..... | 68 |
| Graf 74 Frekvenční křivka vzorku č. 64..... | 68 |
| Graf 75 Frekvenční křivka vzorku č. 65..... | 69 |
| Graf 76 Frekvenční křivka vzorku č. 66..... | 69 |
| Graf 77 Frekvenční křivka vzorku č. 67..... | 70 |
| Graf 78 Frekvenční křivka vzorku č. 68..... | 70 |
| Graf 79 Porovnání vlivu koncentrace polymeru a druhu rozpouštědla na velikost nanočástic přidáním terbinafinu..... | 71 |
| Graf 80 Frekvenční křivka vzorku č. 69..... | 72 |
| Graf 81 Frekvenční křivka vzorku č. 70..... | 73 |
| Graf 82 Frekvenční křivka vzorku č. 71..... | 73 |
| Graf 83 Frekvenční křivka vzorku č. 72..... | 74 |
| Graf 84 Frekvenční křivka vzorku č. 73..... | 74 |
| Graf 85 Frekvenční křivka vzorku č. 74..... | 75 |
| Graf 86 Frekvenční křivka vzorku č. 75..... | 75 |
| Graf 87 Vliv druhu polymeru a koncentrace EDA na velikost nanočástic | 76 |
| Graf 88 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 69..... | 78 |
| Graf 89 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 70..... | 78 |
| Graf 90 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 71..... | 79 |
| Graf 91 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 72..... | 79 |
| Graf 92 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 73..... | 80 |
| Graf 93 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 74..... | 80 |
| Graf 94 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 75..... | 81 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Graf 95 Frekvenční křivka vzorku č. 76..... | 82 |
| Graf 96 Frekvenční křivka vzorku č. 77..... | 82 |
| Graf 97 Frekvenční křivka vzorku č. 78..... | 83 |
| Graf 98 Frekvenční křivka vzorku č. 79..... | 83 |
| Graf 99 Frekvenční křivka vzorku č. 80..... | 84 |
| Graf 100 Frekvenční křivka vzorku č. 81..... | 84 |
| Graf 101 Frekvenční křivka vzorku č. 82..... | 85 |
| Graf 102 Frekvenční křivka vzorku č. 83..... | 85 |
| Graf 103 Vliv druhu polymeru a koncentrace EDA na velikost nanočástic při pH 5 | 86 |
| Graf 104 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 76..... | 88 |
| Graf 105 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 77..... | 88 |
| Graf 106 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 78..... | 89 |
| Graf 107 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 79..... | 89 |
| Graf 108 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 80..... | 90 |
| Graf 109 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 81..... | 90 |
| Graf 110 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 82..... | 91 |
| Graf 111 Křivka Z-potenciálu vzorku č. 83..... | 91 |