



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SOLUBILIZACE VE VODĚ NEROZPUSTNÝCH VITAMÍNŮ DO VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ NA BÁZI IONTOVÝCH AMFIFILNÍCH PÁRŮ

SOLUBILIZATION OF WATER-INSOLUBLE VITAMINS INTO VESICULAR SYSTEMS BASED ON IONIC
AMPHIPHILIC PAIRS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nikola Kolomá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1500/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Nikola Kolomá**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Solubilizace ve vodě nerozpustných vitamínů do vezikulárních systémů na bázi iontových amfifilních párů

Zadání diplomové práce:

- 1) Rešerše na způsoby inkorporace ve vodě nerozpustných vitamínů a na metody stanovení efektivity této inkorporace.
- 2) Na základě rešerše vybrat modelové vitamíny a zvolit vhodné techniky pro stanovení efektivity jejich inkorporace do vezikulárního systému na bázi iontového páru CTA–DS.
- 3) Zhodnotit získané výsledky a postupy z hlediska použitelnosti daného vezikulárního systému jako nosiče nepolárních vitamínů.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Nikola Kolomá
student(ka)

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací a přípravou kataniontových vezikulárních systémů a jejich následnou interakcí s ve vodě nerozpustnými vitamíny. Kataniontové vezikulární systémy byly připraveny z dvou různě nabitých povrchově aktivních látek CTAB a SDS za vzniku iontového amfifilního páru. Stabilita vezikul byla zajištěna přidáním cholesterolu spolu s kladně nabitou povrchově aktivní látkou DODAC. Pro následnou solubilizaci do těchto vezikul byl vybrán vitamín A a vitamín E. Další část práce byla zaměřena na stanovení efektivity inkorporace těchto vitamínů do vezikulárních systémů HTMA-DS. Charakterizace těchto systémů byla provedena pomocí měření na UV-VIS spektrometru, DLS a pomocí HPLC s UV-VIS detektorem. Během měření na UV-VIS a HPLC byla stanovena účinnost solubilizace vitamínu A a vitamínu E do vezikul. V obou případech byla stanovena vyšší účinnost u vezikul s inkorporovaným vitamínem A. Vyšší účinnost u obou vitamínů byla stanovena pomocí metody HPLC. Důvodem je pravděpodobně vyšší citlivost metody, práce s tmavým sklem a příprava jednotlivých vzorků do vialek, které byly následně vloženy do přístroje pro jednotlivé dávkování pomocí injektoru. Práce slouží především ke zhodnocení výsledků z hlediska použitelnosti daného vezikulárního systému za účelem uplatnění ve farmaceutických aplikacích jako nosiče nepolárních vitamínů.

ABSTRACT

This thesis deals with the characterization and preparation of cationic vesicular systems and their interaction with water-insoluble vitamins. Cationic vesicles systems was prepared from two differently charged surfactants CTAB and SDS in formation ion pair amphiphile. Stability of vesicles was secured by adding cholesterol with positively charged surfactant DODAC. Were selected vitamin A and vitamin E for solubilization into these vesicles. The next part of this work was focused on determining the efficiency of incorporation these vitamins into the HTMA-DS vesicular system. The characterization of these systems was improved by measurement on a UV-VIS spectrometer, DLS and by HPLC with UV-VIS detector. During measurement by UV-VIS and HPLC the efficiency of solubilization of vitamin A and vitamin E into vesicles was determined. In both cases higher efficiency was determined for vesicles with incorporated vitamin A. Higher efficiency for both vitamins was determined by HPLC. The reason is probably the higher sensitivity of the method, work in labs with dark glass and preparing individual samples into vials, which were inserted into the device for individual dosing by injector. The work serves primary evaluation results in view of the vesicular system for use in pharmaceutical application like carrier non-polar vitamins.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kataniontové vezikuly, iontový amfifilní pár, enkapsulační účinnost, vitamín A, vitamín E, UV-VIS, HPLC

KEYWORDS

Cationic vesicles, ion pair amphiphile, encapsulation efficiency, vitamin A, vitamin E, UV-VIS, HPLC

KOLOMÁ, Nikola. *Solubilizace ve vodě nerozpustných vitamínů do vezikulárních systémů na bázi iontových amfifilních párů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131433>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat mému vedoucímu diplomové práce, panu doc. Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D za jeho odborné rady, čas a vstřícný přístup během mé práce. Také bych chtěla poděkovat mé konzultantce Ing. Martině Havlíkové především za její ochotu, velkou trpělivost, vstřícný přístup v laboratoři a pomocnou ruku.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Tenzidy	8
2.1.1	Anionické tenzidy	9
2.1.2	Kationické tenzidy	9
2.1.3	Amfoterní tenzidy	10
2.2	Micelární koloidní roztoky	10
2.2.1	Micely	11
2.2.2	Struktura a tvar micel	13
2.3	Vezikuly	14
2.3.1	Kataniontové vezikulární systémy	15
2.4	Solubilizace	18
2.4.1	Vitamíny rozpustné v tucích	19
2.5	UV-VIS spektrofotometrie	21
2.5.1	Instrumentace UV-VIS spektrofotometrie	23
2.6	Dynamický rozptyl světla.....	24
2.7	Zeta potenciál	25
2.8	Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC.....	26
2.8.1	Instrumentace HPLC.....	27
3	Současný stav řešené problematiky	29
3.1	Tvorba kataniontových vezikulárních systémů	29
3.2	Zvýšení stability vezikulárních systému pomocí cholesterolu a nabitých dvojřetězcových PAL 31	
3.3	Interakce vezikulárních systémů s vitamíny nerozpustných v tucích.....	33
3.3.1	Vezikulární systémy v interakci s vitamínem A	33
3.3.2	Vezikulární systémy v interakci s vitamínem E a stanovení enkapsulační účinnosti pomocí UV-VIS	34
3.4	Stanovení účinnosti zachycení vitamínu a degradace vyvolaná světlem pomocí DLS a HPLC 35	
4	Experimentální část.....	37
4.1	Cíl práce	37
4.2	Použité chemikálie	37

4.3	Použité metody.....	38
4.3.1	Příprava IPA.....	38
4.3.2	Příprava kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů cIPA	38
4.3.3	Stabilizace vezikulárního systému cIPA cholesterolem.....	38
4.3.4	Příprava zásobních roztoků vitamínů.....	38
4.3.1	Příprava kalibrační řady pro měření na UV-VIS spektrofotometru	39
4.3.1	Příprava kalibrační řady pro měření na HPLC s UV-VIS detektorem.....	39
4.3.2	Nepřímá solubilizace vitamínů do vezikulárních systémů cIPA.....	39
4.3.3	Přímá solubilizace vitamínů do vezikulárních systémů cIPA	40
4.3.4	Ultrafiltrace solubilizovaných vitamínů ve vezikulách.....	40
4.3.1	Dynamický rozptyl světla a elektroforetický rozptyl světla.....	40
4.3.2	UV-VIS spektrofotometrie.....	41
4.3.3	HPLC s UV-VIS detektorem	41
5	Výsledky a diskuze	42
5.1	Příprava kataniontových vezikulárních systémů HTMA-DS s cholesterolem a pozitivně nabitým DODAC.....	42
5.2	Přímá a nepřímá solubilizace vitamínů do vezikulárních systémů.....	42
5.3	Ultrafiltrace solubilizovaných vitamínů do vezikul a ředění isopropylalkoholem.....	43
5.4	Dynamický rozptyl světla a elektroforetický rozptyl světla	45
5.5	UV-VIS spektrofotometrie	48
5.5.1	Kalibrační křivky	48
5.5.2	Stanovení enkapsulační účinnosti metodou UV-VIS.....	49
5.6	HPLC s UV-VIS detektorem.....	50
6	Závěr	53
7	Seznam použitých zdrojů	55
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	59
8.1	Seznam použitých zkratk.....	59
9	Seznam příloh	60
10	Přílohy.....	61

1 ÚVOD

V poslední době mají biokompatibilní materiály pro zapouzdření zdraví prospěšných materiálů veliký potenciál v potravinářském i farmaceutickém průmyslu. Právě díky své biokompatibilitě a jiným příznivým vlastnostem byla velká pozornost zaměřena na použití lipidových nosičů. V případě systému na bázi liposomů se jedná o velice slibnou technologii, která je schopná zajistit efektivní dodání či řízené uvolňování velkého množství bioaktivních látek s funkčními vlastnostmi pro zdraví člověka. Další možností během výroby těchto systémů je optimalizace složení daného produktu a zpracování, které ovlivní požadované vlastnosti během podávání.

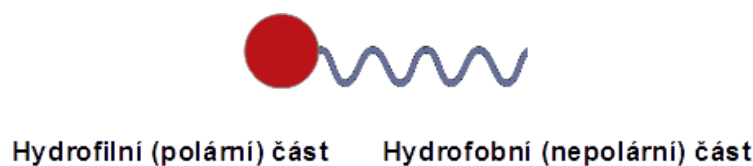
Velká pozornost je věnována použití nanoliposomů jako nosičů bioaktivních složek v potravinářských a farmaceutických dávkovacích systémech pro enkapsulaci antioxidantů. Použití liposomů jako antioxidačních vitaminových nosičů představuje vývoj nových funkčních potravinových formulací a řešení problémů s jejich stabilitou, která silně brání jejich aplikaci. Vlivem nízké stability vitamínů je nezbytné využívat ochranné materiály k zabránění zhoršení při trávení a při jejich absorpci v organismu. Pro zapouzdření vitamínů se používají především nanočástice pevných lipidů, zapouzdření lipidů a systémy tvořeny z povrchově aktivních látek. V současnosti se výzkum soustředí také na tvorbu kataniontových vezikulárních systémů, které jsou tvořeny právě z povrchově aktivních látek, které jsou běžně dostupné. Tyto vezikulární systémy mají výhodu i v tom, že jsou levnější, stabilnější a méně náchylné na degradaci.

Cílem této práce byla příprava kataniontových vezikulárních systémů na bázi iontového páru HTMA-DS, do kterých byl následně pomocí nepřímé i přímé solubilizace inkorporován vitamín A a vitamín E. Pro zlepšení stability vezikul byl použit cholesterol společně s kladně nabitou povrchově aktivní látkou DODAC. Účinnost solubilizace vitamínů do vezikulárních systémů byla poté sledována pomocí UV-VIS spektrofotometru a HPLC s UV-VIS detektorem. Pro sledování velikosti částic v systémech byla použita metoda dynamického rozptylu světla. Díky výsledné charakterizaci těchto systémů s inkorporovanými vitamíny je možné předpovídat účinnost a použitelnost v případě použití jako nosiče nepolárních vitamínů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

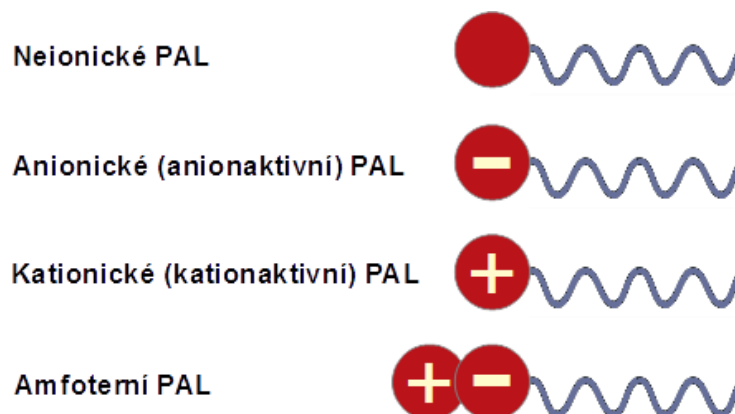
2.1 Tenzidy

Tenzidy, neboli povrchově aktivní látky (PAL), jsou látky, které vytvářejí micely v roztoku a jsou schopné se adsorbovat na rozhraní mezi roztokem a jinou fází. Pro uskutečnění těchto dvou fyzikálních vlastností je zapotřebí, aby povrchově aktivní látka měla v chemické struktuře dvě různé funkční skupiny s různou afinitou v rámci stejné molekuly. Molekuly těchto látek mají obvykle alkylový řetězec s 8–22 uhlíky. Tento uhlíkatý řetězec můžeme definovat jako hydrofobní skupinu, která nevykazuje afinitu k vodě. Další funkční skupinu, kterou obsahují molekuly povrchově aktivních látek, je skupina hydrofilní, která naopak k vodě vysokou afinitu má. Tento druh struktury se dvěma protichůdnými funkcemi se nazývá amfifilní struktura.



Obrázek 1: Obecná struktura povrchově aktivní látky.

Povrchově aktivní látky se dělí na iontové a neiontové. V případě iontových povrchově aktivních látek jsou subklasifikovány na aniontové, u kterých se hydrofilní skupina disociuje na anionty ve vodných roztocích a kationtové povrchové látky, u kterých se zase disociují na kationty. Dalším případem jsou amfoterní povrchově aktivní látky, které se disociují na anionty a kationty, často v závislosti na pH. Neiontové povrchově aktivní látky se ve vodných roztocích nedisociují na ionty a jsou subklasifikovány v závislosti na typu jejich hydrofilní skupiny 55[1].



Obrázek 2: Rozdělení povrchově aktivních látek dle náboje.

V případě umístění povrchově aktivní látky do vody, dochází k zarovnání na povrchu s hydrofobním koncem vytlačením z vody. Takové vyrovnání narušuje povrchovou strukturu vody a snižuje povrchové napětí. V olejových kapalinách jsou povrchově aktivní látky zarovnány s hydrofilním koncem vytlačeným z kapaliny. V tomto případě je povrchové napětí oleje sníženo.

Nejznámější použití povrchově aktivních látek jsou mýdla a detergenty k odplavení olejových látek. Zde se hydrofobní konec povrchově aktivních látek rozpouští na povrch oleje, zatímco hydrofilní konec zůstává vystaven okolní vodě. Výsledkem je, že se olej rozpadá na malé kapičky obklopené hydrofilním koncem povrchově aktivních látek. Malé olejové kapičky jsou solubilizovány ve vodě a mohou být nyní odplaveny [2].

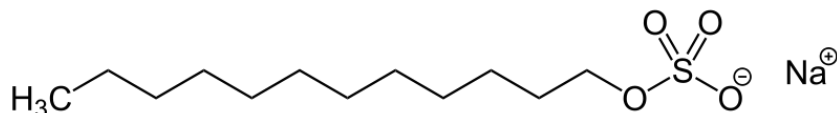
2.1.1 Anionické tenzidy

Anionické tenzidy nejlépe odstraňují nečistoty, hlínu a některé mastné skvrny. Tyto povrchově aktivní látky fungují po ionizaci. Po přidání do vody tyto látky ionizují a mají záporný náboj. Negativně nabitě povrchově aktivní látky se vážou na kladně nabitě částice, jako je jíla. Obecně jsou tyto látky velice účinné při odstraňování částicových nečistot. Příklady aniontových povrchově aktivních skupin zahrnují sulfonové kyseliny, alkohol sulfáty, alkylbenzensulfonáty, kyselina fosforečná, nebo soli karboxylových kyselin [3].

2.1.1.1 Dodecylsulfát sodný (SDS)

Obecně se jedná o jednu z nejlépe biokompatibilních středně toxických aniontových povrchově aktivních látek, která se využívá ve farmaceutických a průmyslových aplikacích. Obsahuje amfifilní molekulu, která obsahuje hydrofilní a hydrofobní skupinu.

Dodecylsulfát sodný je nejvíce zkoumaný a široce používaný aniontový tenzid. Získává se ve formě prášku i v peletách a používá se v polymerní biotechnologii a biochemii. Kritická koncentrace micel se mění se změnou teploty a přidáním elektrolytu. Ve vyšší koncentraci způsobuje podráždění pokožky a očí a je využíván především jako čisticí prostředek v domácnosti. Vyskytuje se též v šampónech, zubních pastách a další kosmetice. Další využití může mít během denaturace bílkovin při elektroforéze. Tato laboratorní technika se nazývá SDS-PAGE [4].



Obrázek 3: Chemická struktura SDS.

2.1.2 Kationické tenzidy

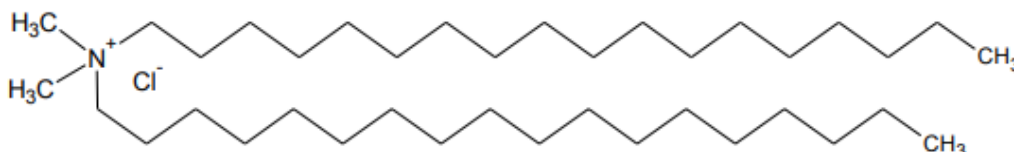
Kationtové povrchově aktivní látky jsou veškeré látky, které nesou kladný náboj. Tento náboj může být stálý nebo může existovat pouze v určitých rozmezí hodnot pH. Většina z těchto látek jsou kvarterní amoniové sloučeniny, které se nejčastěji používají jako změkčovadla tkanin, antistatická činidla, oplachovací prostředky, dispergátory částic a emulgátory. Kromě toho kationy také vykazují vysokou biologickou aktivitu proti mikroorganismům, díky své přitažlivosti k negativně nabitým biomembránám prokaryot.

Mezi kationtové povrchově aktivní látky patří kvarterní amoniové sloučeniny, které se vyskytují pouze jako komplex s aniontem. Běžně používané alifatické kvarterní amoniové sloučeniny zahrnují např. cetriamium bromid nebo cetylpyridinium chlorid. Aromatické příklady zahrnují deriváty pyridinu a deriváty alkylbenzenu. Dále se jedná o sloučeniny na bázi aminu. Primární, sekundární a terciální aminy, které mohou být kladně nabitě v závislosti na hodnotě pH okolí.

2.1.2.1 Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid (DODAC)

Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid je kationický tenzidy, který obsahuje dva řetězce ve své struktuře a řadí se mezi kvarterní amoniové soli. Jedná se o pevnou látku ve formě prášku, který je nerozpustný ve vodě. Při zahřátí se rozkládá a uvolňuje toxické výpary oxidu dusíku a chlorovodíku.

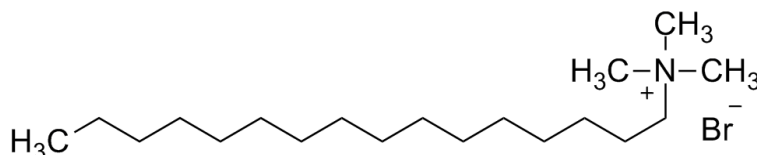
Využívá se do výrobků používaných v domácnosti, především do čistících prostředků, pracích prostředků, mýdel, odmašťovačů a odstraňovačů skvrn. Další využití můžeme najít v kosmetice, kde se používá do kondicionérů na vlasy díky svým antistatickým vlastnostem [5].



Obrázek 4: Chemická struktura DODAC.

2.1.2.2 Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB)

Cetyltrimethylamoniumbromid je kationický tenzid a lze ho klasifikovat jako kvarterní amoniovou sůl. Jedná se o bromidovou sůl cetylmethylamonia a je jednou ze složek topického antiseptického cetrimidu. Jedná se o bílou pevnou látku a v současné době se používá v mnoha lokálních dermatologických přípravcích a spotřebních výrobcích, jako jsou šampony a přípravky na mytí rukou [6].



Obrázek 5: Chemická struktura CTAB.

2.1.3 Amfoterní tenzidy

Amfoterní tenzidy obsahují ve své nedisociované části molekuly anion i kation. Díky tomu vynikají svými vlastnostmi a je možné je kombinovat s kationickými i s anionickými tenzidy. Amfoterní tenzidy patří mezi speciální tenzidy, které jsou využívány především v kosmetických a mycích prostředcích. Příkladem mohou být vlasové i tělové šampóny, tekutá mýdla, koupelové pěny nebo mycí prostředky na nádobí. Velikou výhodou těchto tenzidů je vysoká snášenlivost a stabilita [7].

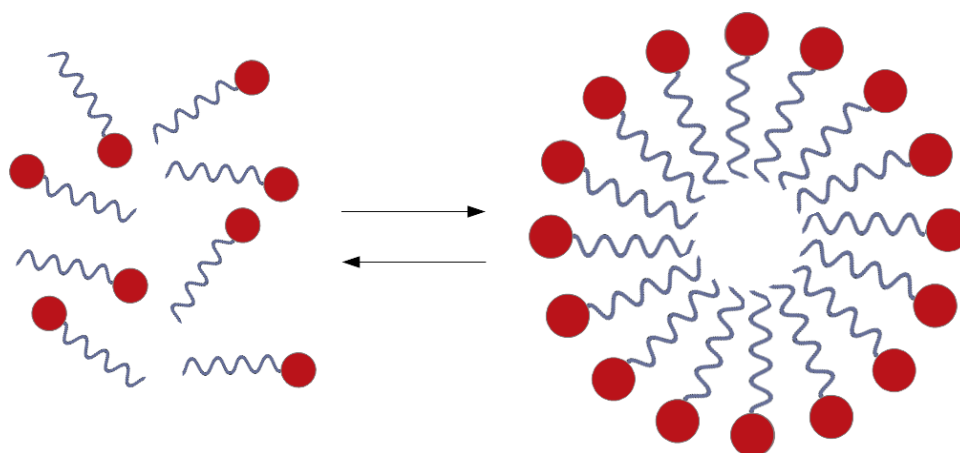
2.2 Micelární koloidní roztoky

V případě vhodně zvoleného rozpouštědla, některé molekulární látky poskytují ve velkém zředění pravé roztoky. V určité koncentraci se však molekuly asociují do té míry, že se tvoří částice koloidních rozměrů. Tyto vznikající částice či útvary a látky, které se chovají stejným způsobem, můžeme označit jako micelární koloidní roztoky. Micelární koloidní roztoky rovněž vznikají samovolným rozpuštěním. Jejich vylučování z roztoku se řídí termodynamickými zákony fázových rovnováh. Vlastnosti těchto roztoků závisí na fyzikálních podmínkách, kterými je teplota, tlak, vlastní koncentrace a koncentrace

daných látek. Stejně jako tvar, struktura a průměrný rozměr micely se mění s fyzikálními podmínkami, tak i makroskopické vlastnosti jsou určeny okamžitým stavem systému. Můžeme tedy říct, že se jedná o reverzibilní systémy [8].

2.2.1 Micely

Micely jsou amfifilní koloidní struktury s průměrem částic od 5 nm do 10 nm. Skládají se ze dvou zcela odlišných oblastí s opačnou afinitou k vodě. Tyto amfifilní molekuly, které tvoří micely, se sdružují při určitých koncentracích a při vhodných teplotách. Jádrem micely je tvořeno hydrofobními fragmenty amfifilních molekul, zatímco plášť micely je tvořen z hydrofilních fragmentů micelárních molekul. Při nízkých koncentracích ve vodném médiu tyto amfifilní molekuly existují samostatně. Avšak při zvýšení jejich koncentrace dochází k agregaci. Agregace nastává v poměrně úzkém rozmezí daných koncentrací. Koncentrace, při které monomerní amfifil tvoří micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC), v přítomnosti určité prahové teploty nazývané kritická micelární teplota (CMT) označována také jako Kraftova teplota [9].



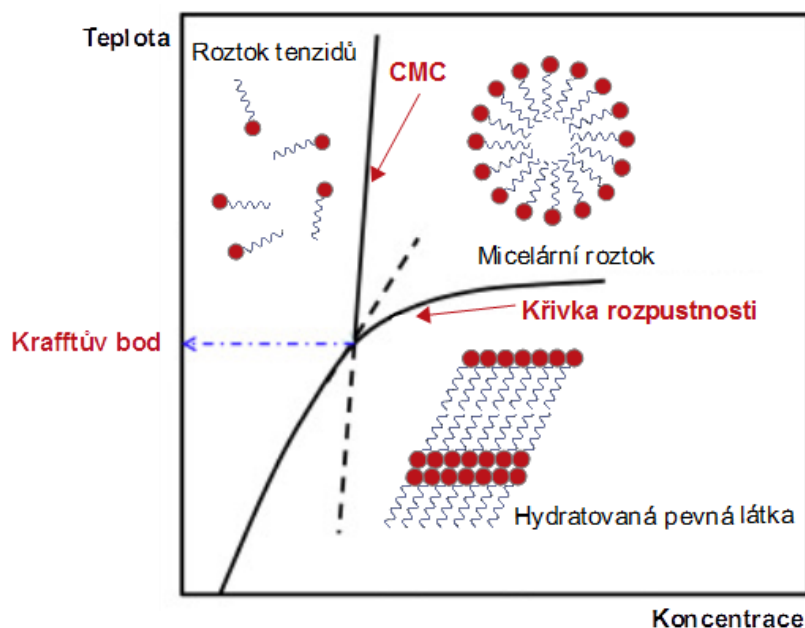
Obrázek 6: Schéma tvorby micel ve vodném prostředí.

2.2.1.1 Kraftova teplota (Kraftův bod)

Při Kraftově teplotě se koncentrace nasyceného roztoku rovná hodnotě CMC. Je to teplota, při které dochází k drastickému zvyšování rozpustnosti iontových povrchově aktivních látek ve vodě. Též ho můžeme definovat jako trojný bod křivky rozpustnosti monomeru surfaktantu, teplotní křivky CMC a čáry fázového přechodu hydratovaných látek k micelám nebo tekutých krystalů. V případě poklesu teploty pod Kraftův bod se zvýšením hodnoty CMC, dochází k vysrážení micelárního roztoku a tvorbě nerozpustných krystalů s dvouvrstvou strukturou. Naopak se zvýšením CMC a teploty, vyšší než Kraftův bod, dochází k formaci micel (viz. Obrázek 7: Fázový diagram povrchově aktivních látek popisující Kraftův bod. Obrázek 7).

Kraftův bod je ovlivněn hydrofilními a lipofilními skupinami. V případě identické hydrofilní skupiny se zvyšuje Kraftův bod a rozpustnost ve vodě klesá vlivem zvyšujícího se množství uhlíků v alkylovém řetězci. Naopak, když se k nenasyčené skupině přidají polární skupiny, rozpustnost ve vodě se zvyšuje a Kraftův bod tak klesá. Pokud je však lipofilní skupina identická, rozpustnost se mění s počtem a polohou hydrofilních skupin. Pokud bude hydrofilní skupina blíže středu alkylového řetězce, tak rozpustnost bude mít tendenci se zvyšovat.

Klíčovou úlohou je snížit Krafftův bod, aby se zachovala stabilita vzorce při nízké teplotě, což v podstatě znamená, že je důležitá minimalizace krystalizace povrchově aktivní látky [10].

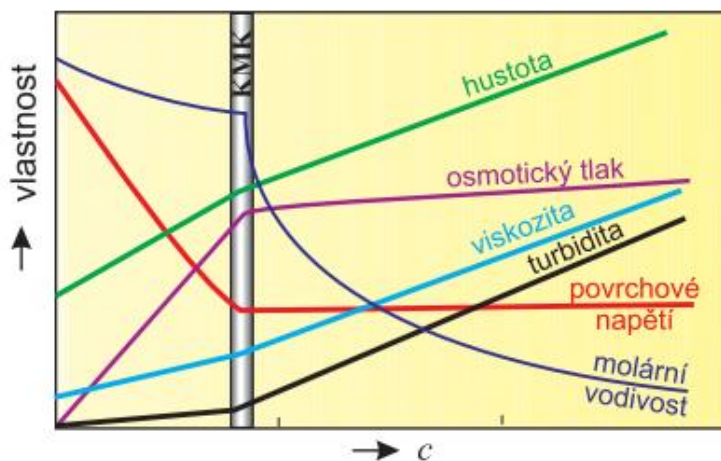


Obrázek 7: Fázový diagram povrchově aktivních látek popisující Krafftův bod.

2.2.1.2 Kritická micelární koncentrace (CMC)

U roztoku, který je tvořen amfifilními molekulami, dochází při určité koncentraci k agregaci molekul do útvarů koloidních velikostí, které nazýváme micely. Tuto určitou koncentraci označujeme jako kritickou micelární koncentrací (CMC). Obecně můžeme říct, že CMC není výrazně vysoká a pro různé povrchově aktivní látky kolísá v rozmezí 10^{-5} – 10^{-3} dm^{-3} . Vlivem této koncentrace se v důsledku vzniku micel v roztoku PAL mění fyzikálně-chemické vlastnosti závislých na koncentraci. Při CMC dochází ke změně v roztoku PAL, např. u hustoty, osmotického tlaku, viskozity, povrchového napětí, molární vodivosti či turbidity (viz. Obrázek 8).

V případě koncentrační závislosti hustoty a viskozity dochází k velmi málo výrazným zlomům. Naopak u molární vodivosti můžeme ze začátku pozorovat mírné klesání a při dosažení hodnoty CMC nastává velmi výrazný zlom – pokles. Vlivem tvorby elektrické dvojvrstvy, kterou vytvářejí protiionty a na micely tak ulpívají, ztrácejí dané protiionty schopnost samostatného pohybu a nemohou přispívat k vodivosti systému. V důsledku toho molární vodivost, která je dána součtem iontových vodivostí micely a volných protiiontů klesá. Osmotický tlak je úměrný koncentraci roztoku a přibližně se řídí van't Hoffovou rovnicí. Vlivem rozpouštění ve formě micel nad CMC stoupá osmotický tlak mnohem pomaleji. U povrchového napětí roztoků PAL zase s rostoucí koncentrací dochází k prudkému klesání. Po dosažení CMC se povrchové napětí mění zanedbatelně [11].



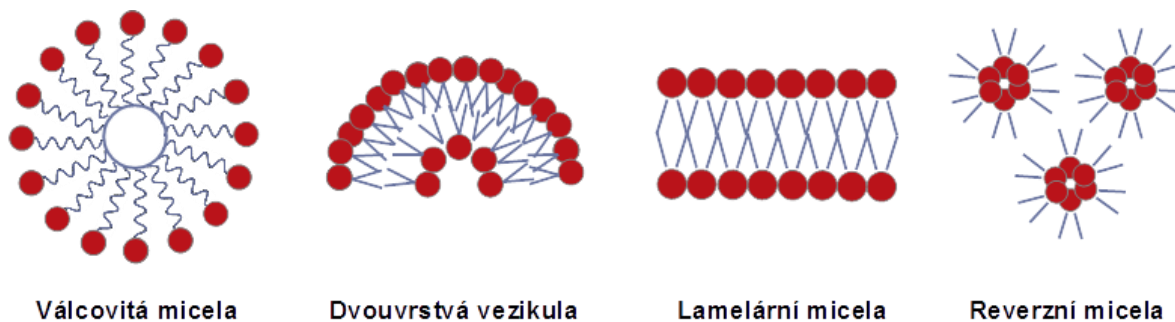
Obrázek 8: Graf závislosti fyzikálních veličin na koncentraci PAL [11].

2.2.2 Struktura a tvar micel

V roce 1955 H. V. Tartar poznamenal, že většina malých rozpustných micel mají spíše elipsoidní než sférický tvar. Sférické a elipsoidní micely představují skupinu micelárních tvarů, ve kterých je agregační číslo micel neustále proměnlivé a navrhuje se, aby amfifily s jediným uhlovodíkovým řetězcem na skupinu polárních hlav tvořily micely s distribucí velikostí a tvarů v rámci jedné skupiny. V případě amfifilů s dvěma uhlovodíkovými řetězci na skupinu hlav vyžadují menší povrchové plochy a geometrické úvahy pak naznačují preferenci rozšířených dvojvrstev nebo vezikul před sférickými nebo elipsoidními micely v souladu s experimentálními porovnáním [12].

Pomocí metody s rozptylem záření bylo dokázáno, že ve zředěných vodných roztocích nad hodnotou CMC vznikají malé tzv. Hartleyovy micely, kulovité agregáty molekul povrchově aktivních látek. Tyto agregáty mají navzájem propletené uhlovodíkové řetězce, které tvoří jádro micely a jejich polární skupiny směřují ven. Poloměr takové micely se přibližně rovná délce molekuly PAL. V těchto micelách se počet molekul PAL velmi často pohybuje mezi 50–150 jednotkami a závisí na fyzikálních podmínkách. Vlivem rostoucí koncentrace v roztoku se rozměr micel zvětšuje a uhlovodíkové řetězce se začínají více orientovat rovnoběžně. Nejdříve dochází k formaci kulových micel ve válcovité útvary a vlivem dalšího navýšení koncentrace vznikají tzv. McBainovy micely (lamelární), které jsou složeny ze dvou vrstev povrchově aktivních látek. Tyto dvě vrstvy jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci, ionogenní skupiny směřují ven a svojí stavbou se podobají na dvojrozměrný krystal [11].

V případě přítomnosti dvou hydrofobních řetězců v amfifilní molekule, mohou také vzniknout dvouvrstvé membrány, vezikuly nebo obrácené micely, které se tvoří v nepolárních rozpouštědlech. Jejich jádro tvoří hydrofilní skupiny, zatímco hydrofobní uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí. Tyto micely nazýváme reverzní [8].



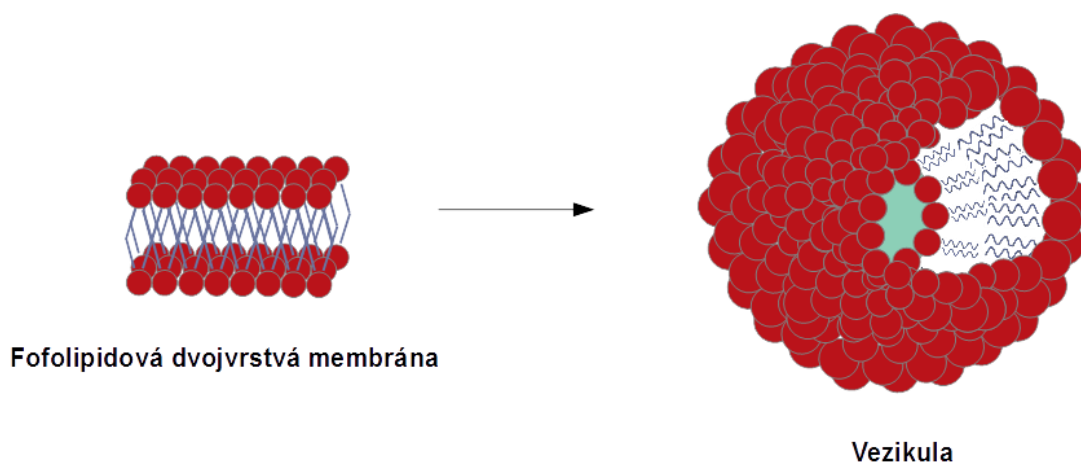
Obrázek 9: Struktura a tvar micel.

2.3 Vezikuly

Vezikuly obecně plní mnoho základních funkcí ve všech živých organismech. Reagují na změnu při mechanickém namáhání a při převodu aplikované síly na mechanické a biologické reakce. Odezvu při mechanickém zatížení ložiska zároveň ovlivňují i biochemické a biofyzikální signály.

V posledních letech si vezikuly získaly velkou pozornost ve farmaceutickém průmyslu jako nosič léčiva, který může složit jako umělý systém, který napodobuje buňky. Díky schopnosti vezikul pronikat póry jsou velice vhodnými pro terapeutické látky, díky kterým je možné účinně dosáhnout na infikovaná místa. Hlavním výzkumem a výzvou v této oblasti je tedy schopnost vezikul s požadovanými mechanickými vlastnostmi zapouzdřit léky, či jiné účinné látky, a uvolnit je dle potřeby [13].

Vezikuly neboli umělé lipidové váčky, jsou složeny z jedné nebo více dvouvrstevných membrán, které jsou uspořádány do tvaru připomínající obal. Tento obal obklopuje vodnou mikrofázi a odděluje ji tak od vodného disperzního prostředí. Vnější i vnitřní povrch dvojvrstvé membrány je tvořen hydrofilními skupinami, které zabraňují styku hydrofobních řetězců s vodou. Vezikuly mohou dosáhnout rozměr od desítek nanometrů do desítek mikrometrů. Vezikuly, které jsou tvořeny z přírodních i syntetických fosfolipidů se nazývají liposomy. Vezikuly je možné připravit dispergováním nebo kondenzací, ale při vhodném uspořádání dochází i ke tvorbě samovolným rozpuštěním [8].



Obrázek 10: Struktura vezikuly a fosfolipidové membrány.

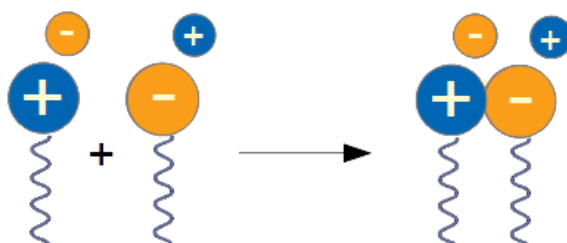
2.3.1 Kataniontové vezikulární systémy

Všestranné vezikulární systémy přilákaly pozornost díky svým slibným terapeutickým aplikacím. Tyto vezikulární systémy mají schopnost zapouzdřit polární léčiva ve svém vodném kompartmentu a do uhlovodíkové domény mohou být zabudovány naopak hydrofobní sloučeniny. Jedny z nejvíce studovaných systémů jsou liposomy, složené z přírodních polárních lipidů, které jsou biokompatibilní, biologicky odbouratelné a netoxické. Liposomy však mají i některé nevýhody jako jsou nákladné suroviny pro jejich přípravu, vysoce energetický a zdoluhavý postup přípravy s několika kroky, vznik nerovnovážných struktur s omezenou koloidní stabilitou a snadná chemická degradace hydrolýzou přírodních lipidů.

Jako vhodnou alternativou těchto liposomů jsou zkoumány kataniontové vezikuly, které jsou schopny se spontánně shromažďovat bez jakýkoli energetických požadavků po smíchání kationtových a aniontových povrchově aktivních látek. Jejich termodynamická nebo kinetická stabilita je jednou z mnoha výhod. Lze je připravit za pomoci jednoduchých a ekonomicky přijatelných podmínek z povrchově aktivních látek. Jejich velikost, povrchovou hustotu, flexibilitu či propustnost můžeme pozměnit úpravou koncentrace nebo směšovací poměrem kationtových a aniontových PAL. Případnou úpravu teploty či délky řetězce lze zajistit přidáním solí nebo pomocných rozpouštědel [14].

Kataniontové vezikulární systémy jsou tvořeny směsí dvou opačně nabitých povrchově aktivních látek. Asociace kationtových a aniontových povrchově aktivních látek prostřednictvím interakcí mezi jejich polárními hlavními skupinami mohou vytvořit komplex se strukturou, která se velmi podobá dvojí řetězcové struktuře fosfolipidů. Tyto komplexy mají tendenci ve vodném prostředí tvořit vezikulární struktury za určitých podmínek. Směsi opačně nabitých povrchově aktivních látek můžeme klasifikovat do dvou typů: kataniontové směsi a amfifilní iontové páry (IPA). Přestože kataniontové směsi mohou tvořit kataniontové vezikuly spontánně, tyto systémy vykazují komplikace u fázového chování. U vezikul IPA mají bez přebytku soli obvykle nízkou rozpustnost ve vodě a tvoří kataniontové vezikuly s obtížností. Jedná se však o složité systémy a je nutné překonání nedostatků, jako je přítomný přebytek soli v kataniontových vezikulách, nízká rozpustnost a špatná fyzická stabilita kataniontových vezikul, pomocí různých aditiv a chemických látek [15].

Vzhledem k fyzikálně chemickým a biologickým vlastnostem jsou tyto kataniontové vezikuly zvláště zajímavé pro aplikace v nanotechnologiích a biomedicině. Bylo zjištěno, že lipidové váčky jsou cenné v imunologii, membránové biologii, diagnostických technikách a v genetickém inženýrství. Tyto vezikuly především hrají hlavní roli při modelování biologických membrán a při transportu a cílení aktivních látek do organismu [16].

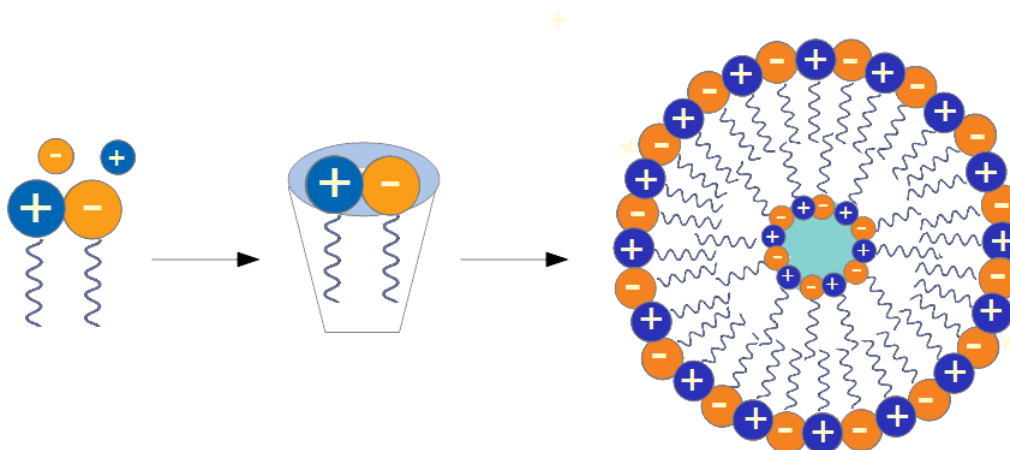


Obrázek 11: Vznik dvouřetězcového tenzidu s protiionty z jednotlivých opačně nabitých PAL.

2.3.1.1 IPA (amfifilní iontový pár)

Přípravou ze směsi kationtových a aniontových povrchově aktivních látek na základě elektrostatických přitažlivých sil mezi polárními hlavními skupinami vznikají kataniontové povrchově aktivní látky. Po odstranění protiiontů z této směsi se získaný zbytek nazývá IPA. IPA je tedy obecně tvořena spárováním dvou jednořetězcových protilehlých nabitých povrchově aktivních látek se stejným molárním poměrem a lze ji považovat za povrchově aktivní látku s dvojitým řetězcem. Vlivem kritického parametru balení, který určuje mikrostrukturu agregátů povrchově aktivních látek ve vodné fázi, se IPA proto raději shromažďuje do dvouvrstvých vezikul než do micel. V případě tvorby micel by docházelo ke zmenšení účinné oblasti hlavní skupiny [17].

Příprava IPA může probíhat i pomocí chemických metod jako je iontová výměna, extrakce a srážení. U iontové výměny je zapotřebí iontoměničová pryskyřice, která je schopna přeměnit aniontové a kationtové povrchově aktivní látky do jejich protonovaných a hydroxidových forem. Poté se provede acidobazická reakce smícháním dvou roztoků povrchově aktivních látek. Při extrakčních metodách se IPA připravuje smícháním molárního množství opačně nabitých povrchově aktivních látek ve vodě a následné extrakce vhodným organickým rozpouštědlem. Kataniontových vezikuly připravené z čisté vodné fáze IPA obvykle vykazují krátkodobou fyzikální stabilitu. Na překonání této nežádoucí vlastnosti lze použít různé postupy k úpravě vezikuly [16].



Obrázek 12: Vznik kataniontových vezikul ze základní jednotky IPA.

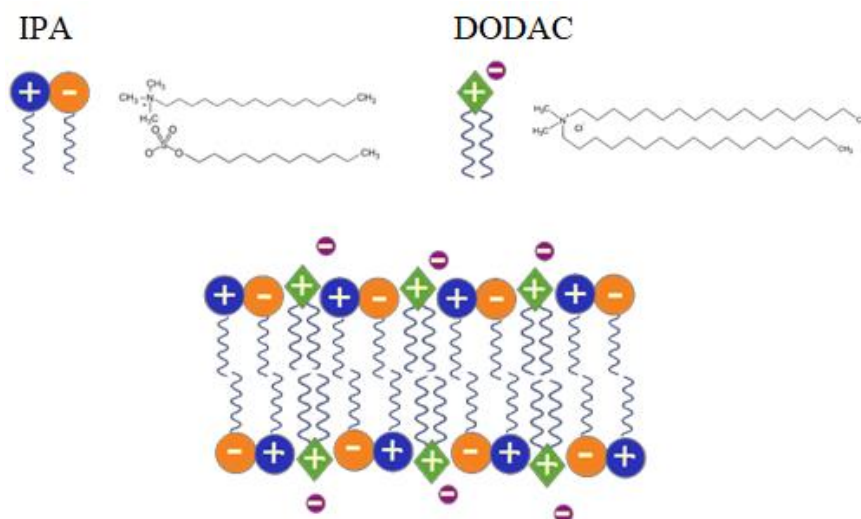
2.3.1.2 Stabilizace kataniontových vezikulárních systémů pomocí DODAC a cholesterolu

Hlavním výzkumem v této oblasti je schopnost kataniontových vezikulárních systémů zapouzdřit léky, či jiné účinné látky a možnost je uvolnit dle potřeby. Tento požadavek však vede k určitým úpravám složení dvouvrstvé membrány [18]. Důvodem je špatná fyzikální stabilita kataniontových vezikul, které byly připraveny pouze ze základní stavební jednotky IPA ve vodné fázi. Špatná stabilita těchto vezikul může způsobit, že se snadno spojí nebo agregují a nemůžou si tak dlouhodobě uchovat svou velikost.

Jednou z možností, jak zlepšit fyzikální stabilitu, je přidání některých nabitých dvořetězcových povrchově aktivních látek. Díky tomu jsou kataniontové vezikuly stejně nabitě, odpuzivé interakce mezi nimi převládají a vlivem toho je agregace a fúze inhibována. Nabitě kataniontové vezikuly mohou také

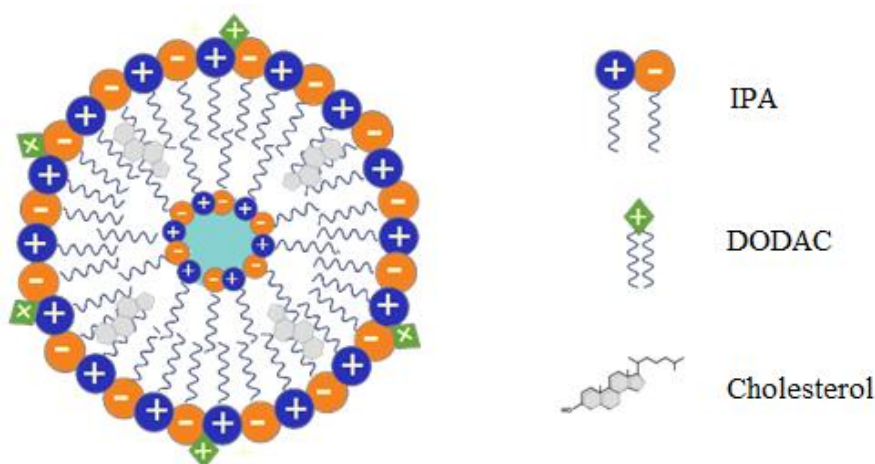
interagovat s opačně nabitými polymery prostřednictvím elektrostatických a hydrofobních interakcí. Další výhodou může být zvýšení stability a biokompatibility [19].

Diocetadecyldimethylamoniumchlorid (DODAC) je dvouřetězcová kationtová povrchově aktivní látka a přidavkem do systému bylo prokázáno, že dochází ke zlepšení odpudivé interakce mezi vezikuly a změně molekulární interakce uvnitř vezikulárních dvojvrstev.



Obrázek 13: Začlenění DODAC do membrány kataniontových vezikul.

Dalším postupem pro zlepšení stability vezikul se používá cholesterol. Cholesterol působí jako regulátor membránové propustnosti, pružnosti a tuhosti, má schopnost zabránit agregaci a tím zvýšit stabilitu dvojvrstev. Hydroxylová skupina, která tvoří vodíkové vazby a je inkorporována do dvojvrstvy vezikul, zvyšuje jejich stabilitu a tekutost. Je schopen ovlivňovat charakter náboje, fyzikální stabilitu a molekulární složení dvojvrstev. Jeho přítomnost také ovlivňuje elektrostatický odpor a tím dochází ke snížení potenciálu zeta. Celkové snížení tohoto potenciálu vezikul vlivem cholesterolu dochází ke snížení tendence k protiontové vazbě. V případě většího množství cholesterolu, však může docházet ke krystalizaci uhlovodíkových řetězců a destabilizačnímu účinku na vezikuly [19].

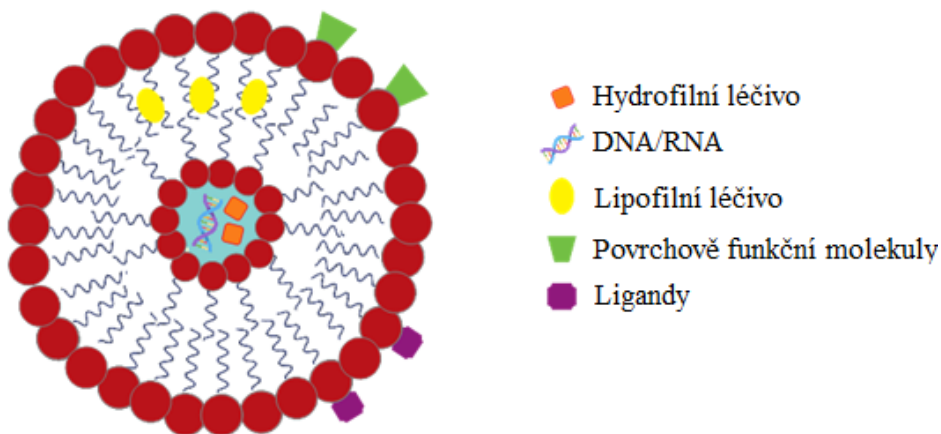


Obrázek 14: Začlenění DODAC a cholesterolu do membrány kataniontových vezikul.

2.3.1.3 Obecná aplikace liposomů

Lipidové dvojvrstvy a liposomy vykazují různé fázové přechody, které by mohly být použity ke spuštění uvolňování léčiva nebo fúzi liposomů při vhodném spuštění. Tyto dvojvrstvy mohou existovat v nízkoteplotní pevné fázi a nad určitou teplotou v tenké neuspořádané fázi. Tento přechod lze právě využít k řízení úniku liposomů a tím docílit účinnější dodání enkapsulovaných léčiv do cílových tkání. Dvojvrstvy mohou také procházet přechody do jiné kapalně-krytalické fáze vlivem zvýšení celkové nebo průměrné plochy polárních hlav. Tyto přechody na vnější monovrstvě lze ovlivnit hydrolyzou nebo protonací lipidů obsahujících slabé bazické skupiny a mohou tak vyvolat fúzi liposomů a uvolnění jejich obsahu.

Pro dodání léčiva mohou být liposomy formulovány jako suspenze, aerosol nebo pevná forma. V případě pevné formy je příkladem gelový krém nebo suchý prášek. Tyto pevné formy mohou být podávání topicky a parenterálně. U intravenózního podání a systémového účinku jsou lipidy automaticky rozpoznány jako cizí částice a následně tak endocytovány buňkami mononukleárního fagocytárního systému (MPS) a fixovanými speciálními buňkami v játrech a slezině. V tomto případě je to velice užitečné při cílení do těchto buněk. Vlivem tohoto osudu liposomů byla snaha o nalezení dalších liposomů, které by byly schopny se vyhnout tomuto rychlému vychytávání MPS. Výsledkem bylo nalezení několik lipidových kompozic, které jsou schopny prodloužit dobu krevního oběhu a vedly tak k dalšímu vývoji stericky stabilizovaných liposomů [20].



Obrázek 15: Různé typy systémů k podávání léků pomocí liposomů.

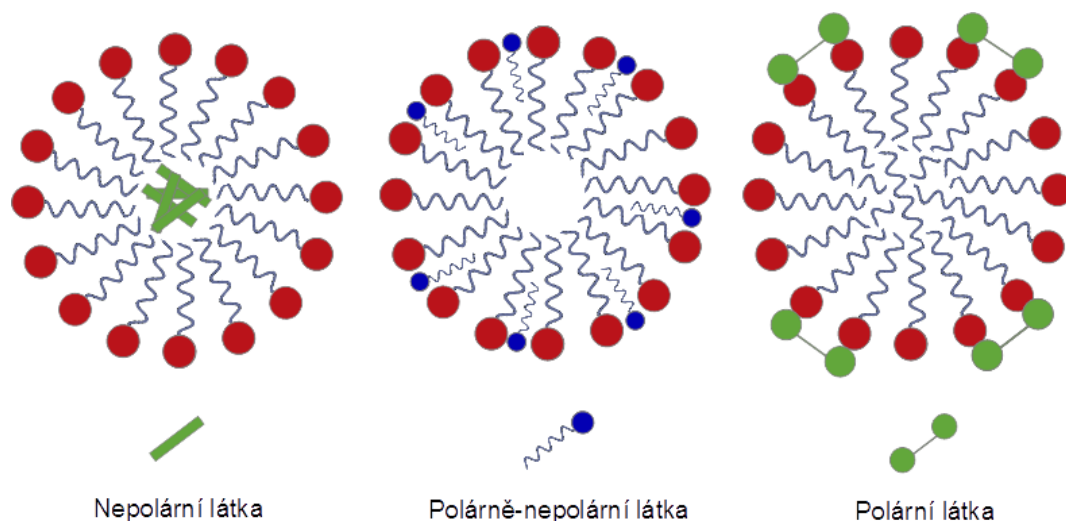
2.4 Solubilizace

Solubilizace je jednou z významných vlastností micelárních koloidů, která souvisí se stavbou jejich micel a jedná se o schopnost rozpouštět nerozpustné, nebo málo rozpustné látky v čistém disperzním prostředí.

Mechanismus solubilizace se liší vlivem disperzního prostředí. Na obrázku (viz. Obrázek 16) jsou znázorněny 3 možnosti solubilizace různých molekul disperzního prostředí. V případě rozpouštědla nepolární povahy se tyto látky rozpouštějí v jádru micely. Naopak solubilizace polárních látek probíhá na povrchu micely nebo v těsné blízkosti povrchu. Molekuly, které mají polární i nepolární skupinu se

rozmišťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze.

Při solubilizaci dochází ke zvyšování hmotnosti PAL v důsledku zabudování molekul do solubilizátu micely a vlivem zvětšení objemu hydrofobního jádra, který způsobí zvětšení počtu molekul PAL, které tvoří micelu [11].



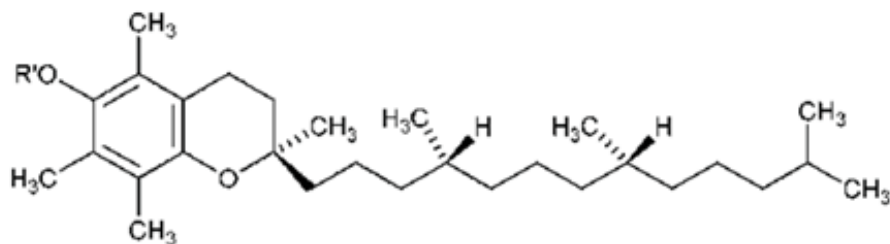
Obrázek 16: Mechanismus solubilizace vlivem disperzního prostředí.

Solubilizace má velký rozsah užití a už prvním příkladem je praktický význam při detergenti, během které dochází k praní znečištěných povrchů působením PAL. Dochází zde k absorpci molekul PAL ze zředěného vodného roztoku na povrch pevné látky a olejovité vrstvy, která je součástí znečištění. Dochází ke změně velikosti smáčecího úhlu a olejovitá vrstva a jiné nečistoty se postupně sbalují a postupným uvolněním přecházejí do roztoku, kde jsou solubilizovány do micel. Tyto micely mají poté hydrofilní charakter a není tedy možné, aby se vážaly zpět na čistý povrch pevné látky. Základem je vhodný detergent, který je schopen difundovat do čisté hmoty, dobře smáčet jeho povrch, převést nečistoty do objemové fáze a solubilizovat je. Další využití má při syntéze latexů, kde hraje důležitou roli při emulzní polymeraci nenasycených uhlovodíků. Tato polymerace probíhá v micelách, které obsahují solubilizovaný uhlovodík. Solubilizace se uplatňuje i v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu pro výrobu herbicidů, insekticidů či fungicidů. V potravinářském průmyslu mají význam při koloidním rozpouštění vody v systémech s nepolárním prostředím, kde vznikají micely s hydrofilním jádrem a hydrofobním povrchem a dochází k tzv. obrácené solubilizaci [11].

2.4.1 Vitamíny rozpustné v tucích

Obecně vitamíny jsou nezbytné mikroživiny požadované lidským tělem pro správný růst a vývoj. Dělí se na vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích. Ve vodě rozpustné vitamíny se konzumují v potravě a přebytečné množství se z těla vylučuje ven. U vitamínů rozpustných v tucích se v těle ukládají v tkáních a játrech.

Vitamíny rozpustné v tucích jsou vitamíny A, D, E a K a každý z těchto vitamínů se dále dělí do dalších skupin v závislosti na molekulární struktuře. Mezi skupinu vitamínů rozpustných v tucích jsou zahrnuty také karotenoidy, které jsou prekurzory vitamínu A. Jedná se o lipofilní, hydrofobní molekuly, které jsou sestaveny z isoprenoidních jednotek, které jsou použity pro syntézu cholesterolu [21].



Obrázek 18: Chemická struktura vitamínu E.

Acetátový ester tokoferolu se používá jako doplněk stravy z důvodu jeho větší stability. Protože není izolován bez chemického zpracování, není možné ho legálně nazvat přírodním, ale pouze jako odvozeným z přírodních zdrojů.

Přirozená forma tokoferolů a tokotrienolů existuje v neesterifikovaných formách a jsou široce distribuovány do ořechů, semen, ovoce, zeleniny a trav. Hlavním zdrojem vitamínu E jsou oleje z obilných semen, margarín a další výrobky z nich vyrobené.

Během experimentálního pozorování zvířat, které byli zbaveny vitamínu E způsobilo mnoho různých syndromů, které lze vysvětlit, že vitamín působí jako antioxidant při stabilizaci nenasycených lipidů v biologických membránách. Vitamín E dále pomáhá tvořit krevní buňky, nervovou tkáň, posiluje imunitní systém a chrání oxidaci z polynenasycených mastných kyselin. Též se podílí na udržování imunitní funkce, inhibici růstu a diferenciaci rakovinných buněk, vychytávání volných radikálů, inhibici DNA, RNA a syntézy proteinů v rakovinných buňkách [23].

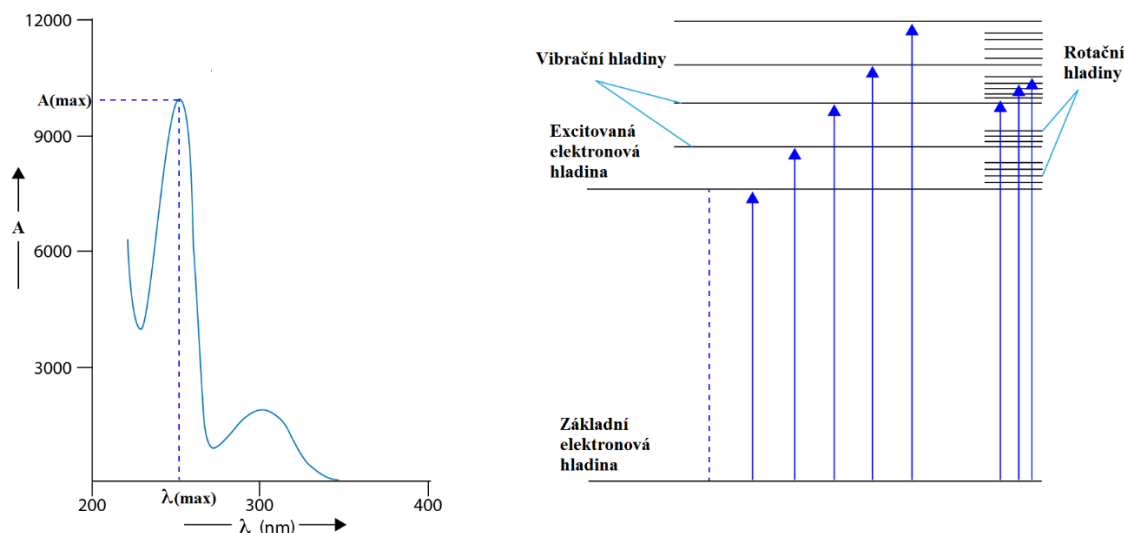
2.5 UV-VIS spektrofotometrie

Ultrafialová a viditelná spektrofotometrie patří mezi optické spektrální metody, při které dochází k absorpci záření v rozsahu 200–800 nm zředěnými roztoky molekul. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů a v UV-VIS oblasti se záření absorbuje při přechodu z nižšího elektronového pásu do vyššího. Výsledkem měření je absorpční spektrum, které slouží ke kvalitativní identifikaci organických sloučenin obsahující chromoforní skupiny. Tyto skupiny atomů v molekule způsobující absorpci záření v UV-VIS oblasti se obecně nazývají chromofory a vyznačují se tím, že ve své struktuře obsahují násobné vazby.

Elektronové absorpční spektrum neboli absorpční křivka, je definována jako závislost transmitance nebo absorbance na vlnové délce nebo vlnočtu záření. Absorpční spektrum je pásové, kdy jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronu v molekule do excitovaného stavu. Tyto jednotlivé pásy ze spektra se popisují jejich maximem vlnové délky – λ_{max} , která určuje polohu a souvisí s energií orbitalů, mezi kterými nastává přesun elektronů při excitaci. Za běžných podmínek se elektron nachází na základní elektronové a vibrační hladině. Absorpcí fotonu přijme energii a v důsledku této energie dochází k přechodu elektronu na excitovanou hladinu a jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin. Díky tomu je absorpce fotonů možná o jen málo se lišící energii a vytvářejí se velmi blízké absorpční linie ve spektru, které ve výsledku splývají v pás [24].

Vnitřní energie molekuly je dána součtem tří druhů energií a to elektronové, vibrační a rotační. Tyto energie jsou kvantovány a mohou nabývat jen určitých diskrétních hodnot, které odpovídají hladinám

energie. Mezi jednotlivými hladinami jsou značné energetické rozdíly energie. Mezi základní a excitovanou elektronovou hladinou je rozdíl energie veliký a odpovídá hodnotě 10^2 kJ/mol. U sousedních energetických vibračních hladin je rozdíl energie menší a v případě rotačních hladin je rozdíl mezi energiemi nejnižší, který odpovídá hodnotě 10 kJ/mol.



Obrázek 19: Základní schéma absorpčního spektra a elektronové hladiny pro přechody elektronů při absorpci UV-VIS záření molekulou [24].

Absorpční spektrální analýza v UV-VIS oblasti se může rozdělit na několik částí dle použití přístrojové techniky, a to na spektrofotometrii, fotometrii a kolorimetrii. Ze všech uvedených je dnes nejvýznamnější technikou spektrofotometrie.

V případě UV-VIS spektrofotometrii se většinou měří absorbance. Absorbance je definována jako záporný dekadický logaritmus transmittance. Transmittance je veličina, co definuje část prošlého záření látkou.

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right), \quad (1)$$

kde A představuje absorbanci, T transmittanci, I je prošlý zářivý tok a I_0 je dopadající zářivý tok [25]. Absorbanci je možné vyjádřit i pomocí Lambert-Beerova zákona. Tento zákon definuje, že absorbance při určité vlnové délce závisí na koncentraci c a na tloušťce vrstvy l :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c, \quad (2)$$

kde ε představuje molární absorpční koeficient, kdy se jedná se o konstantu, která je daná pro určitou látku za daných podmínek a při přesné vlnové délce. Veličina l charakterizuje tloušťku absorbující vrstvy a c látkovou koncentraci absorbující látky.

Tato závislost absorbance na koncentraci platí pouze pro monochromatické záření při nízkých koncentracích. V případě vyšších koncentrací může docházet k odchýlkám tohoto zákona. Další

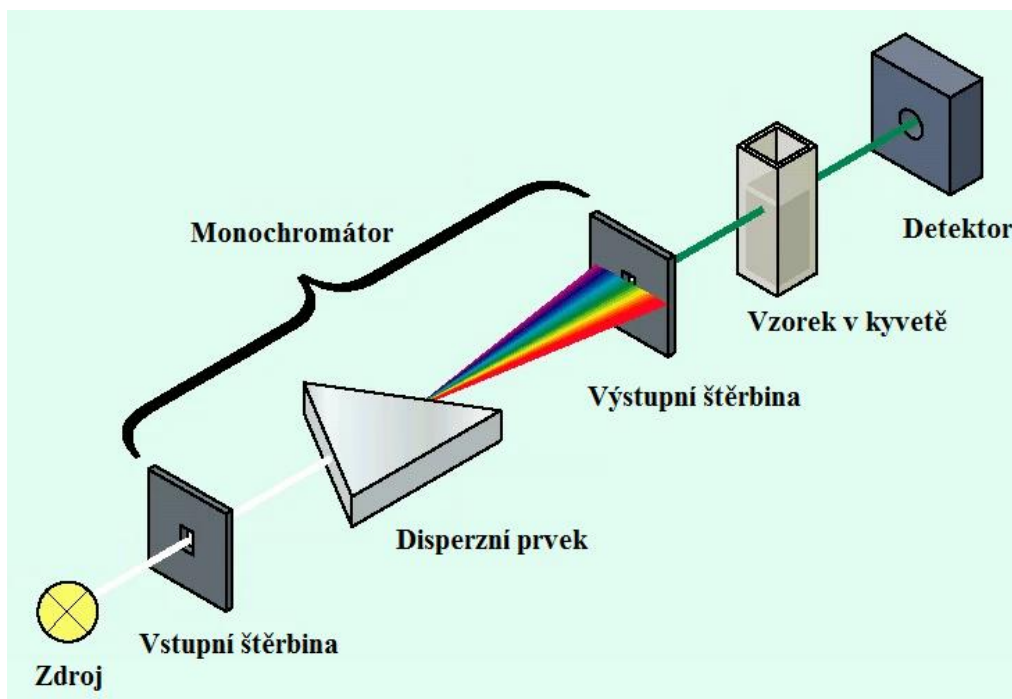
výjimkou, kdy není možné uplatnit tento zákon, je v případě, že dochází k jiným interakcím látky s prostředím. Tato absorpční spektrofotometrie má velké využití v kvantitativní analýze a využívá se především pro stanovení koncentrace látky v určitém roztoku. U kvantitativní analýzy při stanovení dané látky je však důležité vybrat správnou vlnovou délku, při které bude stanovovaná látka silně absorbovat, a naopak ostatní látky při této vlnové délce budou absorbovat minimálně. Před každým měřením je běžné, že dochází k proměření závislosti absorbance na vlnové délce při konstantní vlnové délce a tloušťce vrstvy. Výslednou závislostí při platnosti Lambertova-Beerova zákona je kalibrační přímka.

2.5.1 Instrumentace UV-VIS spektrofotometrie

U spektrofotometrie se během měření sleduje intenzita monochromatického záření při průchodu měřenou látkou v roztoku. Hlavními částmi absorpčního spektrofotometru je zdroj záření, monochromátor, absorpční prostředí a detekční systém. Jako zdroj záření se především používá wolframová nebo halogenová žárovka pro viditelnou oblast a vodíková výbojka pro oblast ultrafialovou. Jelikož Lambert-Beerův zákon platí pouze pro monochromatické záření, jsou v přístrojích zabudované mřížkové nebo hranolové monochromátory. Monochromátor je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, rozkladným prvkem a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Jako rozkladný prvek se používá hranol nebo reflexní mřížka a během jeho natáčení se postupně zobrazují jednotlivé monochromatické obrazy vstupní štěrbinu na výstupní štěrbinu. Univerzálním rozkladným prvkem pro rozlišovací schopnost ve všech vlnových délkách má mřížka. V případě UV oblasti se používá křemenný hranol, kde je rozlišení větší a směrem k delším vlnovým délkám se zmenšuje. Absorpční prostředí je tvořeno kyvetou se srovnávacím roztokem, který tvoří roztok látky ve vhodném rozpouštědle.

Detekční systém se skládá z detektoru záření a elektronického zařízení, který zpracovává jeho odezvy. Detektor funguje na principu převodu zářivého toku na elektrický signál. Tento signál detektoru se dále zpracovává v zesilovači a jeho výstup se vede na měřidlo nebo číslicový displej. Mezi detektory záření se používají fotonásobiče, fotonky, polovodičové fotoelektrické články a diodová pole. Ve viditelné oblasti záření se používají fotonky nebo fotonásobiče nebo fotoodpory.

Spektrofotometry jsou jednopaprskové i dvoupaprskové. U jednopaprskových přístrojů je používání jednodušší a slouží k analýze absorpčního spektra bod po dobu. Schéma jednopaprskového UV-VIS spektrofotometru je možné vidět na obrázku (viz. Obrázek 20).



Obrázek 20: Schéma UV-VIS spektrofotometru.

Během měření vychází polychromatické záření ze zdroje a dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na disperzním prvku vychází z výstupní štěrbinu monochromátoru monochromatické záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek. Následuje průchod záření přes absorpční prostředí a následně toto monochromatické záření na fotoelektrický detektor za vzniku fotoproudu a následného analogového nebo digitálního výstupu [26].

2.6 Dynamický rozptyl světla

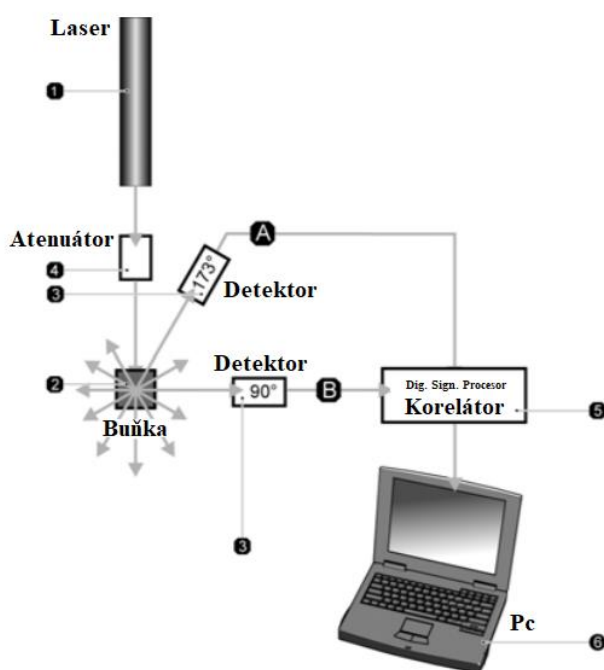
Optické vlastnosti koloidních soustav jsou závislé na fyzikálních vlastnostech, jako je jejich velikost, elektrická vodivost a absorpce světla. V případě interakce světla s těmito soustavami nejlepší charakterizaci poskytuje rozptyl světla a absorpce světla. Ke stanovení velikosti koloidních soustav je jednou z nejpoužívanějších metod dynamického rozptylu světla (DLS z angl. *dynamic light-scattering*) [27].

Obecně se DLS zabývá měřením suspendovaných částic v kapalině. Principem měření velikosti částic je sledování Brownova pohybu. Brownův pohyb je náhodný pohyb částic vlivem srážek molekul rozpouštědla a v závislosti na pohybu částic se mění intenzita rozptýleného světla. Čím větší částice jsou, tím pomalejší Brownův pohyb budou mít a naopak malé částice se vlivem srážek molekul rozpouštědla pohybují rychleji a tím se také rychleji mění intenzita rozptýleného světla. Rychlost Brownova pohybu je definována vlastností známou jako translační difúzní koeficient. Velikost částic se vypočítá z translačního difúzního koeficientu pomocí StokesEinsteinovy rovnice:

$$D = k_B T / 6\pi\eta a, \quad (3)$$

kde k_B značí Boltzmanovu konstantu, jejíž hodnota je $1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K, T je termodynamická teplota, α udává poloměr sledované částice a součin $k_B T$ udává tepelnou energii pohybu.

Podmínkou pro správné měření je teplota z důvodu nezbytné znalosti viskozity pro přesné stanovení. Měření rychlosti částic rozptýlení v důsledku Brownova pohybu se provádí při kolísání intenzity rozptýleného světla pomocí vhodného optického uspořádání. Výkyvy intenzity rozptýleného světla závisí právě na velikosti částic. Systém dynamického rozptylu světla se skládá z několika hlavních komponentů. Jako první je laser, který poskytuje světelný zdroj k osvětlení vzorku v buňce, kde prochází skrz vzorek laserový paprsek. Detektor dále měří rozptýlené světlo. Je však podmínkou, aby intenzita rozptýleného světla byla ve specifickém rozsahu pro úspěšné měření. Pro řízení této intenzity slouží atenuátor, který je schopen snížit intenzitu laserového zdroje a tím snížit intenzitu rozptylu, nebo v případě nízkých koncentrací ve vzorku může množství rozptýleného světla zvýšit intenzitu laserového zdroje. Následuje předání signálu intenzity z detektoru na digitální procesorovou desku zvanou korelátor. Tento korelátor porovnává intenzitu rozptylu v po sobě jdoucích časových intervalech k odvození rychlosti, při které se intenzita mění. Tato informace se poté předá do počítače, kde software analyzuje data a vyhodnotí informaci o velikosti [28].



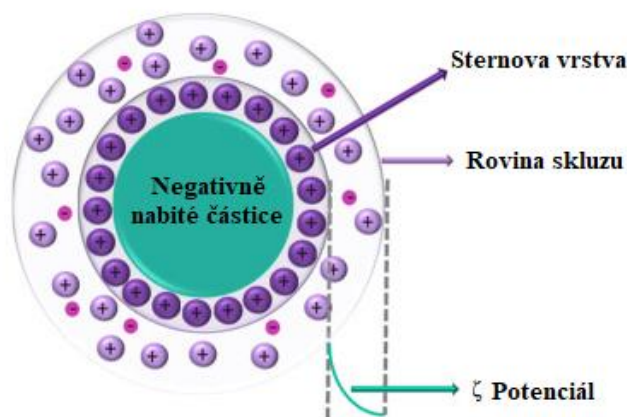
Obrázek 21: Schéma instrumentace metody dynamického rozptylu světla.

2.7 Zeta potenciál

Vlivem přítomnosti částic disperzní fáze a rozvinutého fázového rozhraní v disperzních soustavách dochází ke vzniku elektrokinetických jevů. U nabitých koloidních částic pak dochází k seskupení malých iontů s opačně nabitým nábojem a na povrchu těchto koloidních částí tak vznikají dvě nabitě vrstvy, tzv. elektrická dvojvrstva. V této elektrické dvojvrstvě můžeme odlišit dvě základní části. Část bližší k povrchu se nazývá kompaktní, působí zde adsorpční síly a v případě vzdálenější difúzní části lze tyto adsorpční síly zanedbat. Díky povrchovému náboji koloidních částic existuje potenciálový

rozdíl mezi jejich povrchem a roztokem. V případě potenciálových rozdílů se dělí na dva druhy. Prvním je elektrochemický potenciál, který zodpovídá za jevy spojené s vedením elektrického proudu, za membránové potenciály a je dán celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a objemem kapaliny. V druhém případě se jedná o elektrokinetický potenciál (zeta potenciál ζ), který je charakterizován jako rozdíl mezi objemem kapaliny a tenkou vrstvou protiiontů poutanou k povrchu částice, tedy na rozhraní mezi kompaktní a difúzní částí elektrické dvojvrstvy. Elektrický náboj dvojvrstvy popisuje a ovlivňuje celkovou stabilitu koloidního systému. Tento potenciál je také zodpovědný za vznik elektrokinetickým jevů, jakými je elektroforéza, elektroosmóza, potenciál proudění a sedimentační potenciál [29].

Zeta potenciál se měří pomocí elektroforetického rozptylu světla (ELS). Elektroforetický rozptyl světla měří, jak rychle se v kapalině pohybují částice po aplikování elektrického pole. Díky známé hodnotě této rychlosti, hodnoty velikosti pole a dalších charakteristických veličin můžeme poté vypočítat výslednou hodnotu zeta potenciálu [27].



Obrázek 22: Schéma elektrické dvojvrstvy a zeta potenciálu [30].

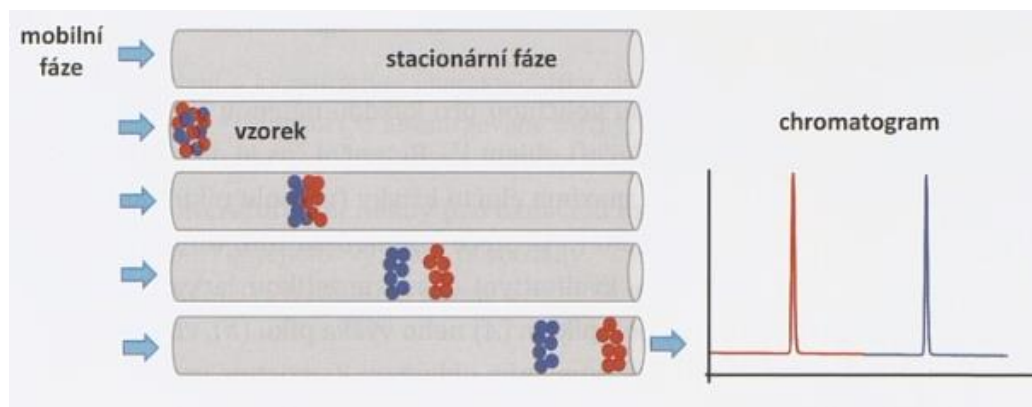
Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje zeta potenciál jsou pH média. Mezi další faktory patří iontová síla, koncentrace dalších složek v systému a teplota. Obecně významem potenciálu zeta spočívá v tom, že jeho hodnota může souviset s krátkodobou a dlouhodobou stabilitou emulzí. Emulze s vysokým potenciálem zeta (záporným i kladným) jsou elektricky stabilizovány v důsledku elektrostatického odpuzování jednotlivých částic, zatímco emulze s nízkým potenciálem zeta mají sklon ke srážení nebo vločkování, což může vést ke špatné stabilitě. Obecně v rozmezí hodnot zeta potenciálu -30 mV až +30 mV se emulze považují za nestabilní. V případě emulze s vysokým zeta potenciálem převyšují odpudivé síly ty atraktivní a vede to k relativně stabilnímu systému [31].

2.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

Obecně chromatografie patří mezi separační metody, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze. Jedná se o fázi mobilní (pohyblivou) a fázi stacionární (nepohyblivou). U kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina a stacionární fází může být tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu a mobilní fáze protéká tímto sorbentem. Nejčastějším uspořádáním kapalinové

chromatografie je právě vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC (High Performance Liquid Chromatography). V případě tohoto uspořádání mobilní fáze je rozdíl v přivádění do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku.

K umožnění distribuce mezi stacionární a mobilní fází je důležitá existence fázového rozhraní. V průběhu dělení poté dochází k opakovanému ustalování rovnováhy příslušných dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. V ideálním případě se chromatografický systém může blížit k rovnováze. Toto dělení je znázorněné na obrázku (viz. Obrázek 23).



Obrázek 23: Průběh dělení mezi mobilní a stacionární fází značící rovnováhu.

Jednotlivě separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenávány během průchodu detektorem a signál je následně převeden do podoby chromatografického záznamu, zvaný chromatogram. Ten chromatografický záznam je charakteristický křivkami gausovského tvaru, které jsou nazývány píky.

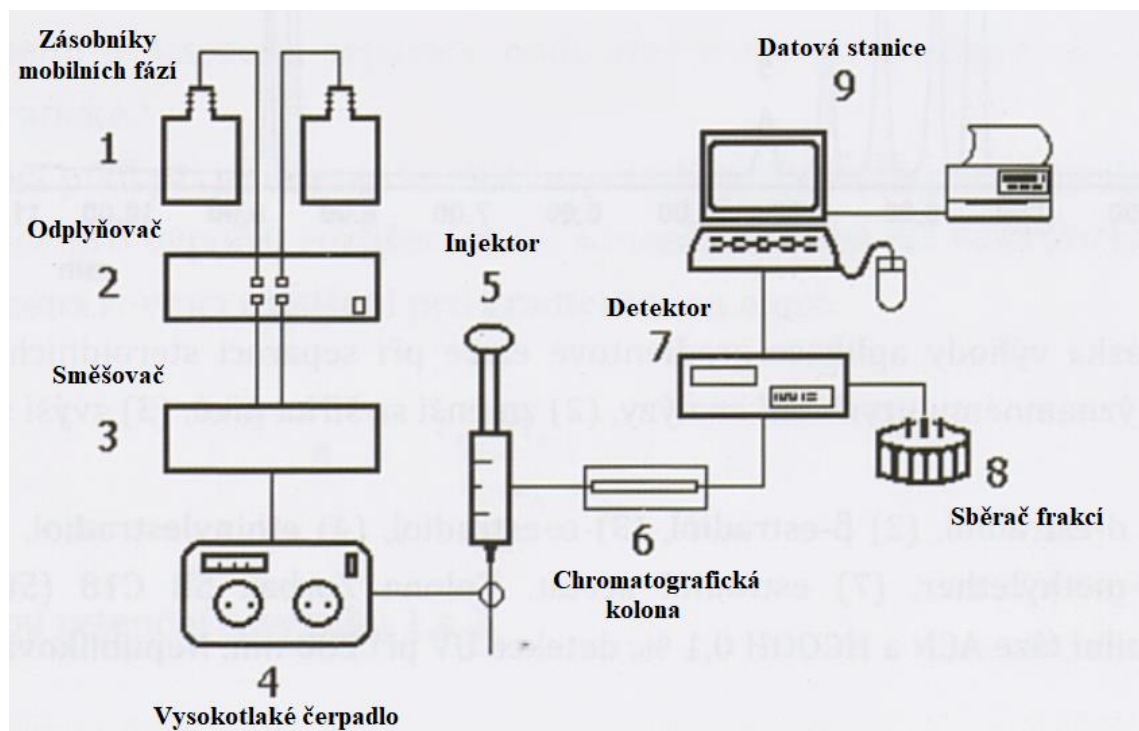
Pro každou dělenou látku je charakteristickou veličinou retenční (eluční) čas t_R nebo retenční (eluční) objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima křivky, neboli vrcholu píku a jedná se o kvalitativní charakteristiku látky. V případě retenčního objemu se jedná o objem mobilní fáze, která proteče kolonou za tuto dobu. Kvantitativní charakteristika látky je poté plocha pod píkem (A) nebo výška píku (h) [32].

HPLC je oblíbené díky rychlé a senzitivní separaci s přesnou kvantifikací rozdělených analytů. Může být aplikována na širokou skupinu látek. Separační metody používané u HPLC závisí na charakteru stacionární fáze, náplni kolony a složení mobilní fáze.

Při HPLC může být mobilní fáze pumpována přes kolonu ve stejném složení během celé analýzy a procesu dělení. Tento způsob je označován jako isokratický. Naopak u komplikovaných vzorků s obsahem mnoha různých látek s různým stupněm relativní polarit je nutné pro jejich dokonalé rozdělení v průběhu dělení měnit složení mobilní fáze. Tento způsob označujeme jako gradientový.

2.8.1 Instrumentace HPLC

Blokové schéma je uvedeno na obrázku (viz. Obrázek 24). Kapalinový chromatograf se však může lehce lišit a může mít řadu obměn, kdy je možné některé komponenty vyřadit nebo naopak přidat. Při isokratické eluci je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci může být také uskutečněna pomocí dvou vysokotlakých čerpadel, kdy je směšovač zařazen za vysokotlakým čerpadle. Odplynění mobilní fáze je provedeno v odplyňovači [33].



Obrázek 24: Blokové schéma HPLC [33].

Vysokotlaká pumpa se využívá k zajištění průtoku mobilní fáze. Přes velmi malé částice náplně kolony musí pumpa vyvinout vysoký tlak. Současně musí zaručit konstantní a velmi nízký průtok bez tlakových a objemových rázů a kolísání. Někdy se k vyrovnání a kolísání tlaku při pohybu pístu využívají i dvoupístové pumpy.

Pro nástřik vzorku do systému se používá injektor. Tento systém je ideální vzhledem k vysokému tlaku v dělicím systému chromatografu. Může být mechanickým pootočením připojen nebo odpojen od dělicí kolony. Po vydávkování vzorku do odpojeného injektoru za nízkého tlaku se injektor pootočí a vzorek se tak dostane do oblasti vysokého tlaku na začátek dělicí kolony. V častějším případě se nyní k přesnému dávkování velmi malých objemů vzorků používají přesné Hamiltonské stříkačky.

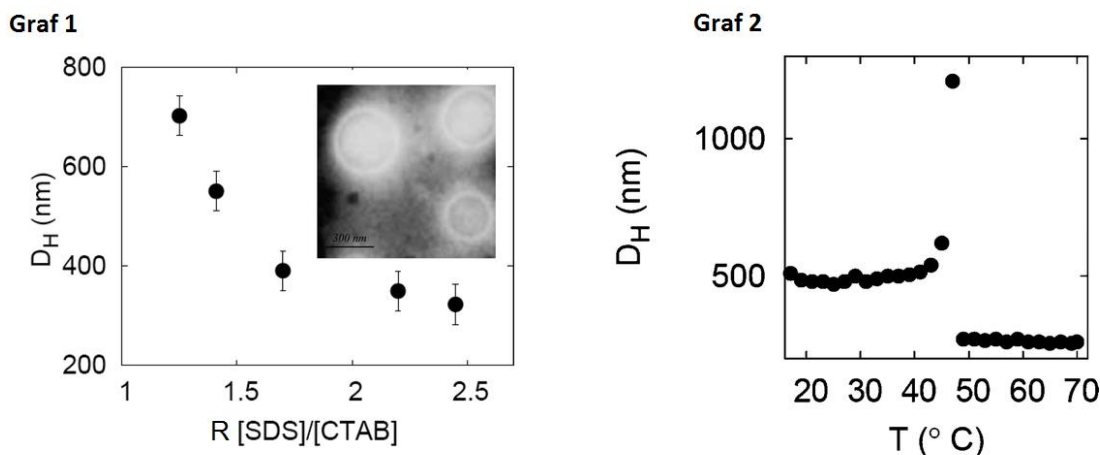
Jednou z nejdůležitějších součástí HPLC je dělicí kolona. Délka kolony se obvykle pohybuje okolo velikosti 25 cm s náplní částic o velikosti 5–10 μm . Nově se používají i kratší kolony o délce 3–5 cm plněné velmi malými částicemi o přibližné velikosti 2–3 μm . Díky kratší konstrukci na těchto menších kolonách probíhá dělení rychleji. Kolony s malým průměrem, menším než 2 mm, vykazují vysokou senzitivitu. Nevýhodou však je, že vyžadují pumpu s velmi malým průtokem a speciální detektory s malou průtokovou celou.

Nejčastěji využívaným detektorem pro měření na HPLC je UV-VIS detektor pro měření absorbance ve viditelné a ultrafialové oblasti. Podmínkou jeho použití je však schopnost rozdělené analytů, vycházejících z kolony a také schopnost absorbovat světlo určité vlnové délky. Dalším detektorem pro měření může být detektor s diodovým polem, který umožňuje proměřit rozdělené látky při více vlnových délkách nebo v celém spektru. Poskytuje tak informace o identitě a čistotě píku. Naopak pro přirozeně fluoreskující látky je vhodný fluorescenční detektor a pro látky, které obsahují v molekule elektroaktivní funkční skupinu lze detektovat elektrochemickým detektorem na vodivostním principu. V tomto případě se jedná o konduktometrický detektor [33].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Tvorba kataniontových vezikulárních systémů

Patrizia Andreozzi, Sergio S. Funari a spol. ve své práci zkoumali kataniontový systém, který byl tvořen z dodecylsulfátu sodného (SDS) a cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) pomocí různých experimentálních technik pro charakterizaci vnitřní struktury a velikosti kataniontových vezikul a za účelem stanovení přechodů do unilamelárního stavu. Vezikulární systémy byly připraveny při různých poměrech SDS a CTAB za vzniku zakaleného roztoku vezikul. Rovnováha tohoto systému byla dosažena po několika dnech stání při pokojové teplotě bez sonifikace. Příkladem experimentální techniky bylo měření dynamického rozptylu světla (DLS). DLS měření bylo prováděno při 25°C a byl sledován střední hydrodynamický průměr vezikul v závislosti na teplotě a molárního poměru RSDS/CTAB. Na obrázku (viz. Obrázek 25) je dokázána závislost poměru složení na hydrodynamickém průměru vezikul, kde lze odvodit, že se zvyšující se hodnotou D_H dochází ke snižování k poměru R mezi SDS/CTAB. Hodnoty blížící se k neutralizaci náboje potvrzují, že částečné náboje na těchto vezikulách hrají důležitou roli při mezifázového zakřivení. Na druhém grafu je možné pozorovat významné ovlivnění vezikul teplotou, kde dochází ke zvyšování teploty k posunu D_H ke skoku vzhůru a náhlým poklesem nad kritickou hodnotou.

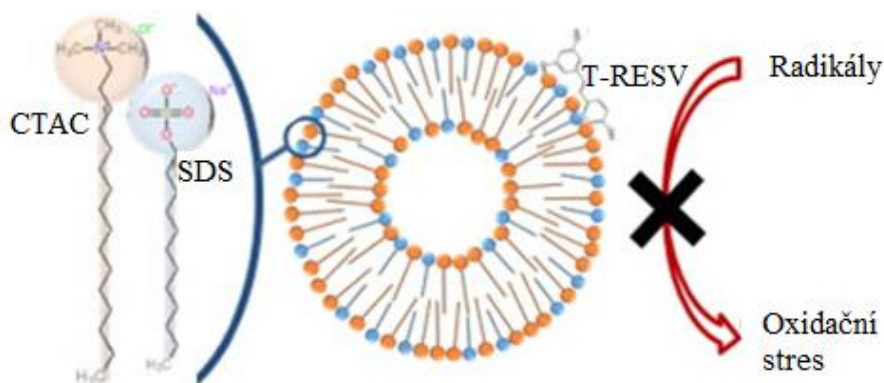


Obrázek 25: Závislost složení hydrodynamického průměru vezikul SDS/CTAB ukazující přítomnost vezikul v rozmezí velikosti z měření DLS a teplotní závislost hydrodynamického průměru vezikul SDS/CTAB.

Měření DLS bylo prováděno i v závislosti na čase, při kterém byla pozorována téměř konstantní hodnota D_H vezikul po dobu 1 měsíce. Dalším experimentem bylo měření SAXS, které se především zaměřuje na vnitřní organizace vezikul, zatímco měření DLS slouží k modifikaci v celkové velikosti. Během měření se sledoval přechod multilamelární povahy vezikul na unilamelární organizaci při 20°C a z výsledků lze odvodit závěr, že je přechod z multi na unilamelární vezikuly ovlivněn značným snížením D_H hodnot nad kritickou teplotou. Experimenty během této práce potvrzují změny velikosti vezikul vlivem změnami jejich vnitřní struktury. Po zahřátí se multilamelární vezikuly mění na unilamelární se současnými fúzními a růstovými mechanismy vezikul. Tento přechod do více vrstev je zpětný proces, v experimentálním časovém měřítku dlouhý a vezikuly připravené za vysokých teplot

zůstávají nerušené po dlouhou dobu. Díky teplotě je možné získat unilamelární vezikulární disperze s dobře definovaným čistým nábojem. Tato vlastnost vezikul je velice přínosná v případě dalších biomedicínských aplikací [34].

Irene Russo Krauss a spol. se ve své práci zaměřili na přípravu a charakterizaci kataniontových vezikul připravených prostřednictvím CTAB a SDS, vhodných pro solubilizaci aktivních látek jako nanonosiče. Do těchto agregátů inkorporovali přírodní antioxidant trans-resveratrol (t-RESV), který je ve vodě málo rozpustný. Chemicko-fyzikální charakterizace byla měřena prostřednictvím dynamického rozptylu světla a struktura a dynamika agregátů byla analyzována pomocí malého úhlového rozptylu a elektronové paramagnetické rezonanční spektroskopie. Tento systém tvořený směsí CTAC-SDS charakterizovali jako složitý s velkým rozsahem složením, ve kterém se tvoří pouze vezikuly, kde převládají kationty. V porovnání se směsí CTAB-SDS má rozsah o mnoho širší a nemá sklon k tvorbě prodloužených micel. Vlivem nepřímého účinku chloridových iontů dochází ke stabilizaci vezikul díky přítomnosti přidaného elektrolytu při vysoké koncentraci. Další stabilizace nastává kvůli asymetrii mezi alkylovými konci obou PAL, kde dochází k částečné interdigitaci jejich konců ve dvojrvtvém vnitřním jádru. Během solubilizace aktivní látky t-RESV do kataniontových vezikul sledovali, zda jsou tyto systémy jako nanonosiče vhodné pro jejich cílení. Aktivní látka t-RESV byla částečně solubilizována mezi hlavní skupiny PAL a částečně mezi skupiny, které jsou částečně vystaveny okolnímu prostředí bez jiného vedlejšího procesu jako je izomerizace nebo autoagregace. Sledovali schopnost t-RESV uplatňovat svou antioxidační aktivitu ve vodném prostředí obklopujícím vezikuly. Experiment, který sledoval tuto aktivitu v přítomnosti agregátu CTAC-SDS dokazuje, že aktivní látka t-RESV vyvíjí významnou zachycovací aktivitu vůči radikálům ve vodném prostředí bez přidaného dalšího rozpouštědla nebo solubilizátoru. Tato skutečnost je velice významná a závisí na koncentraci a rozpustnosti této aktivní látky.

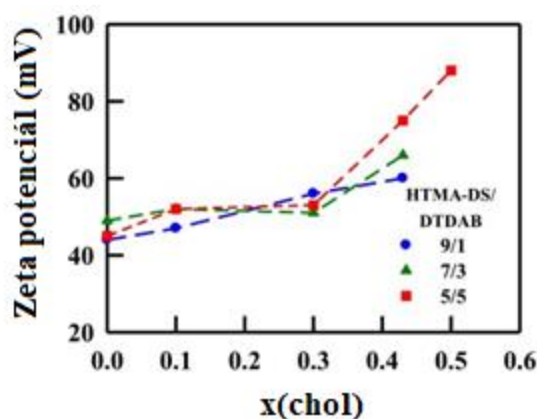


Obrázek 26: Mechanismus CTAC-SDS vezikul s t-RESV během radikálového zachytu.

Dalším zaměřením v této práci bylo na aplikační význam této kataniontové směsi a bez ohledu na významné vlastnosti zůstává toto použití poměrně omezené. V důsledku toho tato práce ukazuje právě enkapsulační možnosti těchto systémů pro další výzkum a aplikaci [35].

3.2 Zvýšení stability vezikulárních systému pomocí cholesterolu a nabitých dvojřetězcových PAL

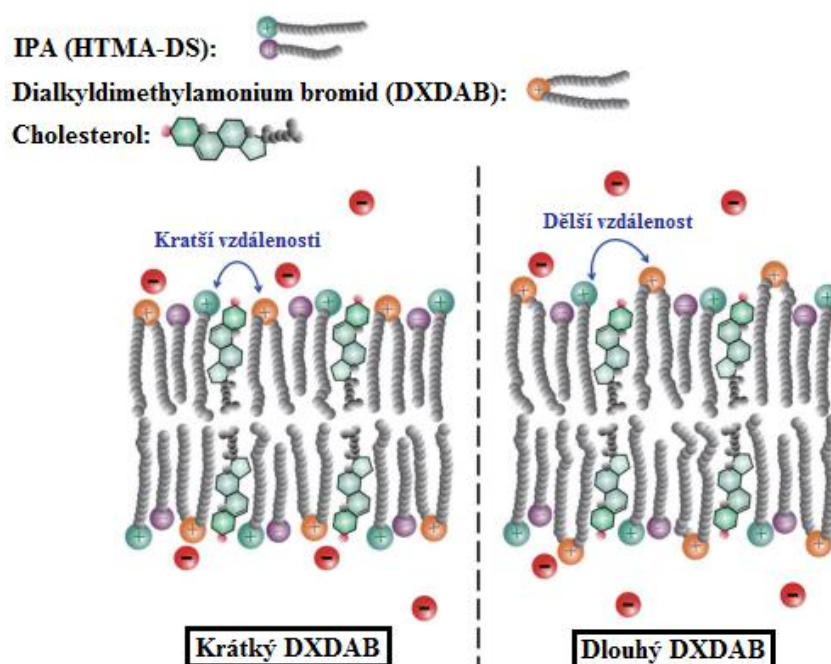
An-Tsung Kuo, Cheng-Lin Tu a spol. se zabývali přípravou kataniontových vezikulárních systémů z IPA a zvýšením fyzické stability těchto struktur úpravou interakcí mezi váčky. Pro úpravu molekulárního složení vezikulárních dvojvrstev a zvýšení stability použili cholesterol. Určité množství cholesterolu přidali do kataniontových vezikul, které byly tvořeny hexadecyltrimethylamonium-dodecylsulfátem (HTMA-DS) s ditetradecyldimethylamoniumbromidem (DTDAB). Tato práce především slouží k objasnění účinku cholesterolu na fyzickou stabilitu v přítomnosti nebo nepřítomnosti v těchto vezikulách. Pro vyhodnocení fyzické stability a nábojového charakteru byl měřen potenciál zeta pomocí dynamického rozptylu světla. Během měření vezikul složených z HTMA-DS/DTDAB s různým molárním podílem cholesterolu x_{chol} docházelo ke zvýšení zeta potenciálů vlivem zvýšeného elektrostatického odporu mezi váčky a následné stabilitě vezikul. V případě absence cholesterolu při různých směšovacích poměrech vezikul nebyla naměřena žádná významná změna v potenciálu zeta. Začleněním cholesterolu při $x_{\text{chol}} 4 \text{ mM}$ docházelo k vytlačování molekul tvořících dvojvrstvu od sebe a zvýšila se tak vzdálenost mezi hlavními skupinami a došlo ke snížení elektrostatického odpuzování mezi nabitými hlavními skupinami. Tendence vazby protiiontu se snížila a projevilo se to na zvýšení přírůstku potenciálu zeta, který je znázorněn na obrázku (viz. Obrázek 27). Zjistili, že přidávkem nízkého obsahu cholesterolu $x_{\text{chol}} \leq 0,3$ docházelo ke tvorbě malých vezikul vlivem kondenzačních účinků, zatímco vysoký obsah cholesterolu $x_{\text{chol}} > 0,3$ podporoval tvorbu velkých vezikul.



Obrázek 27: Závislost molárního podílu cholesterolu při různých směšovacích poměrech HTMA-DS/DTDAB na měřeném zeta potenciálu.

Výsledky této práce ukazují, že ve smíšených vezikulách HTMA-DS/DTDAB se obecně zvýšila fyzikální stabilita způsobená interakcí ve vezikulárních dvojvrstvách s upraveným obsahem cholesterolu. Zahrnutý cholesterol v těchto systémech zvýšil vzdálenost mezi nabitými hlavními skupinami molekul tvořících vezikuly, snížil tendenci protiiontové vazby na povrchu vezikul a došlo tak k výraznějšímu nábojovému charakteru vezikul. Mechanická pevnost dvojvrstvy se zvýšila díky zvětšenému kontaktu se sousedními uhlovodíkovými řetězci způsobeným sterolovým kruhem ve struktuře cholesterolu. Naopak alkylový postranní řetězec cholesterolu spolu s uhlovodíkovými řetězci blízko konců v molekulách tvoří flexibilní oblasti uvnitř vezikulárních dvojvrstev. Přítomnost cholesterolu ve vezikulárních dvojvrstvách zvýšila vnitřní elektrostatickou odpudivost, ale také upravila vnější vezikulární obal [36].

An-Tsung Kuo, Cheng-Lin Tu ve své další práci zkoumali účinky cholesterolu a různě dlouhého alkylového řetězce DXDAB na fyzickou stabilitu kataniontových vezikul připravených z IPA a hexadecyltrimethylamoniumdodecylsulfát (HTMA-DS). Předpokládali, že by mohlo docházet ke větší stabilitě vezikul vlivem správného množství cholesterolu v kombinaci se vhodně zvolenou délkou uhlovodíkového řetězce DXDAB. Výsledky této práce byly zkoumány pomocí analýzy velikosti, zeta potenciálu a s infračervenou analýzou s Fourierovou transformací. Během měření docházelo po zahrnutí cholesterolu do smíšených vezikul HTMA-DS/DXDAB ke zvýšení potenciálu zeta vezikul a zvýšila se tak jejich stabilita. Na obrázku (viz. Obrázek 28) je znázorněné schéma, které ukazuje účinek cholesterolu na molekulární složení a nábojový charakter vezikul s různě dlouhými délkami řetězce DXDAB.



Obrázek 28: Struktura vezikulárních systémů v porovnání s krátkými a dlouhými uhlovodíkovými řetězci DXDAB a cholesterolem.

V souvislosti s DXDAB a jeho délkou alkylového řetězce zaznamenali, že vzdálenost mezi nabitými hlavními skupinami oddělenými cholesterolem se zvětší se zvětšením délky uhlovodíkového řetězce DXDAB. Vlivem zvýšené vzdálenosti mezi nabitými hlavními skupinami dochází ke snížení tendence k vázání protiiontů na povrchu vezikul a následnému zvýšení zeta potenciálu vezikul. Vlivem zvyšujícímu se účinku cholesterolu na náboj dochází k celkové zvýšení stability systému. Čím je tedy délka řetězce DXDAB delší, tím dochází k výraznějšímu zvýšení stability vezikul HTMA-DS/DXDAB. Tato zjištění jsou velice užitečná pro další vývoj kataniontových vezikul jako nosičů léčiv [37].

Wei-Ta Li, Chia-Yao Tseng a spol. zkoumali účinky různé délky alkylového dvojitého řetězce kationtové povrchové látky přidané ke směsi IPA. Účinky délky alkylového řetězce byly porovnány u ditetradecyldimethylamoniumbromidu (DTDAB), dihexadecyldimethylamoniumbromidu (DHDAB) a dioktadecyldimethylamoniumbromidu (DODAB). Tyto kationtové povrchové látky byly připravené s hexadecyltrimethylamonium-dodecylsulfátem (HTMA-DS), následně analyzovány a porovnány. Fyzické stabilitě kataniontových vezikul HTMA-DS/DXDA předchází změny interakce ve

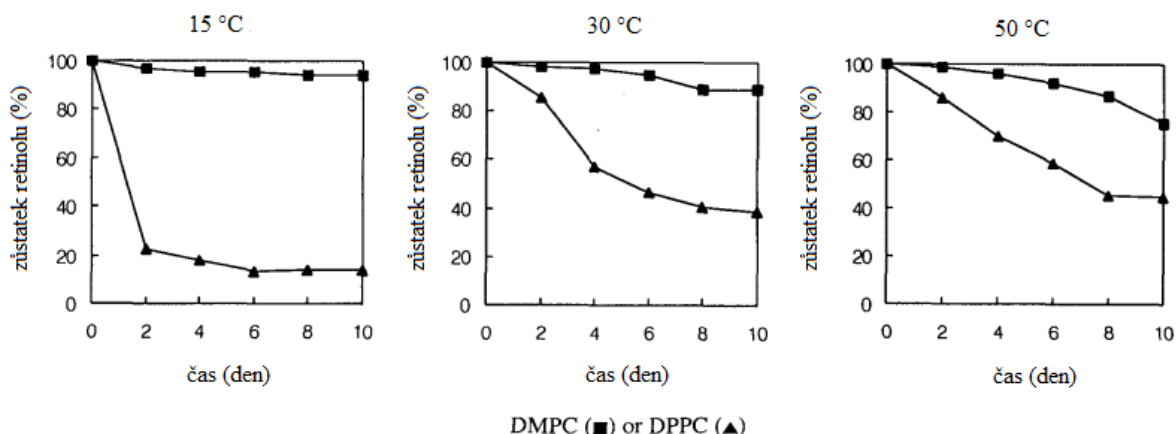
vezikulárních dvojrstvách vlivem vytěsnění kationtové části HTMA pomocí DXDAB. K objasnění těchto účinků délky alkylového řetězce DXDAB použili Langmuirovu metodu pomocí jedné vrstvy. Přidáním DXDAB s dlouhými alkylovými řetězci do monovrstvy HTMA-DS vedlo k silné intermolekulární přitažlivosti s monovrstvou a vedlo to k neúplné desorpci HTMA při vysoké povrchové hustotě. Naopak v případě přidání DXDAB s krátkými alkylovými řetězci došlo pouze k částečnému vytěsnění HTMA, a díky tomu zůstalo určité množství HTMA ve smíšené monovrstvě. Nejen délka alkylového řetězce DXDAB je schopná ovlivnit interakci ve smíšených monovrstvách vezikul ale i shoda molekulární struktury mezi DXDAB a HTMA-DS. Pro sledování přidaného DXDAB na strukturu monovrstvy HTMA-DS použili Brewsterův úhlový mikroskop a odhalili účinek shody molekulární struktury na molekulární interakci. Přidáním DHDAB se stejnou délkou alkylového řetězce jako HTMA vznikaly dobře zabalené struktury ve smíšené monovrstvě, které lze považovat za odraz vysokého napětí. Naopak u smíšené monovrstvy obsahující DODAB vlivem slabého napětí uvnitř vznikaly struktury s nepravidelným tvarem. Slabé napětí uvnitř bylo způsobené slabými interakcemi nebo výrazným pohybem uhlovodíkových řetězců. Nesprávně přiřazená část alkylových řetězců může při přípravě vezikul s odpovídajícími kompozicemi případně tvořit defekty dvojrstvých struktur [38].

3.3 Interakce vezikulárních systémů s vitamíny nerozpustných v tucích

3.3.1 Vezikulární systémy v interakci s vitamínem A

Seung-Cheol Lee, Kyung-Eun a spol. zkoumali vliv cholesterolu na stabilitu retinolu zabudovaného do liposomu při různých podmínkách. Během přípravy liposomu do fosfolipidové dvojrstvy přidali retinol zároveň s cholesterolem a sledovali vliv různé teploty a pH na stabilitu. Začlenění retinolu bylo úspěšné v alkalickém, neutrálním i kyselém prostředí a po přidání cholesterolu do systému došlo ke zvětšení velikosti liposomů a zlepšení zapouzdření. Stabilita retinolu se zvyšovala se zvyšujícím se obsahem cholesterolu v lipidové dvojrstvě vlivem interakce hydrofobních acylových řetězců fosfolipidu a vodíkových vazeb. Předpokládá se, že retinol je distribuován a stabilizován v hydrofobním jádru liposomů jak v planárním rozhraní mezi lipidovými konci, tak v rámci každé oblasti acylového řetězce. Cholesterol zajistil tedy možné umístění retinolu v liposomu do fosfolipidové dvojrstvy i přes jeho hydrofobicitu. V případě překročení meze vhodného množství cholesterolu by však mohlo způsobit blokaci při přestupu membránou a další ovlivnění vlastností [39].

Kyung-Eun Lee, Jin-Ju Kim a spol. se zabývali vlivem teploty fázového přechodu různých fosfolipidů v liposomech na stabilitu inkorporovaného retinolu. K přípravě liposomů použili dva druhy fosfolipidů lišící se délkou řetězce a teplotou fázového přechodu, L- α -dimyristoylfosfatidylcholin (DMPC) a D, L- α -dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC). Liposomy s retinolem připravili jako multilamelární vezikuly (MLVS), které skladovali při 15, 30 a 50 °C a následně analyzovali. Inkorporace retinolu do liposomů DPPC a DMPC se v účinnosti zapouzdření výrazně nelišila. V případě velikosti liposomů, však docházelo s rostoucí délkou řetězce ke zvýšení velikosti. Delší řetězec DPPC zvýšil průměrnou velikost liposomů až 10x více jak u DMPC, avšak účinnosti zabudování aktivních látek do liposomů závisí na množství lipidů ve vezikule a na velikosti je nezávislá. Množství inkorporovaného retinolu do liposomu DPPC a DMPC bylo tedy téměř stejné. Sloučeniny, které jsou rozpustné v tucích a mohou být inkorporovány do dvojrstvé fáze liposomů a jejich výběr velikostí je kompromisem mezi účinností inkorporace a stabilitou. Během práce sledovali stabilitu retinolu v DMPC a DPPC liposomech při různých teplotách v časové závislosti.



Obrázek 29: Závislost stability vezikul DMPC a DPPC s retinolem v závislosti na čase a teplotě.

Tento experiment prováděli v 10mM fosfátového pufru obsahující retinol při pH 7 a výsledky zaznamenávali jako funkci doby skladování při teplotě 15 °C, 30 °C a 50 °C. Stabilita retinolu v DMPC liposomu byla daleko lépe udržována v porovnání DPPC liposomu i bez ohledu na teplotu. Při 15 °C retinol v DMPC liposomech během skladování ve tmě degradoval výrazně pomaleji jak v DPPC liposomech, kde docházelo ke značně zvýšené degradaci. Během skladování při 30 °C byl ochranný účinek v DPPC liposomu zvýšen, zatímco u DMPC liposomu naopak mírně poklesl. Rychlost degradace retinolu v liposomech byla také snížena při 50 °C. Obecně lze říct, že inkorporace retinolu do DMPC liposomů snížila stabilitu během zvyšování teploty, zatímco stabilita v DPPC liposomech se s rostoucí teplotou zvýšila. To znamená, že teplota není jediným faktorem ve struktuře liposomální dvojvrstvy a stále jsou zapotřebí podrobné studie vlivu teploty na degradaci retinolu v lipidových dvouvrstvách se specifickými teplotami přechodu [40].

3.3.2 Vezikulární systémy v interakci s vitamínem E a stanovení enkapsulační účinnosti pomocí UV-VIS

Sabrina Bochicchio, Anna Andela Barba a spol. se ve své práci zabývali novým postupem pro přípravu liposomů s vitamíny s různou hydrofobicitou. Mezi zapouzdřené vitamíny použili α - tokoferol, vitamin B12 a ergokalciferol z důvodu velkého antioxidačního potenciálu a jejich rozdílným hydrofilně-lipofilním a rozpustným vlastnostem. Všechny druhy liposomálních struktur byly následně charakterizovány z hlediska účinnosti zapouzdření, velikosti a stability v relativně dlouhém období. Během přípravy liposomů použili metodu hydratace tenkého filmu, kdy vytvořili multilamelární vezikuly (MLV) a následnou sonifikací došlo ke zmenšení velikosti vezikul vlivem rozbití lipidové dvojvrstvy na malé unilamelární vezikuly (SUV). Cílem práce bylo vytvořit nanoliposomální vektory (NLV) s vysokou enkapsulační účinností vitamínů pro řízené a cílené uvolňování. Zapouzdřené vitamíny v liposomech promyli PBS, zcentrifugovali a vzniklé sraženiny následně rozpustili v ethanolu z důvodu podpory rozpuštění liposomálních dvojvrstev. Připravené systémy proměřili na UV-spektroskopii a pomocí kalibrační křivky stanovili přesné množství vitamínů zapouzdřených v liposomech. Vlivem zapouzdření v liposomech může docházet ke zlepšení stability a zajištění biologické dostupnosti vitamínů rozpustných v tucích s omezením absorpce. Inkorporace i uvolňování hydrofilních a hydrofobních vitamínů jsou ovlivněny lipidovým složením SUV a díky tomu může docházet k různému ovlivnění účinnosti začlenění léčiva. U liposomových formulací pro stabilitu

dvojvrstvy hraje důležitou roli cholesterol. Složení lipidové dvojvrstvy, stejně jako začlenění správného množství cholesterolu jsou nezbytné pro účinnost zapouzdření hydrofobních molekul. Během této práce získali vysoké účinnosti zapouzdření u všech formulací. Liposomy získali s velikostí na míru v rozmezí 2,9 µm do 5,7 µm pro MLV, které po sonifikaci dosáhly SUV v průměrném rozshau velikosti 40 nm – 51 nm. Vysokého zapouzdření dosáhli jak u MLV, tak u SUV a zjistili, že čím vyšší je hydrofobicita vitamínů, tím je vyšší účinnost zapouzdření [41].

Yu-San Liu, Chih-Fang Wen a spol. se zabývali přípravou kataniontových vezikul podobných etosomu pro transport dermálních léků a jejich stabilitou. Připravili vezikuly z iontového amfifilního páru decyltrimethylamoniumbromidem a dodecylsulfátu sodného DeTMA-DS a s ethanolem jako vhodným rozpouštědlem ve vodném pufovacím roztoku, do kterých se snažili zapouzdřit vitamin E. Dále sledovali účinky po přidání cholesterolu na fyzickou stabilitu, tuhost dvojité membrány a účinnost enkapsulace těchto kataniontových vezikul. Během práce potvrdili významné zvýšení stability kataniontových vezikul v některých vodných ethanolových roztocích. Do určité míry se se zvyšující koncentrací ethanolu stabilita zvyšuje a po dosažení maxima při specifické koncentraci ethanolu naopak dochází ke snižování stability. Optimální koncentrace ethanolu pro nejstabilnější prázdné kataniontové vezikuly našli při 20 obj.%. Kataniontové vezikuly s ethanolem poté zkoumali ohledně zapouzdření tokoferolu v přítomnosti cholesterolu. Během experimentu zjistili, že zvýšením koncentrace cholesterolu ve vezikulárních systémech vede ke zvýšení počátečního průměru vezikul a zvýšení účinnosti zapouzdření z 32,82 % na 67,51 %. Cholesterol měl také příznivé účinky na životnost vezikul, které bylo prodlouženo ze 169 na 376 dnů. Tato skutečnost odhalila, že cholesterol může působit jako stabilizační činidlo ve dvojvrstvě IPA. Jelikož se u tokoferolu jedná o hydrofobní léčivo, bude přednostně solubilizováno ve dvojvrstvách IPA. Vyšší účinnost zapouzdření je tedy způsobena vyšší tuhostí dvojvrstvy vlivem začlenění cholesterolu. Jedinou nevýhodou zvýšení tuhosti dvojvrstvy by mohlo nastat v případě zhoršení průniku přes kožní bariéru. V případě kataniontových vezikul je tedy možné přizpůsobit potřebné vlastnosti pomocí vhodně zvolené koncentraci ethanolu a cholesterolu [42].

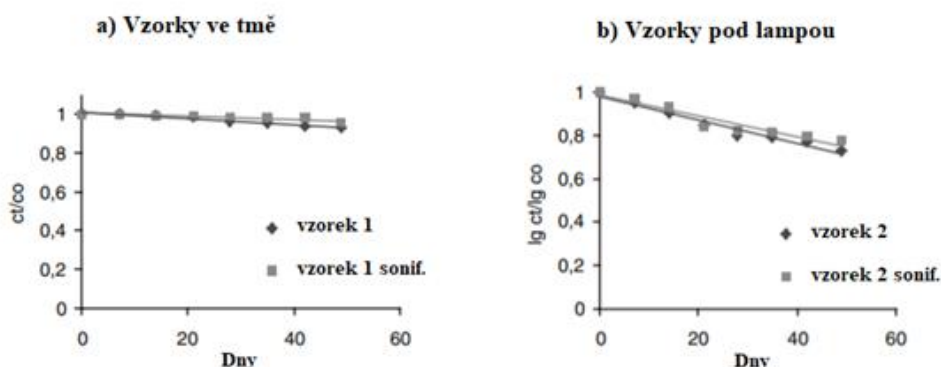
3.4 Stanovení účinnosti zachycení vitamínu a degradace vyvolaná světlem pomocí DLS a HPLC

Terapeutické použití retinoidů je stále omezené kvůli nepříznivým účinkům a jejich chemické nestabilitě způsobené vlhkostí, kyslíkem, kyselinami, kovy a vystavením světlu.

M. Carafa, C. Marianecchi, A. Codeca a spol. se ve své práci zabývali vlivem inkluze unilamelárních vezikul ve fosfolipidu a surfaktantu na degradaci vyvolanou světlem vitamínu A ve formě retinylpalmitátu. Vezikuly připravili pomocí techniky tenkého filmu a charakterizovali je pomocí techniky mikroskopie, dynamického rozptylu světla pro měření velikosti a potenciálu zeta. Studie stability a účinnosti zachycení vitamínu prováděli pomocí HPLC na vzorcích, které kontinuálně vystavovali světlu lampy v zatemněné místnosti. Unilamelární vezikuly získali pomocí přípravy tenkého filmu ze směsi surfaktantů a cholesterolu, který následně rehydratovali přidáním vodné fáze. Vzniklou disperzi míchali po dobu 15 minut a následně ji sonifikovali při amplitudě 18% po dobu 5 minut a 30 minut. Z důvodu lipofilní povahy vitamínu A ho přidali k původní organické fázi už před vytvořením filmu. Pro oddělení vezikul s inkorporovaným vitamínem od ostatních vezikul použili gelovou filtraci. Veškerou přípravu prováděli za nízkých světlených podmínek z důvodu vysoké citlivosti vitamínu na světlo. Měření velikosti částic a zeta potenciál prováděli z důvodu sledování stability vezikul pomocí dynamického rozptylu světla v destilované vodě při 25 °C až po dobu 1 měsíce. Další měření pro

charakterizaci lokalizace retinylpalmitátu ve vezikulách prováděli s kolizním kalením za přidání jodidu draselného, který působí jako tlumič molekulární fluorescence náboje a neumožňuje vstup do nepolární membrány. Míra ztráty fluorescence v důsledku zvýšení koncentrace KI poskytne hodnocení této situace ve dvou vrstvách. Zachycení vitamínu A ve vezikulách také hodnotili pomocí HPLC po rozrušení vezikul lyofilizací, poté rozpuštěním lipofilní skupiny v hexanu a následnou filtrací. Účinnost zachycení dále vypočítali pomocí rovnice: $e.e. = 100 \cdot m_{\text{(zabudovaného léčiva)}} / m_{\text{(léčiva k přípravě vezikul)}}$.

Sledovali vliv sonifikace na rychlost degradace vitamínů vzorků uchovávané ve tmě a vzorků uchovávané pod světelnou lampou. Zjistili, že v případě sonifikace během přípravy vezikul nedošlo k výraznému ovlivnění degradace. Potvrdili však, že v případě ozáření vzorků světlem pod lampou je degradace ovlivněna.



Obrázek 30: Vliv sonifikace na rychlost degradace vitamínů za snížených světelných podmínek (A) a za světelného záření (B).

Z veškerých výsledků během měření došli k závěru, že prevence fotodegradace retinylpalmitátu není možná a nelze ji nijak ovlivnit. V analyzovaných vezikulách je retinylpalmitát interkalován do dvojvrstvy vezikul a částečně je tak vystaven vnější vodní fázi a ochranu před degradací lze prokázat ve stovnáním s referenčním roztokem THF:voda 9:1. Naznačuje to tedy, že stabilita molekul, které reagují procesem zvaný fotolýza retinolu, nemohla být vylepšena v těchto dvojvrstvách vezikul, kde se mohou nacházet molekuly léčiva. Výsledky dále naznačují, že stabilita retinylpalmitátu je silně ovlivněna vezikulární stabilitou, který závisí na složení vezikul, věku liposomů a oxidaci fosfolipidů, které by mohly urychlovat degradační procesy retinyl palmitátu [43].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Cíl práce

Tato diplomová práce navazuje na mezinárodní projekt č. 19-14024 J (GACR) s National Chenk Kung University na Taiwanu. Cílem bylo připravit kataniontové vezikulární systémy smícháním zásobního prášku IPA, cholesterolu a kladně nabitě povrchově aktivní látky DODAC. Na základě rešerše vybrat vhodné modelové vitamíny nerozpustné ve vodě pro solubilizaci do těchto kataniontových vezikulárních systémů (cIPA) a vhodné techniky pro stanovení efektivity této inkorporace. Nakonec zhodnotit získané výsledky a postupy z hlediska použitelnosti daných vezikulárních systémů jako nosičů těch nepolárních vitamínů.

4.2 Použité chemikálie

Tenzidy

Hexadecyltrimethylamonium bromid – CTAB

Sigma Aldrich, CAS: 57-09-0, Mw: 364,45g/mol

Dodecylsulfát sodný – SDS

Sigma Aldrich, CAS: 151-21-3, Mw: 288,38 g/mol

Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid – DODAC

Alfa Aesar, CAS: 107-64-2, Mw: 586,64 g/mol

Vitamíny

Retinyl acetát – vitamín A

Sigma Aldrich, CAS: 127-47-9, Mw: 328,49 g/mol

DL-a-Tokoferol acetát – vitamín E

Sigma Aldrich, CAS: 7695-91-2, Mw: 472,74 g/mol

Rozpouštědla

Isopropylalkohol

Lach ner s.r.o., CAS: 67-63-0, Mw: 60,10 g/mol

Chloroform

Penta s.r.o., CAS: 67-66-3, Mw: 119,38g/mol

Ostatní

Cholesterol

Sigma Aldrich, cAS: 57-88-5, Mw: 386,65 g/mol

Deionizovaná voda

ELGA systém

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava IPA

Jako první byl připraven zásobní prášek IPA. Během přípravy bylo naváženo příslušné množství tenzidu CTAB, aby výsledná koncentrace roztoku tenzidu činila 20 mM. Toto připravené množství CTAB bylo smícháno s deionizovanou vodou s výsledným objemem 1 l. Stejným postupem byl připraven zásobní roztok tenzidu SDS s výslednou koncentrací 20 mM. Takto připravené roztoky tenzidů byly přes noc ponechány na míchačce a další den byly smíchány v poměru 1:1. Výsledný roztok byl ponechán po dobu 3 dnů na míchačce pro efektivnější precipitaci a udržován při teplotě 30 °C. Následně byla provedena centrifugace po dobu 10 min při 3500 ot/min. Po centrifugaci se provedla filtrace za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce se speciálním filtrem za vzniku zásobního prášku. Vzniklý zásobní prášek byl následně promyt 50 ml deionizované vody pro odstranění protiiontů za vzniku prášku IPA. Zásobní prášek byl přesunut na Petriho misku a uložen do sušárny při 50 °C po dobu 3–5 dní. Z takto získaného zásobního prášku byl připraven zásobní roztok IPA v chloroformu o koncentraci 0,12 M.

4.3.2 Příprava kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů cIPA

Pro přípravu kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů byl použit připravený zásobní roztok IPA v chloroformu a zásobní roztok tenzidu DODAC v chloroformu. Výsledná koncentrace obou roztoků byla 0,12 M. Během míšení těchto zásobních roztoků byl zachován poměru 9:1 pro IPA:DODAC. Tento poměr odpovídal napipetovanému množství 900 ul IPA a 100 ul DODAC.

4.3.3 Stabilizace vezikulárního systému cIPA cholesterolem

Před napipetováním zásobních roztoků IPA a DODAC pro tvorbu vezikulárních systémů bylo do pyrexky naváženo 0,035 g cholesterolu, aby jeho výsledná koncentrace odpovídala 43 mol. %. Následně byla chloroformová směs zásobních roztoků s cholesterolem v pyrexce rozpuštěna a zvortexována. Ke vzniklé rozpuštěné směsi byly přidány skleněné kuličky, které tvořily 1–2 vrstvy na dně pyrexky. Směs se skleněnými kuličkami byla opět zvortexována z důvodu dokonalého pokrytí povrchu na všech kuličkách. Dokonalé pokrytí co největší plochy nám později umožňuje co nejlepší odpařování chloroformu. Chloroformová fáze byla odpařována po dobu několika hodin s občasným promícháním. Následně byl tenký film rehydratován 60 ml deionizované vody systému ELGA, směs zvortexována a sonifikována tyčovým dispergátorem Bandelin SONOPULS HD 3200 se sodnou VS 70T při amplitudě 50 % až do energie 25 kJ. Během sonifikace došlo k odkalení roztoku za vzniku opalescence. Po přípravě vezikulárních systémů bylo provedeno kontrolní měření průměrné velikosti vezikul na DLS přístroji a zeta potenciálu. Pro ověření by se hodnoty velikosti částic měly pohybovat mezi 80 nm a 100 nm.

4.3.4 Příprava zásobních roztoků vitamínů

Byly připraveny zásobní roztoky vitamínu A a vitamínu E v isopropylalkoholu. Zásobní roztok vitamínu A byl připraven rozpuštěním 0,0163 g retinyl acetátu s 50 ml isopropylalkoholu v odměrné baňce. U zásobního roztoku vitamínu E bylo rozpuštěno 0,039 g DL- α -Tokoferol acetátu v 50 ml isopropylalkoholu v odměrné baňce. Výsledná koncentrace obou zásobních roztoků vitamínů činila 1 mM. Takto připravené zásobní roztoky byly zaparafilmované a z důvodu nestálosti na světle

a ponechány po dobu 2 hodin na míchačce ve tmě. Tyto zásobní roztoky byly později skladovány v lednici.

4.3.1 Příprava kalibrační řady pro měření na UV-VIS spektrofotometru

Kalibrační řady jednotlivých vitamínů byly tvořeny ze zásobních roztoků v isopropylalkoholu, roztoku cIPA s cholesterolem a samotným isopropylalkoholem o různých 10 koncentracích. Ze zásobního roztoku vitamínu A bylo do suchých vialek pipetováno příslušné množství v závislosti na výsledných koncentracích, které byly 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125; 0,015; 0,01752; 0,02 a 0,0225 mM. Následně bylo do vialek napipetováno příslušné množství samotného rozpouštědla isopropylalkoholu, aby celkový objem i se zásobním roztokem odpovídal 2,5 ml. Na závěr do každé vialky byla napipetované HTMA-DS vezikuly v objemu 2,5 ml. Můžeme tedy říct, že byly vzorky připravené z vitamínu v isopropylalkoholu a vezikul HTMA-DS v poměru 1:1.

V případě zásobního roztoku vitamínu E bylo pipetováno příslušné množství v závislosti na výsledných koncentracích, které byly 0,035; 0,07; 0,1; 0,135; 0,17; 0,2; 0,235; 0,27; 0,3 a 0,335 mM. Další postup byl stejný jako při přípravě kalibrační řady vitamínu A. U všech připravených vzorků kalibračních řad byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru. Měření kalibrační řady bylo provedeno 3krát z důvodu stanovení minimální odchylky. Výsledné hodnoty byly poté vyneseny do grafu a následně sestaveny kalibrační křivky.

4.3.1 Příprava kalibrační řady pro měření na HPLC s UV-VIS detektorem

Kalibrační řady byly připravené stejně jak pro měření na UV-VIS spektrofotometru s rozdílem výsledného objemu. Byly tvořeny ze zásobních roztoků v isopropylalkoholu, roztoku čistých vezikul HTMA-DS s cholesterolem a samotným isopropylalkoholem o různých 7 koncentracích. Ze zásobního roztoku vitamínu A bylo do suchých tmavých vialek pipetováno příslušné množství v závislosti na výsledných koncentracích, které byly 0,01; 0,0125; 0,015; 0,0175; 0,02; 0,0225 a 0,025 mM. Následně bylo do vialek napipetované příslušné množství samotného rozpouštědla isopropylalkoholu, aby celkový objem se zásobním roztokem vitamínu odpovídal 0,75 ml. Na závěr do každé vialky byly napipetovány vezikuly HTMA-DS v objemu 0,75 ml. I v případě kalibrační řady pro měření HPLC odpovídal poměru vitamínu s isopropanol a vezikul 1:1.

V případě zásobního roztoku vitamínu E bylo pipetováno příslušné množství v závislosti na výsledných koncentracích, které byly 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 a 0,35 mM. Další postup byl stejný jako při přípravě kalibrační řady vitamínu A. U všech připravených vzorků kalibračních řad byla měřena absorbance eluátu při vlnové délce 290 nm. Výsledné hodnoty byly poté vyneseny do grafu a následně sestaveny kalibrační křivky.

4.3.2 Nepřímá solubilizace vitamínů do vezikulárních systémů cIPA

Během nepřímé solubilizace byly zásobní roztoky vitamínu A a vitamínu E napipetovány do vialek a následně odpařeny v digestoři za vzniku tenkého filmu. Zásobní roztok vitamínu A byl pipetován v objemu 0,1 ml při koncentraci 0,02 mM a po odpaření bylo přidáno 5 ml předem připravených vezikul. V případě vitamínu E bylo napipetováno ze zásobního roztoku do vialky 0,9 ml s koncentrací 0,3 mM a po odpaření byly přidány 3 ml vezikul. Roztoky byly obaleny v alobalu, zaparafilmované a do druhého dne ponechány na třepačce.

4.3.3 Přímá solubilizace vitamínů do vezikulárních systémů cIPA

Přímá solubilizace vitamínů se prováděla do chloroformového filmu už během přípravy vezikulárních systémů cIPA. Do pyrexky bylo naváženo příslušné množství čistého vitamínu spolu s cholesterolem. U vitamínu A bylo naváženo 0,0008 g, aby výsledná koncentrace vitamínu ve vezikulách odpovídala 0,04 mM a u vitamínu E bylo naváženo 0,017 g pro výslednou koncentraci vitamínu ve vezikulách $0,6 \cdot 10^{-3}$ mM. Tyto koncentrace byly zvolené na základě výpočtu pomocí molárního absorpčního koeficientu, aby výsledná absorbance odpovídala přibližné hodnotě 1. Následně byl navážen k surovému vitamínu i cholesterol v množství 0,035g vitamínu A. Dále bylo přidáno příslušné množství připraveného roztoku IPA v chloroformu a roztoku DODAC v chloroformu. Během míchání byly jednotlivé složky rozpuštěny a po přidání 2 vrstev skleněných kuliček odpařeny v digestoři za vzniku filmu. Po odpaření chloroformové fáze byl film rehydratován deionizovanou vodou a oba roztoky vezikul sonifikovány. Tento postup systémů je podrobně popsán v kapitole 4.3.2 a 4.3.3.

4.3.4 Ultrafiltrace solubilizovaných vitamínů ve vezikulách

Vzorky připravené přímou i nepřímou solubilizací vitamínů do vezikul byly v objemu 4–5 ml napipetovány do membránových zkumavek Pall Corporation značky Microsep Advance s membránou Omega MWCO 30K a následně centrifugovány po dobu 15 minut při 4 000 ot/min. V případě, že má membrána označení MWCO (Molecular Weight Cut Off), tak tato hodnota udává nejmenší průměrnou molekulovou hmotnost molekuly, která nebude účinně přestupovat přes membránu a z 90 % bude zachována uvnitř membrány. V tomto případě uvnitř membrány zůstanou molekuly s molekulovou hmotností alespoň 30 kDa a více. Po centrifugaci byl odebrán 1 ml horní i spodní částí vzorku ze zkumavky do vialky a následně zředěn 1 ml isopropylalkoholu. Toto přidání isopropylalkoholu způsobí následné rozbití vezikul a možnost lepšího stanovení množství inkorporovaných vitamínů na UV-VIS spektrofotometru a HPLC s detektorem UV-VIS.

4.3.1 Dynamický rozptyl světla a elektroforetický rozptyl světla

Měření velikosti částic probíhalo na přístroji ZetaSizer Nano ZS od firmy Malvern Instrument v režimu *size*. Při měření byly roztoky napipetované do skleněné kyvety a nastaveny příslušné parametry měření. Rozpouštědlem byla voda a kalibrace teploty odpovídala 25 °C. Měření probíhalo ve 3 opakováních. Výsledkem měření je graf závislosti intenzity na velikosti částic a korelační křivka, která znázorňuje průběh měření.

V případě zeta potenciálu bylo měření provedeno v režimu *zeta*. Do kyvety se vzorkem byla opatrně ponořena dip cela s měřicí elektrodou. Parametry měření byly nastavené podobně jak u metody *size* s rozdílem kyvety s dip celou a v počtu měření, které bylo zvýšeno na 5 opakování. Principem tohoto měření je sledování fázové odezvy na vloženém napětí pomocí elektrody.

Pro toto měření byly použity připravené vezikulární systémy HTMA-DS a vezikulární systémy HTMA-DS s inkorporovanými vitamíny pomocí přímé solubilizace. Vezikuly s vitamíny byly sledovány v závislosti na čase po dobu 1., 3., 10., a 20. dne. Čisté vezikuly byly přeměřovány pouze pro správnost a porovnání hodnot v den přípravy.

4.3.2 UV-VIS spektrofotometrie

Měření bylo prováděno na spektrofotometru UV-VIS HITACHI U-3900H, Hitachi High-Tech. Absorbance byla změřena u všech kalibračních roztoků vitamínu A, vitamínu E a vzorků připravených přímou i nepřímou solubilizací a následnou centrifugací. U všech vzorků byla měřena absorbance v rozsahu vlnových délek 250–500 nm a pro měření byla použita křemenná kyveta. Veškeré vzorky byly měřeny čerstvé v den přípravy z důvodu nejvyšší přesnosti ve třech opakováních z důvodu nestálosti vitamínů na světle. V případě vyhodnocení koncentrace vitamínu v neznámém vzorku byla použita rovnice linregrese kalibrační křivky:

$$y = a \cdot x \Rightarrow A = a \cdot c, \quad (4)$$

kde A je změřená absorbance, a je koeficient rovnice linregrese a c je koncentrace vitamínu. Z vypočítaných koncentrací byl spočítán průměr a byla zjištěna jejich směrodatná odchylka. Následně byla vypočítána enkapsulační účinnost (E.E. z angl. *Encapsulation Efficiency*) vitamínu do vezikul:

$$\text{E.E. (\%)} = \frac{c(\text{původní})}{c(\text{naměřená})} \cdot 100, \quad (5)$$

kde $c(\text{původní})$ je původní koncentrace, která byla připravena během solubilizace vitamínu do vezikul a $c(\text{naměřená})$ je koncentrace zjištěna po centrifugaci a následném smíchání s izopropylalkoholem pomocí metody UV-VIS nebo HPLC a následném dopočítání pomocí kalibrační křivky.

4.3.3 HPLC s UV-VIS detektorem

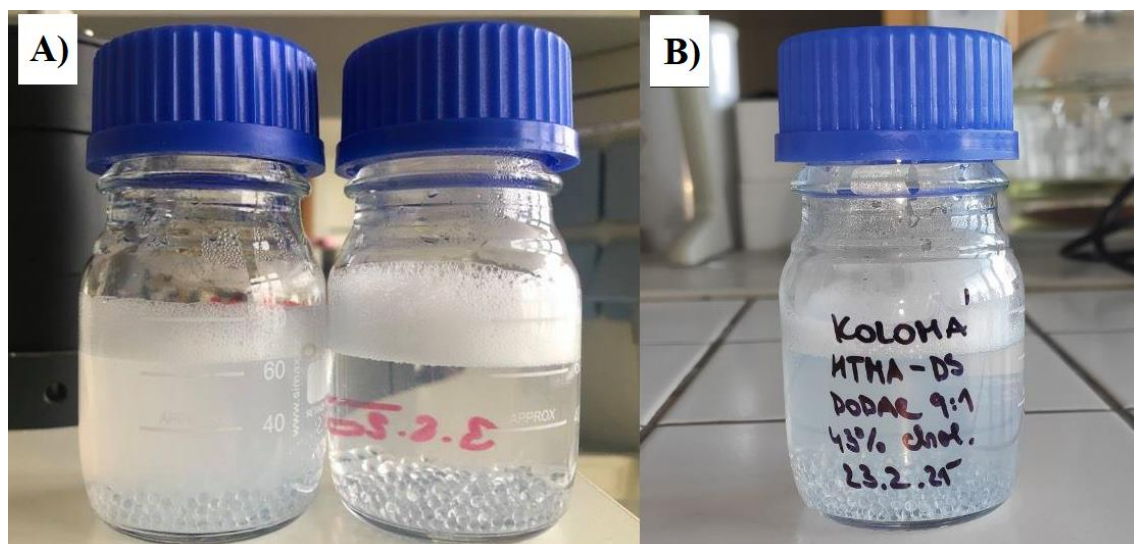
Měření bylo prováděno na přístroji Agilent 1220 s UV-VIS detektorem a OpenLAB Chromatography Data Systémem (CDS). Tento přístroj obsahuje spádové čerpadlo s integrovaným odplyněním až do 600 barm autosampler pro 0,1 – 100 ul dávkování z 2 ml nebo 6 ml vialek, kolonu se stabilní teplotou až do 60 °C a variabilní detektor vlnové délky s datovou rychlostí 80 Hz. Pro ovládání kapalinového chromatografu byl využíván program OpenLAB CDS v edici ChemStation, který je nainstalovaný ve dvou verzích. Ve verzi online je ovládán přístroj a samotné měření, které bylo nastaveno při vlnové délce 290 nm a čase měření 4 min + post time 3 min. Jako mobilní fáze byl použitý isopropylalkohol. Analýza a zpracování dat bylo poté provedeno ve verzi Offline.

Kalibrační řady a veškeré vzorky vitamínu A a vitamínu E byly měřeny v průběhu jedné sekvence při stejných podmínkách. Měření bylo prováděno v několika opakováních pro minimalizaci chyb.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Příprava kataniontových vezikulárních systémů HTMA-DS s cholesterolem a pozitivně nabitým DODAC

Smícháním čirých roztoků povrchově aktivních látek CTAB a SDS vznikal zakalený roztok se sraženinou. Byla provedena filtrace pomocí Büchnerovy nálevky za sníženého tlaku. Vzniklý filtrační koláč byl promýván deionizovanou vodou pro odstranění protiiontů a následně usušen při dané teplotě v sušárně. Vzniklý prášek IPA byl následně použit pro přípravu katanionických vezikulárních systémů dle postupu v kapitole 4.3.2. a 4.3.3. Během přípravy byl vzniklý tenký film rehydratován za vzniku silně zakaleného roztoku. Tento zakalený roztok byl podroben sonifikaci. Díky sonifikaci došlo k rozbití multilamelárních vezikul na unilamelární a následnému odkalení roztoku za vzniku opalescence. Pomocí dynamického rozptylu světla byla ověřena průměrná velikost vzniklých unilamelárních vezikul. Dále byly vezikuly HTMA-DS použity pro další experimenty a měření.



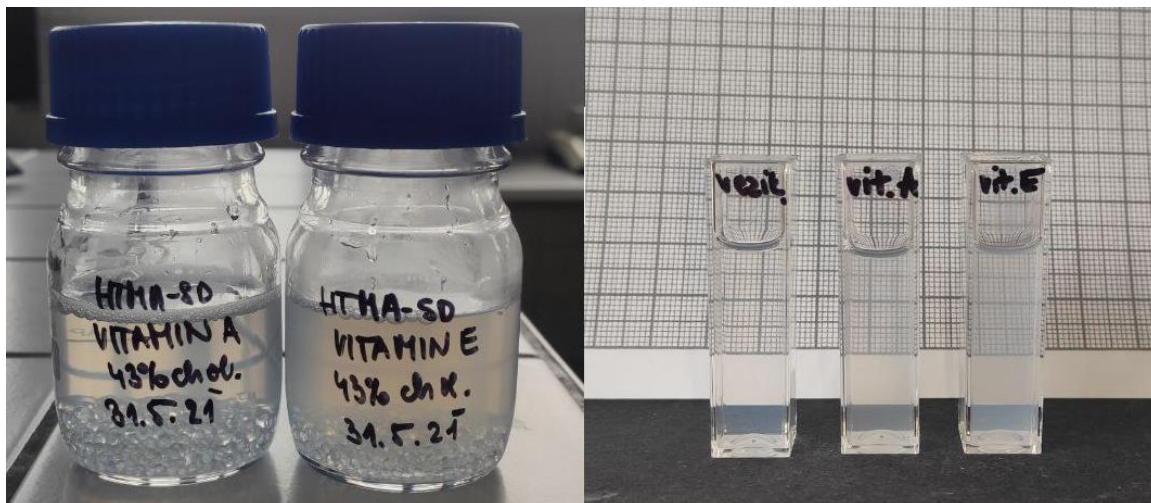
Obrázek 31: Porovnání míry zákalu před sonifikací a po sonifikací (A) a výsledné unilamelární vezikuly pro další experimenty (B).

5.2 Přímá a nepřímá solubilizace vitamínů do vezikulárních systémů

Při nepřímé solubilizaci bylo pipetováno příslušné množství zásobního roztoku vitamínů v isopropylalkoholu do vialky. Po odpaření isopropylalkoholu vznikl tenký film na stěnách vialky. Tento vzniklý film byl následně hydratován čerstvě připraveným roztokem vezikul HTMA-DS a po 24 hodinách na třepače byly vzorky stanoveny.

Přímá solubilizace vitamínů probíhala už při přípravě vezikulárních systémů. Podrobný postup přípravy je popsán v kapitole 4.2.3. Během přípravy vznikl zakalený roztok multilamelárních vezikul, který byl následně podroben sonifikaci. Sonifikace byla prováděna až do energie 25 kJ za vzniku unilamelárních vezikul s inkorporovanými vitamíny. Během sonifikace docházelo k částečnému odkalení roztoků za vzniku lehké opalescence. Z obrázků je možné porovnat míru zakalení a opalescence čistých vezikul a vezikul s inkorporovanými vitamíny. V případě inkorporovaného

vitamínu E do vezikul je možné vidět nejvyšší míru zakalení. Toto zakalení mohlo být způsobeno přidáním surového vitamínu ve formě α -tokoferolu viskózní kapaliny. Vitamin A byl během přípravy navažován v sypkém stavu a zakalení výsledného roztoku vezikul je o něco slabší oproti vezikul s vitamínem E. Čisté vezikuly HTMA-DS mají nejmenší míru zakalení.



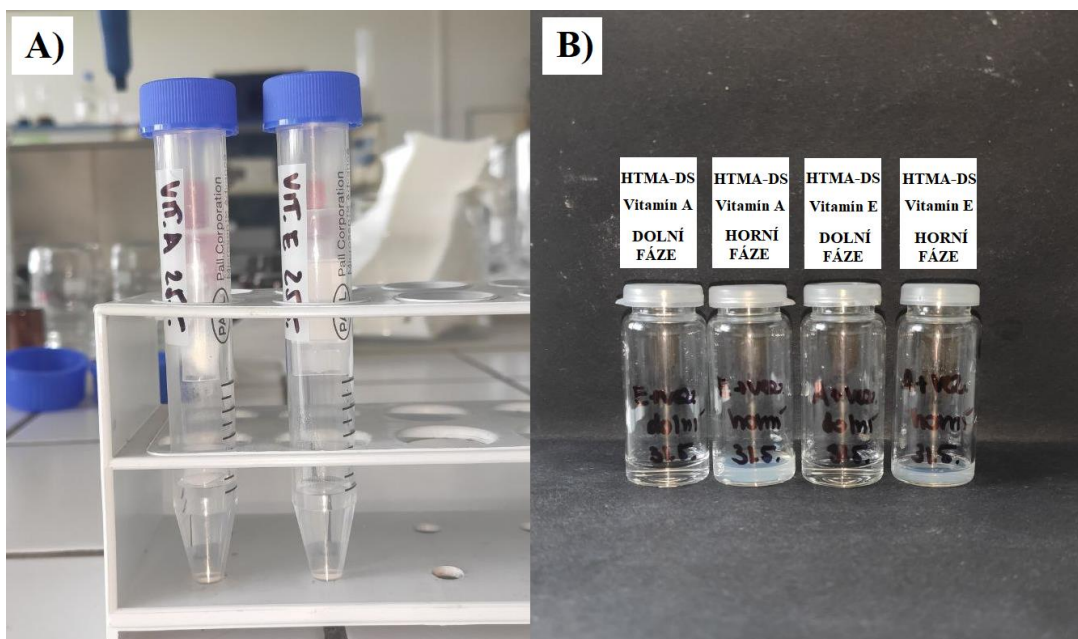
Obrázek 32: Vzniklé unilamelární vezikuly HTMA-DS s vitamíny a porovnání míry zakalení jednotlivých systémů.

5.3 Ultrafiltrace solubilizovaných vitamínů do vezikul a ředění isopropylalkoholem

Po skončení centrifugace vezikul s vitamíny bylo možné pozorovat, že došlo k úspěšnému odstředění a z původních 4 ml vzorku vznikl 1 ml retentátu (horní část) a 3 ml permeátu (dolní část) vitamínu A a stejné množství retentátu i permeátu v případě vitamínu E. Retentát i permeát byl přepipetován v objemu 1 ml zvlášť do čistých vialek a následně zředěn 1 ml isopropyl alkoholem. Takto připravené vzorky byly změřeny na UV-VIS spektrofotometru.

Během dalšího experimentu bylo do centrifugačních zkumavek pipetováno 5 ml vezikul s inkorporovanými vitamíny. Po odstředění byly opět viditelné změny v případě objemu retentátu a permeátu. Z původních 5 ml vzorku vznikl 1 ml retentátu (horní část) a 4 ml permeátu (dolní část) vitamínu A a v případě vitamínu E odpovídal 3,5 ml retentátu (horní část) a 1,5 ml permeátu (dolní část). Můžeme tedy říct, že v případě vitamínu A dochází k daleko vyšší propustnosti přes membránu v porovnání s vitamínem E.

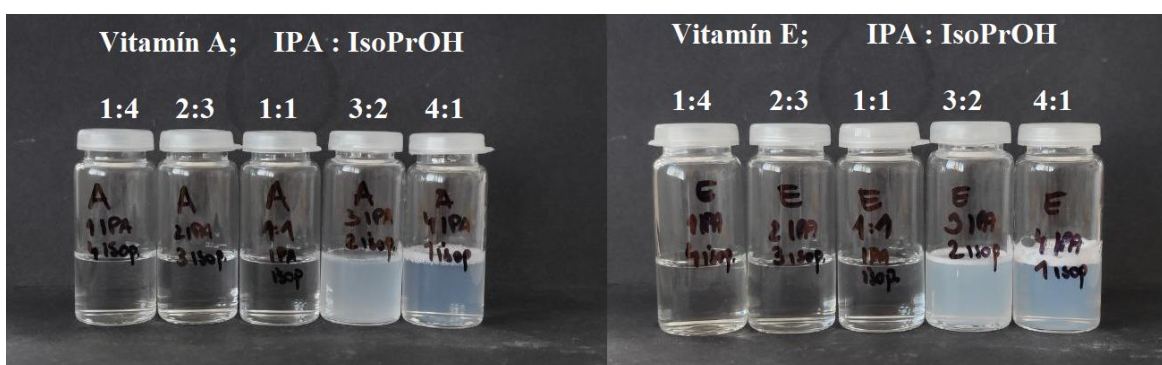
Tato skutečnost je dále potvrzena i během vyhodnocení velikosti částic jednotlivých vezikul s vitamíny pomocí metody DLS. V případě vezikul s vitamínem A vznikají částice v den přípravy s přibližnou velikostí 100–120 nm. Vezikuly s vitamínem E mají v den přípravy hodnoty o něco vyšší, které odpovídají hodnotám v rozmezí 140–160 nm. Můžeme tedy potvrdit, že v případě menších vezikul je propustnost během centrifugace v membránové zkumavce účinnější.



Obrázek 33: Membránové centrifugační zkumavky s roztoky (A) a přepipetovaná horní i dolní fáze vezikul HTMA-DS s vitamíny bez isopropylalkoholu (B).

Na obrázku (viz Obrázek 33 (B)) je možné vidět, že v případě čistého retentátu – horní koncentrované části – před zředěním, je roztok opalescentní s lehkým zákalem. Z důvodu měření na UV-VIS detektoru, který je velice na zákal je pro stanovení enkapsulační účinnosti nutné vezikuly s vitamíny zředit isopropylalkoholem. Přidaný isopropylalkohol způsobí rozrušení struktury vezikulárního systému, při kterém dojde k následnému odkalení vzorku a uvolnění solubilizovaného vitamínu z vezikul do roztoku. Na první pohled můžeme vidět, že případně permeátu - spodní části po centrifugaci – je pouze voda a naopak v retentátu jsou přítomny vezikuly i s vitamíny. Toto tvrzení bylo později potvrzeno i během měření.

V návaznosti na toto měření byl proveden experiment, díky kterému bylo možné určit správný poměr ředění retentátu a permeátu vezikul s vitamíny isopropylalkoholem. V tomto případě byly veškeré vzorky ke stanovení koncentrace vitamínů narředěny isopropylalkoholem 1:1 a 1:2. Vlivem ředění isopropylalkoholem docházelo k rozbití vezikul a vyčištění roztoku. Čiré vzorky bez zákalu bylo poté možné změřit na UV-VIS spektrofotometru i HPLC s UV-VIS detektorem a stanovit tak enkapsulační účinnost.



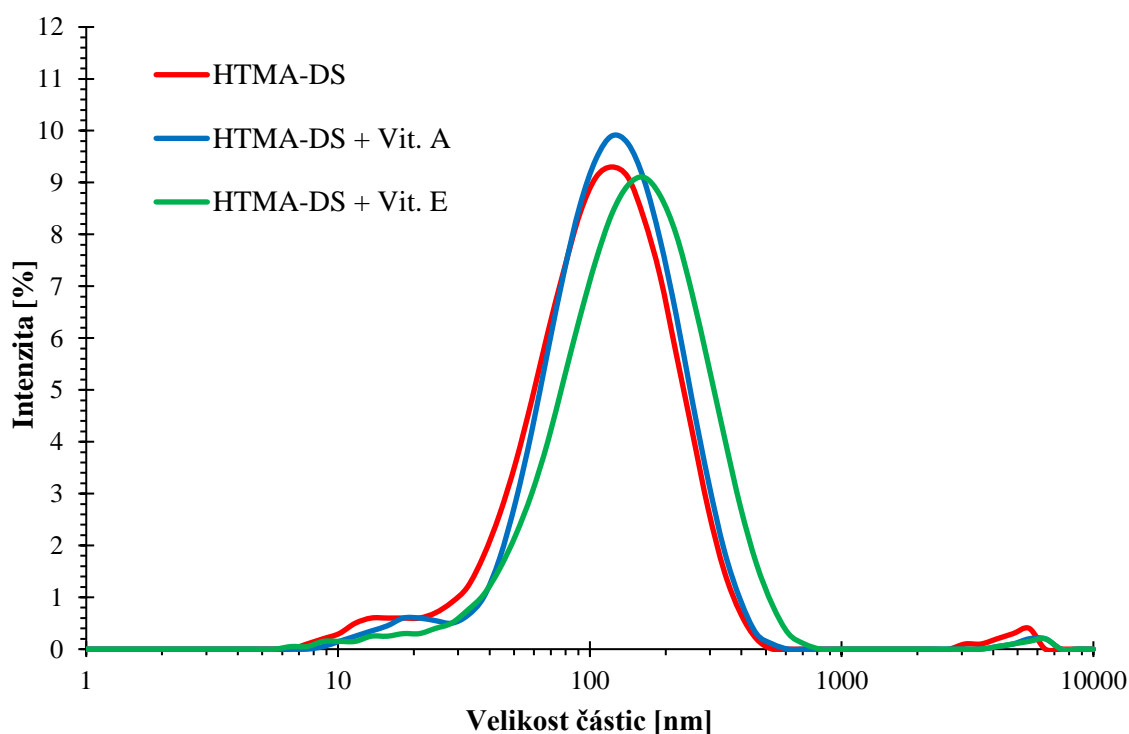
Obrázek 34: Porovnání míry zákalu při ředění HTMA-DS vezikul s izopropylalkoholem.

Ideální poměr k ředění během příprav byl vybrán na základě tohoto experimentu s míšením různých poměrů IPA:IsoPrOH. Jak je možné vidět, se snižující se koncentrací alkoholu se zákal zvyšuje. U všech roztoků, u kterých převažuje větší objem roztoku IPA, dochází ke vzniku lehkého zákalu s jemnou opalescencí. Tento jemný zákal s opalescencí se velice podobá roztoku samotných vezikul HTMA-DS. S postupným přidáváním většího objemu alkoholu dochází ke snižování zákalu s opalescencí za vzniku čirého roztoku. V případě prvních tří zkumavek s poměry 1:4, 2:3 a 1:1 docházelo k odkalení roztoku bez výrazných rozdílů, proto by byly k přípravě vhodné všechny tyto poměry. Pro co nejjednodušší výpočty potřebné k přípravě byl však vybrán poměr 1:1. Tento poměr IPA:IsoPrOH byl dodržován po celou dobu během přípravy kalibračních křivek a vzorků vezikul s vitamíny.

5.4 Dynamický rozptyl světla a elektroforetický rozptyl světla

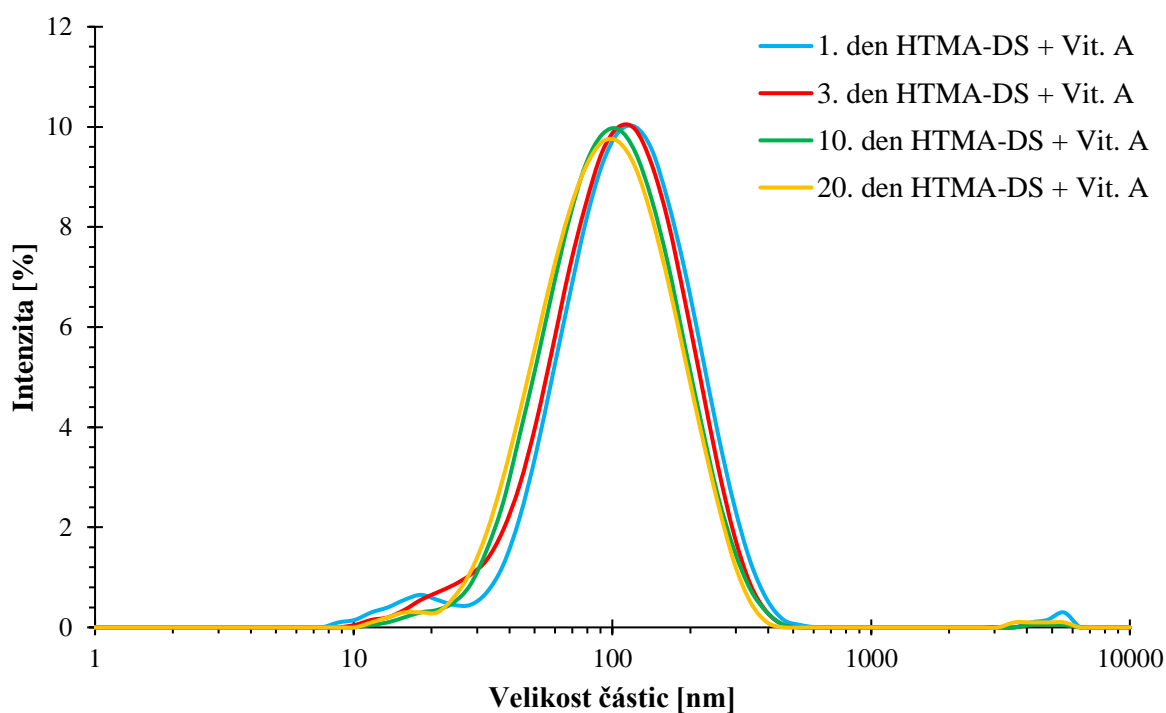
Pomocí měření dynamického rozptylu světla byly pozorované rozdíly ve velikosti částic v čistých vezikulách a vezikulách s inkorporovaným vitamínem A a E pomocí přímé solubilizace. Měření bylo provedeno v den přípravy pro přesnější výsledky.

Na obrázku (viz. Obrázek 35) je možné vidět, že se jednotlivé systémy vezikul nepatrně liší. Velikosti částic v systémech se pohybuje okolo 100 nm. V případě čistých vezikul HTMA-DS je však velikost částic o něco nižší, než u vezikul s inkorporovanými vitamíny. U vezikul s vitamínem E je hodnota velikosti částic nejvyšší, ale intenzita je naopak nejnižší. Díky tomuto porovnání můžeme říct, že se tyto 3 systémy od sebe lehce liší. Korelační křivky (viz. Příloha 1.) ve všech případech vykazuje ideální průběh při každém měření.

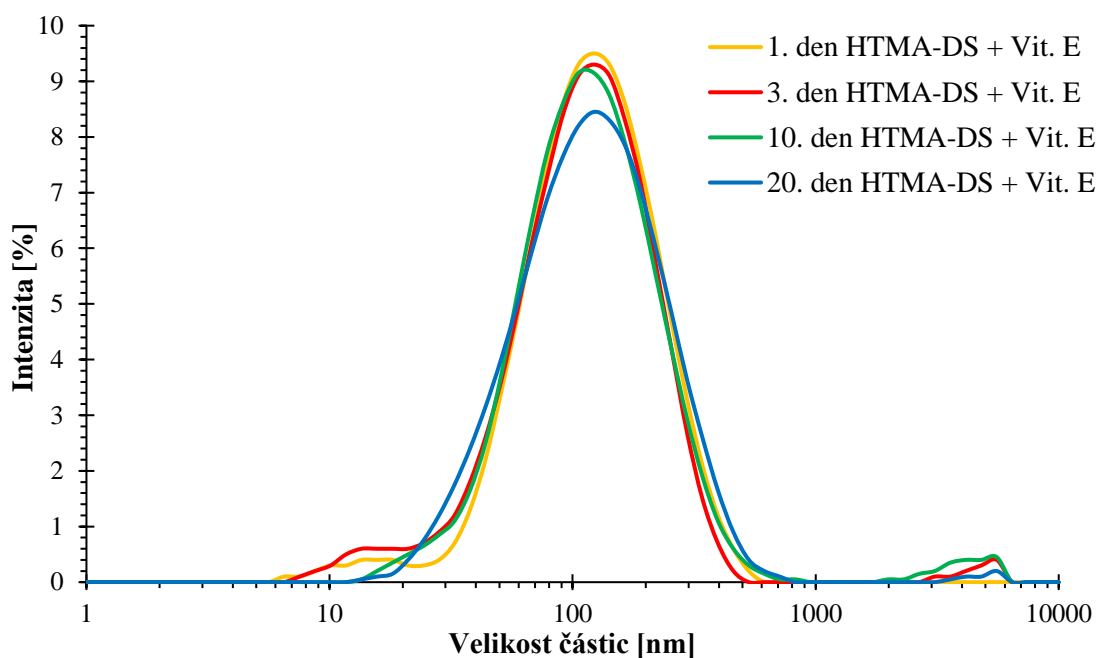


Obrázek 35: Graf závislosti intenzity na velikost částic vezikul HTMA-DS a vezikul s inkorporovanými vitamíny HTMA-DS + Vit. A a HTMA-DS + Vit. E.

Při dalším měření dynamického rozptylu světla byla pozorována stálost velikosti částic v závislosti na čase u vezikul s vitamíny. Měření bylo prováděno 1. den, 3. den, 10. den a 20. den přípravy. Během měření byly vezikuly uchovávány v sušárně při 30 °C zabalené v alobalu, aby docházelo co k nejnižší degradaci vlivem světla. Na obrázku (viz. Obrázek 36) částice HTMA-DS s vitamínem A vykazují v závislosti na teplotě opravdu mírný pokles velikosti částic. K největší změně a poklesu velikosti částic došlo až během měření 20. den přípravy. Nepatrná změna velikost částic může být způsobena vlivem degradace vitamínu na světlo. V případě velikosti částic vezikul HTMA-DS s vitamínem E (viz. Obrázek 37) jsou křivky daleko rozmanitější. Z grafu je zřejmé, že v závislosti na čase ve vezikulách dochází jak k výraznějším změnám intenzity, tak i velikosti částic. Předpokládá se, že měření vezikul s vitamínem E v den přípravy vykazuje nejideálnější a nejrealnější výsledky. Vlivem času dochází ke snížení intenzity i velikosti částic. Korelační křivky vykazují ideální průběh měření (viz. Příloha 2., 3.).



Obrázek 36: Graf závislosti intenzity na velikost částic vezikul HTMA-DS + Vitamín A v závislosti na čase.



Obrázek 37: Graf závislosti intenzity na velikost částic vezikul HTMA-DS + Vitamin E v závislosti na čase.

Pomocí metody elektroforetického rozptylu světla byly měřeny veškeré hodnoty zeta potenciálu. Všechny naměřené hodnoty zeta potenciálu vezikul vykazují stabilní chování. V důsledku přípravy kationtových vezikulárních systémů můžeme opravdu potvrdit, že jsou tyto systémy na povrchu kladně nabitě, jelikož je zeta potenciál naměřen v kladných hodnotách. Tyto systémy jsou kladně nabitě vlivem přídavku kladně nabitě povrchově aktivní látky DODAC během přípravy. V Tabulce 1. jsou popsány jednotlivé hodnoty zeta potenciálu pro veškeré vezikuly. Nejvyšší hodnota zeta potenciálu byla naměřena u čistých vezikul HTMA-DS bez vitamínu, která odpovídá hodnotě 74 ± 2 mV. V případě vezikul HTMA-DS s inkorporovanými vitamíny jsou tyto hodnoty o něco nižší a v den přípravy se pohybují okolo 60–70 mV. Časem se tyto hodnoty postupně snižují a po 20 dnech jsou hodnoty zeta potenciálu výrazně nižší a pohybují se do 50 mV. Je tedy zřejmé, že se tyto systémy vlivem času mění.

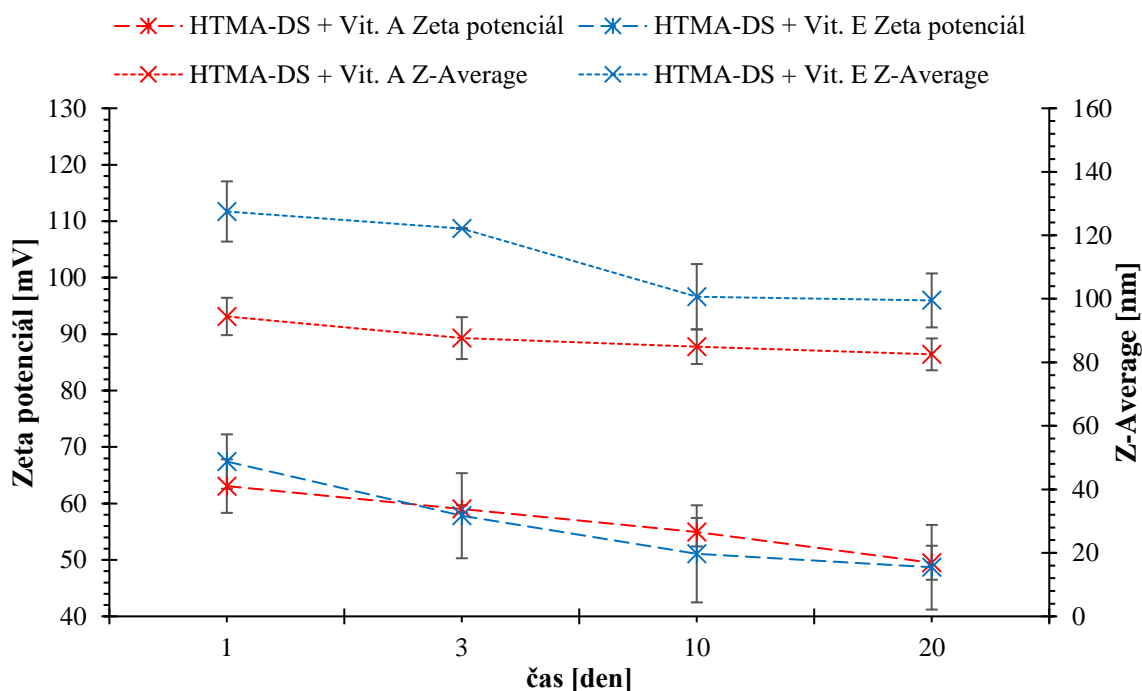
Tabulka 1: Naměřené hodnoty Zeta potenciálu ve vezikulárních systémech.

Kationtové vezikulární systémy	Zeta potenciál
1. den HTMA-DS	74 ± 2
1. den HTMA-DS + Vit. A	63 ± 1
3. den HTMA-DS + Vit. A	59 ± 2
10. den HTMA-DS + Vit. A	55 ± 1
20. den HTMA-DS + Vit. A	50 ± 1
1. den HTMA-DS + Vit. E	68 ± 2
3. den HTMA-DS + Vit. E	58 ± 1
10. den HTMA-DS + Vit. E	51 ± 1
20. den HTMA-DS + Vit. E	49 ± 2

Pro obecný přehled veškerých hodnot z měření pomocí metody DLS byla přiložena tabulka (viz. Tabulka 3).

Na obrázku (viz. Obrázek 38) je možné porovnat jednotlivá měření v závislosti na čase. V průběhu sledování stability po dobu 20 dní docházelo k mírnému a plynulému poklesu hodnot Zeta potenciálu i hodnot průměrné velikosti částic. Jediný výrazný pokles nastal při měření HTMA-DS vezikul s vitamínem E 10. den přípravy. Příčinou jednotlivých poklesů může být degradace jednotlivých vitamínů na světle v závislosti na čase.

Pro přesnější výsledky byly jednotlivé hodnoty měřeny ve 2 opakování.

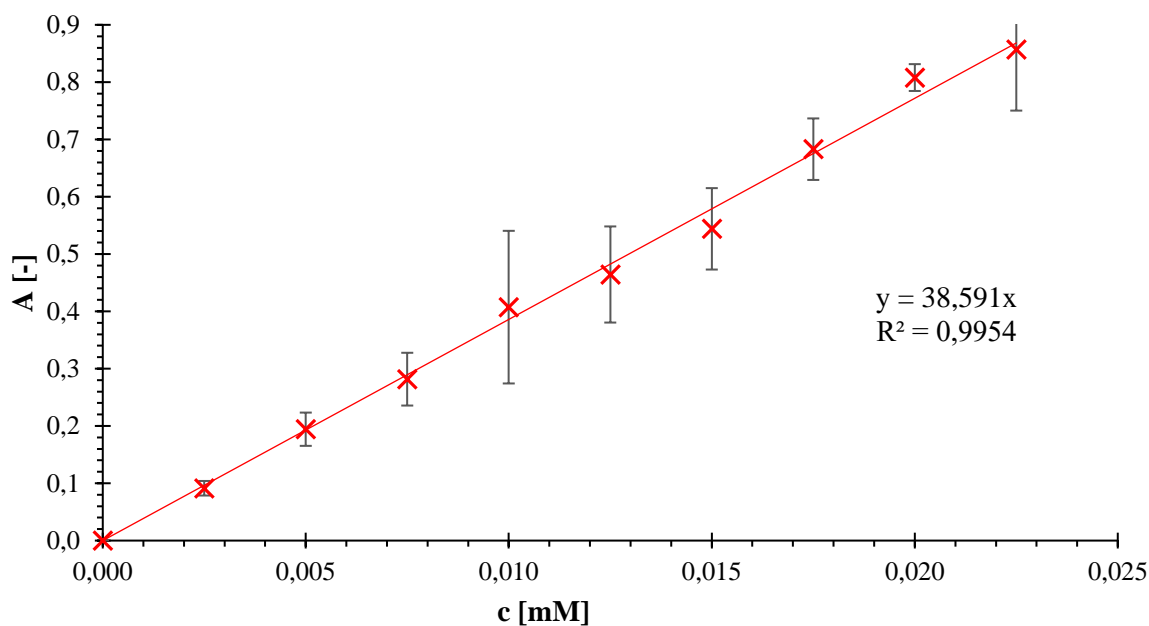


Obrázek 38: Závislost zeta potenciálu částic a průměrné velikosti částic na době měření u vzorků HTMA-DS, které obsahují vitamín A a vitamín E.

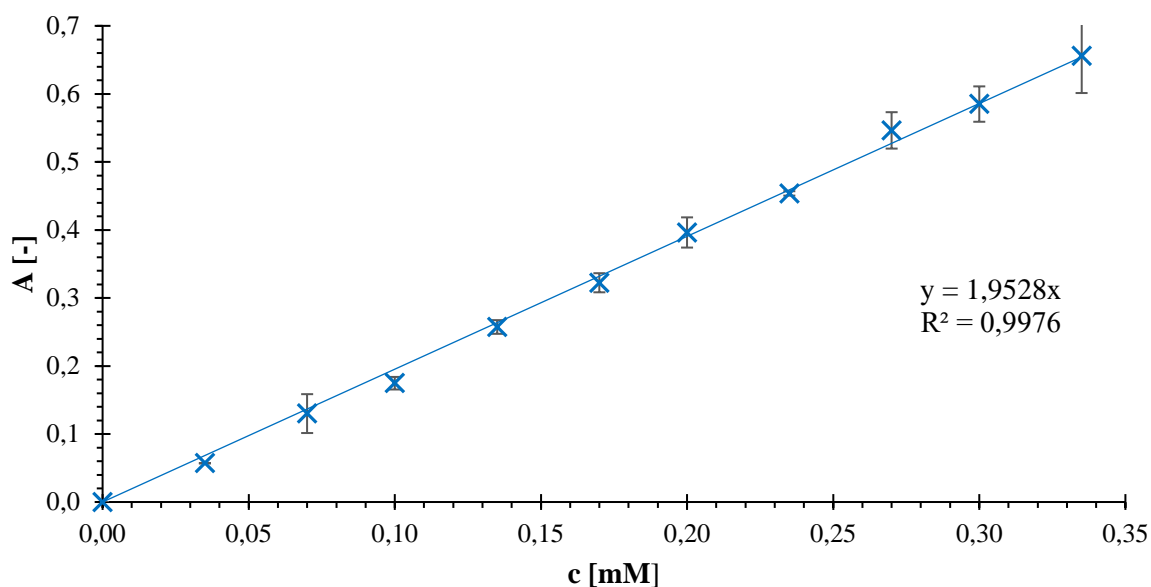
5.5 UV-VIS spektrofotometrie

5.5.1 Kalibrační křivky

Pro stanovení účinnosti solubilizace vitamínů do vezikul bylo nejdříve potřeba sestavit kalibrační křivky vitamínu A a vitamínu E v systému cIPA + cholesterol. Roztoky pro kalibrační řadu byly připraveny ze zásobních roztoků jednotlivých vitamínů v isopropylalkoholu. Křivky byly sestaveny měřením absorbance deseti roztoků vitamínu A jedenácti roztoků vitamínu E o známých zvyšujících se koncentracích. Z příslušných naměřených hodnot absorbancí byly vybrány nejvyšší hodnoty v blízkosti absorpčního maxima jednotlivých vitamínů. Pro vitamín A bylo vybráno absorpční maximum při vlnové délce 326 nm a pro vitamín E při vlnové délce 285 nm. Měření bylo prováděno ve 3 opakování a výsledné hodnoty byly zprůměrovány a vypočítána směrodatná odchylka. Hodnoty byly poté vyneseny do grafu v závislosti naměřené absorbance na koncentraci. Jednotlivé kalibrační křivky jsou znázorněny na obrázku (viz. Obrázek 39 a Obrázek 40). U vitamínu A mohlo docházet k odchylkám z důvodu velké citlivosti na světlo a následné degradace. Jednotlivé hodnoty se tedy mohly lehce lišit.



Obrázek 39: Kalibrační křivka vitamínu A v systému isopropylalkoholu a vezikul HTMA-DS.



Obrázek 40: Kalibrační křivka vitamínu E v systému isopropylalkoholu a vezikul HTMA-DS.

5.5.2 Stanovení enkapsulační účinnosti metodou UV-VIS

Jako další byly změřeny vzorky připravené přímou a nepřímou solubilizací. Připravené vzorky byly zcentrifugovány, odebrány v objemu 1 ml z retentátu a permeátu do vialky a následně zředěny 1 ml isopropylalkoholu. V případě absorpčního spektra vzorku příslušného vitamínu byla vybrána absorpční maxima dle stejné hodnoty absorbance jako u kalibračních roztoků. Výsledná koncentrace

vitamínu ve vzorku byla vypočítaná z rovnice linregrese kalibrační křivky a přepočítána účinnost solubilizace.

Vzorky připravené nepřímou solubilizací nevykazovali žádný signál během měření. Z tohoto důvodu bylo třeba provést zkušební měření, zda došlo k rozpuštění tenkého filmu do vezikul po odpaření isopropylalkoholu. Proto byly napipetovány 4 ml isopropylalkoholu do vialky, u které došlo k dřívějšímu odpaření za vzniku tenkého filmu s vitamínem. Vialky byly umístěny do třepačky a do druhého dny byly míchány. Následující den byl roztok změřen, při kterém bylo naměřeno absorpční spektrum vitamínu. Toto měření tedy potvrdilo, že veškeré vitamíny zůstaly přichycené na stěny vialky a do roztoku se uvolnili až po přidání alkoholové fáze. Je tedy zřejmé, že po přidání vezikul k tenkému film nedošlo ani k částečné solubilizaci.

Naopak měření vzorků připravených přímou solubilizací potvrdilo přítomnost vitamínů. Z naměřených absorpčních spekter byl opět vybrány nejvyšší hodnoty absorpčního maxima jednotlivých vitamínů a vypočítány jednotlivé koncentrace a účinnost solubilizace. Měření jednotlivých vzorků bylo opakováno 3krát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.

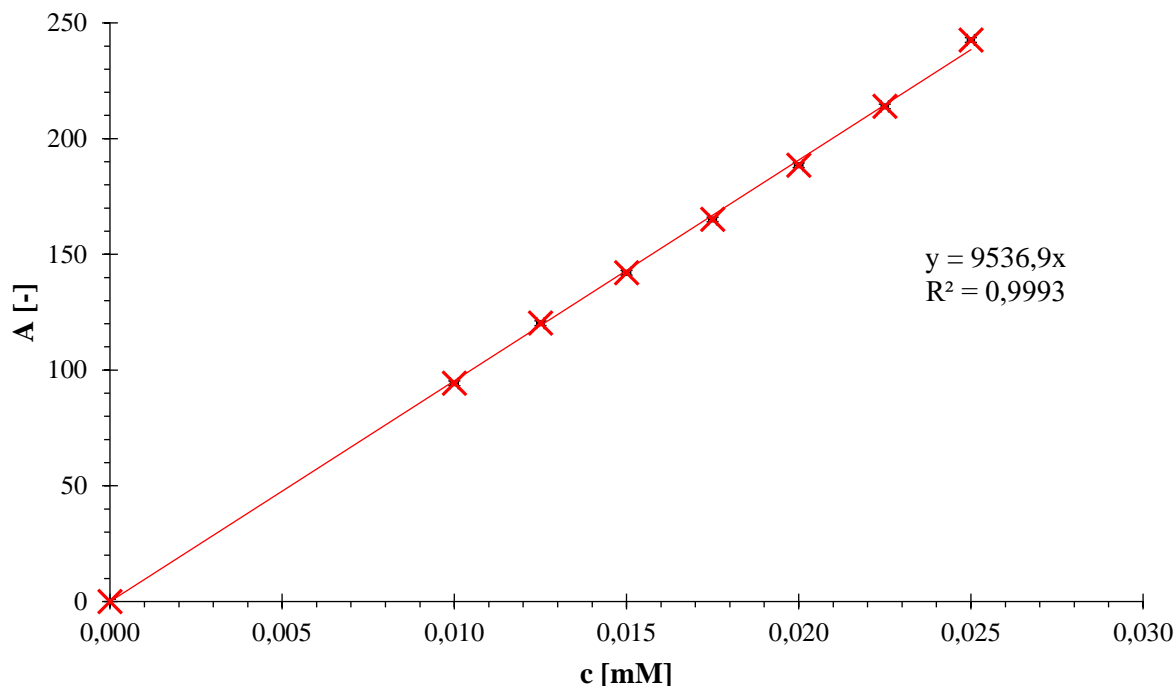
U vitamínu A pro zvolenou vlnovou délku 326 nm odpovídala průměrná hodnota absorbance $0,27 \pm 0,03$. Díky této hodnotě byla pomocí linregrese vypočítána reálná koncentrace vitamínu ve vzorku, která činila 0,007 mM. Pomocí přepočtu v porovnání s koncentrací vitamínu během přípravy bylo možné určit účinnost solubilizace. Účinnost solubilizace vitamínu A do vezikul byla 34,98 %. U vitamínu E pro vlnovou délku 285 nm odpovídala výsledná absorbance $0,25 \pm 0,02$. Pomocí stejného přepočtu jako u vitamínu A byla vypočítána reálná koncentrace ve vzorku na 0,126 mM a účinnost solubilizace do vezikul činila 30,39 %.

V případě měření vzorků dolní fáze po centrifugaci byla potvrzena nepřítomnost jakéhokoliv množství vitamínů.

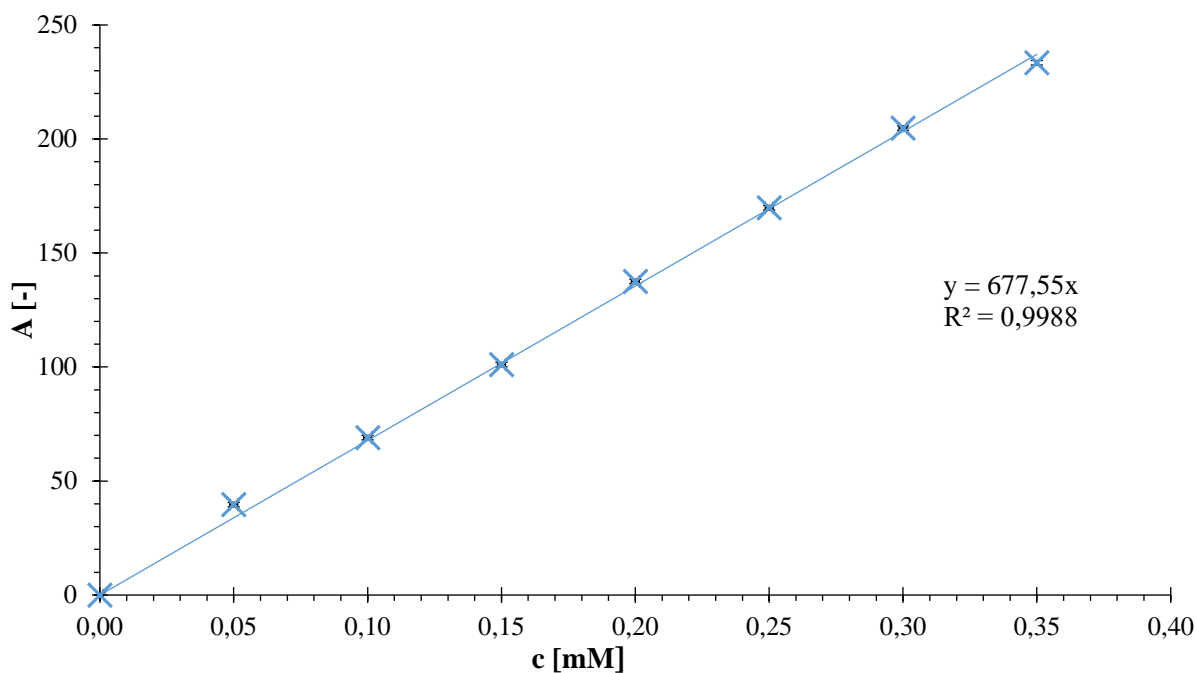
5.6 HPLC s UV-VIS detektorem

Pro měření na HPLC byla připravena kalibrační řada roztoků se zvyšující se koncentrací stejně jako pro předešlé měření na UV-VIS spektrofotometru. S rozdílem byla kalibrační řada pro zásobní roztok vitamínu A a vitamínu E v isopropylalkoholu a vezikulách připravena o 7 různých koncentrací. Pro stanovení neznámé koncentrace solubilizovaných vitamínů byly vzorky připraveny pouze přímou solubilizací, následně zcentrifugovány a odebrány z membránových zkumavek do čistých tmavých vialek. Následně byly tyto vzorky zředěny isopropylalkoholem v poměru 1:1, 1:2 a analyzovány na HPLC přístroji. Veškeré měření probíhalo při jedné vlnové délce, která byla nastavena na 290 nm pro všechny vzorky a byla sledována separace jednotlivých složek.

Měření bylo prováděno ve 3 opakování a z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka pro vitamín A a vitamín E. Jednotlivé kalibrační křivky jsou znázorněny na obrázku (viz. Obrázek 41 a Obrázek 42).



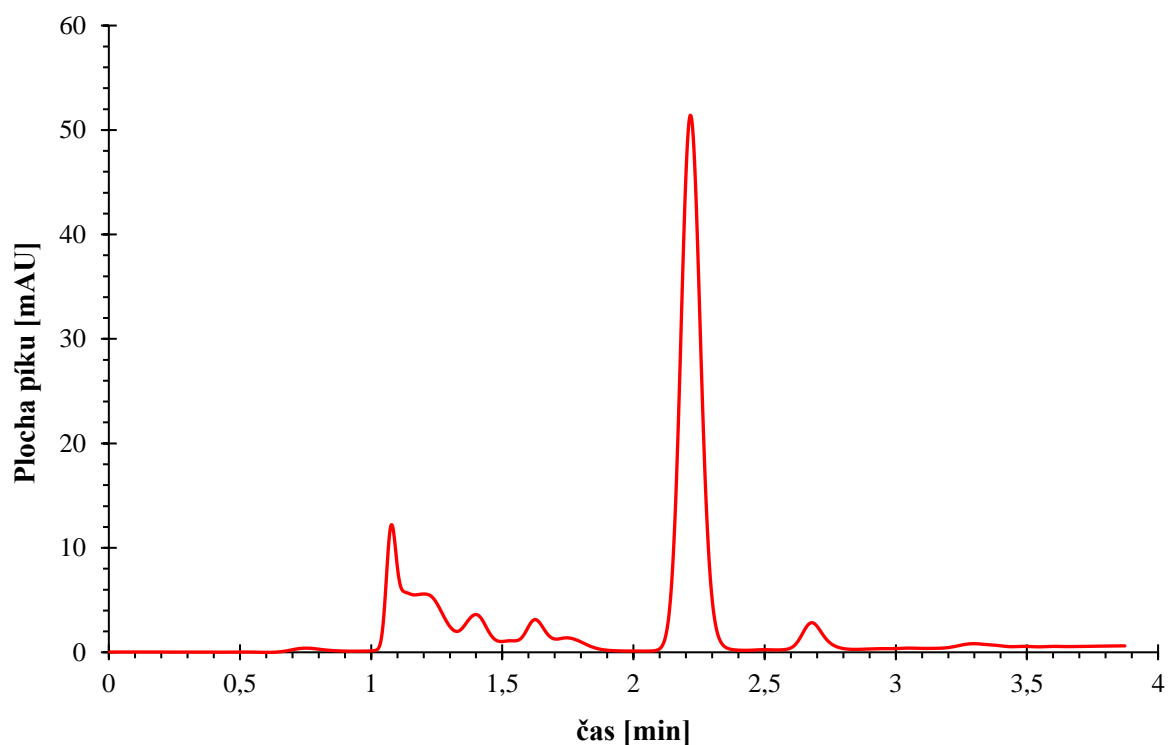
Obrázek 41: Kalibrační křivka vitamínu A v systému isopropylalkoholu a vezikul HTMA-DS.



Obrázek 42: Kalibrační křivka vitamínu E v systému isopropylalkoholu a vezikul HTMA-DS.

Vyhodnocení a zpracování dat jednotlivých vzorků bylo prováděno v systému LC1220 (offline). Na základně sestavení kalibrační křivky pro jednotlivé vitamíny byla poté vyhodnocena přesná koncentrace vitamínu ve vzorku. Tato koncentrace byla porovnána s původní koncentrací vitamínu ve vezikulách a následně vypočítána enkapsulační účinnost. U vitamínu A tato enkapsulační účinnost odpovídala 86,81 % a u vitamínu E odpovídala účinnost 68,74 %.

Přesné koncentrace jednotlivých vitamínů ve vezikulách byly vyhodnoceny na základě separace pomocí metody HPLC s UV-VIS detektorem. Ukázka chromatografického záznamu separace HTMA-DS vezikul s inkorporovaným vitamínem A je znázorněna na obrázku (viz. Obrázek 43).



Obrázek 43: Chromatografický záznam separace HTMA-DS vezikul s vitamínem A.

Výsledné enkapsulační účinnosti vitamínu A a vitamínu E, které byly stanovovány pomocí metody UV-VIS a metody HPLC s UV-VIS detektorem jsou porovnány v tabulce (viz. Tabulka 2).

Tabulka 2: Tabulka hodnot enkapsulační účinnosti vitamínu A a vitamínu E stanovených pomocí metody UV-VIS a metody HPLC.

	Vitamín A	Vitamín E
UV-VIS spektrofotometrie	34,98 %	30,39 %
HPLC S UV-VIS detektorem	86,81 %	67,74 %

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vybrat modelové vitamíny a zvolit vhodné techniky pro stanovení efektivity jejich inkorporace do vezikulárního systému na bázi iontového páru HTMA-DS. Pro veškeré experimenty byl vybrán vitamín A a vitamín E. Byla provedena solubilizace těchto vitamínů do vezikulárního systému HTMA-DS a zjištěna enkapsulační účinnost jejich inkorporace na UV-VIS spektrofotometru a HPLC s UV-VIS detektorem. Dynamickým rozptylem světla byla charakterizována velikost vezikulárních systémů a měřením zeta potenciálu byla sledována jejich stabilita.

Kataniontové vezikulární systémy byly připraveny ze směsi kladně a záporně povrchových aktivních látek. Během přípravy byl použit kladně nabitý CTAB a záporně nabitý SDS. Následným spárováním povrchově aktivních látek a odstraněním jejich protiiontů došlo ke vzniku IPA. Tento systém byl následně stabilizován přidáním kladně nabitě povrchově aktivní látky DODAC a cholesterolu. Kataniontové vezikulární systémy vznikly smíšením IPA a DODAC v chloroformu spolu s cholesterolem. Veškerý chloroform byl odpařen za vzniku tenkého filmu, který byl následně rehydratován a sonifikován za vzniku unilamelárních vezikul. Vzniklé kataniontové vezikulární systémy byly změřeny metodou DLS pro přesné stanovení velikosti částic a metodou ELD pro stanovení zeta potenciálu.

Během prvního experimentu, při kterém byla provedena nepřímá solubilizace, byly vzorky analyzovány na UV-VIS spektrofotometru. Ukázalo se však, že metoda přímé solubilizace je neúspěšná a vzniklý film s vitamíny se do vezikul nerozpustil. Díky těmto výsledkům můžeme říct, že nepřímá solubilizace byla neúspěšná a vitamíny do vezikul nebyly solubilizovány ani v malém množství. Měření potvrdilo, že vzniklý tenký film vitamínu přilnul ke stěně vialky a pomocí vezikul jej nebylo možné rozpustit. Až v případě přidání čistého isopropylalkoholu do vialky došlo k rozpouštění tenkého filmu a k naměření absorpčního spektra vitamínu.

Dalším experimentem byla přímá solubilizace vitamínu A a vitamínu E do chloroformové fáze během přípravy vezikul HTMA-DS. Postup přípravy vezikul byl stejný až na přidávek surového vitamínu k cholesterolu za vzniku čirého chloroformového roztoku, který byl následně odpařen. Po rehydrataci a sonifikaci bylo odebráno příslušné množství do membránových zkumavek a provedena centrifugace. Bylo možné pozorovat odlišné objemy po centrifugaci. V případě vezikul s vitamínem A docházelo k daleko větší propustnosti přes membránu jak u vitamínu E. Je tedy zřejmé, že se velikost jednotlivých vezikul s vitamínem A a vitamínem E liší. Tato skutečnost byla potvrzena pomocí metody DLS, při kterém byla změřena velikost částic vezikul s vitamínem A s přibližnou velikostí 100–120 nm. Vezikuly s vitamínem E mají v den přípravy hodnoty o něco vyšší, které odpovídají hodnotám v rozmezí 140–160 nm.

Byla sledována velikost částic a stabilita jednotlivých HTMA-DS vezikul s inkorporovanými vitamíny pomocí metody DLS. Bylo potvrzeno, že vlivem postupné degradace na světle v závislosti na čase vykazují vezikuly HTMA-DS mírné snížení stability. V porovnání měli čisté vezikuly ze všech měřených vzorků nejvyšší zeta potenciál, který odpovídal hodnotě 74 ± 2 mV. U vezikul s inkorporovanými vitamíny se zeta potenciál pohyboval mezi 60–70 mV a v závislosti na čase mírně klesal. V případě naměřených hodnot průměrné velikosti částic můžeme potvrdit, že docházelo k postupnému snižování u jednotlivých systémů a v porovnání obou vitamínů se tyto hodnoty liší. Je tedy zřejmé, že velikost molekul v obou roztocích vezikulárních systémů může záviset na struktuře

inkorporovaného vitamínu. V případě vitamínu A se jedná o terpenický alkohol, který je tvořen čtyřmi isoprenoidními jednotkami a v porovnání s vitamínem E je jeho struktura o něco menší. Je tedy pravděpodobné, že k větší propustnosti na membráně dochází vlivem menší molekuly. Tato skutečnost byla potvrzena během měření průměrné velikosti částic. V případě vezikul HTMA-DS s vitamínem A byly tyto hodnoty značně nižší oproti systému s vitamínem E.

Dále následovalo měření, při kterém z naměřených dat vzorků a kalibrační řady pomocí UV-VIS spektrofotometru byla pomocí linregrese vypočítána reálná koncentrace vitamínu A ve vzorku, která činila 0,007 mM. Následným přepočtem bylo možné určit účinnost solubilizace vitamínu A do vezikul, která byla stanovena na 34,98%. U vitamínu E byla vypočítána reálná koncentrace ve vzorku na 0,126 mM a účinnost solubilizace do vezikul činila 30,39 %.

Toto stanovení bylo ověřeno i pomocí HPLC s UV-VIS detektorem. Naměřená data byla vyhodnocena v systému LC1220 (offline) a sestavením kalibrační křivky v systému bylo možné vyhodnotit přesnou koncentraci vitamínů ve vzorku. V případě vitamínu A byla výsledná koncentrace 0,044 mM a v porovnání s původní koncentrací to odpovídá 86,81% účinnosti solubilizace do vezikul. V případě výsledné koncentrace vitamínu E byla koncentrace stanovena na 0,057 mM. Účinnost solubilizace vitamínu E do vezikul v porovnání s reálnou koncentrací odpovídá 68,74 %.

Když porovnáme výsledné účinnosti jednotlivých vitamínů ve vezikulách stanovené pomocí UV-VIS spektrofotometru a HPLC, tak je zřejmé, že dochází k mírným odchýlkám. V obou případech je vyšší účinnost stanovena pro vitamín A v porovnání s vitamínem E. Během měření na HPLC s UV-VIS detektorem jsou však výsledné hodnoty vyšší. Tato skutečnost je pravděpodobně ovlivněna tím, že v případě metody HPLC se jedná o velice přesnou a citlivou metodu, při které dochází k přesné separaci jednotlivých komponent obsažených ve vzorku. K dalšímu snížení odchylek mohlo dojít vlivem snížení propustnosti světla ke vzorkům díky tmavému sklu, které bylo používáno během přípravy zásobních roztoků, jednotlivých vzorků a během měření. V případě stanovení na UV-VIS spektrofotometru bylo používáno čiré sklo, které bylo následně baleno do alobalu. Před samotným měřením byly vzorky přelévány do křemenné kyvety, kdežto během HPLC byly vzorky odebírány pomocí injektoru přímo z tmavé vialky, do které byly vzorky připraveny. Vlivem vysoké citlivosti vitamínů na světlo mohly být odchylky způsobené během přípravy a stanovení v řádu desítek minut.

Během veškerých experimentů bylo velice důležité, aby všechna práce s roztoky a vitamíny byla prováděna a měřena ve stejný den z důvodu co největší eliminace chyby. Jedná se totiž o velice citlivé systémy na světlo, které další den neodpovídají reálným výsledkům. Z důvodu této vysoké citlivosti mohlo docházet k malým odchýlkám i během měření.

V této diplomové práci byla prokázána úspěšnost solubilizace nerozpustných vitamínů ve vodě do vezikul HTMA-DS pomocí metody UV-VIS a HPLC. Pomocí HPLC s UV-VIS detektorem byla výsledná účinnost vyšší. Důvodem je vyšší přesnost a citlivost separační metody. Na závěr je tedy možné zhodnotit, že účinnost solubilizace vitamínu A a vitamínu E je vysoká a pro další experimenty by bylo vhodné i nadále měřit na přístroji HPLC s UV-VIS detektorem. Tento fakt by mohl být velice užitečný v dalším výzkumu pro použití vezikul jako nosiče nepolárních vitamínů. Věřím, že zvýšením stability a zabráněním tak degradaci vitamínů v řádů několika hodin by mohly mít vezikuly veliké využití.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NAKAMA, Y. Surfactants. *Cosmetic Science and Technology*. Elsevier, 2017, 2017, , 231-244. ISBN 9780128020050. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X
- [2] DAVIDOVITS, Paul. Fluids. *Physics in Biology and Medicine*. Elsevier, 2019, 2019, , 85-101. ISBN 9780128137161. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813716-1.00007-0
- [3] WILLIAMS, Jesse J. Formulation of Carpet Cleaners. *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*. Elsevier, 2007, 2007, , 103-123. ISBN 9780444516640. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451664-0/50004-8
- [4] Bhattarai, Ajaya & Niraula, Tulasi & Chatterjee, Sujeet. (2014). Sodium dodecyl sulphate: A very useful surfactant for Scientific Investigations. *The Journal of Knowledge and Innovation*. 2. 111-113.
- [5] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 7879, Dimethyldioctadecylammonium chloride. Retrieved April 25, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyldioctadecylammonium-chloride>.
- [6] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 5974, Cetrimonium bromide. Retrieved April 25, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cetrimonium-bromide>.
- [7] ŠMIDRKAL, JAN. *TENZIDY A DETERGENTY DNES*. Chem. Listy 93, 421 - 427 (1999). Ustav technologie mléka a tuků, Vysoká škola chemicko-technologická, 1999. Dostupné také z: http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf
- [8] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [9] SCHMITZ, Kenneth S. *Physical chemistry: multidisciplinary applications in society*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, [2018]. ISBN 978-012-8005-132.
- [10] NAKAMA, Y. Surfactants. *Cosmetic Science and Technology*. Elsevier, 2017, 2017, , 231-244. ISBN 9780128020050. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X
- [11] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [12] TANFORD, Charles. Micelle shape and size. *The Journal of Physical Chemistry*. 1972, **76**(21), 3020-3024. ISSN 0022-3654. Dostupné z: doi:10.1021/j100665a018
- [13] MORSHED, Adnan, Buddini Iroshika KARAWDENIYA, Y.M. Nuwan D.Y. BANDARA, Min Jun KIM a Prashanta DUTTA. Mechanical characterization of vesicles and cells: A review. *ELECTROPHORESIS*. 2020, **41**(7-8), 449-470. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201900362

- [14] PINAZO, Aurora, Ramon PONS, Ana MARQUÉS, Maribel FARFAN, Anderson DA SILVA a Lourdes PEREZ. Biocompatible Catanionic Vesicles from Arginine-Based Surfactants: A New Strategy to Tune the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Vesicular Systems. *Pharmaceutics*. 2020, **12**(9). ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12090857
- [15] KUO, An-Tsung a Chien-Hsiang CHANG. Recent Strategies in the Development of Catanionic Vesicles. *Journal of Oleo Science*. 2016, **65**(5), 377-384. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess15249
- [16] TALEGAONKAR, Sushama, PR MISHRA, RK KHAR a SS BIJU. Vesicular systems: An overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, **68**(2). ISSN 0250-474X. Dostupné z: doi:10.4103/0250-474X.25707
- [17] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science*. 2014, **292**(3), 589-597. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-013-3104-9
- [18] MORSHED, Adnan, Buddini Iroshika KARAWDENIYA, Y.M. Nuwan D.Y. BANDARA, Min Jun KIM a Prashanta DUTTA. Mechanical characterization of vesicles and cells: A review. *ELECTROPHORESIS*. 2020, **41**(7-8), 449-470. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201900362
- [19] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Adam JUGL, Ludmila MRAVCOVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Po-Sung HUANG, Miloslav PEKAŘ a Filip MRAVEC. Study of cholesterol's effect on the properties of catanionic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020, **607**. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526
- [20] LASIC, D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*. **16**(7), 307-321. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(98)01220-7
- [21] STEVENS, Sherri L. Fat-Soluble Vitamins. *Nursing Clinics of North America*. 2021, **56**(1), 33-45. ISSN 00296465. Dostupné z: doi:10.1016/j.cnur.2020.10.003
- [22] ENGELKING, Larry R. Vitamin A. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*. Elsevier, 2015, 2015, , 282-287. ISBN 9780123919090. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-391909-0.50044-X
- [23] RAJASEKARAN, A. Nutraceuticals. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. Elsevier, 2017, 2017, , 107-134. ISBN 9780128032015. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12287-5
- [24] UV detection for HPLC – Fundamental Principles, Practical Implications. *CrawfordScientific* [online]. 2000 [cit. 2021-4-25]. Dostupné z: <https://www.crawfordscientific.com/technical/chromatography-blog/hplc-chromatography-tips/hplc-practice/hplc-uv-detection>

- [25] PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [26] PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [27] *Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu* [online]. [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>
- [28] *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes: technical note* [online]. [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/MRK656.pdf>
- [29] BIRIUKOV, Denys, Pavel FIBICH a Milan PŘEDOTA. Zeta Potential Determination from Molecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2020, **124**(5), 3159-3170. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.9b11371
- [30] GUMUSTAS, Mehmet, Ceyda T. SENDEL-TURK, Aysen GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN a Bengi USLU. Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. Elsevier, 2017, 2017, , 67-108. ISBN 9780323527255. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8
- [31] LU, Guang Wei a Ping GAO. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*. Elsevier, 2010, 2010, , 59-94. ISBN 9780815520252. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4
- [32] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [33] DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4226-1.
- [34] ANDREOZZI, Patrizia, Sergio S. FUNARI, Camillo LA MESA, Paolo MARIANI, Maria Grazia ORTORE, Raffaele SINIBALDI a Francesco SPINOZZI. Multi- to Unilamellar Transitions in Catanionic Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, **114**(24), 8056-8060. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp100437v
- [35] RUSSO KRAUSS, Irene, Riccardo IMPERATORE, Augusta DE SANTIS, Alessandra LUCHINI, Luigi PADUANO a Gerardino D'ERRICO. Structure and dynamics of cetyltrimethylammonium chloride-sodium dodecylsulfate (CTAC-SDS) catanionic vesicles: High-value nano-vehicles from low-cost surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017, **501**, 112-122. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2017.04.032
- [36] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged catanionic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2018, **92**, 29-35. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2018.02.013
- [37] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced Physical Stability of Mixed Ion Pair Amphiphile/Double-chained Cationic Surfactant

Vesicles in the Presence of Cholesterol. *Journal of Oleo Science*. 2018, **67**(6), 727-735. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess18008

- [38] KUO, An-Tsung, Wei-Ta LI, Chia-Yao TSENG, Fang-Wei HSIAO a Chien-Hsiang CHANG. Probing the alkyl chain length effects on molecular packing characteristics of mixed ion pair amphiphile/double-chained cationic surfactant vesicular bilayers with the Langmuir monolayer approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, **454**, 23-31. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2014.04.013
- [39] LEE, Seung-Cheol, Kyung-Eun LEE, Jin-Ju KIM a Sun-Hee LIM. The Effect of Cholesterol in the Liposome Bilayer on the Stabilization of Incorporated Retinol. *Journal of Liposome Research*. 2008, **15**(3-4), 157-166. ISSN 0898-2104. Dostupné z: doi:10.1080/08982100500364131
- [40] LEE, Kyung-Eun, Jin-Ju KIM, Hyun-Gyun YUK, Ji-Young JANG a Seung-Cheol LEE. Effect of Phase Transition Temperature of Phospholipid on the Stability of Retinol Incorporated into Liposomes. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2003, **8**(3), 235-238. ISSN 2287-1098. Dostupné z: doi:10.3746/jfn.2003.8.3.235
- [41] BOCHICCHIO, Sabrina, Anna Angela BARBA, Gabriele GRASSI a Gaetano LAMBERTI. Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, **69**, 9-16. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2016.01.025
- [42] LIU, Yu-San, Chih-Fang WEN a Yu-Min YANG. Development of ethosome-like cationic vesicles for dermal drug delivery. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2012, **43**(6). ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2012.06.008
- [43] CARAFA, M., C. MARIANECCI, A. CODECA, P. SQUILLACI, M. SCALZO, F. CERRETO a E. SANTUCCI. Retinyl palmitate-loaded vesicles: influence on vitamin light-induced degradation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2006, **16**(6), 407-412. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/S1773-2247(06)50080-2

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

CMC	kritická micelární koncentrace
CMT	kritická micelární teplota
CTAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
DHDAB	dihexadecyldimethylamonium bromid
DODAC	dioktadecyldimethylamonium chlorid
DTAB	ditetradecyldimethylamonium bromid
DXDAC	dialkyldimethylamonium chlorid
HTMA-DS	hexydecyltrimethylamonium-hexadecylsulfát
IPA	ionic pair amphiphilic (amfifilní iontový pár)
MLVS	multilamelární vezikuly
MPS	mononukleární fagocytární systém
PAL	povrchově aktivní látka
SDS	dodecylsírán sodný
SUV	unilamelární vezikuly

9 SEZNAM PŘÍLOH

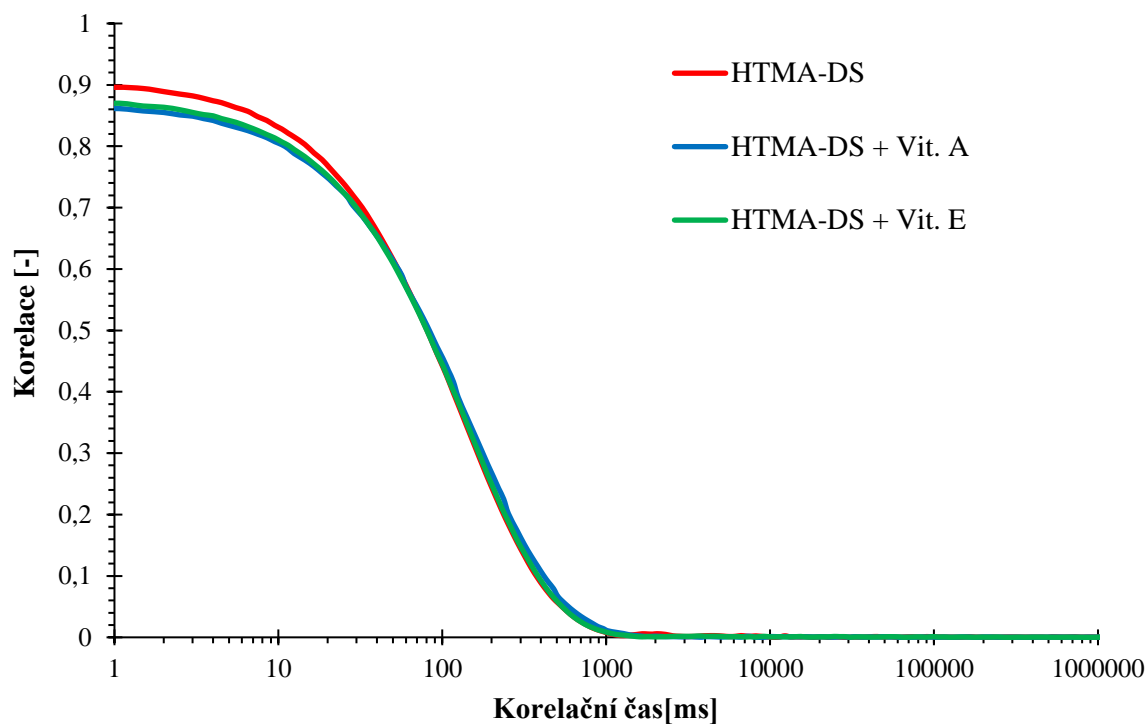
Příloha 1: Korelační křivky průběhu měření vezikulárních systémů HTMA-DS a vezikulárních systémů HTMA-DS s vitamíny v den přípravy

Příloha 2: Korelační křivky průběhu měření vezikulárních systémů HTMA-DS s inkorporovaným vitamínem A v závislosti na čase

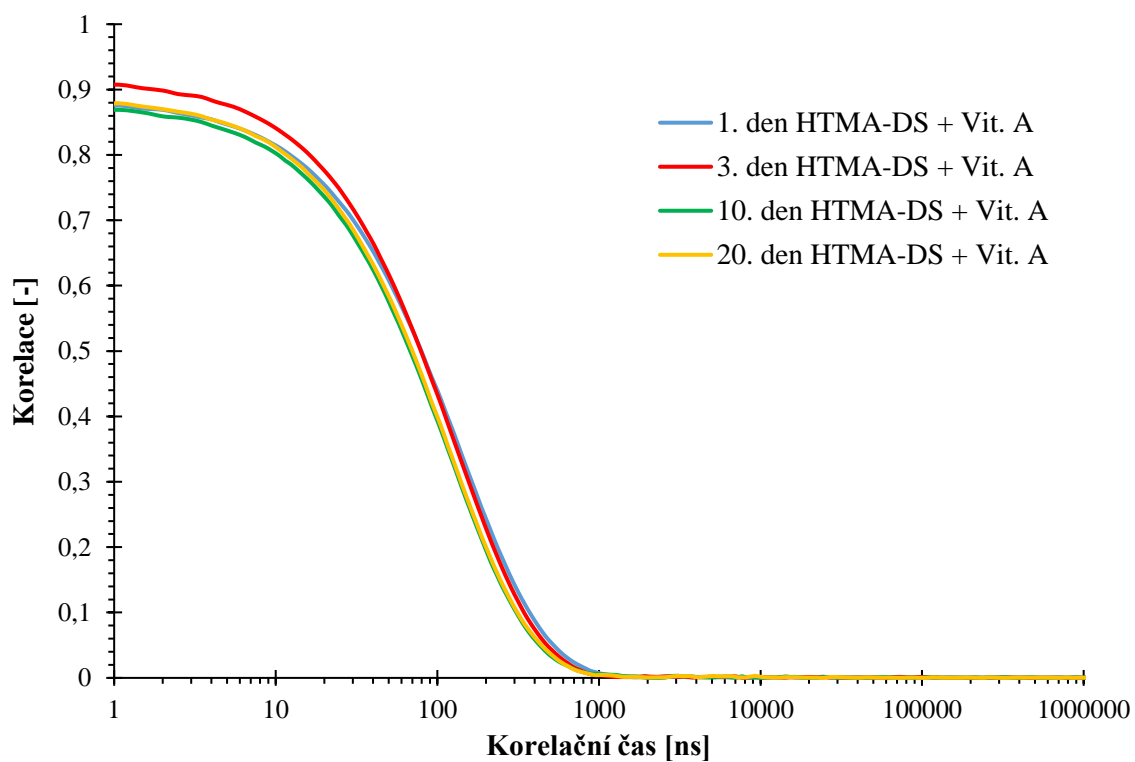
Příloha 3: Korelační křivky průběhu měření vezikulárních systémů HTMA-DS s inkorporovaným vitamínem E v závislosti na čase

Příloha 4: Stručný přehled naměřených hodnot během měření na DLS

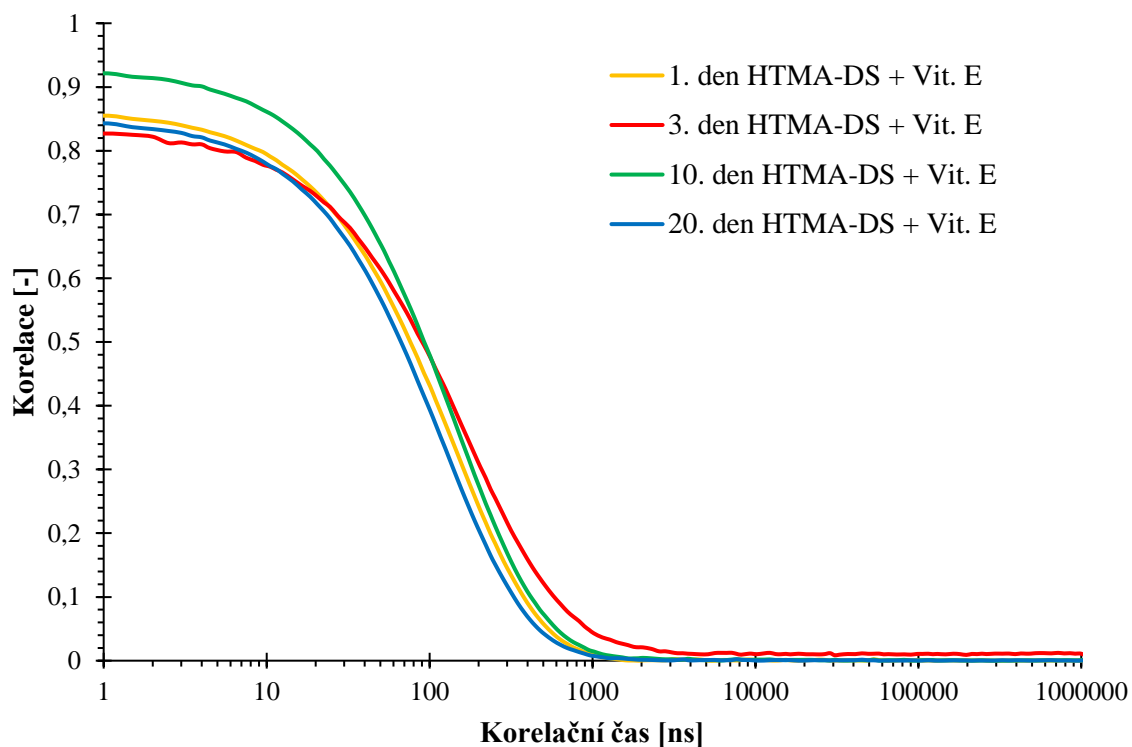
10 PŘÍLOHY



Obrázek 44: Korelační křivky průběhu měření vezikulárních systémů HTMA-DS a vezikulárních systémů HTMA-DS s vitamíny v den přípravy.



Obrázek 45: Korelační křivky průběhu měření vezikulárních systémů HTMA-DS s inkorporovaným vitamínem A v závislosti na čase.



Obrázek 46: Korelační křivky průběhu měření vezikulárních systémů HTMA-DS s inkorporovaným vitamínem E v závislosti na čase.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty zeta potenciálu, průměrné velikosti částic a indexu polydisperzity HTMA-DS vezikul po dobu 20 dní.

Kataniontové vezikulární systémy	Zeta potenciál	Z-Average	PDI
1. den HTMA-DS	74 ±2	90 ±2	0,32 ±0,02
1. den HTMA-DS + Vit. A	63 ±1	94 ±6	0,28 ±0,01
3. den HTMA-DS + Vit. A	59 ±2	87 ±7	0,26 ±0,01
10. den HTMA-DS + Vit. A	55 ±1	84 ±5	0,24 ±0,01
20. den HTMA-DS + Vit. A	50 ±1	82 ±3	0,23 ±0,01
1. den HTMA-DS + Vit. E	68 ±2	127 ±7	0,29 ±0,01
3. den HTMA-DS + Vit. E	58 ±1	122 ±1	0,44 ±0,04
10. den HTMA-DS + Vit. E	51 ±1	101 ±9	0,29 ±0,02
20. den HTMA-DS + Vit. E	49 ±2	99 ±11	0,28 ±0,01