

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Nanovláknenné nosiče léčiv 1

Nanofiberdrugcarriers 1

Mgr. JANA VODIČKOVÁ

Konsultant: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Poděkování

Děkuji doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné vedení, PharmDr. Pavlu Berkovi, Ph.D. a paní Janě Fendrichové za technickou pomoc při HPLC stanovení pro předkládanou rigorózní práci.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2019

Mgr. Jana Vodičková

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Jméno a příjmení: Jana Vodičková

Název diplomové práce: *Nanovláknenné nosiče léčiv 1*

Školitel: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc

V teoretické části práce je zmíněno strukturálně hierarchické dělení nanomateriálů, podána charakteristika netkaných nanotextilií a technologie Nanospideru® pro výrobu netkaných textilií metodou elektrospiningu. Je popsána stručná charakteristika vlastností a použití polyurethanu (PUR) včetně nanovláken a charakterizováno měření kontaktního úhlu.

Experiment se zabývá měřením smáčivostí kompozitní chitosanpolyurethanové nanomembrány. Dokládá obtížnou smáčitelnost a nízkou kapilaritu testovaných nanovláknenných produktů. Další část je věnována proměření liberačních vlastností nanovláknenné kompozitní membrány z hlediska uvolňování kofeinu a kyseliny listové jako modelových léčiv. Poslední část se zabývá disolucí kyseliny listové z nezesíťovaných a síťovaných nanomembrán z polyvinylalkoholu (PVA).

Všechny nanomembrány byly poskytnuty firmou Elmarco s.r.o. Liberec za účelem proměření liberačních profilů léčiv při screeningu poloprovozních parametrů elektrospiningu pro nanozvlákňování kombinací různých polymerů a léčiv.

Klíčová slova: Nanospider®, elektrospining, polyurethan, polyvinylalkohol, kontaktní úhel, chitosan-polyuretanová nanomembrána,

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Name: Jana Vodičková

Title of diploma thesis: *Nanofiber drug carriers 1*

Supervisor: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc

In the theoretical part is mentioned structurally hierarchical division of nanomaterials, characteristics of nonwoven nanotextiles and technology of Nanospider® for production of nonwoven nanofiber mats by electrospinning method. A brief description of properties and use of polyurethane including nanofibers is described and contact angle measurement is characterized.

The experiment deals with measurement of wettability of composite chitosan-polyurethane nanomembrane. It shows difficult water wettability and low capillarity of tested nanofibrous products. The next part is devoted to measuring the release properties of nanofibrous composite membranes in terms of caffeine release as a model drug. The last part deals with the dissolution of folic acid from non-crosslinked and cross-linked PVA nanofiber membranes.

All membranes were provided by Elmarco s.r.o. Liberec in order to measure the liberation profiles of drugs in the screening of pilot plant parameters of electrospinning for nanofiber by combinations of different polymers and drugs

Key words: Nanospider®, electrospinning, polyurethane, contact angle, chitosan-polyurethane nanomembrane, polyvinylalchole

Obsah

1. ÚVOD.....	10
2. CÍL PRÁCE.....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1. Nanovláknenné materiály.....	12
3.1.1 Elektrosponing nanovláknenných membrán.....	12
3.1.2 Výrobní zařízení Nanospider®.....	14
3.1.3 Netkané nanotextílie jako vláknité materiály.....	15
3.1.4 Nanovláknenné nosiče s obsahem léčiva.....	17
3.2. Polyuretan.....	18
3.2.1 Formy polyuretanu.....	20
3.3. Kontaktní úhel.....	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
4.1 Nanovláknenný materiál.....	26
4.2 Přístroje.....	26
4.3 Suroviny.....	27
4.4 Měření kontaktního úhlu.....	27
4.4.1 Příprava vzorků.....	27
4.4.2 Provedení.....	27
4.5 Liberace kofeinu z nanovláken.....	28
4.5.1 Příprava akceptorové faze.....	28
4.5.2 Příprava liberačních buněk.....	28
4.5.3 Provedení disolučního pokusu.....	29
4.5.4 HPLC stanovení kofeinu.....	29
4.5.5 Liberace kyseliny listové z nanovláken.....	29
4.5.6 HPLC stanovení kyseliny listové.....	30
5. DOKUMENTACE.....	31
5.1 Mikrofotografické záznamy stacionárních kapek (ukázky).....	31

5.2 Záznamy HPLC stanovení.....	32
5.2.1. Chromatografické záznamy standardů.....	32
5.3 Protokoly “ dynamických” disolučních experimentů.....	34
6. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
6.1 Hodnocení kontaktních úhlů.....	39
6.2 Výsledky “statického” liberačního měření kofeinu.....	40
6.3 Výsledky “dynamického” disolučního měření kofeinu.....	42
6.4 Výsledky disoluce kyseliny listové z PVA nanovláken.....	43
7. ZÁVĚRY.....	46
8. LITERATURA.....	47

Seznam obrázků

Obrázek č. 1 Foto netkané textilie.....	12
Obrázek č. 2 Laboratorní zařízení Nanospider® pro výrobu nanovláken.....	14
Obrázek č. 3 Průmyslová linka na výrobu nanovláken	15
Obrázek č. 4 Kapka kapaliny na tuhém povrchu	23
Obrázek č. 5 Vliv adsorpce na hodnotu úhlu smáčení	23
Obrázek č. 6 Kontaktní úhel smačející kapaliny na různých površích	24
Obrázek č. 7 Kontakt vody na membráně CHIT-PUR číslo 1 z líce.	31
Obrázek č. 8 Ukázka záznamu pro standard kofeinu v koncentraci 0,01 mol/l.....	32
Obrázek č. 9 Ukázka záznamu pro standard kofeinu v koncentraci 0,05 mol/l.....	33
Obrázek č. 10 Kalibrační závislost kyseliny listové	33
Obrázek č. 11 Průběh „stacionární“ liberace kofeinu z nanovlákných PUR-Chit membrán s kofeinem (n = 5; SD).....	41
Obrázek č. 12 Průběh „dynamického“ rozpouštění kofeinu z nanovlákných PUR-Chitmembrán s kofeinem (n= 6, SD).	42

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 Přehled přístrojů konkrétního typu dodávaných výrobcí	26
Tabulka č. 2 Přehled surovin s číslem šarže a jejich výrobcem.....	27
Tabulka č. 3 Hodnoty kontaktních úhlů membrán (z líce)	39
Tabulka č. 4 Hodnoty koncentrací k. listové v akceptorovém pufru při disoluci nanovláken PVA s obsahem 0,49 % léčiva	43
Tabulka č. 5 Hodnoty koncentrací k. listové v akceptorovém pufru při disoluci z nanovláken síťovaného PVA s obsahem 3,3 % léčiva.....	43
Tabulka č. 6: Hodnoty podílu uvolněné a rozpouštěné kyseliny listové vzhledem k uvolnitelnému množství.....	44

Seznam zkratek

ES	elektrospining
ε	koeficient drsnosti a zlomků
DMF	N, N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
CHIT – PUR	chitosan – polyuretanová nanomembrána
PUR	polyuretan
PVA	polyvinylalkohol
THF	tetrahydrofuran
TPU	termoplastický polyurethan
C_k	koncentrace korigovaná
C_{nk}	koncentrace nekorigovaná
Qt (exp)	naměřené množství látky v čase t
Qt (teor)	vypočtené množství látky v čase t
V_{dop}	objem doplňované kapaliny
V_o	počáteční objem kapaliny
g/l	gram na litr
$g \cdot min^{-1} \cdot m^{-1}$	gram za minutu na metr
$g \cdot m^{-2}$	gram na metr čtverečný
h	hodina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
kV	kilovolt
μl	mikrolitr
mg%	miligram procenta
min.	minuta
ml	mililitr
nesit.	nesíťované
θ	kontaktní úhel
SARS	těžký akutní respirační syndrom

Sit.	síťovaný
Smodch	směrodatná odchylka
ϕ_i	podíl chemicky odlišných částí povrchu
$\gamma_{l\ ays}$	povrchové energie kapaliny, popřípadě tuhé látky
γ_{sl}	mezifázová energie tuhá látka kapalina
γ_{so}	povrchová energie čisté tuhé látky
γ_{sg}	povrchová energie tuhé látky v rovnováze s parou kapaliny tvořící kapku

1. ÚVOD

Práce s odstupem času navazuje na moudiplomovou práci¹ a rozšiřuje ji screeningem povrchových, liberačních a disolučních vlastností nanovlákných membrán z dalších polymerů a s obsahem dalších modelových léčiv. Jejím záměrem bylo získat a poskytnout podklady pro racionální výběr polymerů a pro nastavení parametrů elektrospinningu při výzkumu a vývoji nanovlákných nosičů léčiv.

Detailní informace o nastavení formulačních proměnných a produkčních parametrů elektrospinningu bylo rámcově konzultováno s pracovníky firmy Elmarco s.r.o. Liberec, konkrétně zejména s Ing. Denisou Stránskou. Veškeré detailní informace jsou uloženy u zmíněného výrobce zařízení Nanospider®, který byl výrobcem a dodavatelem všech testovaných nanovlákných membrán.

2.CÍL PRÁCE

V teoretické části bylo úkolem:

- a) Uvést problematiku nanovlákných membrán, podat stručnou informaci o využití nanovlákných textilií a charakterizovat jejich výrobutechnologií Nanospider®.
- b) Popsatzáklad problematiky kontaktního úhlu.
- c) Shrnout podstatné informace o vlastnostech a využití polyurethanu jako polymeru, který je jednou ze součástí nanovláknětestovaných v pokusné části.

V experimentu bylo úkolem:

- a) Vyhodnotit smáčivost polyuretan-chitosanové nanovlákněmembrány orientační metodou měření kontaktního úhlu.
- b) Proměřit liberaci, resp. disoluci kofeinu z polyuretan-chitosanových nanovlákn.
- c) Proměřit liberaci kyseliny listové z nanovlákn sítovaného a nesítovaného PVA.

3. TEORETICKÁ ČÁST

V oblasti nanomateriálů lze dnes popisované struktury obecně rozlišovat na soustavy nulidimenzionálních částic (0-D),² jednorozměrných vláken (1-D),³ dvourozměrných membrán (2-D)^{4,5} a třídimenzionálních (3-D) struktur typu scaffolds (lešení).⁶

3.1 Nanovláknenné materiály

Nanovláknenné materiálynejrůznější chemické povahy se zpracovávají převážně do formy netkaných membrán (**Obr.č. 1**), fólií a textilií rozdílné gramáže, průměru vláken, porozity, orientace vláken a dalších parametrů.

Obrázek č. 1 Foto netkané textilie



Tyto materiály poskytují řadu možností pro využití v různých oborech, například v oblasti filtrace vzduchu i kapalin, protihlukové ochrany a také medicíny a hygieny.

Nanotextiliejsou tvořeny nanovláknny o průměru menším než 1 mikrometr, obvykle 50 až 800 nanometrů. Jednotlivá vlákna jsou tedy viditelná jen pod elektronovým mikroskopem. Jako textilie se nanovláknna vyrábějí několika metodami, jednou z nich jetvorba vrstvy náhodně uložených vláken metodou elektrospiningu (ES), což je metoda založená na principu zvlákňování v silném elektrickém poli.⁷

Českému výzkumnému týmu z Technické univerzity v Liberci se podařilo ve spolupráci s firmou Elmarco s.r.o., Liberec jako prvním na světě vyvinout a patentovat technologii bezjehlovéhoelektrospininiguNanospider®, která je využitelná pro průmyslovou výrobu vysoce kvalitních netkaných nanotextilií.

3.1.1 Elektrospiningnanovláknenných membrán

Elektrospinning jako metoda jemného zvlákňování materiálů poskytuje relativně snadný postup vytváření mikrovláknenných a nanovláknenných membrán.

Do současné doby bylo popsáno více než 100 různých syntetických a přírodních organických polymerů a množství jejich kombinací zpracovaných právě ES metodou. Velká část z nich byla vyzkoušena i jako nosiče léčiv.⁸Morfologii těchto vláken lze

dobře regulovat parametry uvedenými v následujícím odstavci. Tuto problematiku ve vztahu k ES z jehly (trysky) i volného povrchu detailně pojednávají práce řady tuzemských autorů.^{9,10,11}

Parametry ES a jejich vliv na morfologii vláken¹¹

Parametry roztoku pro ES¹²

Parametr	Vliv
Viskozita	Tvorba nízkých vrstev, vysoký nárůst průměru vlákna, zmizení kapiček [13]
Koncentrace polymeru	Zvýšení průměru vlákna ^[14,15]
Mol. hmotn. polymeru	Se zvýšením hmotnosti snížení počtu vrstev a kapiček ^[16]
Vodivost	Se zvýšením vodivosti snížení průměru vlákna [17]
Povrchové napětí	Nepřesvědčivé spojení s morfologií vlákna, vysoké povrchové napětí vede k nestabilitě tvorby vláken ^[18]

Parametry ES zařízení

Použité napětí	Snížení průměru vlákna se zvýšením napětí ^[19]
Vzdálenost elektrod	Vytváření kapiček s příliš malou a příliš velkou vzdáleností, pro stejnoměrná vlákna vyžadována minimální vzdálenost [20]
Rychlost posuvu/průtok.	Snížení průměru vlákna se snížením průtoku, tvorba kapiček při příliš vysokém průtoku [21]
Typ kolektoru	Vliv na struktur. morfologii vláken. Nevodivý kolektor vytváří porézní strukturu s kruhovými póry na povrchu vláken [22]

Parametry prostředí

Vlhkost	Vysoká vlhkost vede ke kruhovým pórům na vláknech [23]
Teplota	Zvýšení teploty vede ke snížení průměru vlákna ^[23]

Kromě elektrického napětí a vzdálenosti mezi elektrodami patří mezi hlavní parametry, které mají vliv na proces výroby a výslednou morfologii nanovláken, vlastnosti polymerního roztoku, ze kterého ES probíhá.²⁴ Viskoelastická síla roztoku závisí na koncentraci polymeru a průměrné molekulové hmotnosti polymeru na jedné straně a na

vlastnostech rozpouštědla na straně druhé, to vše se promítá do hodnot viskozity a povrchového napětí roztoku.

Do současnosti byly publikovány četné a rozsáhlé studie ES tvorby nanovláken, včetně studia mechanismu jejich vzniku,²⁵ podmínek a charakteristik vláknenných membrán.^{26,27} Publikace popisují různé typy morfologie vláken úpravou podmínek ES. Jsou popsána nanovlákná, vlákna spirálovitě paralelně stočená,²⁸ vícevrstvá,²⁹ kroucená,^{30,31} s porézní povrchovou strukturou,³² se středovým jádrem,³³ i vlákna dutá.³⁴ To vše přináší možnost tvorby elektrostaticky zvlákněných netkaných textilií, membrán či fólií s fyzikálně-chemickými vlastnostmi zaměřenými na různé specifické aplikace.

3.1.2 Výrobní zařízení Nanospider®

Na originální řešení výroby nanovláken přišel výzkumný tým profesora Oldřicha Jirsáka z Technické univerzity v Liberci. V principu byl postup znám už dříve, nenabízel však průmyslové využití především z hlediska dostatečné kapacity výroby.

Technologie Nanospider® tak představila unikátní způsob zvláknování z volné hladiny roztoku polymeru v silném elektrostatickém poli. Tato technologie umožňuje zvláknovat nejen z kapky polymeru procházejícího tryskou do elektrického pole, ale z celé tenké vrstvy roztoku polymeru.

Ukázky laboratorního a výrobního zařízení jsou na následujících obrázcích č. 2 a 3.

Obrázek č. 2 Laboratorní zařízení Nanospider® pro výrobu nanovláken



Tato technologie používá zvláknovací elektrodu ve tvaru tenké struny a pohyblivou hlavu pro nanášení roztoku polymeru po celé délce struny. Vlivem silného elektrického

pole se pak nanovlákná formují z tenké vrstvy polymeru na elektrodě. Jednou z výhod této metody je, že se pro zvláknování používá malé množství stále čerstvého roztoku, což je předpokladem pro udržení konstantních parametrů vstupního, a tudíž i finálního materiálu získávaného při dlouhodobé výrobě.³⁵

Unikátnost výrobního zařízení spočívá ve variabilitě nastavení průměru nanovláken i hmotnosti vrstev nanovláken v průmyslovém měřítku. Jako vstupní suroviny lze použít široké spektrum více než 40 polymerů.⁷ Používáním různých podkladových materiálů se řeší problémy adheze vytvořených nanovláken.

Obrázek č. 3 Průmyslová linka na výrobu nanovláken



Předností tohoto zařízení je relativní mechanická jednoduchost, snadná údržba a nízké provozní náklady. Umožňuje v průmyslovém měřítku výrobu s vysokou rovnoměrností výstupního materiálu v široké škále polymer. Firma Elmarco spolupracuje s nejvýznamnějšími světovými firmami a renomovanými univerzitami. Založila s irskou firmou AlltracelPharmaceuticals společný podnik NANOPEUTICS.³⁶

3.1.3 Netkané nanotextilie jako vláknité materiály

Nanovlákná má průměr několik desítek až tisíc atomů, a proto také má unikátní vlastnosti. Vlákna mají díky svému rozměru obrovský měrný povrch, přitom váží jen 0,1 až 1 g/m². Výhodou nanovlákných textilií je jejich vysoká pórovitost při malé velikosti pórů, transparentnost a vynikající mechanické vlastnosti. Při výrobě se nanovlákná zachycují na podkladovém materiálu ve vrstvách o plošné hmotnosti v řádech až desítek g/m².³⁷ Materiály jsou i na dotek velmi jemné.

Nanovlákná se dají připravit a vyrobit z různých polymerů. Základní postupy přitom spočívají ve využití roztoků polymerů nebo tavenin polymerů. Materiály se upravují podle zamýšleného použití, např. na hojení ran musí být zvolen polymer je

biokompatibilní, s výhodou také biodegradabilní. Připravují i nanovlákná z anorganických materiálů. Rozdíl mezi anorganickým a polymerním materiálem spočívá v tepelné odolnosti a fyzikálně-chemických vlastnostech. Důležitý rozdíl spočívá v tom, že při výrobě nanovláken z tavenin se neuvolňují škodlivé výpary rozpouštědel.³⁷Tuto nesnáž při ESřeší použitím vodných roztoků.

Využití:

1. Hlavní oblastí použití nanovláknenných materiálů a nanotextilií v průmyslu je filtrace vzduchu. Příkladem může být využití v automobilovém průmyslu. Je známo, že použití nanovláknenných filtrů do turbín a motorů významně zvyšuje životnost motorů. Kombinace filtrace vzduchu, paliva a olejů přispívá i k úspoře paliva. Kabinové filtry zlepšují čistotu interiéru vozu a přinášejí vyšší komfort pro alergiky a lidi citlivé na prach a pyly.
2. Jinou významnou aplikační oblastí je protihluková ochrana. Akustické vlastnosti nanovláknenných materiálů jsou výrazně lepší než stávajících materiálů z mikrovláken a jejich hmotnost je přibližně třetinová.
3. Nanotextilie dále nacházejí uplatnění také v potravinářském průmyslu, např. jako součást ekologických obalových materiálů, ale také jako stavební prvky matrice pro umělé potraviny. Aplikací v potravinářském a zemědělském sektoru je dosud relativně málo, což zřejmě souvisí s tím, že se vlákna vyrábějí především ze syntetických polymerů.³⁸
4. Mezi důležitěperspektivní oblastí využití nanovláken patří lékařství, kde se jako medicínské textilie již uplatňují. Využívají se přitom obecné vlastnosti, jakými jsou: pevnost, poddajnost, tvarovatelnost, pružnost, prodyšnost pro plyny a propustnost pro kapaliny. Použití přitom sahá od oděvních textilií, chirurgických šicích nití, obvazů, po náhradu lidských tkání (například kostí a kůže). Také lze využít unikátních schopností nanovláken zastavovat krvácení, urychlovat hojení a zabraňovat pooperačním srůstům a jizvám. Díky malým rozměrům pórů mohou být nanovlákná používána jako bariérové a filtrační materiály, například v ústenkách, rouškách či maskách, bakterie, viry ani mikroby jimi neprojdou. Přídavkem aktivních látek tyto produkty získají antimikrobiální účinky. Například přidáním stříbra lze mikroorganismy ničit přímo, čímž se účinnost filtrů dále zvyšuje.

5. V biomedicině mohou netkané vláknité membrány napodobovat struktury extracelulární hmoty (matrix), proto jsou při vhodné volbě biokompatibilního, resp. biodegradovatelného polymeru použitelné v tkáňovém inženýrství, například při poranění svalů, rekonstrukci kostí, kůže, cév, chrupavek a potenciálně i nervové tkáně.^{39,40}

Terapeuticky důležité aplikace nanozvlákněných membrán zahrnují především tvorbu depotů léčiv pro malé molekuly, ale také velké geny a velké molekuly proteinů⁸.

V dnešní době tedy již není technika ES určena pouze pro akademický výzkum, ale uplatňuje se ve vývoji mnoha nových produktů v řadě průmyslových odvětví.

Některé z aplikací, které v současné době používají ES zvláknění pro tkáňové inženýrství jsou k dispozici pod označením NanoAligned™, NanoECM™, NanoCare™, NanoMesh™, Absorb™, Tegaderm™, pro podání léčiv například jako Rivelin® Patch.

3.1.4 Nanovláknenné nosiče s obsahem léčiva

Netkaná ES vlákna obsahující léčivo získala rozšířené využití obvazů ran, regeneraci tkání a prevenci infekcí anaerobních bakteriemi. Léčivo se do nanovláknenných materiálů dostává několika způsoby.

1. Nejjednodušší způsob spočívá v ponoření ES membrán do vodného roztoku léčiv, která se k nanovláknenné síti připojují elektrostatickými silami.
2. Druhý způsob představuje smíchání léčiv s roztokem polymeru. Na rozdíl od čistě povrchové fyzikální adsorpce může při ES léčivo zakotvit uvnitř vláken a zajistit tak například profily prodlouženého uvolňování. Léčiva jsou tímto lokalizována uvnitř vláken nebo náhodně na povrchu vlákna nebo v jeho těsné blízkosti.
3. Koaxiální elektrostatické zvláknění a emulzní elektrostatické zvláknění jsou způsoby, jak vytvářet vlákna typu jádro – stěna, aby byla co nejlépe zachována účinnost léčiv, například proteinů. Většina biomolekul tak může být plně zapouzdřena do vnitřního jádra vláken. Tato vlákna potom mohou také poskytovat profil bifázického uvolňování léčiva, který je složen z okamžitého a prodlouženého uvolňování. Úpravou podmínek může být množství léčiva uvolněného v první fázi přesně přizpůsobeno aktuální potřebě, zatímco zbývající léčivo se doplňkově uvolňuje na základě difúzního mechanismu.

4. Čtvrtá metoda je založena na imobilizaci biomolekul ve vláknech, kdy je rychlost uvolňování obecně určována externím prostředím, například působením enzymů. Vzhledem ke své složitosti není tento přístup prakticky používán.

Ve srovnání s dosud malým praktickým využitím podávání a řízení liberace léčiv pomocí mikrosfér, hydrogelů a micelních systémů, jsou vláknité nosiče slibné především díky relativní snadnosti a variabilitě jejich použití. Variabilita vlastností vláken umožňuje realizaci nastavitelného chování při uvolňování i stabilního degradačního profilu léčiv. Například vlákna s relativně velkými průměry vždy vykazují delší dobu uvolňování téměř nultého řádu, zatímco například vyšší koncentrace léčivé látky vede k výraznějšímu nástupu uvolnění látky hned po podání, při kontaktu s biologickým prostředím (tzv. „burst“ efektu).

Stále však existují problémy, zejména pokud jde o zajištění uvolňování léčiv z povrchu vzorku během prvních hodin tak, aby byla snížena variabilita. Problémem také bývá zbylé, nerozpuštěné léčivo.

Další vývoj

Oblastmi dalšího vývoje v oblasti zdravotnictví jsou podání léčiv, filtrace plynů a kapalin i speciální oděvy. Mezi perspektivní patří ochranné a bariérové oděvy pro armádu a sportovce, důležité budou materiály pro uchovávání elektrické energie a určitě také extrémně lehké a pevné konstrukční materiály.⁴¹

Vedle elektrostatického zvlákňování existuje i několik jiných výrobních technologií, jako předení průtahem (podobné výrobě standardních syntetických vláken), zvlákňování fázovým dělením nebo tzv. samosběrem. Všechny tyto metody jsou velmi málo produktivní a mají více kvalitativních nedostatků než elektrostatické zvlákňování⁴².

3.2 Polyurethan

Polyurethany (PUR) patří do desítky nejmasověji vyráběných polymerů, mají unikátní širší vlastností a teda aplikačních možností.⁴³

PUR obsahují urethanovou skupinu ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$). Většina PUR je typu termosetů. Na rozdíl od nich se termoplastické polyurethany (TPU) při zahřívání taví a snadno dale zpracovávají. Jejich vlastnosti se mohou v široké škále lišit.

PUR se vytvářejí reakcí polyisokyanátů se sloučeninami obsahujícími hydroxyl. Isokyanáty velmi snadno reagují se všemi sloučeninami, které obsahují aktivní uhlík

(např. voda, alkoholy, fenoly, thioly, aminy, karboxylové kyseliny). Hlavní reakce je doprovázena řadou vedlejších reakcí, které se cíleně využívají při výrobě určitých typů polyuretanů. Výroba probíhá jako tzv. one-shot process, komponenty se mísí přímo, obvykle se současným mísením hlavních reaktantů, katalyzátorů, stabilizátorů pěny, vyztužovadly, plnivy a retardanty hoření. Reakce je exotermní a ukončena během půl hodiny v závislosti na katalyzátoru. Konečných výsledků se dosáhne po 24 až 48 hodinách.

Požadované vlastnosti lze přizpůsobit výběrem typu isokyanátu a polyolů, nebo kombinací isokyanátů a kombinací polyolů. Díky silným mezimolekulárním vazbám jsou polyurethany užitečné pro různé aplikace v lepidlech a povlacích, také v elastomerech, pěnách a lékařských aplikacích, protože jsou dobře biologicky kompatibilní.⁴⁴

Pro biomedicínské aplikace je PUR výhodný proto, že je biologicky stabilní a dobře sterilizovatelný. Nachází uplatnění v zařízeních přicházejících do kontaktu s krví, například v umělých srdečních chlopních nebo umělých krevních cévách.

Bylo ukázáno, že kopolymery polyurethanu s alifatickými polyestery, jako například laktid/glykolid, mohou být biologicky rozložitelné.⁴⁵ Funkčně upravené termoplastické síťoviny z taveniny termoplastického polyuretanu (TPU) jsou vhodné pro obvazy na rány. Povrch vláken byl pro zlepšení smáčivosti modifikován polyethylenglykolem, také nanočásticemi stříbra pro antimikrobiální vlastnosti. Takto upravené síťoviny („mats“) TPU ukázaly vynikající antibakteriální vlastnosti, zvýšenou absorpci vody a schopnost podpořit životaschopnost buněk.⁴⁶

Polyuretan můžeme tedy řadit mezi reaktoplasty nebo elastomery. Reaktoplasty jsou plasty teplem tvrditelné. Jsou dodávány ve formě konzistence medu – polyuretanové pryskyřice. Elastomery jsou plasty s elastickými vlastnostmi. Je možné je tvarovat po odlehčení napětí znovu zaujmou svůj tvar. Elasticita polyuretanového kaučuku z velké části nezávisí na teplotě. Detailně je těmto záležitostem speciálně u polyurethanu věnován přehledný článek,⁴⁷

Tepelné vlastnosti polyuretanu:

Lehčený polyuretan nalézá uplatnění jako tepelně, někdy i zvukově, izolační materiál s dobrými elektroizolačními vlastnostmi. Tento lehčený polyuretan je při 20 °C hořlavý a snadno zápalný. Vyrábí se také ve samozhášivé formě a po oddálení plamene uhasíná.⁴⁸

3.2.1 Formy polyuretanu

Polyuretanové pryskyřice

Polyuretany se vyrábí z uhlí, vzduchu a vápna, vznikají polyadici. Podle velikosti ok molekulární sítě jsou tvrdé až gumově elastické. Jsou dostatečně odolné vůči kyselinám, rozpouštědlům a louchům. Tvrdé druhy těchto plastů se používají jako polyuretanové laky a dvousložková lepidla. Elastické polyuretany se používají jako těsnicí hmoty, známé jsou polyuretanové pěny.⁴⁹

Polyuretanová vlákna

Polyuretanová vlákna se vyrábějí z monomerů polymerací nebo polykondenzací. Ve formě vlákna se používají na výrobu plsti pro technické účely. Velmi tenkou vrstvou polyuretanu se impregnují tkaniny používané pro výrobu pláštěů do deště.

Jsou vyráběna ve dvou typech jako klasické polyuretanové vlákno a vlákno segmentové, tj. kopolymerní se segmenty makromolekul z polyuretanu a jiného polymeru.

Rozpouštědla pro ES nanovlákna PUR

Proces tvorby a prodlužování vláken při ES je způsoben odpuzováním nábojů na jejich povrchu. Pokud se zvýší vodivost roztoku, může být vláknem přenášeno více nábojů,⁵⁰ což zvyšuje jejich protažení. Stejně jako vodivost roztoku má vliv také dielektrická konstanta, která snižuje tvorbu kuliček a průměr výsledných vláken.⁵¹

Nejčastěji používanými rozpouštědly pro PUR jsou vysoce polární organická rozpouštědla, jako N, N-dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), N-methylpyrrolidon a tetrahydrofuran (THF).⁵²

Ketony jako aceton, methylethylketon, cyklohexanon jsou pro TPU částečnými rozpouštědly. Ethanol a isopropanol a jiné alifatické alkoholy způsobují mírné nabotnění, alifatické estery jako ethylacetát a butylacetát způsobují silné nabotnění TPU.

Zkoumání účinků rozpouštědel při elektrostatickém zvlákňování TPU ukázalo, že čtyři různá rozpouštědla, konkrétně THF, DMF, N, N-dimethylacetamid a DMSO významně změnila morfologii výsledných nanovláken. Důležitými faktory jsou přitom vodivost rozpouštědla a tlak par rozpouštědel.

Při zkoumání účinků začlenění ethylacetátu (EA) nebo tetrahydrofuranu (THF) do DMF bylo zjištěno, že roztoky TPU v čistém DMF a směsi DMF/EA jsou dobře elektrospínatelné.⁵³ DMF se zdál být nejlepším rozpouštědlem pro rozpuštění pelet TPU, ale ředění roztoků TPU 10 % nebo 20 % EA zajistilo dosažení tenčích vláken. Začlenění THF do DMF vedlo naopak k silnějším vláknům (ve srovnání s roztoky TPU/DMF). Se zvyšující se objemovou frakcí THF je elektrostatické zvlákňování omezeno kvůli vysoké viskozitě a nízké vodivosti.

Polyuretanová vlákna se používají jako neimplatační materiály. Jsou k externímu použití a mohou nebo nemusejí přicházet do kontaktu s lidským tělem. Některé mají absorbovat kapaliny a některé odpuzovat. Mezi produkty tohoto typu patří absorpční polštářky.

Schopnost absorpce mají mít především obvazy. Tato schopnost souvisí s retencí kapalin pod tlakem, rychlostí vztlínání vyžadována je dobrá snášenlivost na tkáních, omezený transport vlhkosti, neuvolňování vláken a jiných částic, a malá přilnavost na zhojené tkáni, nejčastěji kůži.

Polyuretanové nanomembrány jsou často používány pro krytí ran, protože mají dobré bariérové vlastnosti, a přitom jsou permeabilní pro kyslík. Membrána připravená pomocí elektrospínání má výborné hojivé účinky.⁵⁴

Netkané textilie z polyurethanu se také používají jako materiál pro medicínské oděvní textilie. Tradičně používané bavlněné tkaniny nemají ochranný účinek proti průniku virů, bakterií a dalších mikroorganismů. Polyuretan naopak má uplatnění jako ochranná textilie v oděvech proti SARS, a to v kombinaci s polyethyltereafluorethylenem, kdy je PUR membrána laminována na tvarované tkanině z polyesteru s antimikrobiální a voděodolnou úpravou. Membrána z PUR umožňuje transport potu.⁵⁵

3.3 Kontaktní úhel

Měření kontaktního úhlu patří mezi metody, kterými také jsou zkoumány charakteristiky a chování nanovláken. Měření kontaktního úhlu je citlivou metodou

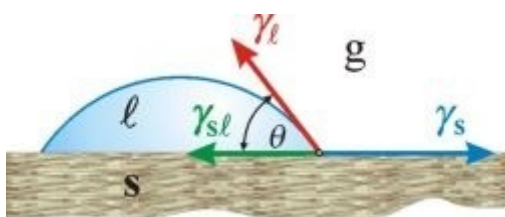
charakterizace povrchu pevných materiálů. Na jeho základě lze stanovit volnou povrchovou energii pevných materiálů a je možné i získat informaci o tom, jak se bude povrch pevných materiálů chovat např. po nanesení tenké vrstvy jiného materiálu. Z toho vyplývá, že metoda poskytuje informace o charakteru povrchové vrstvy materiálů důležité v různých vědních oborech.⁵⁶ Jeho měření přináší informace o smáčivosti rovinných tuhých povrchů danou kapalinou.

Metoda měření kontaktního úhlu a následné stanovení volné povrchové energie je prakticky průmyslově vhodná pro svou rychlost, finanční nenáročnost, vysokou přesnost a citlivost. Kontaktní úhel lze měřit různými způsoby závisujícími na požadované rychlosti a přesnosti měření i na přístrojovém vybavení.

Dříve se měření provádělo pomocí jednoduché optiky. V současné době se využívá kamery pro záznam tvaru kapky s následným softwarovým vyhodnocením. Je tak vyloučen subjektivní vliv pozorovatele. Kontaktní úhel (úhel smáčení) vzniká při interakci kapalin s pevnými látkami. Je-li systém v klidu vzniká statický kontaktní úhel, je-li v pohybu, vzniká úhel dynamický.⁵⁷ Systém v klidu je v rovnováze-nízkoenergetický stav. Stabilní rovnováha vzniká, je-li pevná látka homogenní, planární a nedeforovaná. Pak se formuje rovnovážný kontaktní úhel. Je-li pevná látka heterogenní, systém se může nacházet v metastabilních stavech a kontaktní úhel se pak nazývá metastabilní. Metastabilní kontaktní úhly se mění s objemem kapky, s dodanou vnější mechanickou prací (vibrací) a podle způsobu jakým se formují (klesající nebo stoupající kapalina). Kontaktní úhly se dále rozlišují na klesající a stoupající.

Definice kontaktního úhlu zní tak, že je to úhel, který svírá tečna k povrchu kapky vedená v bodě styku kapky s rozhraním (**Obr. č. 4**). Úhel do 90° je definován jako hydrofilní povrch a nad 90° jako hydrofobní. Při hodnotách větších než 150° je označován jako superhydrofobní povrch a kapka má tvar téměř koule, protože nemá skoro žádný kontakt s povrchem. Je to hlavní charakteristika tvaru kapky kapaliny umístěné na povrchu nerozpustné tuhé látky.⁵⁸

Obrázek č. 4 Kapka kapaliny na tuhém povrchu



Vztah mezi kontaktním úhlem θ a jednotlivými mezifázovými energiemi je dán Youngovou rovnicí (Rovnice 1).

Rovnice 1

$$\gamma_l \cdot \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{sl}$$

kde γ_l a γ_s jsou povrchové energie kapaliny, popř. tuhé látky, γ_{sl} - mezifázová energie tuhá látka-kapalina. Úhel smáčení je jednou z mála přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní pevná látka/kapalina/plyn.

Hodnoty úhlu smáčení mohou být ovlivněny:

Adsorpce látek přítomných v plynné fázi na povrchu tuhé látky (obr. č. 5), která vede ke snížení povrchové energie tuhé látky z hodnoty γ_{s^0} (povrchová energie čisté tuhé látky) na hodnotu γ_{sg} (povrchová energie tuhé látky v rovnováze s parou kapaliny tvořící kapku, popř. dalších látek přítomných v plynné fázi, např. vody); rozdíl je povrchový tlak (Rovnice 2). Youngova rovnice má pak tvar viz Rovnice 3.

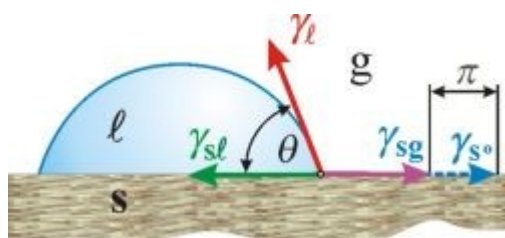
Rovnice 2

$$\gamma_{s^0} - \gamma_{sg} = \pi$$

Rovnice 3

$$\gamma_l \cdot \cos \theta = \gamma_{sg} - \pi - \gamma_{sl}$$

Obrázek č. 5 Vliv adsorpce na hodnotu úhlu smáčení

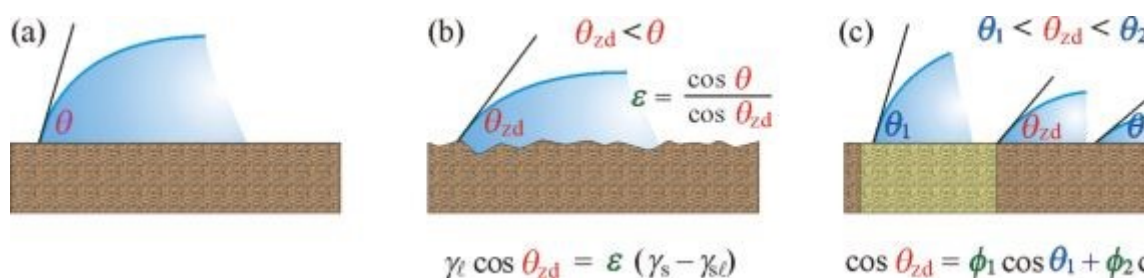


Je zřejmé, že hodnota θ se bude měnit v závislosti na hodnotách π . Tento vliv se významně uplatňuje u tuhých látek o vysoké povrchové energii (např. sklo, křemen, kovy, kovové oxidy, anorganické soli), která se adsorpce snižuje.

Různými ději, k nimž může docházet mezi tuhou látkou a kapalinou (chemická reakce, rozpouštění tuhé látky kapalinou, popř. bobtnání tuhé látky). Při těchto dějích se mění γ_s i γ_{sl} a tedy i pozorovaný úhel smáčení s časem.

Hysterzi úhlu smáčení Drsností a nehomogenitou povrchu, která se může vyskytovat i u pečlivě připravených reálných povrchů (každá rýha na povrchu může působit jako kapilára, v níž kapalina stoupá, je-li θ ostrý, nebo klesá, je-li θ tupý; drsný povrch je tedy obvykle lépe smáčen dobře smáčečícími kapalinami než povrch hladký, zatímco u špatně smáčečících kapalin je tomu naopak). Oba tyto vlivy se projevují ve velikosti úhlu smáčení. V Youngově rovnici jsou uvažovány formou experimentálně zjištěných koeficientů (koeficientu drsnosti ε a zlomků ϕ_i , které vyjadřují podíl chemicky odlišných částí povrchu). Na ideálním hladkém homogenním povrchu je rovnovážný kontaktní úhel roven „Youngovu“ kontaktnímu úhlu (platí zde Youngova rovnice). Rovnovážný kontaktní úhel je na reálném povrchu roven „Wenzellovu“ kontaktnímu úhlu. V tomto případě systém často přechází do metastabilních stavů a klesající a stoupající kontaktní úhly nejsou shodné- vzniká hystereze⁵⁸.

Obrázek č. 6 Kontaktní úhel smačečící kapaliny na různých površích



Kontaktní úhel dobře smáčečící kapaliny (a) na čistém hladkém povrchu, (b) na drsném povrchu, (c) na chemicky heterogenním povrchu (ϕ_1 , popř. ϕ_2 jsou podíly částí povrchu, které se liší chemickým složením, na nichž má uvažovaná kapalina úhel smáčení θ_1 , popř. θ_2)

Teoretické aspekty volné povrchové energie materiálů jsou v dostupné literatuře velmi podrobně rozpracovány.⁵⁹ Novější práce shrnují pokroky v korelaci kontaktních úhlů s povrchovým napětím na rozdílně upravených pevných površích. Diskutuje se smysluplnost měření kontaktních úhlů z hlediska povrchové energie. Diskuse ohledně měření a interpretace kontaktních úhlů ukazují, že při měření bývají porušovány některé

(nebo téměř všechny) předpoklady činěné pro energetické přístupy, za kterých jsou kontaktní úhly měřeny a zpracovávány.⁶⁰

Pro tuto rigorózní práci bylo otázkou, jestli může jednoduchá adaptace měření povrchového napětí kontaktním úhlem přinést užitečnou informaci také pro charakterizaci nanovlákněných membrán, tedy na površích, které nesplňují podmínku rovinného povrchu pevné fáze.

Praktickým záměrem bylo přesvědčit se o charakteru povrchu nanovláken získaných ES z polymerních materiálů známých chemických vlastností, které po nanozvláknění do podoby netkané nanotextiliemohou získat nečekané povrchové charakteristiky.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Nanovláknenný materiál

Jako zkoumané nanovláknenné materiály jsem použila netkanou nesterilizovanou chitosan-polyuretanovou (CHIT-PUR) nanomembránu se zabudovaným kofeinem a zesítené i nezesítené nanomembrány z polyvinylakoholu (PVA) s obsahem kyseliny listové.

Byly vyrobeny a dodány firmou Elmarco s.r.o., Liberec, jejich detailní parametry jsou uchovány u výrobce.

4.2 Přístroje

Tabulka č. 1 Přehled přístrojů konkrétního typu dodávaných výrobcí

Přístroj	Typ	Zařazení/výrobce
Biologický termostat	typ BT120	Lab. přístroje
Degasser	G1379B	Agilent Technologies
Elektrické míchadlo	408N0029	FisherScientific
Isokratická pumpa	G1310A	Agilent Technologies
Laboratorní váhy	440-33	Kern
Lednice 1	D118702	Liebher
Lednice 2	NS 600.3VV	Frigera
pH metr	HC113	Theta
Ponorné vícemístné míchadlo	0502085	VariomagTelesystem
Termostatovaná vodní lázeň	JB5	Grant JB Series
Ultrazvuková lázeň	Uc002PC	Tesla
UV-VIS detektor	G1314B	Agilent Technologies

4.3 Suroviny

Tabulka č. 2 Přehled surovin s číslem šarže a jejich výrobcem

Suroviny	Číslo šarže	Výrobce
Voda na injekci	č.š. 0306190706	Ardeapharma, Ševětín
Kyselina listová 98%	č.š. SL 08154	Sigma-Aldrich, Praha
Kyselina mravenčí	č.š. 403604410	Lachema, Neratovice
Methanol pro HPLC	č.š. 2009-2009	Lachema, Neratovice
Dihydrogenfosforečnan sodný	č.š. A28619A-A	Dr. Kulich, Hr. Králové
Hydrogenfosforečnan sodný	č.š. 2003066406	Tamda, Olomouc
Ultračistá voda pro HPLC	bez šarže	FaF UK, Hradec Králové

Uvedené komerčně dostupné látky odpovídaly deklarované jakosti podle výrobců, respektive dodavatelů.

4.4 Měření kontaktních úhlů

Provedla jsem přímé goniometrické hodnocení mikrofotografie bočního profilu přisedlé kapky v soustavě: netkaná nanomembrána/ voda/ vzduch.

4.4.1 Příprava vzorků

Měla jsem k dispozici 6 nesterilizovaných chitosan-polyuretanových nanomembrán se zabudovaným kofeinem. Z každé membrány jsem vystříhla jeden čtvereček ze středu membrány. Ochrannou fólii jsem odstranila z membrány pinzetou tak, aby nedošlo k porušení a kontaminaci nanovláken. Čtverečky jsem dala do Petrino misky lící stranou vzhůru a nechala na 12 hod v exsikátoru, aby se pro všechny membrány sjednotily podmínky vlhkosti.

4.4.2 Provedení

Jako smáčecí kapalina byla použita voda na injekci. Pokus jsem prováděla s prvními třemi nanomembránami z líce. Vzorek netkaných nanomembrán o rozměrech 2x2cm jsem umístila na nasvícenou horizontálně situovanou plochu.

Pomocí mikropipety jsem nanášela vodu pro injekce. Začínala jsem 20 mikrolitry a postupně jsem po 20 mikrolitrech přidávala, dokud nedošlo k deformaci kapky.

Kapka byla snímána pomocí optické kamery OlympusPixelink PL A 662 při teplotě vzduchu 23–25 °C a teploty vody pro injekce 25°C.

Obrázek jsem přenesla do počítače, kde jsem ho ořezala, zvětšila, poté byl vytisknuta posléze byla určena tečna k povrchu kapky v bodě kontaktu s membránou. Odečet jsem provedla pomocí úhloměru a zapsané hodnoty jsem zpracovala do tabulky. Měřila jsem vnitřní kontaktní úhel, ukázky mikrofotografických záznamů stacionárních kapek jsou uvedeny v části **5. Dokumentace**

4.5 Liberace kofeinu z nanovláken

4.5.1 Příprava akceptorové fáze

Jako akceptorová fáze byl použit fosfátový pufr o pH 7,4 .

Složení: Dihydrogenfosforečnan sodný 0,2 g /l

Hydrogenfosforečnan sodný 1,91 g/l

Postup:

- 1) Odděleně jsem rozpustila navážku dihydrogenfosforečnanu sodného v 500ml ultračisté vody a navážku hydrogenfosforečnanu sodného ve 400ml ultračisté vody.
- 2) Do roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného jsem ponořila elektrodu a za stálého míchání na magnetické míchačce jsem přidala takové množství roztoku hydrogenfosforečnanu sodného, dokud jsem nedosáhla pH 7,4.
- 3) Poté jsem pufr převedla do odměrného válce a doplnila na objem 1000 ml ultračistou vodou.
- 4) Pufr byl uchovávan v tmavé zásobní lahvi při teplotě asi 6°C.

4.5.2 Příprava liberačních buněk

Na pokus jsem nejprve použila netkanou chitosan-polyuretanovou nanomembránu s obsahem kofeinu. Vystříhla jsem čtverečky o rozměru 2x2cm, stříhala jsem od středu do krajů dodané fólie.

Ve „stacionárním“ provedení jsem čtverečky nanomembrán fixovala mezi dvě destičky z plexiskla a to v počtu 1, 2, 3, 5 a 10 vrstev nad sebou. Sklíčka jsem potřela silikonovým adhezním filmem. Pro větší počet membrán nad sebou jsem nechala nanomembrány v plexiskle 12 hodin odležet před pokusem, aby nedošlo k zdeformování povrchu a unikání vzorku. Poté jsem sestavila liberační komůrku, jako

akceptorovou fází jsem použila fosfátový pufr o pH 7,4 bez azidu a soli, jejíž objem byl přibližně 18 ml a promícháván magnetickým míchadélkem. Do donorového prostoru byl odpipetován fosfátový pufr o pH 7,4 o objemu 0,5 ml. Takto připravenou liberační buňku jsem umístila do termostatované vodní lázně temperované na 37 °C a promíchávané ponorným vícemístným míchadlem.

4.5.3 Provedení disolučního pokusu

V „dynamickém“ provedení disolučních pokusů jsem vzorky nanomembrán uložila vždy po 4 kusech (celkem 16 cm²) do 20 ml vialky se zášrubem, do ní vlila 18 ml fosfátového pufru o pH 7,4 jako akceptorovou fází, vialku umístila do vodní lázně termostatované na 37 °C a nechala promíchávat magnetickým míchadlem. Akceptorovou fází jsem v množství 0,7ml odbírala v časových intervalech 10, 20, 40, 60, 120 minut, 8 a 24 hodin. Odběr jsem vkládal do popsané vialky a uchovávala do doby analýzy v chladničce při teplotě asi 6°C. Liberační vialku s membránami jsem po každém odběru doplňovala pufrům opět na původní objem a toto doplnění bylo zohledněno při výpočtu korigovaných koncentrací.

4.5.4 HPLC stanovení kofeinu

Vzorky byly vyhodnoceny metodou HPLC. Jako mobilní fáze byl použit odplyněný roztok 0,2% kyseliny mravenčí v prostředí voda: methanol

v poměru 75:25. Jako standardy byly použity roztoky kofeinu v trometamolu o koncentracích 0,5mg/100 ml, 0,1 mg/100 ml, 0,05 mg/100 ml, 0,01 mg/100 ml a 0,005 mg/100 ml.

Stanovení bylo provedeno na přístroji Agilent Technologies s kolonou ZORBAX Elipse Plus C 18 o rozměru 4,6x 150 mm, průměru 4,6mm a zrnitostí sorbentu 5 mikrometrů. Nástřik byl 60 mikrolitrů, teplota termostatu byla 30 °C, průtok 1,0ml/min a tlak cca 175 barů. Detekce byla spektrofotometrická při vlnové délce 272nm.

4.5.5 Liberace kyseliny listové z nanovláken

Uspořádání pokusu bylo stejné jako v případě „dynamického“ pokusu nanomembrán s kofeinem, celková plocha výstřižků nanomembrán byla opět 16 cm² a byly použity vialky o objemu 10 ml.

4.5.6 HPLC stanovení kyseliny listové

Provedení analýzy proběhlo se směsí 50:50 methanolu a vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného a hydrogenfosforečnan draselného jako mobilní fáze. Nástřik na kolonu činil 30 mikrolitrů. Jako standardy jsem připravila roztoky kyseliny listové o koncentracích 0,5 mg/100 ml, 0,1 mg/100 ml, 0,05 mg/100 ml, 0,01 mg/100 ml a 0,005 mg/100 ml.

Chromatografické hodnocení proběhlo za odborného dohledu a s přímým technickým příspěvkem PharmDr. Pavla Berky, Ph.D.

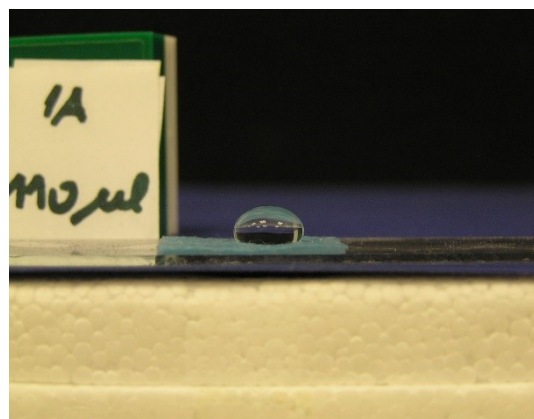
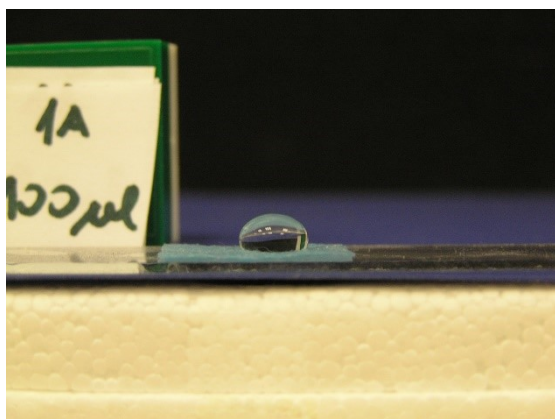
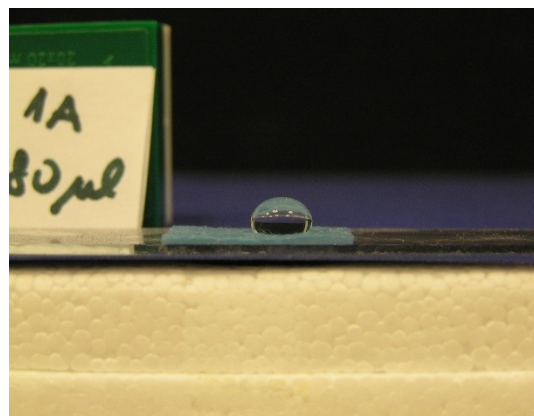
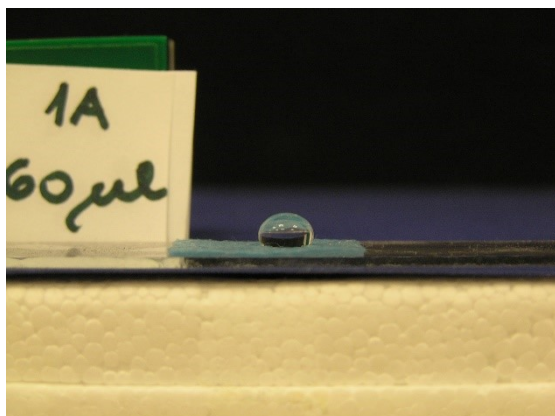
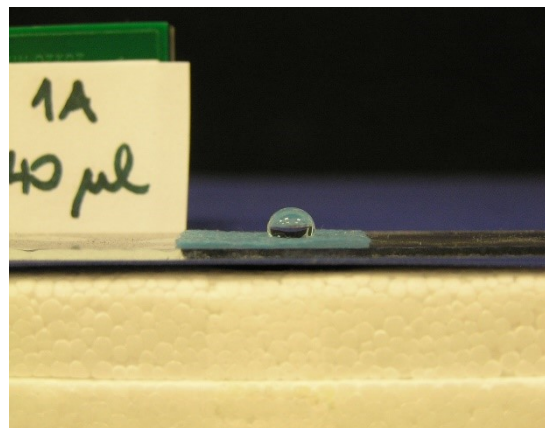
Hodnoty koncentrací sledovaných látek získané ze stanovení kofeinu a kyseliny listové jsem dále zpracovávala pomocí výpočtů, které obnášely přepočty na objem akceptorové kapaliny i korekce na obměňované objemy akceptorové fáze, jak je prezentováno v podobě 5 protokolů v části **5. Dokumentace**

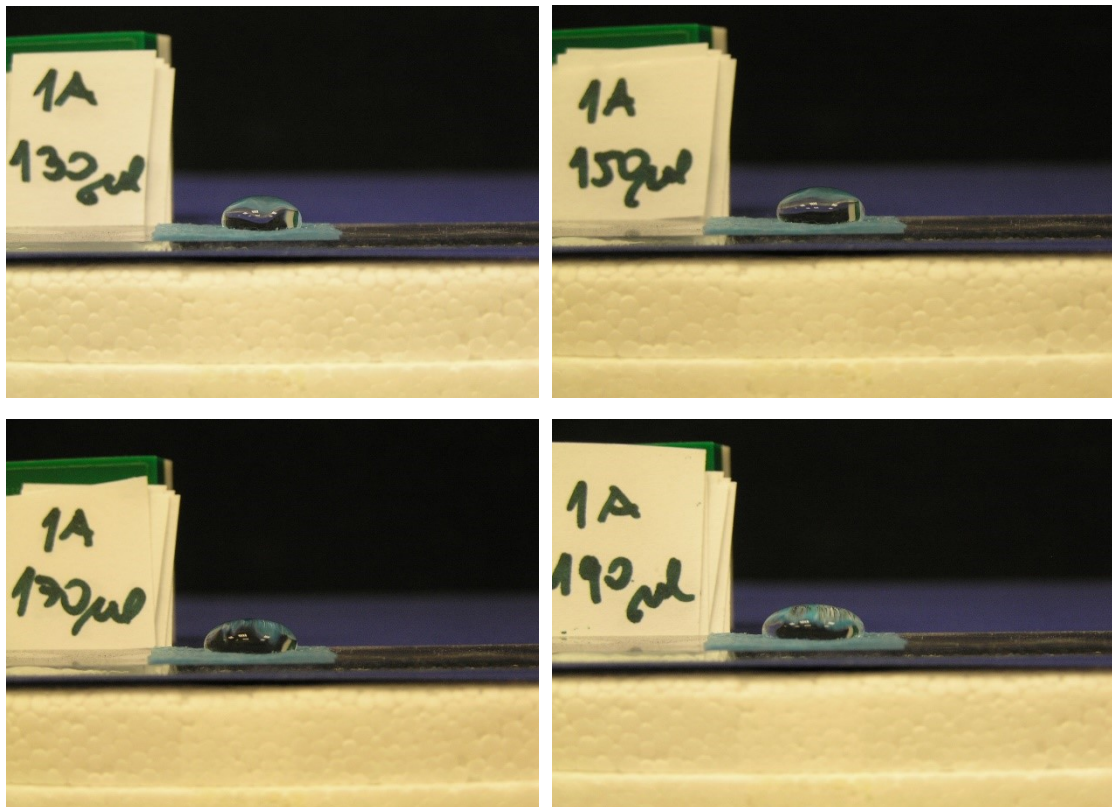
5. DOKUMENTACE

5.1 Mikrofotografické záznamy stacionárních kapek (ukázky)

Obrázek č. 7 Kontakt vody na membráně CHIT-PUR číslo 1 z líce.

Poznámka: Na ostatních vzorcích nanovláknenných membránbylo zobrazení analogické



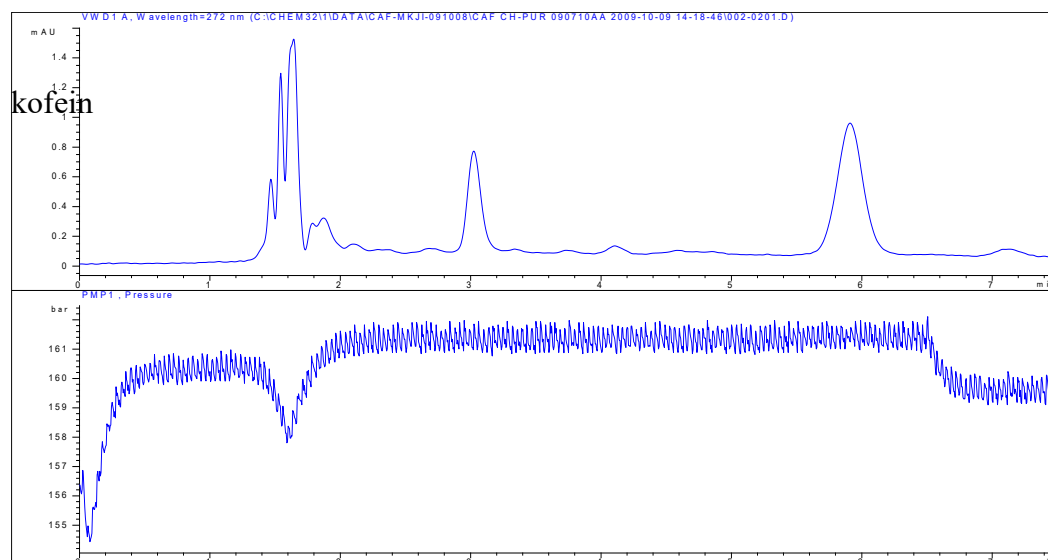


Z výše uvedených ukázek je patrné, že kapka vody mění svůj tvar z kulaté kapičky na elipsoidní útvar, zvětšuje se a nabývá na objemu, nevsakuje se.

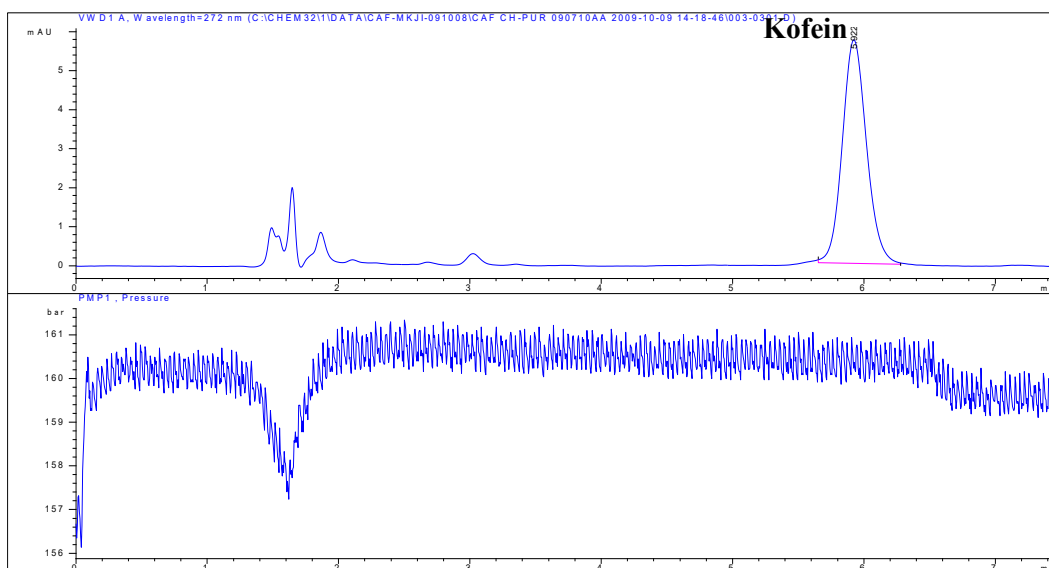
5.2 Záznamy HPLC stanovení

5.2.1 Chromatografické záznamy standardů

Obrázek č. 8 Ukázka záznamu pro standard kofeinu v koncentraci 0,01 mol/l

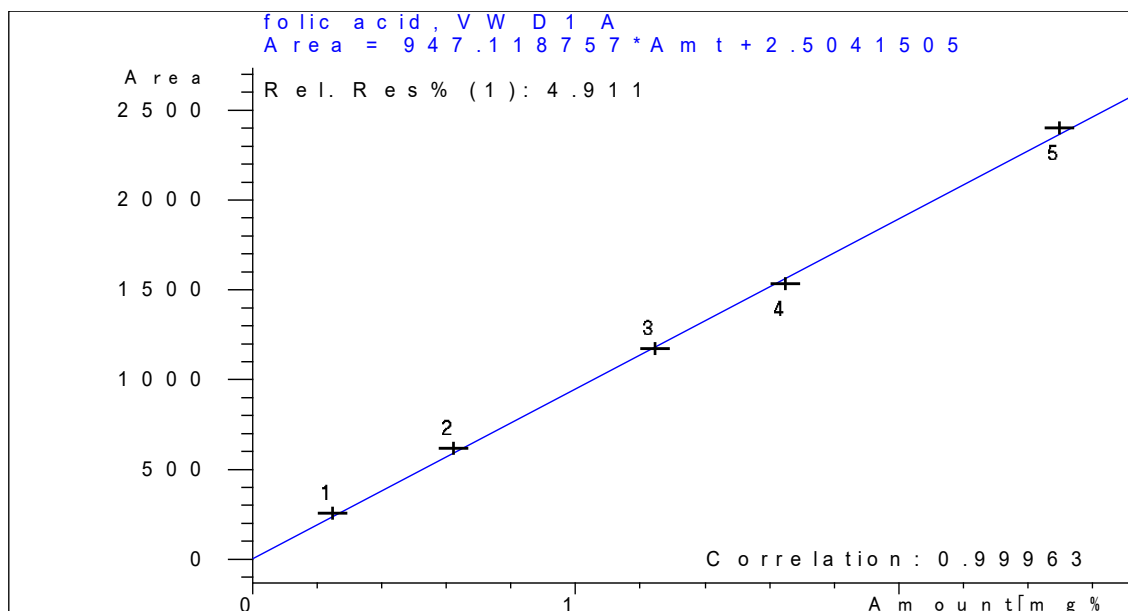


Obrázek č. 9 Ukázka záznamu pro standard kofeinu v koncentraci 0,05 mol/l



Při porovnání dvou předcházejících obrázků č. 8 a č. 9 je patrné, že pík kofeinu je ve své poloze těsně před 6. minutou dobře osamostatněn, bez rizika interference s píky jakýcholi dalších látek. Časové intervaly mezi jednotlivými nástřiky na kolonu byly s rezervou dostatečné.

Obrázek č. 10 Kalibrační závislost kyseliny listové



5.3 Protokoly “dynamických” disolučních experimentů

Protokol 1

V_o	[ml]
T	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o/1\text{cm}^2$

$V_o = 18$

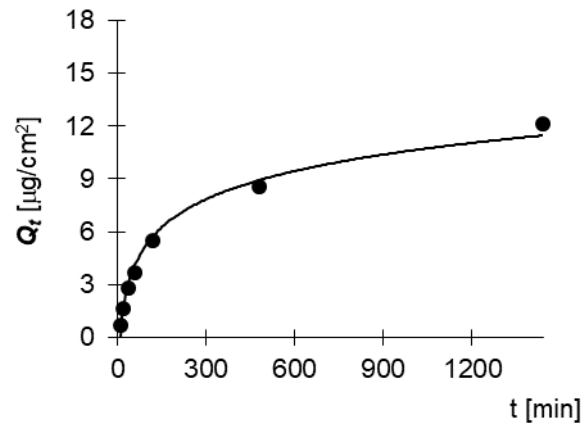
Membr. CHIT-PUR

Látka kofein

Měření: HPLC

T	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,008	0,7	0,008	1,4	0,7
20	0,018	0,7	0,019	3,3	1,7
40	0,030	0,7	0,031	5,6	2,8
60	0,040	0,7	0,041	7,4	3,7
120	0,059	0,7	0,061	10,9	5,5
480	0,092	0,7	0,095	17,1	8,5
1440	0,132	0,7	0,135	24,3	12,2

T	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	0,7	2,9
20	1,7	2,9
40	2,8	3,1
60	3,7	3,2
120	5,5	3,7
480	8,5	6,2
1440	12,2	13,1



Protokol 2

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18$

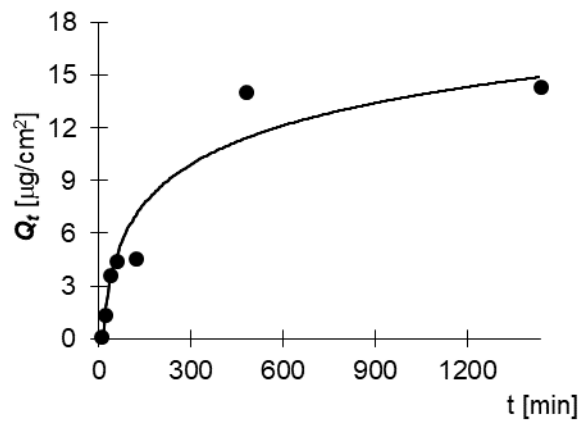
Membr: CHIT-PUR

Donor: kofein

Měření HPLC

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,001	0,7	0,001	0,2	0,1
20	0,015	0,7	0,015	2,6	1,3
40	0,040	0,7	0,040	7,2	3,6
60	0,047	0,7	0,048	8,7	4,4
120	0,048	0,7	0,050	9,0	4,5
480	0,154	0,7	0,156	28,0	14,0
1440	0,153	0,7	0,159	28,6	14,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	0,1	0,1
20	1,3	1,3
40	3,6	3,6
60	4,4	4,4
120	4,5	4,5
480	14,0	14,0
1440	14,3	14,3



Protokol 3

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18$

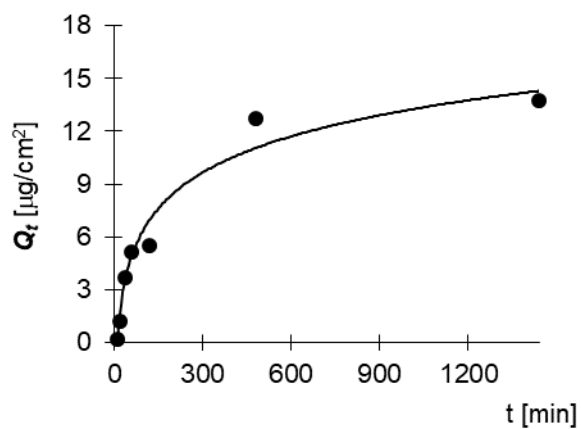
Membr. CHIT-PUR

Donor: kofein

Měření: HPLC

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,002	0,7	0,002	0,3	0,2
20	0,013	0,7	0,014	2,4	1,2
40	0,041	0,7	0,041	7,4	3,7
60	0,055	0,7	0,057	10,2	5,1
120	0,059	0,7	0,061	11,0	5,5
480	0,139	0,7	0,141	25,4	12,7
1440	0,147	0,7	0,152	27,4	13,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
10	0,2	3,5
20	1,2	3,6
40	3,7	3,7
60	5,1	3,9
120	5,5	4,4
480	12,7	7,5
1440	13,7	15,5



Protokol 4

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,2$

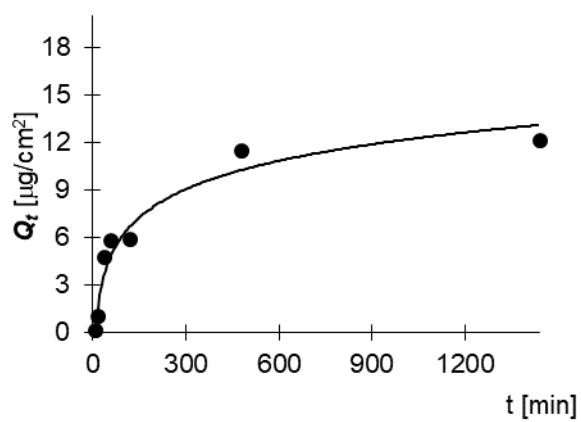
Membr: CHIT-PUR

Donor: kofein

Měření: HPLC

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,001	0,7	0,001	0,2	0,1
20	0,011	0,7	0,011	2,0	1,0
40	0,052	0,7	0,052	9,5	4,7
60	0,062	0,7	0,064	11,6	5,8
120	0,062	0,7	0,065	11,7	5,9
480	0,124	0,7	0,126	23,0	11,5
1440	0,129	0,7	0,134	24,3	12,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	0,1	3,8
20	1,0	3,9
40	4,7	4,0
60	5,8	4,1
120	5,9	4,6
480	11,5	7,1
1440	12,1	13,8



Protokol 5

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,1$

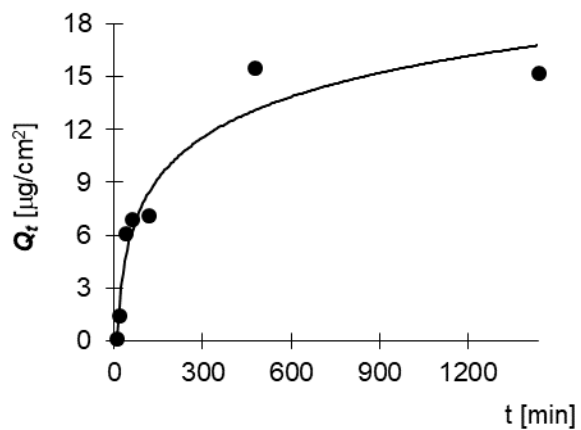
Membr: CHIT-PUR

Donor: kofein

Měření: HPLC

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,001	0,7	0,001	0,2	0,1
20	0,015	0,7	0,015	2,8	1,4
40	0,066	0,7	0,067	12,1	6,1
60	0,073	0,7	0,076	13,7	6,9
120	0,075	0,7	0,078	14,1	7,1
480	0,168	0,7	0,171	31,0	15,5
1440	0,162	0,7	0,168	30,4	15,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	0,1	4,8
20	1,4	4,9
40	6,1	5,1
60	6,9	5,2
120	7,1	5,8
480	15,5	9,0
1440	15,2	17,5



6. VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Hodnocení kontaktních úhlů

Řada procesů spojených s uvolňováním léčiva z prostředí lékové formy a také řada biofyzikálních procesů, které se odehrávají na biologických mezipovrších, je určována tím, jak dobřejsou příslušné povrchy smáčeny relevantní kapalinou. Tato schopnost je kvantifikovatelná hodnotou kontaktního úhlu, který svírá tečna k povrchu kapaliny v místě dotyku kapky s povrchem zkoumané tuhé fáze. Čím je hodnota kontaktního úhlu nižší, tím je smáčení povrchu tuhé látky danou kapalinou lepší.

V **Tab. č.3** je uveden souhrn hodnot naměřených v jednoduchém uspořádání pokusu.

Tabulka č. 3 Hodnoty kontaktních úhlů membrán (z líce)

objem kapky [μ l]	1A [$^{\circ}$]	2A [$^{\circ}$]	3A [$^{\circ}$]	Průměr	smodch
20	131	96,5	132	119,8	20,2
40	116,5	98	114	109,5	10,0
60	122,5	118,5	120,5	120,5	2,0
80	127,5	116	123	122,2	5,8
100	113	116	118	116,0	2,5
120	119	109	116	114,7	5,1
140	117,5	97	131	115,3	17,3
160	125	111	125,5	120,5	8,2
180	118,5	-	-		
200	107	-	-		

Hodnoty kontaktních úhlů byly změřeny z líce a rubu vzorků nanovlákných membrán. Pro hodnocení jsou měření na lící straně membrán. Při předběžném hodnocení bylo ověřeno, že oba povrchy jsou si z hlediska přesnosti měřených hodnot rovnocenné.

Hodnoty u kontaktních úhlů u vyšších nanášek kapaliny se nepodařilo odečíst s dostatečnou spolehlivostí, v tabulce jsou vyznačeny kurzívou.

První odečitatelné hodnoty úhlů poskytla nanáška 20 mikrolitrů. Dobřeměřitelné byly kapky a jejich úhly při 40 mikrolitrech nanesené čištěné vody. Nejlépe potom při 60 mikrolitrech. Při zvyšování objemu kapičky se odečet prováděl subjektivně hůře, odečítané hodnoty více kolísaly, zřejmě také pro různou velikost vláken a porozitu exponovaného povrchu. Hodnoty naměřené při objemu kapičky 160 mikrolitrů a více byly subjektivně odečítány nejobtížněji, resp. se je nepodařilo věrohodněji určit.

Důležité je poznamenat, že k prosáknutí kapaliny kapilaritou přes póry nebo k nasáknutí vody do materiálu nanovlákněného vzorku nedošlo.

První závěr z měření kontaktních úhlů je možné formulovat tak, že hodnocené nanovlákněné PUR-Chitnanomembrány jsou na dostupných površích hydrofobní. V tomto smyslu je výsledek považován za potvrzení hydrofobního charakteru nanovláken. Vliv příměsi chitosanu v PUR vláknech se na celkově hydrofobním charakteru nanovlákněné membrány neprojevil.

Druhým závěrem bylo, že pro praktické navazující uspořádání „statického“ liberačního pokusu vyplynula výstraha, že plánované vrstvení dotyčných nanomembránek může činit problémy z hlediska pravidelnosti i úplnosti jejich smáčení. Jak se později ukázalo, byla tato obava oprávněná. Uspořádání „statického“ liberačního pokusu bylo změněno na „dynamické“ disoluční provedení, které zajišťovalo okamžitý dobrý kontakt povrchu membrán s akceptorovou fází fosfátovým pufrem pH 7,4.

6.2 Výsledky „statického“ liberačního měření kofeinu

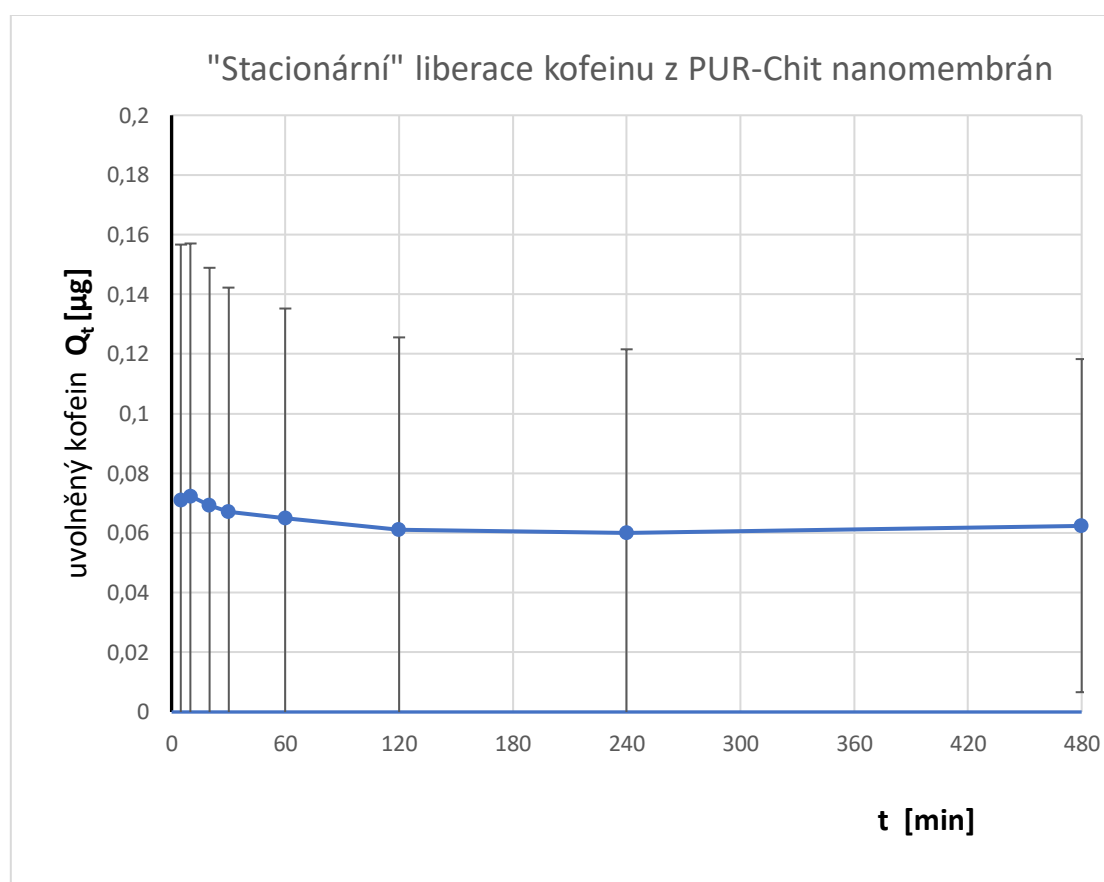
Při provádění „stacionárního“ pokusu, při kterém byly nanovlákněné membrány navrstveny na sebe a zality pufrem pH 7,4 jako aplikační kapalinou, bylo zřejmé, že se špatná smáčivost nanovlákněných membrán projevuje. V jejich složení byl oproti samotným polymerním nanovláknům testovaným z hlediska kontaktních úhlů přítomen kofein v množství, které se do vláken přeneslo z roztoku pro ES s obsahem 5 % kofeinu, ale to zřejmě smáčivost nanovláken neovlivnilo. Prosáknutí navrstvených nanomembránek shora doplňovaným pufrem probíhalo nepravidelně, bublinky vzduchu ve vláknech a mezi membránkami signalizovaly problém.

Stanovení kofeinu v jednotlivých odběrech v akceptorové fázi mělo sice dostatečné chromatografické parametry, jak se ukázalo při stanovení kalibrační závislosti, ale po všech přepočtech získané hodnoty Q_t uvolněného kofeinu z 1 cm² membrány velice kolísaly.

Získané výsledky z liberačního měření jsou prezentovány jednak v části **5. Dokumentace** v ukázkách protokolů (**Protokoly 1 až 5**), a také souhrnným grafem na **Obr. č. 11**. Na něm jsou vyneseny průměrné hodnoty liberovaného kofeinu Q_t [μg] proti času t [min].

Je sice zřejmé, že největší kvantum kofeinu se uvolňuje do 60 až 120 minut pokusu, avšak kolísání jednotlivých hodnot, jak je vystiženo příslušnou směrodatnou odchylkou, neumožňuje tento první náhled považovat za relevantní.

Obrázek č. 11 Průběh „stacionární“ liberace kofeinu z nanovlákněných PUR-Chit membrán s kofeinem (n = 5; SD)

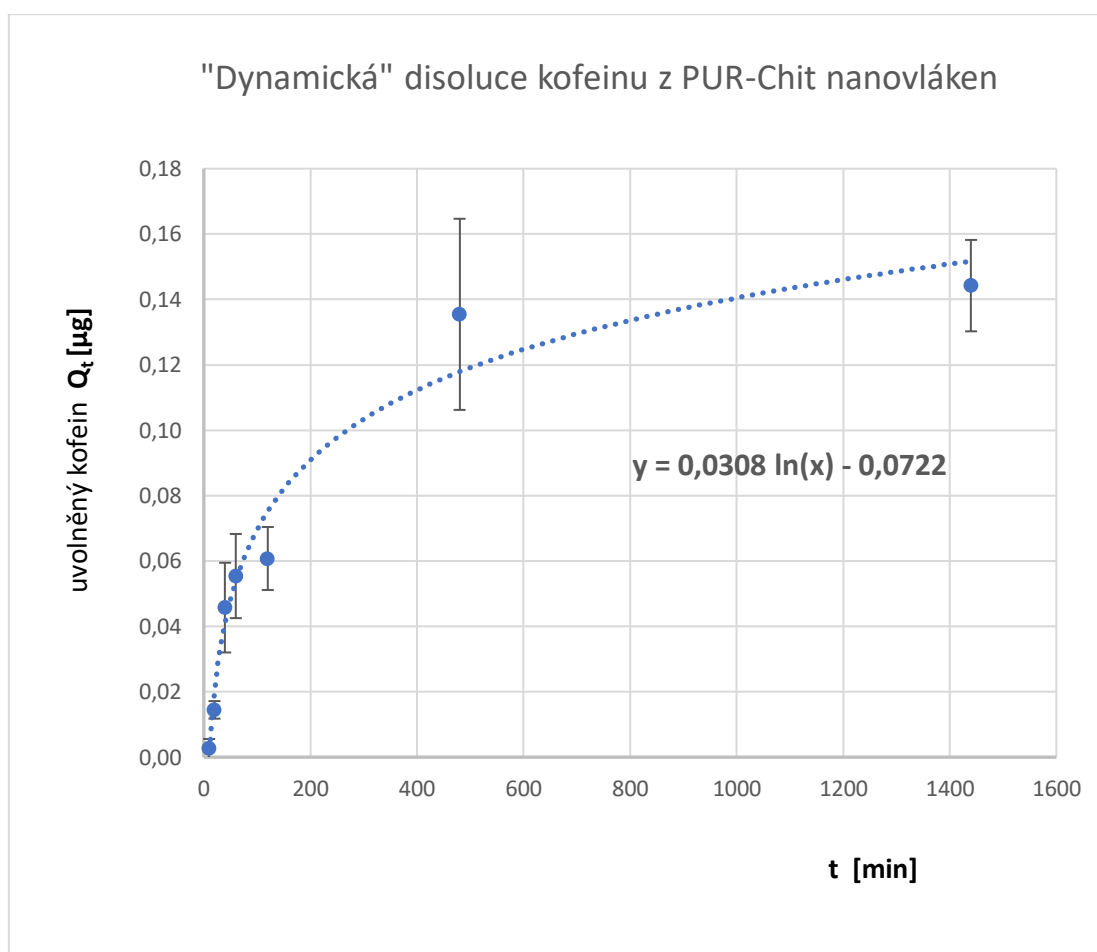


Proto byl následně proveden také „dynamický“ disoluční pokus, při kterém nebyly jednotlivé ústřížky membrán navrstveny na sebe v donorové horní části permeační komůrky, ale byly jednotlivě a volně vloženy do vialek a dispozici pro rozpouštění s promíchaným akceptorovým pufrem pH 7,4.

6.3 Výsledky „dynamického“ disolučního měření kofeinu

Výsledky poskytnuté měřením disoluce kofeinu z PUR-CHIT nanomembrán jsou relativně málo kolísavé, jak je patrné z grafického znázornění průměrných výsledných množství kofeinu v acetoťovém pufru na **Obr. č. 12**. Po přepočtu na množství rozpuštěného kofeinu z jednotkové plochy nanomembrány je patrné, že sedlo 60 minut uvolnilo a rozpustilo více než 1/3 kofeinu a do 6 hodin prakticky všechno uvolnitelné a rozpuštěné množství kofeinu.

Obrázek č. 12 Průběh „dynamického“ rozpouštění kofeinu z nanovlákných PUR-Chitmembrán s kofeinem (n= 6, SD).



Bylo tedy možné říci, že k disoluci kofeinu z hodnocených nanovláken dochází poměrně rychle. Vezmeme-li v potaz první a takřka přímkový úsek disolučního profilu, tak sedlo **1 hodiny** uvolní a rozpustí asi **40 procent** léčiva. Hodnoty příslušných směrodatných odchylek průměrných hodnot (SEM při n=5) jsou v tomto časovém úseku relativně malé.

Zbýlý kofein se potom rozpouští stále, zřetelně již kinetikou 1. řádu, po 6 hodinách se již jeho hodnoty prakticky nezvyšují (pravděpodobně asymptoticky spějí k nějaké rovnovážné, pro daný případ maximální hodnotě.

Na popsaná měření s kofeinem jako modelovým léčivem navazovalo analogické hodnocení disoluce kyseliny listové, tentokrát z nanovlákných membrán z polyvinylalkoholu (PVA) v zesít'ované a nazesít'ované podobě.

6.4 Výsledky disoluce kyseliny listové z PVA nanovláken

Měření rozpuštěného množství kyseliny listové za podmínek dynamického pokusu poskytlo výsledky shrnuté pro jednotlivé nanomembrány v **Tab. č. 4**.

Tabulka č. 4 Hodnoty koncentrací k. listové v akceptorovém pufru při disoluci nanovláken PVA s obsahem 0,49 % léčiva

membrána	Nesit PVA	Nesit PVA	Sit PVA	Sit PVA
navážka [mg]	2,040	2,350	2,390	2,460
t [min]	koncentrace Ck [µg/ml] k. listové v pufru pH 7,4			
5	40,91	49,35	49,18	50,25
7,5	43,00	49,79	50,09	51,49
15	44,43	50,68	50,73	52,73
30	45,75	53,37	53,23	55,45
60	47,39	57,75	56,12	60,02
120	51,39	59,75	60,56	63,69
240	54,24	59,77	63,09	63,77
1440	55,26	64,29	63,79	66,59

U naměřených hodnot se vliv zesítení PVA polymeru výrazněji neprojevuje, vzhledem k počtu opakování daného měření ovšem nelze tento náhled považovat za prokázaný.

Tabulka č. 5 Hodnoty koncentrací k. listové v akceptorovém pufru při disoluci z nanovláken sítovaného PVA s obsahem 3,3 % léčiva

membrána	SitPVA	SitPVA	SitPVA	SitPVA
navážka [mg]	1,0	1,0	1,1	1,0
t [min]	koncentrace Ck [µg/ml] k. listové v pufru pH 7,4			
5	40,91	49,35	49,18	28,7
7,5	43,00	49,79	50,09	29,11
15	44,43	50,68	50,73	29,53
30	45,75	53,37	53,23	30,17
60	47,39	57,75	56,12	30,22
120	51,39	59,75	60,56	30,86
240	54,24	59,77	63,09	31,41
1440	55,26	64,29	63,79	33,2

Je zajímavé, že absolutní hodnoty koncentrací k. listové uvolněné a rozpouštěné z nanovláken s asi 6krát nižší koncentrací léčiva ale vyšší gramáží (cca 2 až 2,5krát) membrány jsou srovnatelné s údaji v **Tab. č. 5**.

Výpočtem z původního (teoretického) obsahu k. listové v 16 cm²nanovláčenných membrán byly zjištěny procentuální hodnoty léčiva disponibilního pro disoluci v pufru pH 7,4 za časový interval 8 hodin. Nalezené hodnoty po 8 hodinách byly považovány při daných podmínkách experimentu za prakticky uvolnitelný podíl.

V procentech je tento podíl vyjádřen takto:

sít'ovaná PVA membrána s k. listovou při 0,49 % v roztoku pro ES	27,26 %
nesít'ovaná PVA membrána s k. listovou při 0,49 % v roztoku pro ES	27,92 %
sít'ovaná PVA membrána s k. listovou při 3,3 % v roztoku pro ES	31,21 %

Na tyto údaje přímo navazuje **Tab. č. 6**, která poskytuje na naměřená data ještě jiný pohled. Obsahuje vypočtené údaje o časovém nárůstu průměrného procentuálního podílu k. listové vzhledem k množství uvolnitelného z nanovláken do 8 hodin od počátku pokusu.

Tabulka č. 6: Hodnoty podílu uvolněné a rozpouštěné kyseliny listové vzhledem k uvolnitelnému množství

čas [min]	podíl léčiva v % z uvolnitelného množství		
	nesít PVA/0,49 %	sít PVA/ 0,49 %	sít PVA/3,3 %
5	74 %	79 %	48 %
7,5	76 %	81 %	50 %
15	78 %	82 %	53 %
30	81 %	85 %	55 %
60	86 %	88 %	59 %
120	91 %	92 %	61 %
240	93 %	94 %	63 %
1440	98 %	98 %	65 %

Výsledky v této tabulce potvrzují, že v případech všech testovaných nanomembrán se kyselina listová uvolňuje z největší části již v prvních 5 minutách pokusu.

Zajímavé je, že v případě nižšího obsahu k. listové v roztoku pronanozvláknění ES (a tedy také nejspíše ve výsledných nanovlákněných membránách) byl procentuální podíl uvolněného množství léčiva vyšší než u membrán s teoreticky vyšším obsahem léčiva, avšak nižší gramáží.

7. ZÁVĚRY

1. Testované nanovlákně PUR-Chit membrány ze směsi polyurethanu a chitosanuse chovají v souladu s charakterem základního polymeru, tedy jako hydrofobní. Nanovláknění se v tomto smyslu neprojevilo, kapilarita prostřednictvím pórů v membráně nebyla pozorována. Nejvíce homogenní výsledky byly získány při nanáše čistěné vody v objemu 40 mikrolitrů.
2. Pro praktické uspořádání liberačních pokusů je nutné s nesmáčivostí a nenasákavostí těchto membrán počítat a upřednostnit disoluční provedení, které zajistí okamžitý dobrý kontakt povrchu membrán s akceptorovou fází.
3. Ve statickémliberačním pokusu se nepodařilo kofein uvolněný z PUR-Chit nanovláken uspokojivě stanovovat. Problém nečinila analytická HPLC metoda, ale právě nepravidelná a neúplná smáčivost vláken.
4. V dynamickém disolučním pokusu bylo dokumentováno, že se kofein z testovaných hydrofobních PUR-Chitnanovláken dostává do akceptorové fáze fosforečnanového pufru pH 7,4 zpočátku velmi pravidelně, do 60 minut se uvolnilo asi 40 procent kofeinu.
5. V disolučním pokusu s membránami s obsahem kyseliny listové v nanovlákněch PVA zesíťovaných i nezesíťovaných došlo k velmi rychlé liberaci a rozpuštění léčiva v řádu minut.
6. Minimálně 50 %, ve většiněpřípadů však cca75 % ze zvlákněnéhmnožství kyseliny listové bylo v akceptorovém pufru prokázáno již po 5 minutách.

8. LITERATURA

- ¹Ihraczká J: Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 4. Polyethylentetrafluotethylen, polyamid 6/12, polyaramid, želatina. Diplomová práce, 2009. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové. 92 s.
- ²Jitendra N. Tiwari, Rajanish N. Tiwari b, Kwang S. Kim: Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science* (2012) 57, 724–803.
- ³ Su B, Wu YC, Jiang L: The art of aligning one-dimensional (1D) nanostructures. *Chem Soc Rev* 2012 (41), 7832–56.
- ⁴ Yao X, Song YL, Jiang L: Applications of bio-inspired special wettable surfaces. *Adv Mater* 2011 (23), 719–34.
- ⁵ Xia F, Jiang L: Bio-inspired, smart, multiscale interfacial materials. *Adv Mater* 2008 (20), 2842–58.
- ⁶ Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, Duvail JL, Jiang XY, et al.: Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog Polym Sci*, 2014 (39), 862–90.
- ⁷Mareš L: Nanotextilie v průmyslové praxi. *Průmyslové spektrum. Trendy/Plasty*, 2009 s. 28. <https://www.mmspektrum.com/clanek/nanotextilie-v-prumyslove-praxi.html>. Dostupné 21.10. 2019.
- ⁸ Vrbata P: Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv. I. Disertační práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové. 2015. 164 s.
- ⁹Mitchell GR, Ahn K-H, Fred DJ: The potential of electrospinning in rapid manufacturing processes. *Virtual Phys Prototyp* 2011 (6), 63-77.
- ¹⁰Lukáš D, Sarkar A, Martinová L, Vodsed'álková K, Lubasová D, Chaloupek J, Pokorný P, Mikeš P, Chvojka J and Komárek M: Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*. 2009 (41), 59-140.
- ¹¹Stránská D: Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv. II. Disertační práce. Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové. 2018. 125 s.

-
- ¹²Bhardwaj, N., Kundu, S.C: Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* 2010 (28), 325–347.
- ¹³ Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, Yong T, Ma Z, Ramaseshan R. Electrospun nanofibers: Solving global issues. *Mater Today* 2006, (9), 40–50.
- ¹⁴ Megelski S, Stephens JS, Chase DB, Rabolt JF. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules* 2002 (35), 8456–66.
- ¹⁵ Stepanyan R, Subbotin A.V, Cuperus L, Boonen P, Dorschu M, Oosterlinck F, Bulters M.J.H.: Nanofiber diameter in electrospinning of polymer solutions: Model and experiment. *Polymer* 2016 (97) 428-439
- ¹⁶ Malik R, Garg T, Goyal AK, Rath G. Polymeric nanofibers: Targeted gastro-retentive drug delivery systems. *J Drug Targeting* 2015 (23), 109–24.
- ¹⁷ Lee J, Kwon H, Seo J, Shin S, Koo JH, Pang C, et al. Conductive fiber-based ultrasensitive textile pressure sensor for wearable electronics. *Adv Mater* 2015 (27). 2433–9.
- ¹⁸ Abdul Khalil HPS, Davoudpour Y, Bhat AH, Rosamah E, Tahir PM: Electrospun cellulose composite nanofibers. In: Pandey JK, Takagi H, Nakagaito AN, Kim HJ (Eds). *Handbook of polymer nanocomposites processing, performance and application*. Heidelberg, Springer; 2015. s. 191–227.
- ¹⁹ Topuz F, Uyar T: Electrospinning of gelatin with tunable fiber morphology from round to flat/ribbon. *Mater Sci Eng (C)*, 2017 (80), s. 371–8.
- ²⁰ Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH: Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer* 2005 (46), s. 5094–102
- ²¹ Nadri S, Nasehi F, Barati G: Effect of parameters on the quality of core-shell fibrous scaffold for retinal differentiation of conjunctiva mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2017 (105), s. 189–97.
- ²² Sill TJ, von Recum HA: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008 (29), s. 1989–2006.
- ²³ Vrieze, S.D., Camp, T.V., Nelvig, A., Hagstrom, B., Westbroek, P., Clerck, K.D., 2009. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J. Mater. Sci.* 44, 1357–1362.

-
- ²⁴Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W, Lim T, Ma Z: An introduction to electrospinning and nanofibers. Singapore. World Scientific Publishing Co. 2005, 396 s. ISBN-13: 978-981256454. 285-291
- ²⁵ Mitchell GR, Ahn KH, Davis FJ: The potential of electrospinning in rapid manufacturing processes. *Virtual Phys Prototyp* 2011 (6), 63–77.
- ²⁶ Park JH, Lee HW, Chae DK, Oh W, Yun JD, Deng Y, et al.: Electrospinning and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan oligosaccharide/clay nanocomposite nanofibers in aqueous solutions. *Colloid Polym Sci* 2009 (287) 943–50
- ²⁷ Liao Y, Zhang L, Gao Y, Zhu ZT, Fong H: Preparation, characterization, and encapsulation/release studies of a composite nanofiber mat electrospun from an emulsion containing poly(lactic-co-glycolic acid). *Polymer* 2008 (49), 5294–9.
- ²⁸ Gupta P, Wilkes GL: Some investigations on the fiber formation by utilizing aside-by-side bicomponent electrospinning approach. *Polymer* 2003 (44), 6353–9.
- ²⁹ Horst M, Madduri S, Milleret V, Sulser T, Gobet R, Eberli D: A bilayered hybrid microfibrillar PLGA–acellular matrix scaffold for hollow organ tissue engineering. *Biomaterials* 2013 (34), 1537–45.
- ³⁰ Canejo JP, Borges JP, Godinho MH, Brogueira P, Teixeira PIC, Terentjev EM: Helical twisting of electrospun liquid crystalline cellulose micro- and nanofibers. *Adv Mater* 2008, (20), 4821–5.
- ³¹ Gu BK, Shin MK, Sohn KW, Kim SI, Kim SJ, Kim SK, et al.: Direct fabrication of twisted nanofibers by electrospinning. *Appl Phys Lett* 2007 (90), 1–3
- ³² Dayal P, Liu J, Kumar S, Kyu T: Experimental and theoretical investigations of porous structure formation in electrospun fibers. *Macromolecules* 2007 (40), 7689–94.
- ³³ Wei M, Kang B, Sung C, Mead J: Core-sheath structure in electrospun nanofibers from polymer blends. *Macromol Mater Eng* 2006 (291), 1307–14.
- ³⁴ Li D, Xia Y.: Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning. *Nano Lett* 2004 (4), 933–8.
- ³⁵ Technologie Nanospider (2019). Dostupné [2019-12-08] z <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>
- ³⁶ Peter R: Technologie Nanospider společnosti Elmarco (2007). Dostupné [2019-12-08] z <http://www.gate2biotech.cz/nanospider-technologie/>.

-
- ³⁷Jirsák, O., Lukáš, D., Sanetrník, F. Výroba a vlastnosti nanovláken (2003). Dostupné [2008-10-07] z: www.ft.vslib.cz/depart/knt/nove/dokumenty/studmaterialy/ntt/nanoact.ppt
- ³⁸Kvasničková, A: Nanotextilie v průmyslové praxi (2009), Dostupné [2009-10-07] z <http://www.mmspektrum.com/clanek/nanotextilie>.
- ³⁹ Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP: A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003 (24), 2077–82.
- ⁴⁰ Smith LA, Ma PX: Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf B* 2004 (39),125–31.
- ⁴¹Jirsák, O., Lukáš, D., Sanetrník, F. Výroba a vlastnosti nanovláken (2003).Dostupné z: www.ft.vslib.cz/depart/knt/nove/dokumenty/studmaterialy/ntt/nanoact.ppt[2009-10-07].
- ⁴²Mittelbach, J., kalab, V. Nanotechnologie z Liberce mají budoucnost I za oceánem, 2009. Dostupné z <http://www.nanocon.cz/sbornik/Lists/Papers/046.pdf>[2009-10-07].
- ⁴³Lederer J: Polyuretany. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwia3_mO66XmAhUFELAKHZg4AmMQFjAEegQIBBAI&url=http%3A%2F%2Fchemistry.ujep.cz%2Fuserfiles%2Ffiles%2FPolyuretany.pdf&usg=AOvVaw07tcMt92erfe84hB_as2ny. Dostupné [2019-12-08]
- ⁴⁴Kultys A, Rogulska M, Głuchowska H: The effect of soft-segment structure on the properties of novel thermoplastic polyurethane elastomers based on an unconventional chain extender. *Polymer Intern.* 2011 (60), 652-659.
- ⁴⁵Zhang JY, Beckman EJ, Piesco NP, Agarwal S: A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro, *Biomaterials* 2000, (21), 1247–1258.
- ⁴⁶Hacker C, Karahaliloglu Z, Seide G, Denkbass EB, Gries T.: Functionally modified,melt-electrospun thermoplastic polyurethane mats for wound-dressing applications, *J Appl Polym Sci* 2014, (8) 131.
- ⁴⁷Akduman C, Kumbasar EPA: Electrospun Polyurethane Nanofibers, *Aspects of Polyurethanes*, Faris Yilmaz, IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.69937. Dostupné [2019-12-07] z <https://www.intechopen.com/books/aspects-of-polyurethanes/electrospun-polyurethane-nanofibers>

-
- ⁴⁸Kupilík, V. Konstrukce pozemních staveb – požární bezpečnost staveb. Přednášky, Praha, 2004. Dostupné [2019-10-07].
- ⁴⁹Pecina P, Pecina J: Materiály a technologie - plasty. Masarykova univerzita, Brno 2006. ISBN 80-210-4100-5.
- ⁵⁰Teo WE and Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006; (17) R89. DOI: 10.1088/0957-4484/17/14/R01
- ⁵¹Wannatong L, Sirivat A and Supaphol P. Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: Preliminary study on polystyrene. *Polymer International*. 2004, (53), 1851-1859. doi: 10.1002/pi.1599
- ⁵²Oprea S. Effect of solvent interactions on the properties of polyurethane films. *High Performance Polymers*. 2005; **17**(2):163-173. DOI: 10.1177/0954008305045688
- ⁵³Cay A, Akcakoca Kumbasar EP, Akduman Ç. Effects of solvent mixtures on the morphology of electrospun thermoplastic polyurethane nanofibres. *Tekstil Konfek* 2015; (25), 38-46
- ⁵⁴ Lukáš D, Sarkar A, Pokorný P: Self organization of jets in electrospinning from free surface, *J Appl Physics* 2008, (103). 10.1063/1.2907967
- ⁵⁵Militký, J: *Textilní materiály v medicíně*, Liberec, 2009. Dostupné [2019-10-07] z <http://www.ft.vslib.cz/clutex/data/HOSPIMedica/01Militky.pdf>
- ⁵⁶Švorčík V, Kolářová K. Goniometrické stanovení povrchové smáčivosti materiálů. Dostupné [2019-10-07] z <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijnimaterialy/labsvl-001/n111043-1.pdf>.
- ⁵⁷Víková M.: Goniometrické stanovení kontaktního úhlu a povrchové energie. <http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/zamestnanci/vikova.martina/teaching/11smac3.pdf> Dostupné [2019-10-07].
- ⁵⁸Bartovská, L., Šišková, M. *Integrovaný systém elektronických studií opor*, Praha, 2005. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es001/motor/main.copyright.html. Dostupné [2008-10-06].
- ⁵⁹KwokDY, NeumannAW: Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interface Sci* 1999 (81), 167-249

⁶⁰Nowak E, Combes G, Hugh Stitt E. b, Pacek W: A comparison of contact angle measurement techniques applied to highly porous catalyst supports. *Powder Technol* 2013 (233), 52–64