

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**katedra farmaceutické technologie**

**studijní program: farmaceutická technologie**



**Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 5.**

Nanofiber membranes as drug carriers 5.

**Rigorózní práce**

**Michal Beneš**

školitel: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, březen 2010

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškeré informační zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v textu řádně vyznačeny.

**Děkuji** Doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, Csc. za odborné vedení práce a za cenné rady.

**Děkuji** Mgr. Pavlu Berkovi za pomoc a vstřícnost při zpracování a vyhodnocení výsledků.

# Obsah

---

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
3.1. STRUKTURA A CHARAKTERISTIKA CHITOSANU .....	8
3.2. ROZPUSTNOST CHITOSANU .....	9
3.3. CHEMICKÉ MODIFIKACE CHITOSANU .....	11
3.4. DERIVÁTY CHITOSANU .....	14
3.4.1. <i>O- a N-karboxymethylchitosany</i> .....	14
3.4.2. <i>Trimethylované, N-sukcinylované, thiolované a azidované chitosany</i> .....	14
3.4.3. <i>Alkylované chitosany</i> .....	15
3.4.4. <i>Chitosany s methoxyfenylovou skupinou</i> .....	16
3.4.5. <i>Sacharidové deriváty chitosanu</i> .....	16
3.4.6. <i>Hydrofobní chitosany</i> .....	16
3.4.7. <i>Chemicky roubované chitosany</i> .....	17
3.5. CHITOSAN JAKO URYCHLOVAČ ADSORPCE .....	17
3.6. BIODROPATIBILITA A BIODEGRADABILITA CHITOSANU A JEHO DERIVÁTŮ .....	17
3.7. ELEKTROSPINING CHITOSANU .....	19
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
4.1. STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI V NANOVLÁKENNÝCH MEMBRÁNÁCH .....	23
4.2. KONCENTRACE KOFEINU V SYTÍCÍM MÉDIU PO SYCENÍ MEMBRÁN .....	24
4.2.1. <i>Stanovení kofeinu</i> .....	26
4.3. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN.....	29
4.3.1. <i>Stanovení kofeinu</i> .....	31
4.4. LIBERACE INKORPOROVANÉHO KOFEINU Z MEMBRÁN .....	31
4.4.1. <i>Stanovení kofeinu</i> .....	32
4.5. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN PO DLOUHODOBÉ ELUCI .....	33
4.5.1. <i>Stanovení kofeinu</i> .....	34
<b>5. DOKUMENTACE</b> .....	<b>35</b>
5.1. STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI V NANOVLÁKENNÝCH MEMBRÁNÁCH .....	35
5.2. KONCENTRACE KOFEINU V SYTÍCÍM MÉDIU PO SYCENÍ MEMBRÁN .....	36
5.3. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN.....	37
5.4. LIBERACE INKORPOROVANÉHO KOFEINU Z MEMBRÁN .....	52
5.5. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN PO DLOUHODOBÉ ELUCI .....	61
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>62</b>
6.1. STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI V NANOVLÁKENNÝCH MEMBRÁNÁCH .....	62
6.2. KONCENTRACE KOFEINU V SYTÍCÍM MÉDIU PO SYCENÍ MEMBRÁN .....	62
6.3. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN.....	65
6.3.1. <i>Gravimetrické stanovení kofeinu</i> .....	65

6.3.2. Stanovení kofeinu metodou HPLC.....	67
6.4. LIBERACE INKORPOROVANÉHO KOFEINU Z MEMBRÁN .....	70
6.5. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN PO DLOUHODOBÉ ELUCI .....	73
<b>7. ZÁVĚRY .....</b>	<b>76</b>
7.1. STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI V NANOVLÁKENNÝCH MEMBRÁNÁCH .....	76
7.2. KONCENTRACE KOFEINU V SYTÍCÍM MÉDIU PO SYCENÍ MEMBRÁN .....	76
7.3. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN.....	76
7.3.1. Gravimetrické stanovení kofeinu .....	76
7.3.2. Stanovení kofeinu metodou HPLC.....	77
7.4. LIBERACE INKORPOROVANÉHO KOFEINU Z MEMBRÁN .....	77
7.5. LIBERACE KOFEINU Z IMPREGNOVANÝCH MEMBRÁN PO DLOUHODOBÉ ELUCI .....	77
<b>8. SOUHRN .....</b>	<b>78</b>
<b>9.ABSTRACT .....</b>	<b>79</b>
<b>10. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY .....</b>	<b>80</b>
10.1. BĚŽNÉ .....	80
10.2. MĚŘENÍ LIBERACE KOFEINU .....	80
<b>11. OZNAČENÍ VZORKŮ .....</b>	<b>81</b>
<b>12.LITERATURA.....</b>	<b>82</b>

# 1. Úvod

---

Rigorózní práce s názvem „Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 5. navazuje na stejnojmenné diplomové práce (s podtituly). Ty byly vyhotoveny na základě spolupráce katedry farmaceutické technologie FaF UK a společnosti Elmarco, Liberec. Spolupráce mezi oběma subjekty pokračuje i nadále a jedním z jejich dalších výsledků je předkládaná rigorózní práce.

Předmětem jejího zájmu je biopolymer chitosan, u něhož se předpokládá velký potenciál pro využití ve farmacii a v biomedicíně. Především na tento polymer se zaměřuje nejen teoretická, ale i experimentální část předkládané práce. Teoretická část přináší širší informace především o rozpustnosti chitosanu a jeho interakcích s biologickým prostředím. Zaměřuje se na základní parametry roztoku chitosanu, z něhož se elektrospiningem získávají nanomembrány. V experimentální části jsou popsány pokusy zaměřené na charakteristiky, které souvisejí s uchováváním léčivého přípravku, kde je nanomembrána nosičem léčiva. Dále jsou provedeny pokusy, kde nanomembrána jako nosič léčiva ovlivňuje jeho uvolňování.

Rigorózní práce přináší nové informace a v mnohém doplňuje výše uvedenou diplomovou práci. Její zaměření podrobněji specifikuje využití nanomembrán k podávání léčiv. Snahou je podat další informace, které by vedly k objasnění a lepšímu pochopení závěrů vyplývajících z experimentů práce diplomové. Obě zmíněné práce pracují s informacemi, které zatím nemají nárok na okamžité praktické využití, a to s ohledem na dlouhotrvající proces objasňování vlastností související s trvajícím exkluzivitou použitých materiálů a v mnoha ohledech i jedinečností jejich vlastností. Potenciálu materiálů tohoto typu bude možné naplno využít tehdy, bude-li probíhat další systematický výzkum.

## 2. Cíle práce

---

Zadání předkládané rigorózní práce úzce souvisí se závěry mojí diplomové práce obhájené v roce 2009 (1). Tyto se týkají nasákavosti nanomembrán, související s obsahem vlhkosti a způsobem uchování nanomembrán a s chováním léčiva adsorbovaného na povrch nanomembrán.

Neochota nanomembrán z hydrofilních polymerů přijmout a udržet hydrofilní médium ověřená ve zmíněné diplomové práci vedla k záměru ověřit, jak se změny obsah vlhkosti změnou způsobu uchování. Dalším poznatkem, který vyplynul z pokusů provedených v rámci diplomové práce je, že nanovláknenné membrány zpomalují uvolňování modelového hydrofilního léčiva z lipofilního vehikula použitého k impregnaci nanomembrán.

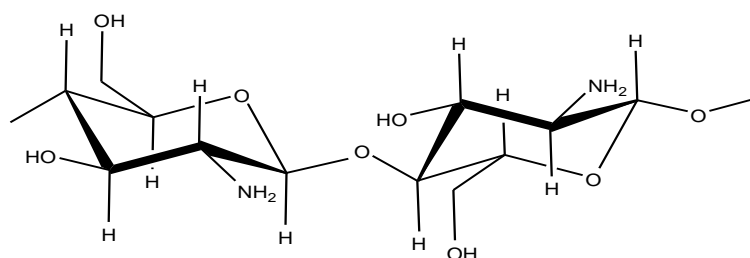
Tato rigorózní práce představuje řadu experimentů zkoumajících schopnost hydrofilního léčiva adsorbovat se na povrch nanomembrán a jeho následnou liberaci in vitro.

1. V teoretické části je jejím cílem shrnout poznatky o chitosanu a jeho hlavních derivátech se zaměřením na jejich rozpustnost a interakci s biologickým prostředím.
2. Dílčí cíle v experimentální části jsou tyto:
  - Zjistit vliv způsobu uchování vzorků nanomembrán na obsah vlhkosti.
  - Zhodnotit změny ve složení sytícího média po sycení membrán.
  - Určit množství kofeinu, které je schopné uvolnit se z povrchu membrán po jejich impregnaci, a to včetně popisu kinetiky tohoto děje.
  - Určit podíl kofeinu inkorporovaného ve vláknech, který je schopen se uvolnit, a to včetně popisu kinetiky tohoto děje.
  - Určit maximální uvolnitelné množství kofeinu z membrán s obsahem inkorporovaného i adsorbovaného kofeinu.
  - Na základě provedených pokusů vymezit podobnost vzorku nanomembrány neznámého složení se vzorky definovanými.

# 3. Teoretická část

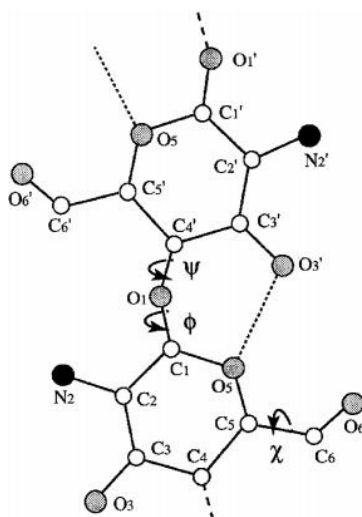
## 3.1. Struktura a charakteristika chitosanu

Chitosan je derivát chitinu, druhého nejběžnějšího přírodního polysacharidu, z něhož se získává alkalickou deacetylací. Chitosan je kopolymer N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukosaminu. Hlavní řetězec polymeru je poskládán z jednotek D-glukosaminu spojených v polohách  $\beta$ -1,4 s vysokým stupněm N-acetylace. Struktura chitosanu je velmi podobná celulóze, rozdíl je v substituci na C-2, kde v případě chitosanu je aminoskupina a v případě celulózy hydroxyskupina.



**Obr. 3.1.** Struktura chitosanu

Chemický název chitosanu je  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopyranosa. (1) V pevném stavu je chitosan semikrystalický polymer. V literatuře je popsáno mnoho polymorfních forem. Samostatný krystal chitosanu je možné získat úplnou deacetylací chitinu s nízkou molekulární hmotností. Krystal je uspořádán v kosočtverečné soustavě s jednotlivými rozměry  $a = 0,807\text{nm}$ ,  $b = 0,844\text{nm}$ ,  $c = 1,034\text{nm}$ . Elementární buňka krystalu je složena ze dvou antiparalelních chitosanových řetězců. Struktura je vlivem působení inter- a intramolekulárních vodíkových vazeb rigidní. Hlavní intramolekulární vodíkové vazby jsou v polohách O3 $\rightarrow$ O5 a intermolekulární v polohách N2 $\rightarrow$ O6 (viz obr. 3.1). (2), (3), (4) Rigidní struktura způsobená přítomností vodíkových vazeb a vysoká krystalinita přispívá k tomu, že je chitosan nerozpustný v běžných organických rozpouštědlech. Snížením molekulové hmotnosti a redukcí krystalinity neuspořádanou deacetylací se významně zlepší rozpustnost ve zředěných kyselinách a umožní zpracování chitosanu do různých forem (vlákna, membrány). (5)



**Obr. 3.2.** Chemická struktura chitosanu. Znázorněny jsou úhly  $\psi$  a  $\phi$ , které definují konformaci řetězce; intermolekulární H-vazby zde zobrazeny nejsou. (2)

### 3.2. Rozpustnost chitosanu

Název chitosan označuje mnoho polymerů, které se liší stupněm deacetylce (40 % až 98 %) a molekulovou hmotností (50 000 až 2 000 000). Tyto dvě charakteristiky jsou velmi důležité pro fyzikálně – chemické vlastnosti chitosanu a z toho důvodu mají velký vliv i na vlastnosti biologické. (1) Chitosan má zásaditý charakter s hodnotami pKa 6,2 až 7,0 pro každou aminoskupinu v poloze C-2 D-glukosaminové jednotky.(1) V kyselém prostředí (např. kyseliny chlorovodíkové, octové, glutamové, mléčné, jablečné, citronové, askorbové, pyrohroznové) (6) jsou primární aminoskupiny protonizovány, čímž se polymer stává pozitivně nabitým polysacharidem s vysokou nábojovou hustotou (každá glukosaminová jednotka nese jeden kladný náboj). (1) Kladně nabitý polyelektrolyt tvoří rozpustné soli s anionty kyselin. (4) Na rozpustnost chitosanu má rozhodující vliv hodnota pH roztoku a pKa kyseliny, která způsobuje ionizaci chitosanu. Míra ionizace chitosanu je dána hodnotou pKa polymeru, která je vysoce závislá na stupni deacetylce. (1), (4) Při pKa chitosanu 6,2 až 7,0 je hranice rozpustnosti vymezena hodnotami pH 6,0 až 6,5. Chitosany s nízkým stupněm deacetylce ( $\leq 40\%$ ) jsou rozpustné až do pH = 9, zatímco vysoce deacetylované chitosany ( $\geq 85\%$ ) jsou rozpustné jen do pH = 6,5. (4)

V zásaditém prostředí, je chitosan deprotonizovaný, ztrácí elektrický náboj i rozpustnost a z roztoku precipituje. (4) Tuto vlastnost je možné využít při

čištění chitosanu kdy je polymer nejprve rozpuštěn v kyselině a filtrován, úpravou pH na hodnotu přibližně 7,5 přidavkem NaOH nebo  $\text{NH}_4\text{OH}$  je potom z roztoku precipitován, vymyt a usušen. (3) Nerozpustnost chitosanu je dána jeho semikrystalickou strukturou se značnými inter- i intramolekulárními vodíkovými vazbami, které zvyšují hustotu kohezivní energie. (4)

Strukturální podobnost chitosanu a celulózy vedla mnoho autorů nejprve ke zkoušení rozpouštědel používaných pro rozpouštění celulózy. Mnoho z těchto rozpouštědel je však toxických, korozivních nebo mutagenních. V mnoha případech jsou tato rozpouštědla silnými kyselinami, fluorovanými a chlorovanými alkoholy, která mohou chitosan rozložit. Navíc jsou s takto zkoušenými rozpouštědly spojeny problémy při převodu z laboratorního do provozního měřítka – rozpouštění může zahrnovat několikanásobnou penetraci rozpouštědlem nebo bobtnání. Pro použití v medicíně proto nejsou vhodná. (4) V dalších organických rozpouštědlech (dimethylformamid, dimethylsulfoxid) není chitosan rozpustný. V okyselených polyolech (polyethylenglykol, glycerol-2-fosfát) se chitosan naopak rozpouští velmi dobře. Nejpoužívanějším rozpouštědlem je 1% kyselina octová o pH přibližně 4. Dobře se rozpouští také v 1% kyselině chlorovodíkové a zředěné kyselině dusičné. V kyselině sírové a fosforečné je chitosan nerozpustný. Koncentrovaná kyselina octová může při vysoké teplotě způsobit depolymerizaci chitosanu (4) stejně jako kyselina dusitá. Reakce s kyselinou dusitou je selektivní, rychlá a snadno říditelná. Stechiometrie a produkty této reakce jsou dobře známy. K depolymerizaci chitosanu je vhodný také peroxid vodíku, jehož působením vznikají oligomery bez přidružených bočních reakcí i za pokojové teploty. Možná je také enzymatická depolymerizace prostřednictvím různých hydrolas – např. lysozym, pektinasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, a amylasa. (2) Enzymatická metoda zajišťuje chemickou jednotnost produktu. Vysoké náklady na pořízení specifických enzymů (např. chitosanas) však obvykle brání průmyslovému využití. (7)

Rozpustnost chitosanu je ovlivněna mnoha dalšími faktory. Jsou jimi také podmínky deacetylace (teplota, doba, koncentrace zásady, poměr množství chitinu k roztoku zásady nebo velikost částic). Dále rozpustnost chitosanu závisí také na iontové koncentraci roztoku. (4) Přídavek soli zvyšuje iontovou

sílu roztoku a rozpustnost chitosanu se tím sníží. Je to dáno neutralizací náboje zvyšující se koncentrací párového iontu. Molekulová hmotnost a distribuce acetylových skupin v hlavním chitosanovém řetězci hrají také významnou roli při rozpouštění. Bylo zjištěno, že pro dosažení vyšší rozpustnosti ve vodném roztoku je třeba, aby rozložení acetylových skupin bylo neuspořádané. (3), (4)

### 3.3. Chemické modifikace chitosanu

Naděje na zlepšení vlastností chitosanu mají původ v úspěšných úpravách chemicky podobné molekuly celulózy. (5) Možnosti pozměnění struktury chitosanu jsou ale podstatně mnohostrannější nežli srovnatelné změny v molekule celulózy. Ke změně vlastností lze využít vedle chemické modifikace hydroxy- skupin v polohách C-3 a C-6, také reaktivitu primární aminoskupiny v poloze C-2. (4), (5) Většina obměn molekuly chitosanu se uplatňuje zejména z důvodu zvýšení rozpustnosti chitosanu, ale také z důvodu zlepšení dalších chemických a mechanických vlastností. Rozpustnost substituovaných derivátů chitosanu v neutrálních a bazických médiích zvyšuje možnosti použití ve farmacii, v kosmetice a v dalších odvětvích. Hygroskopická kapacita upravených vzorků může být užitečná například při formování polymerních filmů, nebo k tvorbě membrán, sloužících ke krytí ran a jejich hojení. (4) Nevýhodou takto připravených derivátů chitosanu je jejich nižší stabilita, například ve srovnání s analogickými deriváty chitinu. Důvodem snížené stability je hydrofilní charakter derivátů a obzvláště pH senzitivita. Je také důležité poznamenat, že vyšší standardnosti získaných produktů a opakovatelnosti postupů modifikace je dosaženo při použití vysoce deacetylovaného chitinu jako výchozí suroviny. Tato úprava zajišťuje jednotnost vstupního materiálu a usnadňuje kontrolu kvality před provedením modifikace. (3) V literatuře je popsána celá řada obměn molekuly chitosanu, avšak následující text se zaměřuje na úpravy, které souvisejí se změnou rozpustnosti, a dále na nadějně deriváty použitelné v oblasti farmacie a biomedicíny. (3), (4)

Významnou úpravou chitosanu je síťování činidly jako epichlorhydrin, diisokyanát, nebo 1,4-butandieoldiglycidylether. Síťování se provádí ve směsi škrobu a chitosanu: škrob je oxidován za tvorby polyaniontu (polyaldehyd),

který reaguje s aminoskupinou chitosanu v přítomnosti redukčního činidla. (3) Ideálním síťovadlem je pro svou rozpustnost ve vodě i organických rozpouštědlech polyethylenglykol. Ten je široce používaným univerzálním materiálem v medicínských aplikacích s nízkou toxicitou i imunogenitou. (5)

Z úprav chitosanu lze dále zmínit N-acylaci. Zavedení objemného substituentu je obecně považováno za úpravu způsobující zvýšení rozpustnosti nerozpustného polymeru. Tato znalost byla využita například při přípravě triethylchitosanu. Vysoce N-triethylovaný chitosan chlorid je rozpustný ve vodě při pokojové teplotě. Ke stejnému účelu slouží také N-acetylace acetanhydridem, při níž množství anhydridu v reakční směsi rozhoduje o stupni acetylace. Rozpustnost derivátu chitosanu, který je takto acetylován z poloviny, se s rostoucí molekulovou hmotností nemění, je-li jako rozpouštědlo použita voda. V alkalickém prostředí se takto upravený chitosan rozpouští tím hůře, čím větší je jeho molekulová hmotnost. Bylo také pozorováno, že chitosan acetylovaný anhydridem s velmi vysokou rozpustností ve vodě si zachovává svou antibakteriální aktivitu. N-acylaci je možné provést dvěma různými zbytky, například acetylovým a butyrylovým. Vzniká tak smíšený ester s velkou molekulovou hmotností a s dobrou rozpustností ve vodě. Tato reakce probíhá v prostředí kyseliny methansulfonové, která zároveň slouží jako katalyzátor. Poměr butyrylových a acetylových zbytků se může měnit v rozmezí 1:0,62 až 1:0,72. S úspěchem byly dále zkoušeny také N- a O- sukcinylace, které pozitivně ovlivňují rozpustnost (4), (8)

Mastné kyseliny s hydrofobním hlavním řetězcem a hydrofilní koncovou skupinou mohou také rozpustnost polymerů zvyšovat. N-acylace chitosanu chloridy různých mastných kyselin zvyšují hydrofobní charakter a způsobují důležité změny ve struktuře chitosanu. Nejlepší mechanické vlastnosti a vlastnosti využitelné v oblasti nosičů léčiv byly nalezeny u palmitoyl chitosanu (stupeň substituce 40% až 50%). Působením 2% (v/v) vodného roztoku kyseliny octové a metanolu na chitosan N-substituovaný anhydridy mastných kyselin byl získán derivát rozpustný ve vodě. (4)

Příprava karboxymethyl- derivátů chitosanu znamenala průlom v oblasti úprav molekul polymerů zejména pro velké možnosti různých aplikací. Vodíkové vazby v takto derivatizovaném chitosanu jsou přerušeny

hydrofobními methylovými skupinami a solubilita je zvýšena přítomností karboxylových skupin. Proces vlastní karboxymethylace je velmi podobný jako u celulózy: chitosan je vystaven působení chloroctové kyseliny v přítomnosti koncentrovaného hydroxidu sodného. (4) Karboxymethylovaný derivát je citlivý k lysozymu, a jeho oligomery jsou degradovány N-acetylglucosaminidasou. Je proto vhodný pro použití v medicíně, například při regeneraci kostí. (2)

S objevem rozpoznávání buněk, virů a bakterií podle molekul cukrů, začaly být zkoušeny obměny chitosanu buněčně-specifickými cukry, které způsobí zvýšení hydrofility chitosanu a rozrušení vodíkových vazeb mezi aminoskupinami. Připojení hydrofilní molekuly cukru, glukonové kyseliny, nebo N-acetylce chitosanu nesoucího cukr, tak výrazně zvyšuje rozpustnost ve vodě. Například mezi cukry nesoucími chitosany je nejlépe rozpustný derivát s fruktózou, jehož rozpustnost dosahuje hodnoty 17,1g/l. Dále je-li stupeň acetylce u N-acetylovaného chitosanu nesoucího 29%, až 63% cukru, je takový derivát rozpustný v celém rozpětí pH. S ohledem na výtěžek, rozpustnost a pH stabilitu, je glukosaminovaný chitosan považován za optimální derivát rozpustný ve vodě. Zavedení disacharidu (maltóza, manóza, galaktóza, laktóza) také znamená signifikantní zvýšení rozpustnosti ve vodě. U chitosanu nesoucího maltózu zůstává rozpustnost zachována i tehdy, přiblíží-li se pH hodnotě 10. Hydrofilně-hydrofobní deriváty byly získány připojením laktózy a alkylu na aminoskupiny chitosanu. Tyto polymery vykazují excelentní rozpustnost ve vodě. (4)

Další metodou, jak získat vodorozpustné deriváty, je enzymatická hydrolýza, která navíc zajišťuje produkt s nízkou molekulovou hmotností. Postupuje se tak, že se částečně deacetylovaný chitosan vystaví působení polyethylenglykol-dialdehyddiethylacetalu. Dochází k Schiffově reakci a ke vzniku odpovídajících aldiminů nebo ketiminů. Ty mohou být konvertovány na N-alkyl deriváty hydrogenací borohydridem. (2) Vzniklý produkt je resorbovatelný, a proto vhodný pro biomedicínské aplikace. (4)

Obecně lze rozpustnost polymerů zvýšit také zavedením kvarterní amoniové nebo fosfoniové skupiny. Příkladem konkrétního derivátu může být N-[(2-hydroxy-3-trimethylamoniumpropyl)]chitosan chlorid, připravený

zavedením amoniové skupiny na aminoskupiny chitosanu, nebo N-methylenfosfonium chitosan. (4)

Roubovaná kopolymerizace je také metoda, jíž lze dosáhnout zlepšení rozpustnosti. Na chitosan se roubojí polární jednotky, rozpustnost roubovaných polymerů se navíc značně zvyšuje po adsorpci měďnatých iontů. Takový polymer je kompletně rozpustný ve zředěné kyselině chlorovodíkové. (4)

## 3.4. Deriváty chitosanu

### 3.4.1. O- a N-karboxymethylchitosany

Karboxymethylchitosany jsou nejprobádanějšími deriváty chitosanu. Jde o amfoterní deriváty, jejichž rozpustnost je závislá na pH prostředí. Získávají se reakcí s chloracetátem sodným v přítomnosti hydroxidu sodného při kontrolovaných reakčních podmínkách. (3) N-karboxymethylchitosan lze připravit reakcí s glyoxylovou kyselinou v přítomnosti redukčního činidla. Produktem je směs monokarboxymethylovaného (-NH-CH<sub>2</sub>COOH), dikarboxymethylovaného (-N(-CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>) a N-acetylovaného chitosanu. Pro získání vodorozpustného derivátu je potřeba, aby byly výchozí látky ve správném poměru. Nutné je dodržet ekvimolární množství glyoxylové kyseliny a reagujících aminoskupin. N-karboxymethylchitosan je jako 1% roztok (o pH=4,80) hodnotnou účinnou složkou kosmetických krémů. Jeho zvlhčující účinky na pokožku jsou dlouhotrvající a jsou považovány za silnější než účinky hyaluronové kyseliny. Schopnost N-karboxymethylchitosanu tvořit tenké filmy přispívá k pocitu jemnosti/hebkosti pokožky a k ochraně před nepříznivými vlivy prostředí nebo před důsledky použití detergentů. Dalším výzkumem bylo potvrzeno, že mono-N-karboxymethylchitosan je použitelný jako enhancer pro intestinální absorpci anionických polymerů, například nízkomolekulárních heparinů. (2)

### 3.4.2. Trimethylované, N-sukcinylované, thiolované a azidované chitosany

Kationické polymery včetně chitosanu je možné použít k tvorbě komplexů a následnému přenosu opačně nabitých polymerů (proteiny, polyanionty,

DNA). Použití těchto elektrostatických komplexů je velmi široké, mezi hlavní oblasti patří příprava antitrombogenních materiálů, tvorba aplikačních systémů léčiv s kontrolovaným uvolňováním, enkapsulace léčiv, imobilizace enzymů a buněk, nosiče genů. (3) Jako nosič DNA může sloužit například trimetylchitosan chlorid (80% stupeň kvarternizace) nesoucí galaktózový zbytek připojený přes 6-O karboxymethylovou skupinu. V důsledku silných bazických vlastností kvarterní amoniové skupiny je trimethylamoniumchitosan vhodnější k přenosu plazmidové DNA než prostý chitosan. (2)

Mukoadhezivní systémy pro podávání léčiv jsou výhodné z důvodů lokalizace léčiva na cílovém místě, prodloužení času potřebného pro absorpci nebo z důvodu zesíleného kontaktu s mukózou, což zajišťuje zvýšený koncentrační gradient léčiva. Nedávné studie naznačují, že polymery nesoucí thiolové skupiny vykazují mnohem silnější adhezivní vlastnosti než běžně používané mukoadhezivní polymery. Jako příklad je možné zmínit konjugát chitosanu s kyselinou thioglykolovou, jehož adhezivní vlastnosti odpovídají desetinásobku neupraveného chitosanu. (2)

Zajímavé biomedicínské vlastnosti přidává chitosanu i další chemická modifikace – připojení kyseliny p-azidobenzoové a laktobionové k chitosanovému řetězci. Touto úpravou vznikne fotosíťovatelný chitosan, který po ozáření UV světlem vytváří kaučukovitý hydrogel. Takto vzniklý hydrogel má vynikající přilnavost ke tkáním, výraznou schopnost stahovat rány a urychlovat jejich uzavírání a hojení. Tento materiál je proto vhodný jako tkáňové lepidlo v chirurgických aplikacích. (2)

### 3.4.3. Alkylované chitosany

Alkylované chitosany jsou velmi důležité amfifilní polymery. Prvním derivátem z této skupiny byl chitosan alkylovaný do vysokého stupně substituce desetiuhlíkatým řetězcem navázaným glykosidickou vazbou. Tento derivát je při zahřátí nad 50°C schopen tvořit gely. Redukční aminací je možné získat sérii amfifilních derivátů s různou délkou postranních řetězců ( $C_n$  3 až 14). Stupeň substituce se obvykle udržuje pod 10%, aby byla zachována rozpustnost derivátů v kyselých roztocích. Alkylované chitosany s dobrou rozpustností při  $pH < 6$  mají velké množství velmi

zajímavých vlastností, mezi které patří například povrchová aktivita. Povrchové napětí snižují tyto látky relativně málo, zato velmi zlepšují stabilitu mezifázového rozhraní. Oproti jednodušším tenzidům mají naprosto odlišné chování. Vzhledem k hydrofobním interakcím mezi postranními řetězci, obzvláště jsou-li tyto řetězce 12-uhlíkové a stupeň substituce přibližně 5%, jsou tyto sloučeniny schopné tvořit gely. Vznik gelu je závislý na pH prostředí a na koncentraci solu a jeho existence je založena na rovnováze mezi elektrostatickými repulzními silami pozitivně nabitých chitosanových řetězců a hydrofobních přitažlivých sil mezi alkylovými řetězci.

Alkylované chitosany jsou kompatibilní s neutrálními a kationaktivními tenzidy. Bylo prokázáno, že kationické tenzidy, které jsou adsorbované na alkylových řetězcích vázaných k chitosanu, podporují jejich rozpustnost. (3)

#### **3.4.4. Chitosany s methoxyfenylovou skupinou**

Vanilin (3-methoxy-4hydroxybenzaldehyd), syringaldehyd (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd) a veratraldehyd (3,4-dimethoxybenzaldehyd) reagují s chitosanem za normálních i redukčních podmínek. Tyto reakce udělují chitosanu nerozpustnost a další vlastnosti. Polymerní film získaný z veratraldehydu je biodegradabilní a mechanicky odolný. (2)

#### **3.4.5. Sacharidové deriváty chitosanu**

Praktické využití by jako hepatospecifický nosič léčiva mohl nalézt laktosylovaný N-sukcinylochitosan. Zkoušen byl jako nosič mitomycinu do jaterních metastáz. Galaktosylovaný chitosan připravený z kyseliny 4-O- $\beta$ -galaktopyranosyl-D-glukonové a chitosanu je zase vhodný jako syntetická náhrada extracelulární matrix hepatocytů. (2)

#### **3.4.6. Hydrofobní chitosany**

Spojování hydrofobních polymerů rozpustných ve vodě je novou skupinou průmyslově důležitých makromolekul. Hydrofobní deriváty chitosanu mohou být snadno získány z chlorovaných acylů s dlouhým řetězcem a anhydridů. Některé z nich jsou určeny k napodobování endotoxinů. (2)

### 3.4.7. Chemicky roubované chitosany

Jedním z nejprozkoumanějších derivátů je chitosan roubovaný polyethylenglykolem. Výhodnou vlastností takto upraveného chitosanu je jeho vodorozpustnost, která je závislá na stupni substituce polyethylenglykolem. (3) Kopolymery s obsahem kyseliny mléčné jsou vzhledem ke své biodegradabilitě široce užívané jako šicí materiál. Jako polymery tvořící pH-senzitivní gely mají potenciální využití při formulaci léčivých přípravků, zejména pro přípravky aplikované do specifických oddílů gastrointestinálního traktu. (2)

## 3.5. Chitosan jako urychlovač adsorpce

Efektivní absorpci léčiv s proteinovou nebo peptidovou strukturou přes mukózy brání jejich vysoká molekulová hmotnost. Nízká biodostupnost potom vede k dosažení pouze subterapeutických hladin léčiv v plazmě. Z tohoto důvodu je nutné mnoho léčiv podávat invazivně – intravenózně, což navíc může způsobovat nízkou compliance pacientů. Je proto velmi důležité zvýšit biodostupnost makromolekulárních látek přes sliznice a dosáhnout tak terapeutických hladin těchto léčiv. Hlavními požadavky na terapeutický systém pro podání makromolekulárních léčiv je prodloužení pobytu léčiva v oblasti, ze které se vstřebává, udržení stability léčiva a zvýšení permeability léčiva do systémové cirkulace. Chitosan je vysoce účinný jako urychlovač penetrace pro peptidy a jejich analogy in vivo, je-li v daném prostředí rozpustný. Při neutrálním pH, jako je například v tenkém střevě, je chitosan nerozpustný (viz. výše) a jako urychlovač penetrace nepůsobí. V prostředí takového charakteru lze problém vyřešit použitím rozpustného derivátu (např. již zmíněný N-trimethylchitosan). (1) Urychlující efekt chitosanu je vysvětlován jeho schopností uvolňovat těsné spoje (tight junctions) mezi epiteliálními buňkami, což umožňuje transport makromolekulárních léčiv přes dobře organizované epitely. (9)

## 3.6. Biokompatibilita a biodegradabilita chitosanu a jeho derivátů

Biokompatibilita krytí na rány vyrobených z různých derivátů chitosanu byla různými laboratořemi hodnocena v následujícím pořadí: chitosan

hydrochlorid < chitosan glutamát < chitosan-glykolát < chitosan-laktát < methylpyrrolidonchitosan. Hodnocení bylo provedeno na základě posouzení rozsahu rozpadu erytrocytů po 24hodinovém působení roztoku příslušné chitosanové soli, nebo, v jiném případě, posouzením výsledků 72hodinové inkubaci chitosanových solí s fibroblasty. Chitosan hydrochlorid v tomto pokusu způsobil inhibici růstu asi v rozsahu 70% až 80%, zatímco methylpyrrolidonchitosan způsobil jen 35% inhibici. Ve srovnání s poly-L-lysinem (jiný biokompatibilní polymer) vykazuje chitosan hydrochlorid 4krát nižší toxicitu. Bylo také prokázáno, že použití chitosanu při hojení ran předchází nadměrnému tvoření jizev. Provedené studie tedy potvrdily, že chemické modifikace poskytují chitosanu vedle nových chemických vlastností také vylepšené biologické charakteristiky. (2)

Uvedených poznatků již bylo využito i v praxi, při přípravě různých typů krytí na rány. Připraveno bylo například biosyntetické krytí složené z houbovité vrstvy chitosanu a kolagenu potažené gentamycin sulfátem. Klinické testy tohoto přípravku proběhly s dobrými výsledky. Navržen byl také gel vyplňující rány získaný z chitosan-malátu, propylenglykolu, arabské klovatiny a rohovníkové gumy. (2)

Protože jsou chitosan a jeho deriváty navrhovány pro rozsáhlé použití v medicíně, je důležité znát jejich chování při rozkladu v organismu. Chitosan je považován za vysoce biodegradabilní. Je snadno exkretován močí, v těle není nikde deponován. Tato tvrzení jsou potvrzena například pokusy s intraperitoneální aplikací chitosanu u myší. Inkubací chitosanu s lysozymem a plazmou myší byla hodnocena také in vitro biodegradabilita. (2) Vedle lysozymu je chitosan degradován i dalšími enzymy, konkrétně N-acetyl-D-glukosaminidasou a lipasami. V lidském těle je značná část materiálů s obsahem chitosanu depolymerizována. Vzniklé oligomery jsou dále hydrolyzovány na N-acetylglukosaminy – běžně se vyskytujícími aminocukry, které buď vstupují do přirozených metabolických drah a jsou tak začleněny do glykoproteinů, anebo jsou vyloučeny jako oxid uhličitý. (2)

Biodegradabilita chitosanu (resp. derivátů) není závislá na stupni deacetylace. Studován byl také vliv fyzikálních parametrů, jako je porozita nebo průměr vláken uspořádaných do membrán. Membrány s vyšší porozitou jsou degradovány rychleji. Je-li porozita membrán stejná, ale liší-li

se průměr vláken, je nepatrně rychlejší degradace membrány s menším průměrem vláken. Kromě toho, neovlivňují morfologické rozdíly mezi dvěma membránami přilnavost k buňkám. (4)

### 3.7. Elektrospining chitosanu

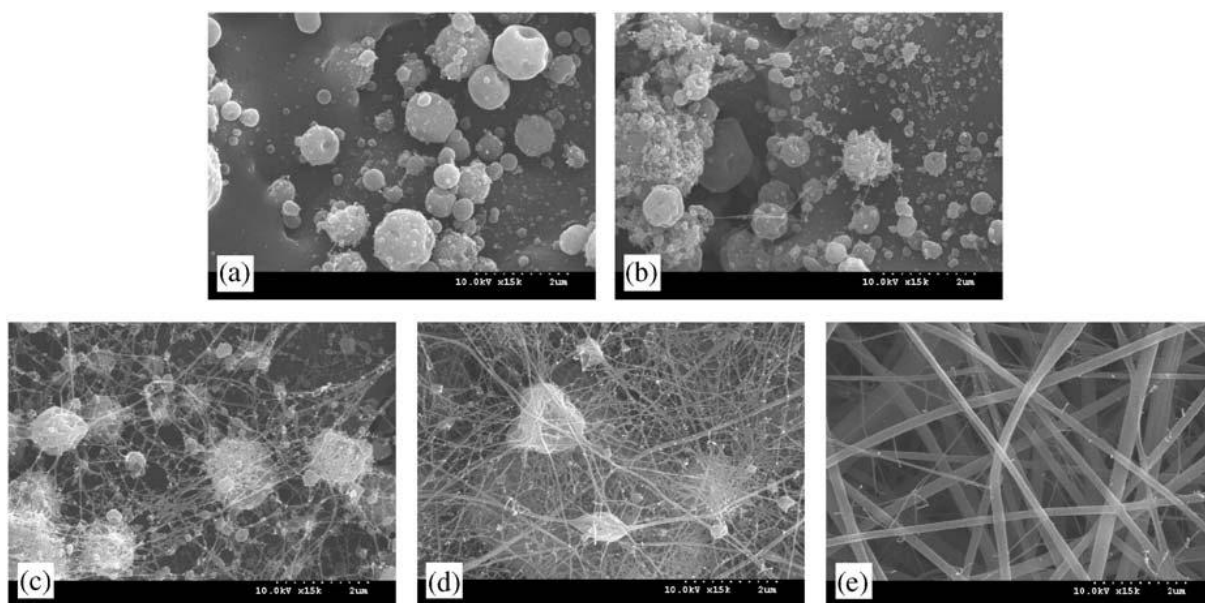
Důležité parametry pro elektrospining polymerů jsou dány nastavením vlastního zařízení pro elektrospining – tedy velikosti elektrického napětí mezi dvěma elektrodami, vzdálenost kolektoru od kapilární elektrody, rychlost průtoku taveniny nebo roztoku, atd., a také vlastnosti polymeru a jeho rozpouštědla (molekulová hmotnost, viskozita, vodivost, povrchové napětí). (10) Elektrospining je velmi komplexní proces a kvalita výsledného produktu je závislá na všech uvedených faktorech. (11) Proces elektrospiningu, resp. vlastní tvorba vlákna, je zahájen v okamžiku, kdy elektrostatická síla překoná povrchové napětí roztoku. To vyžaduje přísun velmi vysokého napětí, které však také vyvolá expanzi roztoku, což má přímý vliv na kvalitu výsledných vláken. Obvykle je tímto snížen průměr a zvýšeno riziko tvorby korálkovitých zrn (viz obr 3.3.a) na vláknech. Průtok roztoku určuje množství polymeru, které je dostupné pro zvláknění. Zvýšení průtoku způsobuje postupné zvýšení průměru vláken a velikosti zrn. Také vnitřní průměr kapilární elektrody ovlivňuje průběh elektrospiningu. Menší průměr redukuje riziko ucpání trysky a tvorbu zrn na vláknech. Vzdálenost kapiláry od kolektoru má přímý vliv na dobu, po kterou je vlákno unášeno silou elektrostatického pole, má také vliv na hodnotu síly tohoto elektrostatického pole. Je-li tato vzdálenost snížena, sníží se doba unášení vlákna a také čas pro odpaření rozpouštědla. Při nižší vzdálenosti je také možné snížit sílu elektrického pole, což má za následek menší míru formování zrn na vláknech. Snížení vzdálenosti mezi oběma elektrodami má na průběh elektrospiningu téměř stejný efekt jako zvýšení napětí mezi těmito elektrodami. (11)

Konfigurace zařízení pro elektrospining je zásadně závislá na materiálu (polymer + rozpouštědlo), který se má zvláknovat. Fyzikální a chemické parametry roztoku polymeru jako jsou například viskozita, vodivost, koncentrace polymeru a rozpouštědla, ovlivňují tvorbu a morfologii výsledných vláken. Nejvýznamnějšími komplikacemi v elektrospiningu

chitosanu je jeho špatná rozpustnost a vysoká viskozita jeho vodných roztoků. (12)

Rozpouštědlo použité k přípravě roztoku polymeru má během elektrospiningu dvě hlavní úlohy. První z nich je vytvořit molekulám takové prostředí, aby se mohly formovat do proudu elektricky nabitého polymeru. Druhá je přenést molekuly solvatovaného polymeru ke kolektoru, kde se molekuly rozpouštědla rychle odpaří a na kolektoru zanechají molekuly polymeru uspořádané do vláken. Výběr správného rozpouštědla je hlavním předpokladem úspěšného průběhu elektrospiningu. (13)

Chitosanová vlákna byla dosud elektrospiningem připravena především ze směsi chitosanu a polyethylenoxidu a ze směsi chitosanu a polyvinylalkoholu. Čistá chitosanová vlákna byla získána z roztoku koncentrované kyseliny trifluoroctové s přidavkem dimethylsulfoxidu (14), nebo z roztoku chitosanu v 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. (11), (15) Použitím těchto toxických rozpouštědel je však limitováno praktické využití hotových vláken. Toxická jsou tato rozpouštědla také pro životní prostředí. Vysoká je i cena těchto rozpouštědel. Dále lze čistá chitosanová vlákna připravit z roztoku chitosanu v koncentrované kyselině octové. (11) Koncentrace kyseliny octové výrazně ovlivňuje povrchové napětí roztoků chitosanu, jehož velikost udává hranice schopnosti zvlákňování. S rostoucí koncentrací kyseliny octové (10% až 90% m/m) výrazně klesá povrchové napětí (54,6mN/m až 31,5mN/m), aniž by se výrazně zvýšila viskozita tohoto roztoku. Naopak čistá kyselina octová nerozpustí dostatečné množství chitosanu a z takového roztoku nelze vlákna elektrospiningem získat. (10)



**Obr. 3.3.** Mikrofotografie vláken získaných elektrospiningem při různých koncentracích (% m/m) kyseliny octové: (a) 10, (b) 30, (c) 50, (d) 70, (e) 90; 4kV/cm, 7% (m/m), chitosan 106000g/mol. (10)

Dalším faktorem, který ovlivňuje viskozitu roztoku je koncentrace chitosanu. (14) Při nízkých koncentracích polymeru neobsahuje roztok dostatečné množství materiálu pro tvorbu souvislých vláken. S rostoucí koncentrací polymeru rychle roste počet přímých vazeb mezi jednotlivými řetězci polymeru, dokud roztok nedosáhne kritické hodnoty, při níž je tvořena trojrozměrná síť vazeb a vzniká viskózní gel, bránící dalšímu průběhu elektrospingu. Gel je tak viskózní, že elektrické pole svou silou nestačí na překonání jeho povrchového napětí. (12),(15) Viskozita tak významně ovlivňuje schopnost zvlákňování daného roztoku, ale i morfologii vzniklých vláken. (12) Do určité míry lze vliv viskozity snížit zahřátím roztoku. Případně je možné množství inter- a intramolekulárních vodíkových vazeb redukovat přidáním močoviny. (15) Podobně jako koncentrace chitosanu, ovlivňuje schopnost zvlákňování i molekulová hmotnost polymeru. Příliš nízká molekulová hmotnost způsobuje spíše než tvorbu vláken zvýšenou tvorbu zrn polymeru, zatímco příliš vysoká molekulová hmotnost vede k utváření vláken s větším středním průměrem. (10) Je-li jako výchozí surovina použit chitosan s velkou molekulovou hmotností je možné ho před použitím vystavit působení roztoku hydroxidu sodného, který hydrolyzuje dlouhé řetězce a molekulovou hmotnost tak sníží. (11)

V různých zdrojích lze nalézt parametry roztoků experimentálně ověřené pro přípravu stejnoměrných a jednotných chitosanových vláken bez zrněk nezvlákněného polymeru<sup>1</sup>:

- vlákna se středním průměrem 70nm je možné získat ze 3% roztoku chitosanu (s molekulovou hmotností 190 000 až 310 000g/mol) v 90% kyselině octové, při napětí 2,0kV/cm (14)
- podle jiného zdroje vzniknou uniformní vlákna pouze ze 7% roztoku chitosanu (s molekulovou hmotností 106 000g/mol) v 90% kyselině octové, při napětí 3kV/cm až 5kV/cm, střední průměr vláken je v tomto případě 60nm (10)
- poslední sledovaný zdroj uvádí vznik vláken se středním průměrem 250nm, vzniklých ze 7% a 7,5% roztoků chitosanu (s mol. hmotností 294 000) v 80% resp. 70% kyselině octové při napětí 1,06kV/cm. (11)

---

<sup>1</sup> Podrobné podmínky elektrospinningu viz citované zdroje.

## 4. Experimentální část

Polymerní nanomembrány hodnocené v této práci byly vyrobeny elektrospiningem v poloprovodních podmínkách a byly k tomuto účelu dodány firmou Elmarco, s.r.o., Liberec. Jako druhý polymer byl při zvlákňování použit polyurethan, který byl nanesen ve druhém technologickém kroku na chitosanovou vrstvu. Tak vznikl materiál, který je z jedné strany chitosanem, z druhé polyurethanem.

Všechny použité suroviny byly kvality lékopisné nebo vyšší. Čištěná voda a voda pro HPLC pochází z centrální přípravný na FaF UK a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

### 4.1. Stanovení obsahu vlhkosti v nanovláčkových membránách

#### Přehled materiálů

složení vzorku	označení během pokusu
chit 2,0g/m <sup>2</sup> , PUR 0,3g/m <sup>2</sup>	2
chit 1,2g/m <sup>2</sup> , PUR 0,7g/m <sup>2</sup>	3
slepý vzorek	6

Tab. 4.1. Materiál – stanovení obsahu vlhkosti

#### Přehled přístrojů

název/typ přístroje	Příslušenství	Popis	výrobce
Sartorius 2004MP	-	analytické váhy	Sartorius GmbH, Německo

Tab. 4.2. Přístroje - stanovení obsahu vlhkosti<sup>2</sup>

#### Provedení pokusu

Z každé membrány bylo nařezáno 10 vzorků o velikosti 18mm x 20mm. Tyto vzorky byly označeny dále uvedeným číselným kódem: X.1 až X.10<sup>3</sup>. Všechny vzorky membrán byly zváženy ihned po nařezání a dále po 12 a po 22 hodinách uchování v exsikátoru nad silikagelem. Obsah vlhkosti

<sup>2</sup> V tomto pokusu byl použit pouze jediný přístroj bez příslušenství.

<sup>3</sup> V uvedeném číselném kódu znamená X číselné označení membrány (tj. 2,3,6 dle tabulky 4.1.), číslo kódového označení je pořadovým číslem vzorku dané membrány. Toto označení je společné pro všechny úlohy, případné změny/výjimky jsou v textu řádně vyznačeny.

v nanovlákných membránách je dán rozdílem hmotností před a po pobytu vzorku v exsikátoru.

## 4.2. Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po sycení membrán

### Přehled materiálů

viz tabulka 4.1.

### Přehled surovin

Název	výrobce/dodavatel
chitosan 93,6%	Elmarco, s.r.o., Liberec
kofein	Kulich, Hradec Králové
kyselina mravenčí 98%	Lach-Ner, s.r.o., Neratovice
methanol pro HPLC (Methanol Chromaslov®)	Sigma-Aldrich, Praha
propylenglykol	Kulich, Hradec Králové
voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové
voda pro HPLC	FaF UK, Hradec Králové

**Tab. 4.3.** Suroviny – koncentrace kofeinu v sytícím médiu po sycení membrán

### Přehled přístrojů

název/typ přístroje	příslušenství	popis	výrobce
Agilent technologies 1200 series	viz tabulka 4.6.	chromatografická sestava	Agilent Tech., USA
Biological thermostat BT50	-	termostat	MK servis s.r.o. (laboratorní přístroje Praha)
Gryf 209 L	skleněná elektroda	digitální pH metr	Gryf HB s.r.o., ČR
Hettich zentrifugen EBA 20	-	centrifuga	Andreas Hettich GmbH & Co, Německo
Sartorius 2004MP	-	analytické váhy	Sartorius GmbH, Německo

**Tab. 4.4.** Přístroje - koncentrace kofeinu v sytícím médiu po sycení membrán

### Provedení pokusu

Pro tento pokus byly použity stejné vzorky jako v úloze „Stanovení obsahu vlhkosti v nanovlákných membránách“ – tj. od každé membrány 6 vzorků

o velikosti 18x20mm. Tyto vzorky byly impregnovány<sup>4</sup> dvěma různými médii:

1. médium: **téměř nasycený vodný roztok kofeinu** (15mg%; pH=5,24)<sup>5</sup>
2. médium: **suspenze kofeinu ve směsi H<sub>2</sub>O : Propylenglykol** v poměru 2:3 (5% suspenze; pH=7,74)

V nasyceném vodném roztoku kofeinu (1. médium) byly impregnovány vzorky označené X.1 až X.3 (tedy 1. až 3. vzorek od každé polymerní membrány), v suspenzi kofeinu ve směsi vody a propylenglykolu byly impregnovány vzorky označené X.4 až X.6.

Poté, co byla tato média připravena, byla temperována 12 hodin v termostatu ( $t = 37^{\circ}\text{C}$ ), 5% suspenze byla navíc centrifugována po dobu 10 minut při 3000ot/min. Do 6 vialek pro každou membránu bylo odměřeno po 2,0 ml média (po 3 vialkách pro vodný roztok a suspenzi kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody a po 2 vialkách pro ethanolický a chloroformový roztok kofeinu). Do připravených vialek byly pinzetou vloženy vzorky membrán. Skleněnou tyčinkou s plochým koncem byl z membrán vytlačen vzduch a nakonec byl vzorek membrány zatížen 5 skleněnými kuličkami.



Obr. 4.1. Centrifuga Hettich EBA 20



Obr. 4.2. Vzorky během pokusu

Takto připravené vzorky byly ponechány 12 hodin v termostatu. Po této době byl z každé z vialek odebrán vzorek o objemu 0,7ml. V tomto objemu byl metodou HPLC stanoven obsah kofeinu (viz odstavec 4.2.1.).

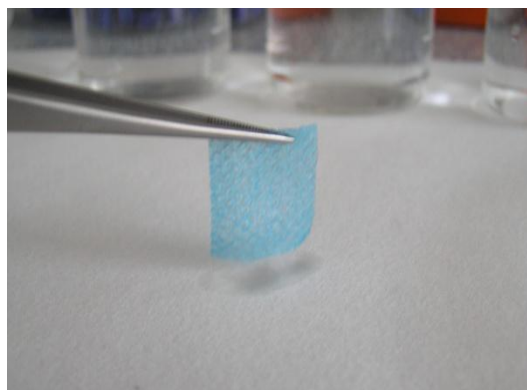
<sup>4</sup> Impregnačí se v celé práci rozumí proces sycení membrán, kdy je kofein fyzikálně naadsorbován na povrchu vláken a mezipovrchu membrán, zatímco inkorporovaný kofein je obsažen v tavenině, resp. v roztoku polymeru ještě před zvlákněním polymeru

<sup>5</sup> Dále v textu je tento roztok označován jako nasycený vodný roztok kofeinu.

Po odebrání vzorku byly membrány z vialek vyjmuty, vypláchnuty ve třech kádinkách s destilovanou vodou (obr. 4.3.).



**Obr. 4.3.** Trojí oplach membrán



**Obr. 4.4.** Odsátí přebytečného média filtr. papírem

Dále bylo z membrán filtračním papírem odsáto přebytečné médium (obr. 4.4.) a jednotlivé vzorky byly ponechány volně vyschnout na Petriho miskách. Suché vzorky byly opět vloženy na 22 hodin do exsikátoru a poté zváženy. Takto upravené membrány impregnované kofeinem byly použity pro další pokus (viz kapitola 4.3. a 4.5.).

#### 4.2.1. Stanovení kofeinu

##### *Příprava kofeinových standardů*

Pro stanovení kalibrační přímky byly použity kofeinové standardy o koncentracích 0,1mg/100ml až 7,5 mg/100ml. Teoretické a přibližně přesné koncentrace připravených standardů jsou uvedeny v tabulce 4.5.

označení standardu	požadovaná koncentrace [mg/100ml]	přesná koncentrace připraveného standardu [mg/100ml]
6	0,10000	0,1000
1	0,46875	0,4690
2	0,93750	0,9375
3	1,87500	1,8750
4	3,75000	3,7500
7	5,00000	5,0000
5	7,50000	7,5000

**Tab. 4.5.** Koncentrace standardů kofeinu

### *Příprava mobilní fáze pro stanovení kofeinu*

Jako mobilní fáze byla použita směs vody a methanolu v poměru 75:25 s obsahem 0,2% kyseliny mravenčí.

Příprava:

$$\begin{array}{r} \text{kys. mravenčí 2g} \quad 100\% \\ \text{x g} \quad 98\% \\ \hline x = \frac{100}{98} \times 2 = 2,04 \text{ml kys. mravenčí (98\%)} \\ 1000 - 2,04 = 997,96 \\ 997,96 \div 100 = 9,9796 \\ 9,9796 \times 75 = 748,47 \text{ml vody} \\ 9,9765 \times 25 = 249,49 \text{ml methanolu (100\%)} \end{array}$$

Před použitím připravené mobilní fáze bylo provedeno odplynění v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

### *Vlastní stanovení kofeinu*

Ke stanovení kofeinu v odebraných vzorcích byla použita sestava pro HPLC firmy Agilent Technologies. Podrobný popis sestavy je uveden v tabulce 4.6.

<b>komponent</b>	<b>označení/typ</b>	<b>poznámka</b>
Degaser	degasser G1379B	-
Čerpadlo	Iso pump G1310A	isokratické čerpadlo
autosampler	ALS 1329A	-
Termostat	TCC G1316A	(thermostated column compartment)
Kolona	Zobrax Eclipse plus C18	oktadecylsilanový sorbent (C18); $\phi = 4,6\text{mm}$ ; délka 150mm; zrnitost 5mikrometrů
Detektor	VWD G1414B	detektor s proměnnou $\lambda$ (variable wave-length detector)

**Tab.4.6.**Chromatografická sestava

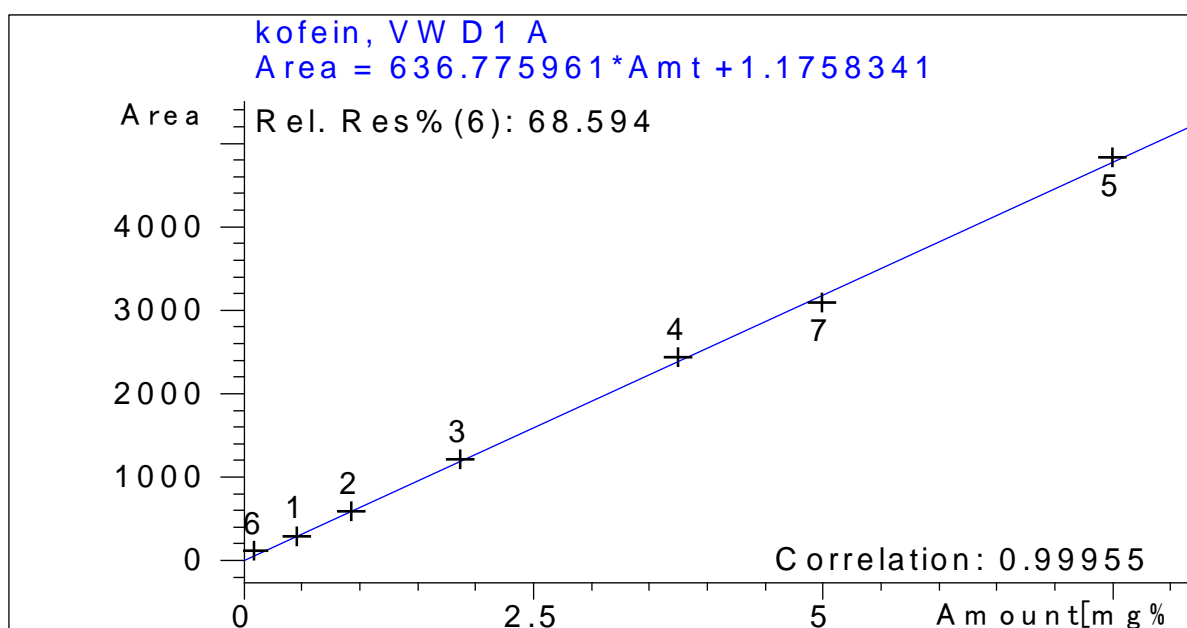


**Obr. 4.5.** Agilent technologies 1200 series

Analýza probíhala za následujících chromatografických podmínek:

- Injektáž (= velikost vzorku dávkovaného na kolonu) = 20 $\mu$ l
- Průtok = 1ml/min
- Nástřik = 20 $\mu$ l
- Délka analýzy 7,5min
- Signál  $\lambda$  = 272nm
- Teplota kolony = 30°C
- Max tlak =  $P_{\max.}$  = 400atm
- Min tlak =  $P_{\min}$  = 0 atm

Pro analýzu kofeinu byla měření kofeinových standardů (viz. samostatný odstavec) stanovena kalibrační přímka:



**Obr. 4.6.** Kalibrační přímka pro stanovení kofeinu

Rovnice kalibrační přímky pro stanovení kofeinu:

$$y = 636,775961 \cdot x + 1,1758341$$

korelační koeficient = 0,99955

### 4.3. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán

#### *Přehled materiálů*

viz tabulka 4.1.

#### *Přehled surovin*

Název	výrobce/dodavatel
ethanol 96%	Kulich, Hradec Králové
chitosan	Elmarco, s.r.o., Liberec
chloroform	Sigma-Aldrich, Praha
kofein	Kulich, Hradec Králové
kyselina mravenčí 98%	Lach-Ner, s.r.o., Neratovice
methanol pro HPLC (methanol Chromaslov®)	Sigma-Aldrich, Praha
propylenglykol	Kulich, Hradec Králové
tromethamol (Trizma®)	Sigma-Aldrich, Praha
voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové
voda pro HPLC	FaF UK, Hradec Králové

**Tab.4.7.** Suroviny - stanovení kofeinu z impregnovaných membrán

#### *Přehled přístrojů*

název/typ přístroje	Příslušenství	Popis	výrobce
Agilent technologies 1200 series	viz tabulka 4.6.	chromatografická sestava	Agilent Tech., USA
Gryf 209 L	skleněná elektroda	digitální pH metr	Gryf HB s.r.o., ČR
Sartorius 2004MP	-	analytické váhy	Sartorius GmbH, Německo
Grant JB5	termostat	vodní lázeň pro permeaci	Grant Instruments, Velká Británie

**Tab. 4.8.** Přístroje – stanovení kofeinu z impregnovaných membrán

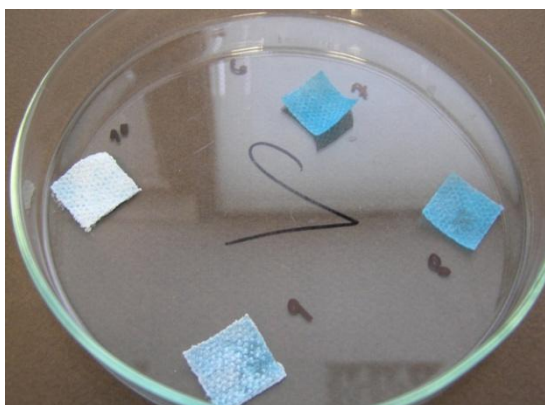
#### *Provedení pokusu*

Vzorky X.3, X.6 z úlohy 4.2. „koncentrace kofeinu v sytícím médiu po sycení membrán“ a dále vzorky X.8. a X.10. připravené stejným postupem,

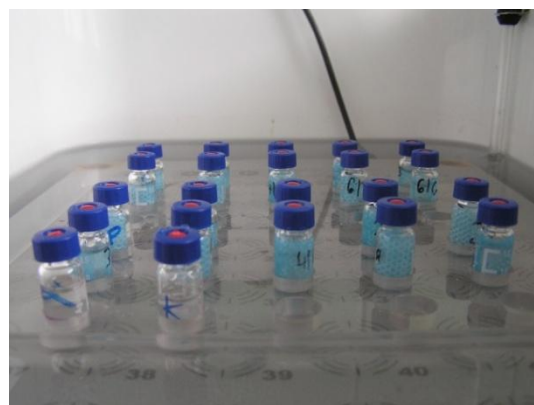
který je popsán v provedení pokusu úlohy 4.2. s použitím dalších dvou médií:

3. médium: **téměř nasycený roztok kofeinu v ethanolu 96%** (1g kofeinu v 52g etanolu; pH=5,13)<sup>6</sup>
4. médium: **téměř nasycený roztok kofeinu v chloroformu** (1g kofeinu v 8,14g chloroformu; pH=1,57)<sup>7</sup>

Jednalo se tedy o membrány velikosti 18mmx20mm, impregnované čtyřmi různými vehikuly, třikrát vypláchnuté vodou a po oschnutí volně na vzduchu vysušené 12 hodinovým uchováním v exsikátoru. Před dalším použitím byly tyto vzorky navíc zváženy na analytických vahách. Takto připravené vzorky byly jednotlivě vloženy do vialek s obsahem 1,5ml TRIS pufru (pH = 7,1) o teplotě 37°C. Během celého pokusu byly vialky umístěny ve vodní lázni a temperovány na 37°C.



**Obr. 4.6.** Vzorky nanovlákněných membrán během schnutí (volně na vzduchu)



**Obr. 4.7.** Vzorky během pokusu ve vodní lázni

V časech 20, 40, 60, 120 a 180 minut od vložení membrán do vialek s pufrům byl odebírán vzorek TRIS pufru s uvolněným kofeinem o objemu 100 $\mu$ l. Stejný objem čistého TRIS pufru byl vložen zpět do vialky. Odebraný vzorek byl zředěn 500 $\mu$ l TRIS pufru a analyzován na obsah kofeinu metodou HPLC (viz odstavec 4.3.1. resp. 4.2.1.). Spolu se zkoumanými vzorky byly do pokusu zařazeny také 2 kontrolní slepé vzorky, které obsahovaly čistou substanci kofeinu bez nanovlákněné membrány. Navážky kofeinu pro tento slepý pokus byly  $K_1 = 0,01135g$ , resp.

<sup>6</sup> Dále v textu je tento roztok označován jako nasycený ethanolický roztok kofeinu.

<sup>7</sup> Dále v textu je tento roztok označován jako nasycený chloroformový roztok kofeinu.

$K_2 = 0,01174\text{g}$  (tato hmotnost je odvozena od průměrné hmotnosti nanovláčkové membrány o velikosti 18 x 20 mm, již zhruba odpovídá).

### 4.3.1. Stanovení kofeinu

Kofeinové standardy, příprava mobilní fáze, chromatografické podmínky i kalibrační přímka byly totožné s těmi, které jsou popsány v kapitole 4.2.1.

## 4.4. Liberace inkorporovaného kofeinu z membrán

### Přehled surovin

Název	výrobce/dodavatel
chitosan	Elmarco, s.r.o., Liberec
kyselina mravenčí 98%	Lach-Ner s.r.o., Neratovice
methanol pro HPLC (methanol Chromaslov®)	Sigma-Aldrich, Praha
tromethamol (Trizma®)	Sigma-Aldrich, Praha
voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové
voda pro HPLC	FaF UK, Hradec Králové

**Tab. 4.9.** Suroviny - liberace inkorporovaného kofeinu

### Přehled materiálů

viz tabulka 4.1.

### Přehled přístrojů

název/typ přístroje	příslušenství	popis	výrobce
Agilent technologies 1200 series	viz tabulka 4.7.	chromatografická sestava	Agilent Tech., USA
Gryf 209 L	skleněná elektroda	digitální pH metr	Gryf HB s.r.o., ČR
Sartorius 2004MP	-	analytické váhy	Sartorius GmbH, Německo
Grant JB5	termostat	vodní lázeň pro permeaci	Grant Instruments, Velká Británie

**Tab. 4.10.** Přehled přístrojů - liberace inkorporovaného kofeinu

### Provedení pokusu

Pro tento pokus byly připraveny 2 nové vzorky od každé membrány o velikosti 18mm x 20mm, které nebyly impregnovány v žádném z vehikul.

Obsahovaly pouze kofein inkorporovaný<sup>8</sup> do membrán výrobcem. Vzorky během pokusu nesly označení X.11 a X.12. Takto připravené vzorky membrán byly zváženy a dále vloženy do vialek spolu s 1,5ml TRIS pufru (pH= 7,1 při t = 37°C) a temperovány na vodní lázni (t = 37°C). Spolu se zkoumanými vzorky byla zařazena dvojice kontrolních, slepých vzorků, které byly tvořeny substancí kofeinu v TRIS pufru bez nanovlákněné membrány. Množství kofeinu v kontrolních vzorcích bylo odvozeno od průměrné hmotnosti vzorku nanovlákněné membrány a činilo  $K_3 = 0,01162\text{g}$ , resp.  $K_4 = 0,01178\text{g}$ . V časech 20, 40, 60, 120 a 180 minut od začátku pokusu bylo ze zkoumaných a kontrolních vzorků odebíráno po 100 $\mu\text{l}$  pufru s kofeinem uvolněným z nanomembrán. K tomuto množství bylo přidáno 500 $\mu\text{l}$  TRIS pufru (t = 37°C). Pufr odebraný z každé vialky byl nahrazen stejným množstvím čistého pufru. V odebraných vzorcích pufru bylo stanoveno množství kofeinu metodou HPLC (viz odstavce 4.4.1., resp. 4.2.1.)



**Obr. 4.8.** Vzorky během pokusu ve vodní lázni

#### 4.4.1. Stanovení kofeinu

Kofeinové standardy, příprava mobilní fáze, chromatografické podmínky i kalibrační přímka byly totožné s těmi, které jsou popsány v kapitole 4.2.1.

---

<sup>8</sup> **inkorporovaný** kofein je obsažen v tavenině, resp. roztoku polymeru ještě před zvlákněním polymeru. V celé práci je tento termín používán v tomto smyslu. **Impregnací** se v celé práci rozumí proces syčení membrán, kdy je kofein fyzikálně vpraven na povrch vláken a mezipovrch membrán, a to adsorpcí ze čtyř různých vehikul za laboratorních podmínek (uvedeny v kapitole 4.2.)

## 4.5. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán po dlouhodobé eluci

### Přehled materiálů

viz tabulka 4.1.

### Přehled surovin

Název	výrobce/dodavatel
chitosan 93,6%	Elmarco, s.r.o., Liberec
kofein	Kulich, Hradec Králové
kyselina mravenčí 98%	Lach-Ner, s.r.o., Neratovice
methanol pro HPLC (methanol Chromaslov®)	Sigma-Aldrich, Praha
propylenglykol	Kulich, Hradec Králové
tromethamol (Trizma®)	Sigma-Aldrich, Praha
voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové
voda pro HPLC	FaF UK, Hradec Králové

**Tab. 4.11.** Suroviny - liberace kofeinu po dlouhodobé eluci

### Přehled přístrojů

název/typ přístroje	Příslušenství	Popis	výrobce
Agilent technologies 1200 series	viz tabulka 4.7.	chromatografická sestava	Agilent Tech., USA
Biological thermostat BT50	-	termostat	MK servis s.r.o. (laboratorní přístroje Praha)
Gryf 209 L	skleněná elektroda	digitální pH metr	Gryf HB s.r.o., ČR
Sartorius 2004MP	-	analytické váhy	Sartorius GmbH, Německo

**Tab. 4.12.** Přístroje – liberace kofeinu po dlouhodobé eluci

### Provedení pokusu

Vzorky X.2 a X.5 z experimentu popsaného v odstavci 4.2., tedy membrány o velikosti 18x20mm impregnované dvěma různými vehikuly (vzorky X.2. nasyceným vodným roztokem kofeinu a vzorky X.5. 5% suspenzí kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody v poměru 3:2) byly jednotlivě vloženy do vialek s obsahem 1,5ml směsi propylenglykolu a vody (3:2) a spolu s nimi temperovány po dobu 5dnů (120 hodin) v termostatu na 37°C. Po této době byly z vialek odstraněny vzorky nanomembrán a v kapalném vehikulu

byl stanoven obsah kofeinu metodou HPLC (viz odstavec 4.5.1, resp. 4.2.1).

#### **4.5.1. Stanovení kofeinu**

Kofeinové standardy, příprava mobilní fáze, chromatografické podmínky i kalibrační přímka byly totožné s těmi, které jsou popsány v kapitole 4.2.1.

# 5. Dokumentace

## 5.1. Stanovení obsahu vlhkosti v nanovlákněných membránách

2	hmotnost před sloupnutím ochr. Vrstvy [g]	0,0124	0,0140	0,0133	0,0115	0,0148	0,0135	0,0157	0,0117	0,0102	0,0144	
	hmotnost po sloupnutí ochranné vrstvy [g]	0,0115	0,0133	0,0124	0,0109	0,0137	0,0126	0,0151	0,0109	0,0096	0,0135	
	hmotnost po 12 hodinách v exsikátoru [g]	0,0114	0,0132	0,0124	0,0108	0,0137	0,0125	0,0149	0,0107	0,0095	0,0134	
	rozdíl hmotnosti membrány před a po vyjmutí z exsikátoru (po 12h) [g]	0,0001	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	0,0001	
	úbytek hmotnosti v % (po 12h)	0,88	0,76	0,00	0,93	0,00	0,80	1,34	1,87	1,05	0,75	0,84
	hmotnost po 22 hodinách v exsikátoru [g]	0,01154	0,01333	0,01230	0,01096	0,01376	0,01272	0,01499	0,01104	0,00959	0,01348	
	rozdíl hmotnosti membrány před a po vyjmutí z exsikátoru (po 22h) [g]	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	
	úbytek hmotnosti v % (po 22h)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,91	0,00	0,00	0,16
3	hmotnost před sloupnutím ochr. Vrstvy [g]	0,0122	0,0135	0,0127	0,0121	0,0121	0,0128	0,0117	0,0104	0,0140	0,0120	
	hmotnost po sloupnutí ochranné vrstvy [g]	0,0115	0,0127	0,0119	0,0112	0,0115	0,0122	0,0109	0,0097	0,0132	0,0111	
	hmotnost po 12 hodinách v exsikátoru [g]	0,0114	0,0126	0,0119	0,0111	0,0112	0,0121	0,0109	0,0096	0,0131	0,0111	
	rozdíl hmotnosti membrány před a po vyjmutí z exsikátoru (po 12h) [g]	0,0001	0,0001	0,0000	0,0001	0,0003	0,0001	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	
	úbytek hmotnosti v % (po 12h)	0,88	0,79	0,00	0,90	2,68	0,83	0,00	1,04	0,76	0,00	0,79
	hmotnost po 22 hodinách v exsikátoru [g]	0,0115	0,0126	0,0119	0,0113	0,0113	0,0122	0,0109	0,0096	0,0131	0,0111	
	rozdíl hmotnosti membrány před a po vyjmutí z exsikátoru (po 22h) [g]	0,0000	0,0001	0,0000	-0,0001	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	
	úbytek hmotnosti v % (po 22h)	0,00	0,79	0,00	-0,88	1,77	0,00	0,00	1,04	0,76	0,00	0,35
6	hmotnost před sloupnutím ochr. Vrstvy [g]	0,0130	0,0136	0,0129	0,0119	0,0118	0,0125	0,0123	0,0135	0,0128	0,0134	
	hmotnost po sloupnutí ochranné vrstvy [g]	0,0120	0,0128	0,0121	0,0108	0,0111	0,0118	0,0115	0,0129	0,0121	0,0128	
	hmotnost po 12 hodinách v exsikátoru [g]	0,0120	0,0128	0,0119	0,0107	0,0108	0,0117	0,0113	0,0126	0,0120	0,0126	
	rozdíl hmotnosti membrány před a po vyjmutí z exsikátoru (po 12h) [g]	0,0000	0,0000	0,0002	0,0001	0,0003	0,0001	0,0002	0,0003	0,0001	0,0002	
	úbytek hmotnosti v % (po 12h)	0,00	0,00	1,68	0,93	2,78	0,85	1,77	2,38	0,83	1,59	1,28
	hmotnost po 22 hodinách v exsikátoru [g]	0,0121	0,0124	0,0120	0,0109	0,0108	0,0117	0,0113	0,0125	0,0119	0,0125	
	rozdíl hmotnosti membrány před a po vyjmutí z exsikátoru (po 22h) [g]	-0,0001	0,0004	0,0001	-0,0001	0,0003	0,0001	0,0002	0,0004	0,0002	0,0003	
	úbytek hmotnosti v % (po 22h)	-0,83	3,23	0,83	-0,92	2,78	0,85	1,77	3,20	1,68	2,40	1,50

Tab. 5.1. Gravimetrické stanovení obsahu vlhkosti v nanovlákněných membránách

## 5.2. Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po syčení membrán

označení vzorku	retenční čas	plocha	koncentrace kofeinu přepočítané podle kalibrační přímky
	[min]		
2.1.	3,901	7794,632	12,23893
2.2.	3,900	8431,366	13,23886
2.3.	3,898	9315,926	14,62799
3.1.	3,903	7241,282	11,36994
3.2.	3,901	8314,680	13,05562
3.3.	3,904	6591,373	10,34932
6.1.	3,899	8540,010	13,40948
6.2.	3,896	7577,695	11,89825
6.3.	3,900	8355,313	13,11943

**Tab. 5.2.** Koncentrace kofeinu ve vodném roztoku po syčení membrán

označení vzorku	retenční čas	plocha	koncentrace kofeinu přepočítané podle kalibrační přímky
	[min]		
2.4.	3,572	331183,500	544,38487
2.5.	3,579	332632,800	522,36838
2.6.	3,572	331254,200	520,20341
3.4.	3,589	329427,900	517,33536
3.5.	3,559	330989,000	519,78693
3.6.	3,558	332354,000	521,93054
6.4.	3,588	330550,200	519,09784
6.5.	3,582	329257,700	517,06808
6.6.	3,616	331235,200	520,17357

**Tab. 5.3.** Koncentrace kofeinu v suspenzi kofeinu ve směsi vody a propylenglykolu po syčení membrán

## 5.3. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán

		vodný roztok kofeinu			suspenze PG:H <sub>2</sub> O (5%kofeinu)			téměř nasycený ethanolický roztok		téměř nasycený chloroformový	
označení membrány	číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	hmotnost nanovlákněné membrány [g]	0,0115	0,0133	0,0124	0,0109	0,0137	0,0126	0,0151	0,0109	0,0096	0,0135
	hmotnost po 22 hodinách v exsikátoru [g]	0,0115	0,0133	0,0123	0,0109	0,0138	0,0127	0,0149	0,0110	0,0096	0,0134
	hmotnost po impregnaci [g]	0,0116	0,0133	0,0124	0,0109	0,0138	0,0127	0,0151	0,0121	0,0188	0,0293
	teoretická hmotnost naadsorbovaného kofeinu [g]	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0010	0,0092	0,0158
3	hmotnost nanovlákněné membrány [g]	0,0115	0,0127	0,0119	0,0112	0,0115	0,0122	0,0109	0,0097	0,0132	0,0111
	hmotnost po 22 hodinách v exsikátoru [g]	0,0115	0,0126	0,0119	0,0113	0,0113	0,0122	0,0109	0,0096	0,0131	0,0111
	hmotnost po impregnaci [g]	0,0115	0,0127	0,0120	0,0113	0,0114	0,0122	0,0121	0,0097	0,0320	0,0266
	teoretická hmotnost naadsorbovaného kofeinu [g]	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0001	0,0189	0,0155
6	hmotnost nanovlákněné membrány [g]	0,0120	0,0128	0,0121	0,0108	0,0111	0,0118	0,0115	0,0129	0,0121	0,0128
	hmotnost po 22 hodinách v exsikátoru [g]	0,0121	0,0124	0,0120	0,0109	0,0108	0,0117	0,0113	0,0125	0,0119	0,0125
	hmotnost po impregnaci [g]	0,0121	0,0128	0,0120	0,0109	0,0109	0,0117	0,0113	0,0126	0,0249	0,0273
	teoretická hmotnost naadsorbovaného kofeinu [g]	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0001	0,0117	0,0000	0,0001	0,0130	0,0148

**Tab. 5.4.** Gravimetrické stanovení naadsorbovaného kofeinu ze 4 vehikul

*Poznámka:*

Vzhledem k formátování textu jsou jednotlivé protokoly uvedeny na samostatných stranách.

# Protokol 1

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 2

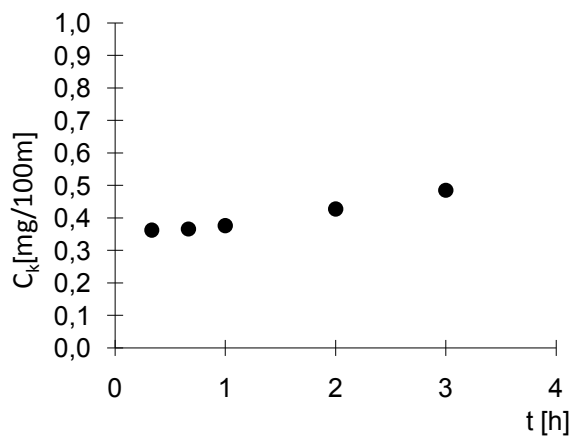
médium: vodný roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,363	0,1	0,363
0,666	0,342	0,1	0,366
1	0,352	0,1	0,376
2	0,402	0,1	0,427
3	0,457	0,1	0,485
0	0,000	0,1	0,032
0	0,000	0,1	0,002
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 5,050046$
Korelační koef.	$r = 0,989651$



**Protokol 2**

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 2

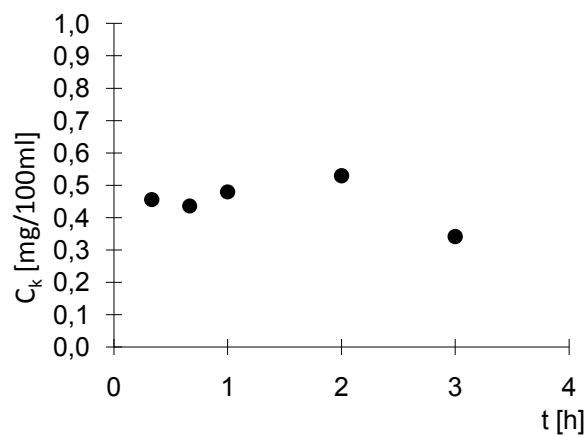
médium: suspenze

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,456	0,1	0,456
0,666	0,405	0,1	0,436
1	0,451	0,1	0,480
2	0,498	0,1	0,530
3	0,306	0,1	0,341
0	0,000	0,1	0,023
0	0,000	0,1	0,002
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 7,316688
Korelační koef.	r = -0,44199



### Protokol 3

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 2

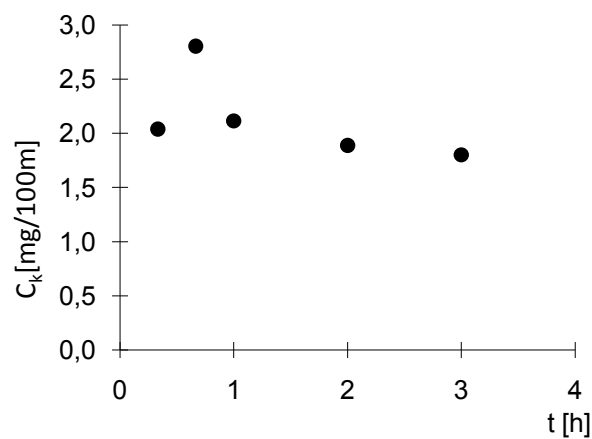
médium: EtOH  
roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	2,039	0,1	2,039
0,666	2,668	0,1	2,804
1	1,928	0,1	2,114
2	1,748	0,1	1,889
3	1,675	0,1	1,801
0	0,000	0,1	0,120
0	0,000	0,1	0,008
0	0,000	0,1	0,001
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 36,63118$
Korelační koef.	$r = -0,61435$



## Protokol 4

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

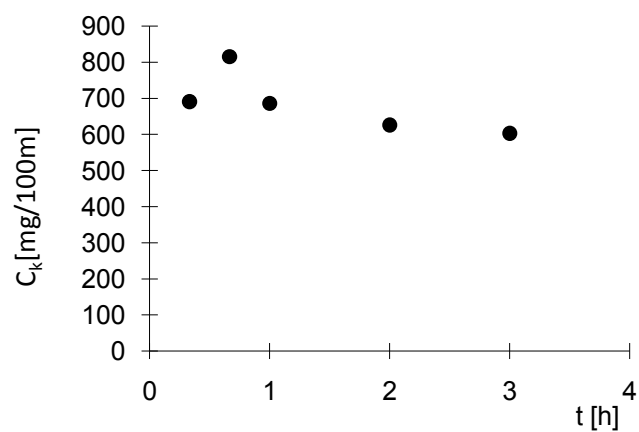
membrána: 2

médium: chloroform.  
roztok

měření: 1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	691,089	0,1	691,089
0,666	769,424	0,1	815,496
1	631,691	0,1	686,057
2	580,366	0,1	626,103
3	561,235	0,1	602,975
0	0,000	0,1	40,198
0	0,000	0,1	2,680
0	0,000	0,1	0,179
0	0,000	0	0,012

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 11453,69
Korelační koef.	r = -0,74774



# Protokol 5

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 3

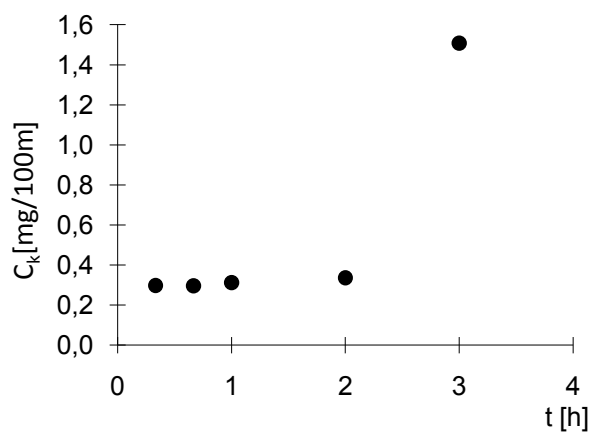
médium: vodný roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,298	0,1	0,298
0,666	0,277	0,1	0,297
1	0,292	0,1	0,312
2	0,316	0,1	0,337
3	1,486	0,1	1,508
0	0,000	0,1	0,101
0	0,000	0,1	0,007
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = -0,37449
Korelační koef.	r = 0,836651



# Protokol 6

$V_o$	[ml]			
t	[h]			
$C_{nk}$	[mg/100ml]			
$\Delta V_{dop}$	[ml]			
$C_k$	[mg/100ml]			

$V_o = 1,5$

membrána: 3

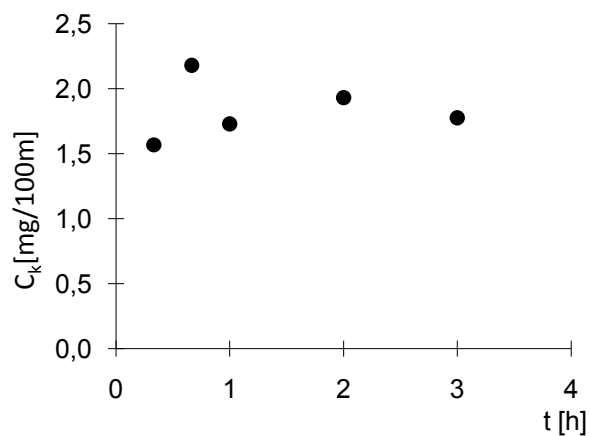
médium:: suspenze

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	1,567	0,1	1,567
0,666	2,075	0,1	2,179
1	1,583	0,1	1,728
2	1,816	0,1	1,931
3	1,647	0,1	1,776
0	0,000	0,1	0,118
0	0,000	0,1	0,008
0	0,000	0,1	0,001
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 27,37226
Korelační koef.	r = 0,038268



**Protokol 7**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 3

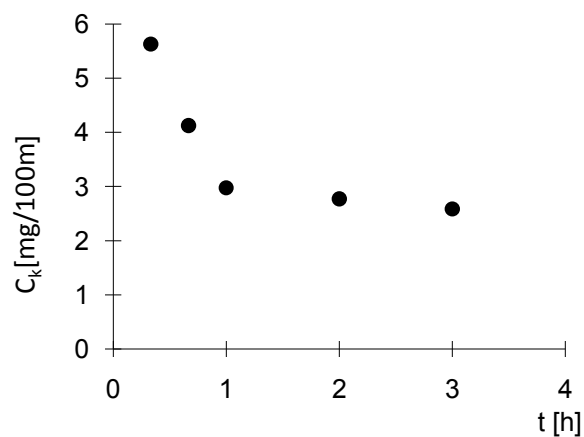
médium: EtOH  
roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	5,629	0,1	5,629
0,666	3,750	0,1	4,125
1	2,701	0,1	2,976
2	2,575	0,1	2,773
3	2,401	0,1	2,586
0	0,000	0,1	0,172
0	0,000	0,1	0,011
0	0,000	0,1	0,001
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 73,7809$
Korelační koef.	$r = -0,7953$



**Protokol 8**

$V_o$	[ml]			
t	[h]			
$C_{nk}$	[mg/100ml]			
$\Delta V_{dop}$	[ml]			
$C_k$	[mg/100ml]			

$V_o = 1,5$

membrána: 3

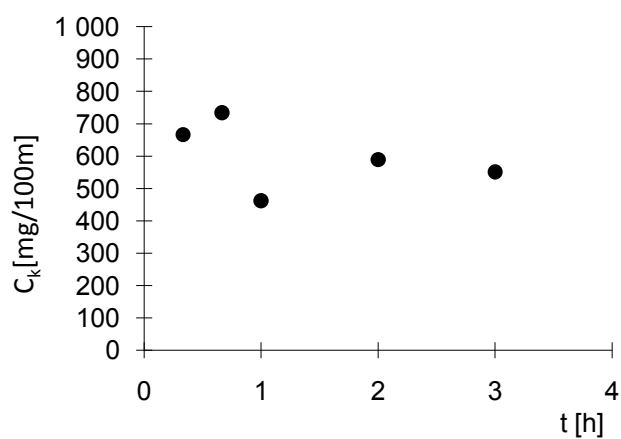
médium: chloroform.  
roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	666,273	0,1	666,273
0,666	689,986	0,1	734,404
1	412,703	0,1	461,664
2	558,262	0,1	589,039
3	511,977	0,1	551,247
0	0,000	0,1	36,750
0	0,000	0,1	2,450
0	0,000	0,1	0,163
0	0,000	0	0,011

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 9884,494
Korelační koef.	r = -0,43367



# Protokol 9

$V_o$	[ml]			
t	[h]			
$C_{nk}$	[mg/100ml]			
$\Delta V_{dop}$	[ml]			
$C_k$	[mg/100ml]			

$V_o = 1,5$

membrána: 6

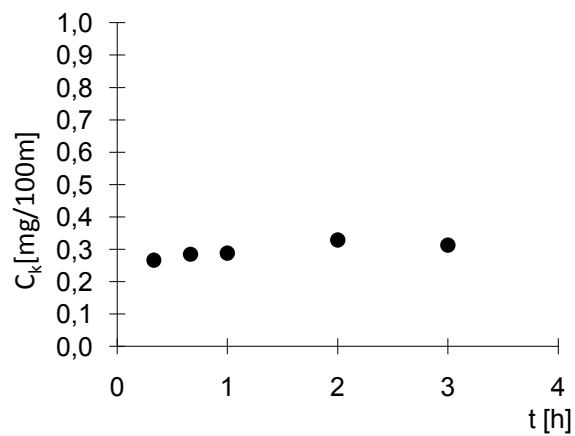
médium: vodný roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,266	0,1	0,266
0,666	0,267	0,1	0,284
1	0,269	0,1	0,288
2	0,309	0,1	0,329
3	0,291	0,1	0,312
0	0,000	0,1	0,021
0	0,000	0,1	0,001
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 4,043426
Korelační koef.	r = 0,833303



**Protokol 10**

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 6

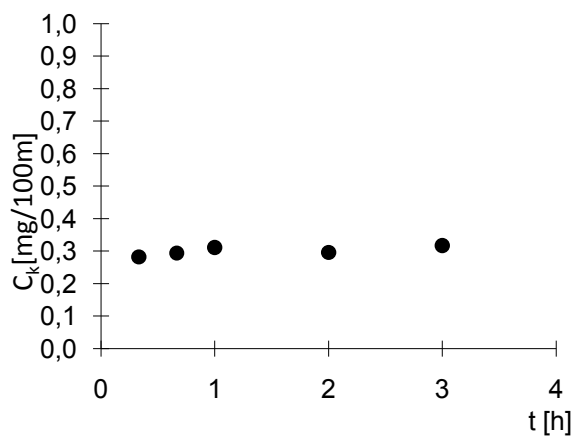
médium: suspenze

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,282	0,1	0,282
0,666	0,275	0,1	0,294
1	0,292	0,1	0,311
2	0,275	0,1	0,296
3	0,297	0,1	0,317
0	0,000	0,1	0,021
0	0,000	0,1	0,001
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 4,30741
Korelační koef.	r = 0,712737



**Protokol 11**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 6

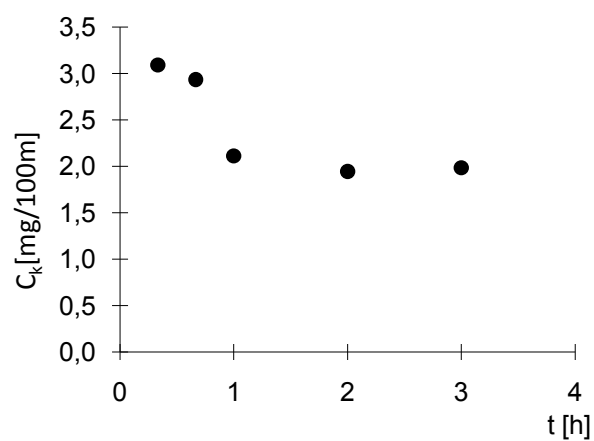
médium: EtOH  
roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	3,091	0,1	3,091
0,666	2,728	0,1	2,934
1	1,916	0,1	2,112
2	1,804	0,1	1,945
3	1,855	0,1	1,985
0	0,000	0,1	0,132
0	0,000	0,1	0,009
0	0,000	0,1	0,001
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 44,81063
Korelační koef.	r = -0,80854



**Protokol 12**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 6

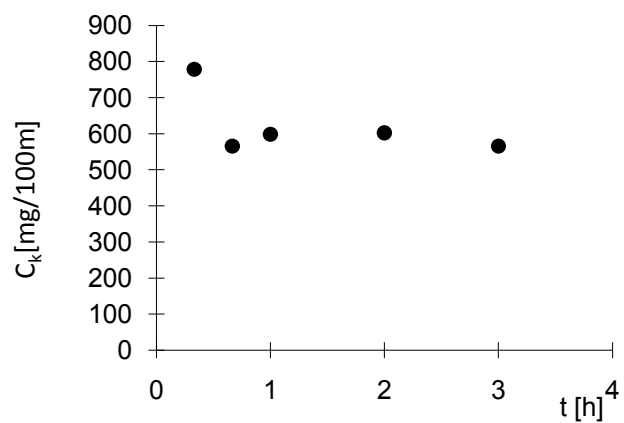
médium: chloroform.  
roztok

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	778,727	0,1	778,727
0,666	513,778	0,1	565,693
1	560,870	0,1	598,583
2	562,343	0,1	602,249
3	525,500	0,1	565,650
0	0,000	0,1	37,710
0	0,000	0,1	2,514
0	0,000	0,1	0,168
0	0,000	0	0,011

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 10297,28$
Korelační koef.	$r = -0,56146$



**Protokol 13**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

kontrol. vz. 1

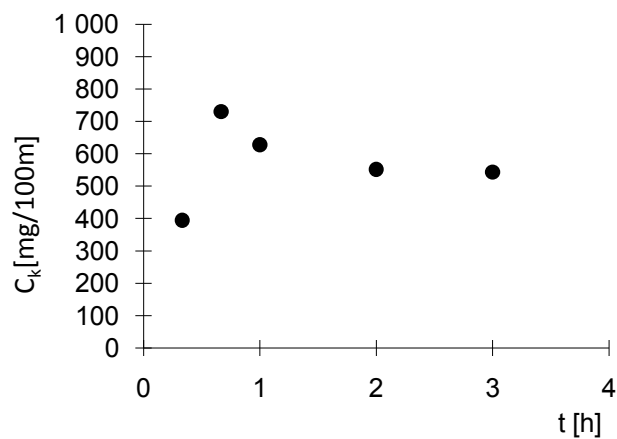
médium: kofein.subst

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	394,255	0,1	394,255
0,666	704,196	0,1	730,480
1	579,585	0,1	628,284
2	509,682	0,1	551,567
3	506,514	0,1	543,285
0	0,000	0,1	36,219
0	0,000	0,1	2,415
0	0,000	0,1	0,161
0	0,000	0	0,011

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 8576,231$
Korelační koef.	$r = -0,01371$



**Protokol 14**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

kontrol. vz. 2

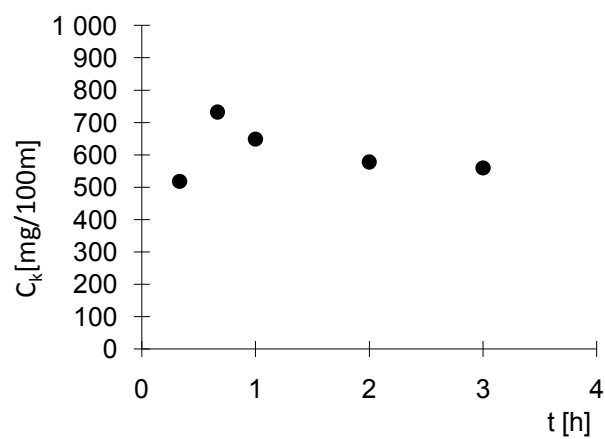
médium: kofein.subst.

měření: 1

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	517,899	0,1	517,899
0,666	697,781	0,1	732,307
1	599,937	0,1	648,758
2	534,624	0,1	577,875
3	521,100	0,1	559,625
0	0,000	0,1	37,308
0	0,000	0,1	2,487
0	0,000	0,1	0,166
0	0,000	0	0,011

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 9581,142$
Korelační koef.	$r = -0,29039$



## 5.4. Liberace inkorporovaného kofeinu z membrán

*Poznámka:*

Vzhledem k formátování textu jsou následující protokoly uvedeny na samostatných stranách.

# Protokol 1

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 2

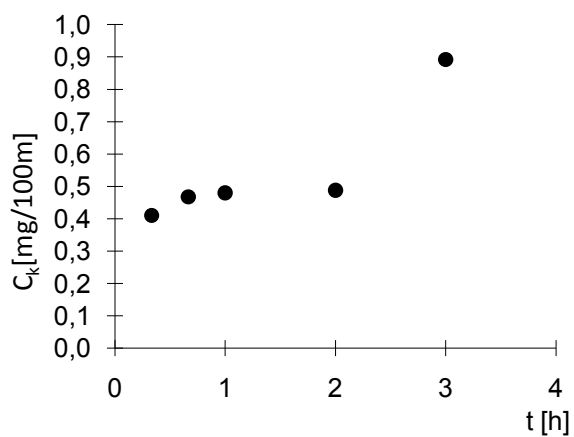
léčivo: kofein

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,410	0,1	0,410
0,666	0,440	0,1	0,468
1	0,449	0,1	0,480
2	0,456	0,1	0,488
3	0,860	0,1	0,892
0	0,000	0,1	0,059
0	0,000	0,1	0,004
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs.člen	$q = 4,913664$
Korelační koef.	$r = 0,878932$



**Protokol 2**

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 2

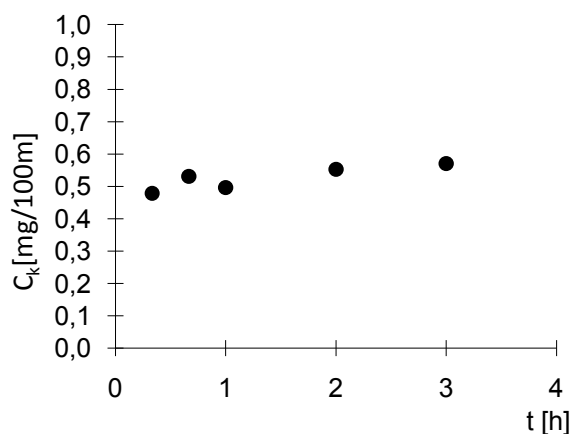
léčivo: kofein

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,478	0,1	0,478
0,666	0,499	0,1	0,531
1	0,461	0,1	0,496
2	0,519	0,1	0,553
3	0,534	0,1	0,571
0	0,000	0,1	0,038
0	0,000	0,1	0,003
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 7,241755
Korelační koef.	r = 0,875053



**Protokol 3**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 3

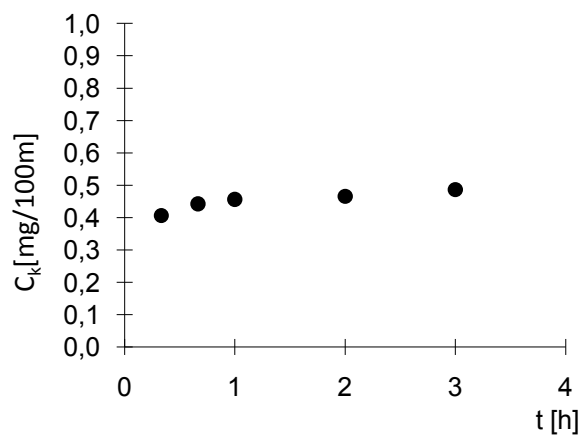
léčivo: kofein

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,406	0,1	0,406
0,666	0,415	0,1	0,442
1	0,426	0,1	0,456
2	0,435	0,1	0,466
3	0,455	0,1	0,486
0	0,000	0,1	0,032
0	0,000	0,1	0,002
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 6,25014$
Korelační koef.	$r = 0,903693$



**Protokol 4**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 3

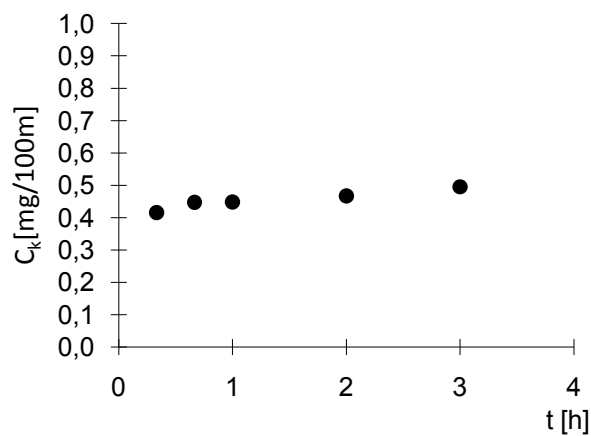
léčivo: kofein

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,416	0,1	0,416
0,666	0,419	0,1	0,447
1	0,418	0,1	0,448
2	0,437	0,1	0,467
3	0,464	0,1	0,495
0	0,000	0,1	0,033
0	0,000	0,1	0,002
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 6,281997$
Korelační koef.	$r = 0,957852$



**Protokol 5**

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 6

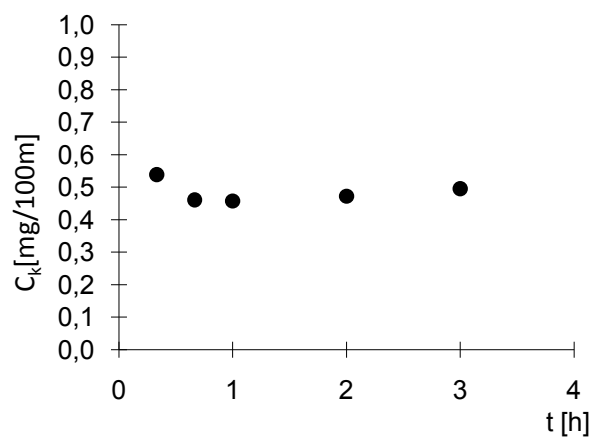
léčivo: kofein

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,539	0,1	0,539
0,666	0,425	0,1	0,461
1	0,427	0,1	0,458
2	0,442	0,1	0,472
3	0,464	0,1	0,496
0	0,000	0,1	0,033
0	0,000	0,1	0,002
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Abs. člen	q = 7,362385
Korelační koef.	r = -0,13422



**Protokol 6**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

membrána: 6

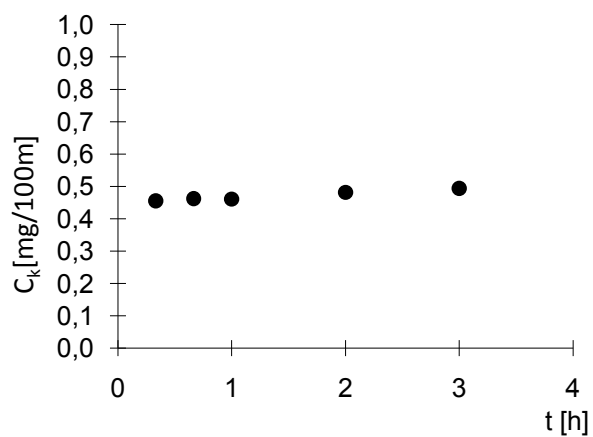
léčivo: kofein

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	0,455	0,1	0,455
0,666	0,432	0,1	0,462
1	0,430	0,1	0,461
2	0,451	0,1	0,482
3	0,462	0,1	0,494
0	0,000	0,1	0,033
0	0,000	0,1	0,002
0	0,000	0,1	0,000
0	0,000	0	0,000

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 6,749599$
Korelační koef.	$r = 0,987436$



**Protokol**

**7**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

kontrola: vz. K3

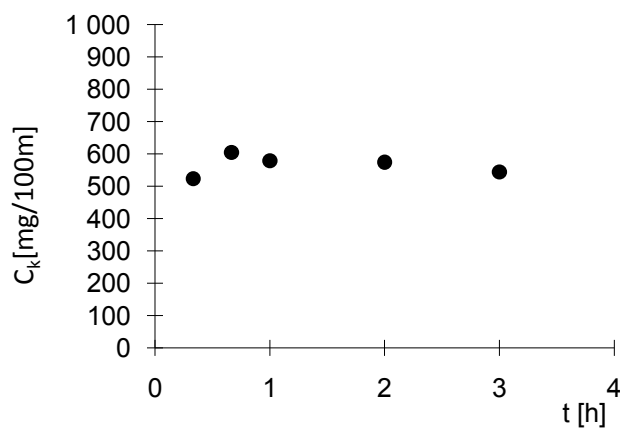
kofein: substance

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	523,138	0,1	523,138
0,666	569,422	0,1	604,297
1	538,269	0,1	578,555
2	535,379	0,1	573,949
3	505,773	0,1	544,036
0	0,000	0,1	36,269
0	0,000	0,1	2,418
0	0,000	0,1	0,161
0	0,000	0	0,011

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 8550,375$
Korelační koef.	$r = -0,12884$



**Protokol 8**

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]

$V_o = 1,5$

kontrola: vz. K4

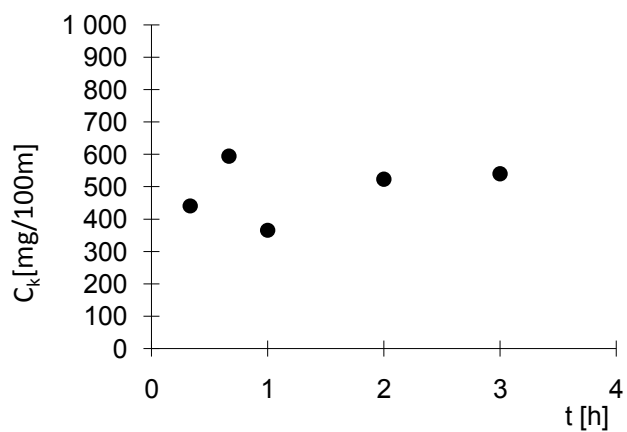
kofein: subst

měření: 2

1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$
0,333	440,686	0,1	440,686
0,666	565,365	0,1	594,744
1	325,798	0,1	365,448
2	499,024	0,1	523,388
3	505,129	0,1	540,022
0	0,000	0,1	36,001
0	0,000	0,1	2,400
0	0,000	0,1	0,160
0	0,000	0	0,011

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Abs. člen	$q = 6838,385$
Korelační koef.	$r = 0,31953$



## 5.5. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán po dlouhodobé eluci

označení vzorku	retenční čas	koncentrace 2.	plocha 2.	koncentrace 3.	plocha 3.	rozdíl v koncentraci mezi 2. a 3. měřeními
	[min]	[mg/100ml]	[mAU]	[mg/100ml]	[mAU]	[%]
2.2.	3,826	0,23732	152,297	0,14342	92,500	39,26%
3.2.	3,821	0,18434	118,557	0,06631	43,400	63,39%
6.2.	3,829	0,36914	236,236	0,21314	136,900	42,05%
2.5.	3,825	0,24465	156,961	0,12661	81,800	47,89%
3.5.	3,831	1,10725	706,247	0,98861	630,700	10,70%
6.5.	3,828	0,23650	151,771	0,14028	90,500	40,37%

**Tab. 5.5.** Koncentrace kofeinu po dlouhodobé maceraci

## 6. Výsledky a diskuze

---

### 6.1. Stanovení obsahu vlhkosti v nanovláknenných membránách

Souhrnné výsledky pokusu „stanovení obsahu vlhkosti v nanovláknenných membránách“ jsou uvedeny v tabulce 5.1. Dvanáctihodinové uchování všech vzorků membrán v exsikátoru nezpůsobí výrazné snížení jejich hmotnosti, a tedy ani snížení obsahu vlhkosti v nanomembránách (úbytek max. 0,0003g). Po dalších deseti hodinách v exsikátoru začíná hmotnost membrán kolísat v rozmezí -0,0001 až 0,0004g, což svědčí o dosažení rovnovážného stavu. Procentuální úbytek hmotnosti po pobytu v exsikátoru se pohybuje v rozmezí 0,16 až 1,50%.

Membránu s číselným označením „6“, tedy slepý vzorek, nelze na základě těchto měření přirovnat k žádnému z ostatních vzorků. Taktéž rozdíly mezi oběma vzorky známého složení nejsou v tomto ohledu výrazně odlišné.

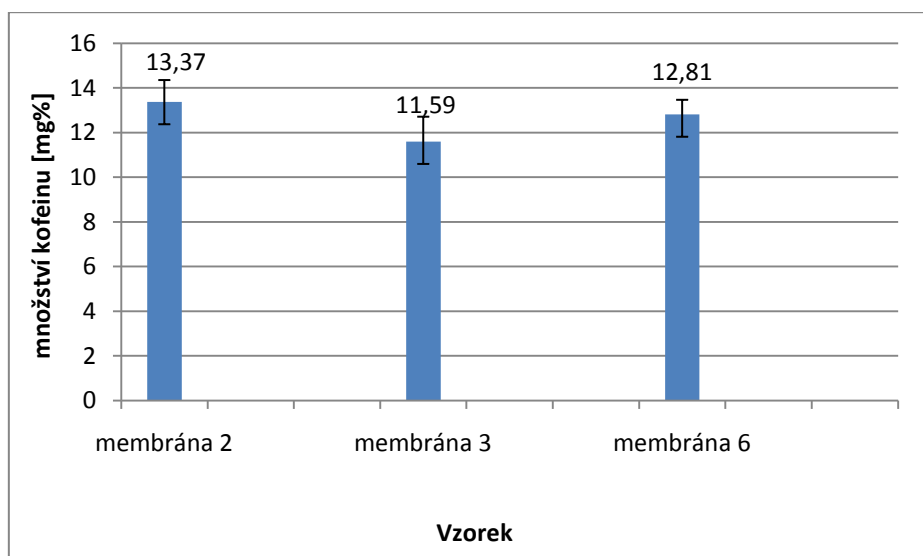
### 6.2. Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po sycení membrán

Tabulky 6.2. a 6.3. a grafy 6.1. a 6.2. uvádějí přehled výsledků experimentu 4.2. „koncentrace kofeinu v sytícím médiu po sycení membrán“. Výraznější závěry nelze vzhledem k malému rozsahu pokusu formulovat. Také je zřejmé, že by analogický pokus vyžadoval větší hmotnost, resp. velikost membrán. Pokus byl přesto proveden a chápán jako zdroj doplňkové informace jak z hlediska příští praktické realizace podobných pokusů, tak pro možnost případného přímého ověření správnosti ostatních experimentů, tedy jako doplňkové měření. K podrobným závěrům lze takovým pokusem dojít, avšak až při použití dostatečně široké základny vzorků.

Dále je nutné zajistit vhodné uskladnění sytících médií tak, aby bylo možné později určit jejich počáteční koncentraci a kvantifikovat přesné množství kofeinu, které bylo z média impregnací membrány odebráno. Podobné měření počátečního obsahu kofeinu v sytících médiích nebylo v daném případě nedopatřením provedeno, a to z důvodu špatně zvolených zásobních nádob, z nichž se rozpouštědla, resp. vnější fáze suspenze, částečně odpařila.

označení vzorku	množství kofeinu přepočtené podle kalibrační křivky	průměrná koncentrace kofeinu pro daný vzorek	směrodatná odchylka
	[mg/100ml]	[mg/100ml]	
2.1.	12,24	13,37	0,97963
2.2.	13,24		
2.3.	14,63		
3.1.	11,37	11,59	1,11591
3.2.	13,06		
3.3.	10,35		
6.1.	13,41	12,81	0,65483
6.2.	11,90		
6.3.	13,12		

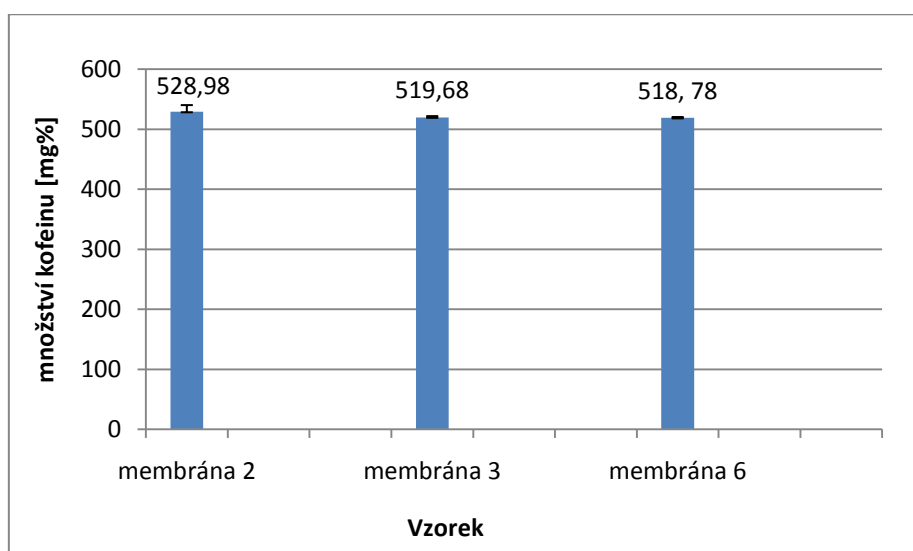
**Tab.6.2.** Výsledky – koncentrace kofeinu ve vodném roztoku po sycení membrán



**Graf 6.1.** Výsledky – koncentrace kofeinu ve vodném roztoku po sycení membrán

označení vzorku	koncentrace kofeinu dle kalibrace	průměrná koncentrace kofeinu	směrodatná odchylka
	[mg/100ml]	[mg/100ml]	
2.4.	544,39	528,98	10,93
2.5.	522,37		
2.6.	520,20		
3.4.	517,34	519,68	1,88
3.5.	519,79		
3.6.	521,93		
6.4.	519,10	518,78	1,29
6.5.	517,07		
6.6.	520,17		

**Tab. 6.3.** Výsledky – koncentrace kofeinu v suspenzi po sycení membrán



**Graf 6.2.** Výsledky – koncentrace kofeinu v suspenzi po sycení membrán

Jednotlivé vzorky membrán jsou získány z plošné textilie stejných charakteristik (plošná hmotnost, rovnoměrnost vláken zajištěná metodou elektrospiningu), rozdíly mezi vzorky různého složení jsou proto zatíženy jen mírnými odchylkami ve velikosti vzorků, vzniklých během ručního dělení. Porovnání takto získaných středních hodnot je proto korektní.

Minimální rozdíly mezi naměřenými hodnotami naadsorbovaného kofeinu neumožňují jednoznačně odlišit jednotlivé membrány. Množství adsorbovaného kofeinu je relativně velmi malé, což bylo potvrzeno i měřením množství adsorbovaného kofeinu gravimetricky (viz odst. 6.3). Nepatrně větší

snížení koncentrace kofeinu v obou sytících médiích bylo při porovnání membrán 2 a 3, pozorováno v případě membrány 3, a to při použití obou sytících médií. Při malé ploše resp. hmotnosti membrán nelze pro další vyhodnocení rozdílů mezi impregnovanými membránami tuto metodu doporučit. Ze stejného důvodu také nelze vzorky membrány 6 jednoznačně připodobnit ani k jedné ze zbylých dvou zkoumaných membrán.

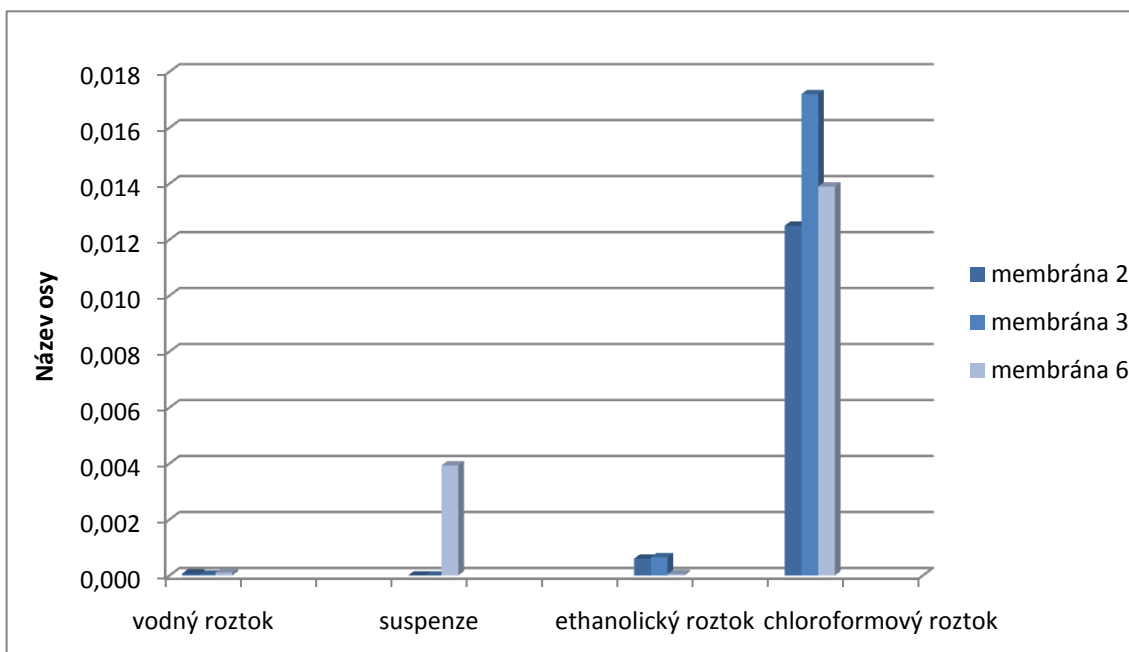
## 6.3. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán

### 6.3.1. Gravimetrické stanovení kofeinu

Hmotnost kofeinu adsorbovaného na impregnovaných membránách byla nejprve stanovena diferenčně gravimetricky. Hodnota adsorbovaného množství kofeinu je dána rozdílem hmotnosti vzorku membrány po a před impregnací (popsáno v kapitolách 4.2 a 4.3, výsledky shrnuje tabulka 5.4. v kapitole 5.3).

membrána	teoretická průměrná hmotnost adsorbovaného kofeinu [g]			adsorpční kapacita membrány [%]		
	2	3	6	2	3	6
nasycený vodný roztok kofeinu	0,0001	0,0000	0,0001	0,81	0,00	0,81
suspenze PG:H <sub>2</sub> O (5%kofeinu)	0,0000	0,0000	0,0039	0,00	0,00	31,85
nasycený ethanolický roztok kofeinu	0,0006	0,0007	0,0000	4,86	5,26	0,40
nasycený chloroformový roztok	0,0125	0,0172	0,0139	101,2	139,3	112,6

Tab. 6.4. Přehled průměrných hmotností naadsorbovaného kofeinu



**Graf 6.3.** Přehled výsledků gravimetricky určeného množství adsorbovaného kofeinu.

Tabulka 6.4. uvádí průměrné hodnoty gravimetricky stanoveného množství kofeinu adsorbovaného na membránách. V případě vodného roztoku a suspenze kofeinu ve směsi vody a propylenglykolu je průměr vypočítán ze tří měření, v případě ethanolického a chloroformového roztoku vychází průměrná hodnota ze dvou měření. Kompletní primární data jsou uvedena v tabulce 5.4. Dále jsou v tabulce 6.4. obsaženy procentuální (m/m) hodnoty obsahu kofeinu (adsorpční kapacita) v membránách po impregnaci. Tyto hodnoty jsou vztaženy k průměrné hmotnosti vzorku (18x20mm) membrány tj. 0,01235g.

Je potřebné upozornit na to, že všechny vzorky membrán byly po kontaktu se sytícím médiem vždy stejným způsobem opláchnuty vodou, aby bylo možné omezit ovlivnění naměřených hodnot adsorbovaného kofeinu v důsledku ulpívání sytícího média na membráně.

Při porovnání membrán 2 a 3 se větší množství kofeinu impregnuje uvedeným způsobem do vzorků membrány 3.

Nejvíce kofeinu se na membrány adsorbuje, je-li k impregnaci použit nasycený chloroformový roztok jako sytící médium. Naopak nejméně kofeinu se na membránách zachytí po impregnaci 5% suspenzí kofeinu ve směsi vody a propylenglykolu.

### 6.3.2. Stanovení kofeinu metodou HPLC

Protokoly z měření liberace kofeinu z impregnovaných membrán jsou uvedeny v kapitole 5.3. Způsob jakým jsou protokoly v kapitole 5.3. číslovány uvádí tabulka 6.5.

		nasyčený vodný roztok kofeinu	suspenze PG:H <sub>2</sub> O (5%kofeinu)	nasyčený ethanolický roztok kofeinu	nasyčený chloroformový roztok
membrána 2	číslo protokolu	1	2	3	4
membrána 3		5	6	7	8
membrána 6		9	10	11	12
kontrola K <sub>1</sub>		13			
kontrola K <sub>2</sub>		14			

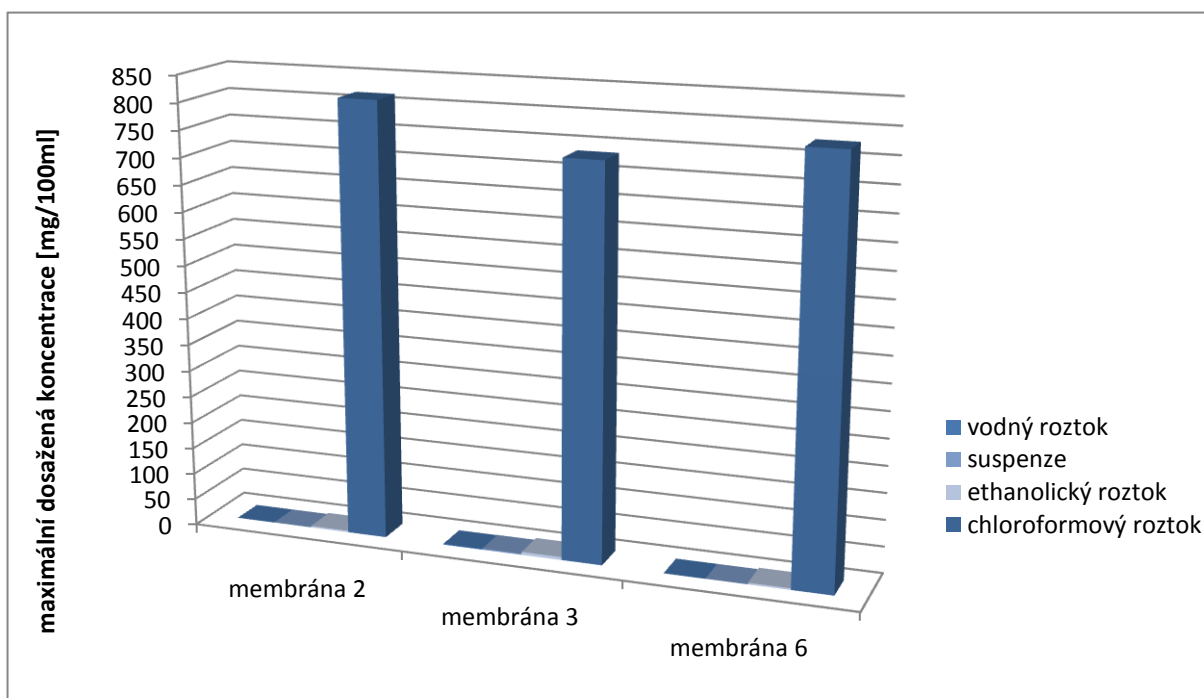
**Tab. 6.5.** Přehled číslování protokolů v kapitole 5.3.

Protokoly číslo 13 a 14 odpovídají kontrolním vzorkům s obsahem čisté kofeinové substance. Tyto vzorky nebyly syceny žádným z uvedených vehikul.

Jednotlivé výsledky stanovení kofeinu metodou HPLC jsou v dokumentaci uvedeny v původní, kompletní, tedy nevyhodnocené podobě. Polohy jednotlivých koncentračních hodnot v čase se jeví jako neuspořádané. Důvody tohoto v dokumentaci ilustrovaného faktu mohou spočívat jednak v průběhu vratných blíže neidentifikovaných dějů v soustavě akceptorové ho média s membránou. V některých případech mohou být kombinovány s chybou metodiky stanovení. Také proto není možné aproximovat určitou část průběhu koncentrací v různých časech odběru přímkou, jak to bývá obvyklé u průběhu permeačních pokusů se zřetelnou periodou steady state. V liberačních pokusech provedeného typu se jedná o závislosti v principu mocninné. Jako výsledky tohoto měření byly proto zvoleny koncentrace  $C_{20}$  v čase  $t=20\text{min}$ , a dále maximální dosažená koncentrace  $C_{\text{max}}$  pro daný vzorek, s vyznačením času, ve kterém bylo této koncentrace dosaženo. Podobný postup se běžně uplatňuje při hodnocení a prezentaci farmakokinetických dat a i v našem případě umožnil sjednotit pohled na naměřené výsledky. Uvedené hodnoty přehledně prezentuje tabulka 6.6.

	koncentrace kofeinu v pufru po 20minutách [mg/100ml]	maximální dosažená koncentrace kofeinu pro daný vzorek		sytící médium
		čas dosažení [min]	koncentrace [mg/100ml]	
membrána 2	0,363	180	0,485	vodný roztok
	0,456	120	0,530	suspenze
	2,039	40	2,804	ethanolický roztok
	691,089	40	815,496	chloroformový roztok
membrána 3	0,298	180	1,508	vodný roztok
	1,567	120	1,931	suspenze
	5,629	20	5,629	ethanolický roztok
	666,273	40	734,404	chloroformový roztok
membrána 6	0,266	120	0,329	vodný roztok
	0,282	180	0,317	suspenze
	3,091	20	3,091	ethanolický roztok
	778,727	20	778,727	chloroformový roztok
kontrola K <sub>1</sub>	5913,800	40	10957,200	
kontrola K <sub>2</sub>	7768,500	40	10984,600	

**Tab. 6.6.** Přehled výsledků – liberace kofeinu z impregnovaných membrán (metoda HPLC)



**Graf 6.3.** Přehled výsledků – liberace kofeinu z impregnovaných membrán (metoda HPLC)

Evidentní jsou rozdíly mezi výsledky vzorků membrán 2 a 3. Větší množství kofeinu (vyšší koncentrace kofeinu v pufru) se uvolní ze vzorků membrány 3. Tato tendence platí při porovnání vzorků membrán impregnovaných vodným roztokem kofeinu, suspenzí a ethanolickým roztokem. Je-li jako sytící médium použit chloroformový roztok kofeinu, uvolní vzorek membrány 3 menší množství modelového léčiva než vzorek membrány 2. Patrná je souvislost s výsledky úlohy 6.2., kde rozdíly v koncentraci kofeinu mezi jednotlivými membránami jsou sice nepatrné, ale tendence závislosti výsledků souhlasí s výsledky z HPLC stanovení kofeinu, uvolněného z impregnovaných membrán. Snížení koncentrací je, v případě obou médií použitých pro impregnaci, větší pro membránu číslo 3. To znamená, že právě membrána 3 je ze stejného sytícího média schopna adsorbovat na svůj povrch (resp. mezipovrchy) větší množství kofeinu. Membrána 6 má nižší schopnost adsorbovat na svůj povrch kofein než membrány 2 a 3.

Z vybraných kapalných vehikul se pro impregnaci membrán jeví jako nejvýhodnější nasycený roztok kofeinu v chloroformu. Z tohoto roztoku se na membrány absorbuje přibližně 1000x větší množství kofeinu než z vodného roztoku, přibližně 850x větší množství než ze suspenze kofeinu ve směsi vody a propylenglykolu a přibližně 200x větší množství kofeinu než z ethanolického roztoku. Uvedené násobky byly zjištěny z průměru hodnot koncentrací všech použitých membrán pro dané sytící médium.

Dále je možné konstatovat, že dosažení maximální koncentrace kofeinu v pufru je závislé na čase eluce v různých případech různě. U vodného roztoku kofeinu a suspenze kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody je maximální koncentrace dosaženo až ke konci měření, tj. od 120. minuty. Naopak v případě ethanolického a chloroformového roztoku kofeinu jsou maximální koncentrace dosaženy do 40 minut. Chování membrán impregnovaných ethanolickým a chloroformovým roztokem v tomto ohledu více připomíná chování čisté substance kofeinu (viz kontrolní vzorky K1 a K2). Uvedené kontrolní vzorky měly potvrdit, že rychlost liberace membrán z membrán nelimituje rychlost rozpouštění kofeinu v daném médiu a za daných podmínek.

## 6.4. Liberace inkorporovaného kofeinu z membrán

Protokoly z měření liberace kofeinu inkorporovaného v nanovlákných membránách jsou uvedeny v kapitole 5.4. Způsob jakým jsou protokoly v kapitole 5.4. číslovány uvádí tabulka 6.7.

		vzorek 1	vzorek 2
membrána 2	číslo protokolu	1	2
membrána 3		3	4
membrána 6		5	6
kontrola K <sub>3</sub>		7	
kontrola K <sub>4</sub>		8	

**Tab. 6.7.** Přehled číslování protokolů v kapitole 5.4.

Protokoly číslo 7 a 8 odpovídají kontrolním vzorkům s obsahem čisté kofeinové substance. Kofein se tedy v těchto dvou případech neuvolňoval z nanovlákných membrán, ale rozpouštěl přímo z použité substance.

Jako posuzovaný parametr byla zvolena koncentrace  $C_{20}$  kofeinu v pufru po 20 minutách od počátku pokusu. Dále je možné chování membrán posoudit na základě maximální koncentrace kofeinu, které by bylo teoreticky možné dosáhnout. Maximální dosažitelná koncentrace kofeinu v prostředí pufru použitého pro eluci je 41,16mg/100ml. Tato hodnota byla získána výpočtem na základě následující úvahy: membrány byly vyrobeny elektrospínigem z roztoku polymeru (chitosan) s obsahem 5% (m/m) kofeinu. Průměrná hmotnost membrány o velikosti 18x20mm je 12,35mg, 5% z tohoto množství je 0,6175mg kofeinu. Uvolní-li se celé toto množství inkorporovaného kofeinu do akceptorové fáze (1,5ml TRIS pufru), vznikne roztok o koncentraci 41,16mg/100ml. Tato maximální hodnota je vynesena v grafu 6.4. Dále byl posuzován čas potřebný k dosažení této koncentrace, hodnocen byl také procentuální podíl kofeinu, který se teoreticky mohl z membrány uvolnit i podíl, který se skutečně uvolnil. V pokusu byly vyhodnoceny také dva kontrolní vzorky, které měly potvrdit, že rychlost liberace kofeinu z membrán není limitována rychlostí rozpouštění v daném médiu a za daných podmínek.

	koncentrace kofeinu v puftru po 20minutách [mg/100ml]	maximální dosažená koncentrace kofeinu pro daný vzorek		podíl dosažené/maximální možné koncentrace [%]
		čas dosažení [min]	koncentrace [mg/100ml]	
membrána 2	0,410	180	0,892	2,17
	0,478	180	0,571	1,39
membrána 3	0,406	180	0,486	1,18
	0,416	180	0,495	1,20
membrána 6	0,539	20	0,539	1,31
	0,455	180	0,494	1,20
Kontrola K <sub>3</sub>	523,138	40	604,297	1468,17
Kontrola K <sub>4</sub>	440,686	40	594,744	1444,96

**Tab. 6.8.** Přehled výsledků – liberace inkorporovaného kofeinu z nanovlákných membránách

Mezi membránami 2 a 3 nejsou z hlediska hodnot  $C_{20}$  výrazné rozdíly. Z membrány 6 se po 20 minutách uvolnilo nepatrně větší množství inkorporovaného kofeinu než z membrán 2 a 3.

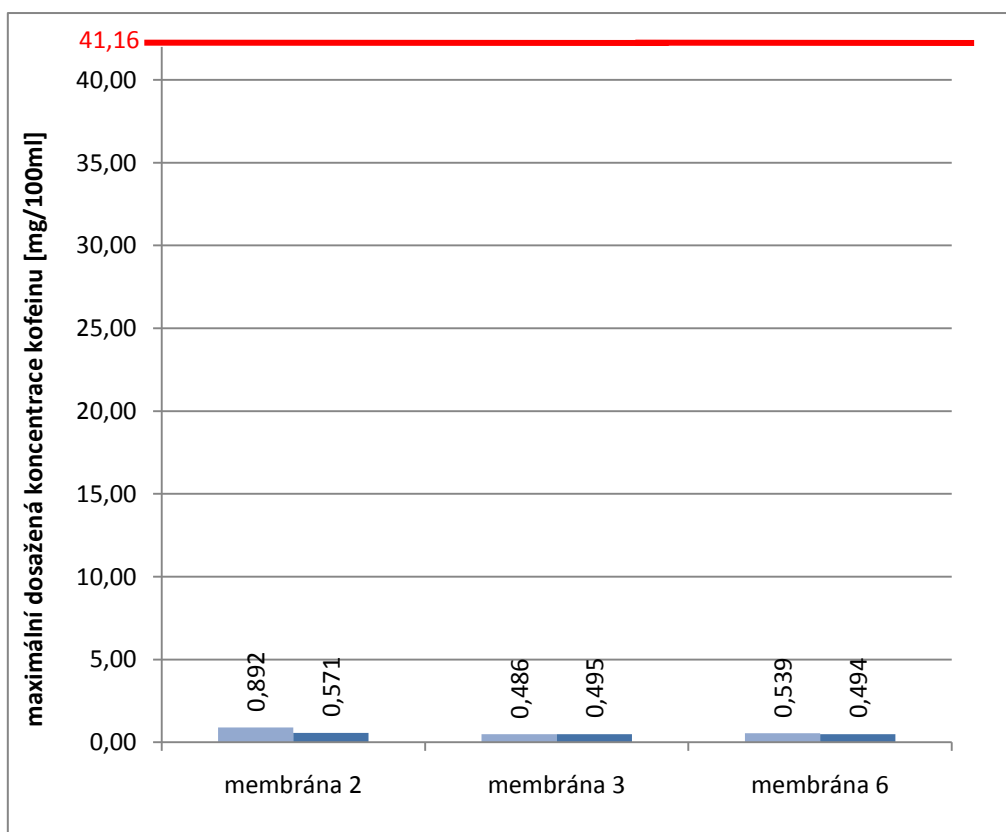
Pokud jde o maximální dosažené koncentrace, je membrána 2 schopna uvolnit větší množství kofeinu než membrána 3. V porovnání s pokusem, kdy bylo zkoumáno uvolněné množství kofeinu z impregnovaných membrán (porovnávalo s membránami impregnovanými vodným roztokem a suspenzí), je možné vysledovat zajímavé souvislosti:

- a) Membrána 2 uvolní větší množství inkorporovaného kofeinu, zatímco impregnovaný kofein ve srovnání s membránou 3 spíše zadržuje (resp. uvolněné množství kofeinu je menší).
- b) Membrána 3 naopak inkorporovaný kofein uvolňuje méně, zatímco kofein impregnovaný uvolní v porovnání s membránou 2 ve větší míře. Materiál, z něhož je vyrobena membrána 2 má tedy celkově nižší využitelnou kapacitu k adsorpci kofeinu než materiál použitý pro výrobu membrány 3.
- c) Podobná závislost platí pro membránu 6 (neznámé složení) – po impregnaci uvolní menší množství kofeinu než membrány 2 a 3 a v ohledu inkorporovaného kofeinu uvolní více kofeinu, než uvedené membrány.

d) Materiál pro výrobu membrány označené číslem 6 má tedy nižší afinitu ke kofeinu. Při impregnaci se neadsorbuje tak vysoké množství kofeinu, jako na ostatní dvě. Zároveň inkorporovaný kofein není ve vláknech tak pevně zadržován.

Doba nutná pro dosažení maximální koncentrace je pro všechny vzorky cca 180 minut. Jedinou výjimku tvoří první vzorek membrány 6, kde je čas nutný pro dosažení maximální koncentrace pouze 20 minut. Při kontrole průběhu závislosti dle protokolu 5 (kapitola 5.4.) je však vidět, že tato první hodnota nápadně vybočuje od ostatních. Je proto možné domnívat se, že u tohoto vzorku došlo k blíže neurčené chybě měření. Po vyloučení tohoto vzorku by bylo maximální koncentrace dosaženo ve stejném čase jako u ostatních vzorků – tedy po 180 minutách.

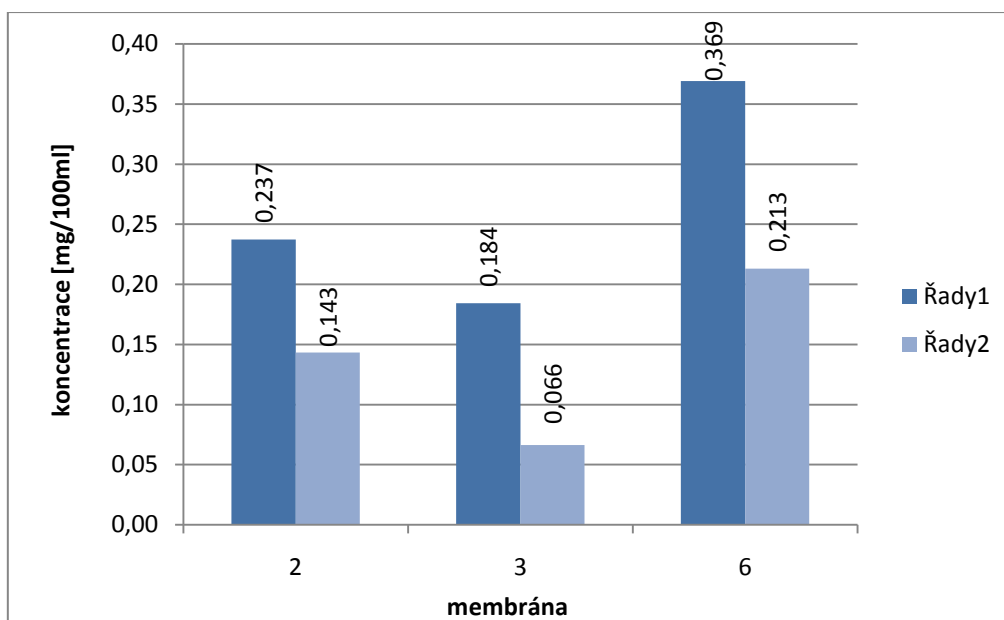
Hodnota maximální teoreticky dosažitelná koncentrace kofeinu v pufru byla vypočtena na 41,16mg/100ml (viz výše). Ve skutečnosti jsou však dosahovány koncentrace na úrovni 1,18 až 2,17% této hodnoty, vyjádřeno číselně: 0,486mg/100ml až 0,892mg/ml. Tento stav vyjadřuje graf 6.4.



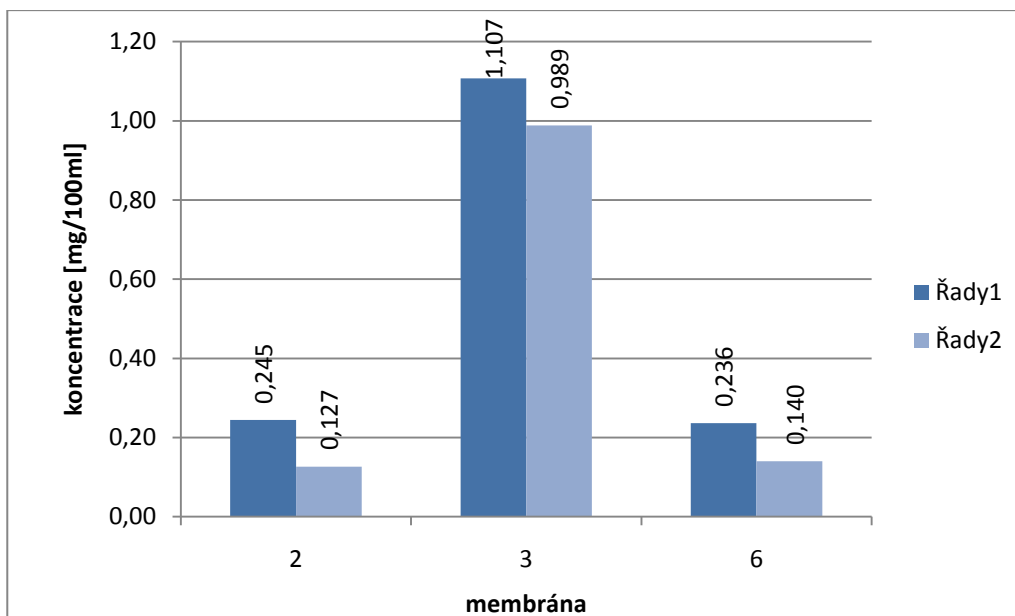
**Graf 6.4.** Množství uvolněného kofeinu inkorporovaného v nanovlákněných membránách.

## 6.5. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán po dlouhodobé eluci

Koncentrace kofeinu v akceptorové fázi (směs propylenglykolu a vody) byla z technických důvodů změřena celkem třikrát. Výsledky prvního měření se od dalších dvou výrazně lišily. První série výsledků proto nebyla pro hodnocení chování membrán použita. Ostatní výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.5. (kapitola 5.5.). Jako souhrnné výsledky nejsou uvažovány průměrné hodnoty z těchto dvou měření. Tento postup byl zvolen jako transparentní způsob vyjádření analogického průběhu závislosti obou interpretovaných měření (viz grafy 6.5. a 6.6.).



**Graf 6.5.** Koncentrace kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody po liberaci membrán syčených nasyceným vodným roztokem kofeinu (řada 1 znázorňuje druhou sérii měření, řada 2 třetí sérii měření)



**Graf 6.6.** Koncentrace kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody po liberaci membrán sycených 5% suspenzí kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody (řada 1 znázorňuje druhou sérii měření, řada 2 třetí sérii měření)

Jak ukazují grafy 6.5. a 6.6., je možné použitým způsobem měření zjistit rozdílnost hodnocených membrán. Na množství uvolněného kofeinu má vedle složení membrán vliv také médium použité k sycení membrán.

Největší množství kofeinu se do akceptorového média (směs propylenglykolu a vody) uvolní v případě impregnace vodným roztokem ze vzorku membrány 6. V případě impregnace membrán 5% suspenzí kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody dosahuje nejvyšších hodnot koncentrace kofeinu v médiu membrána 3.

Pro další hodnocení množství kofeinu uvolněného membránami, resp. pro vyjadřování absorpční kapacity („load capacity“) membrán, je možné navrhnout přepočítání množství kofeinu uvolněného do roztoku na 100mg membrány. Takto přepočítané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6.9. Údaje v této tabulce jsou vztaženy k průměrné hmotnosti vzorků membrán o velikosti 18x20mm, tedy ke vzorkům o velikosti používané ve všech pokusech této práce (tj. 0,01235g). Největší hodnotu takto vypočítané kapacity lze pozorovat u vzorku membrány 3 impregnované suspenzí kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody.

označení vzorku	2. měření		3. měření	
	konzentrace kofeinu v akceptorové fázi	množství kofeinu uvolněného ze 100mg membrány	konzentrace kofeinu v akceptorové fázi	množství kofeinu uvolněného ze 100mg membrány
	[mg/100ml]	[mg]	[mg/100ml]	[mg]
2.2.	0,24	1,92	0,14	1,16
3.2.	0,18	1,49	0,07	0,54
6.2.	0,37	2,99	0,21	1,73
2.5.	0,24	1,91	0,13	1,05
3.5.	1,11	8,96	0,99	8,00
6.5.	0,24	1,91	0,14	1,14

**Tab. 6.9.** Množství uvolněného kofeinu přepočtené na 100mg membrány

# 7. Závěry

---

## 7.1. Stanovení obsahu vlhkosti v nanovláčkových membránách

- Dvanáctihodinové uchování všech zkoumaných vzorků v exsikátoru nad silikagelem nepřináší výrazné ovlivnění obsahu vlhkosti. Z hlediska obsahu vlhkosti dochází k rovnovážnému stavu nejpozději po 22 hodinách pobytu v exsikátoru.
- Vzorky membrán různého složení prakticky nejsou v ohledu obsahu vlhkosti odlišné, a rozdíly naměřené vážením jsou na úrovni do 1,5 %. (viz tabulka 6.1).
- Vzorek membrány 6 (neznámé složení) nelze na základě tohoto měření připodobnit k žádnému ze vzorků známého složení a rozdíly naměřené vážením jsou na úrovni přibližně 1,5%.

## 7.2. Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po sycení membrán

- Rozdíly naměřené po adsorpci léčiva jednotlivými membránami jsou minimální. Přesto je možné pozorovat, že membrána 3 způsobí v obou sytících médiích větší úbytek obsahu kofeinu. Je proto možné se domnívat, že membrána z tohoto materiálu dokáže na svůj povrch adsorbovat větší množství kofeinu.
- Vzorek membrány 6 (neznámé složení) nelze na základě tohoto měření připodobnit k žádnému ze vzorků známého složení. Adsorbční schopnost tohoto vzorku závisí na použitém sytícím médiu a je pro každé pro každé z nich jiná.

## 7.3. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán

### 7.3.1. Gravimetrické stanovení kofeinu

- Nejvíce kofeinu se na membrány adsorbuje, je-li jako sytící médium použit nasycený chloroformový roztok kofeinu.

- Nejméně kofeinu se na membránách zachytí po impregnaci 5% suspenzí kofeinu ve směsi vody a propylenglykolu (2:3) .
- Při porovnání membrány 2 a 3 se větší množství kofeinu adsorbuje na vzorky membrány 3.

### 7.3.2. Stanovení kofeinu metodou HPLC

- Větší množství kofeinu se uvolní z membrány 3. Toto platí, je-li jako sytící médium použit vodný kofeinový roztok, suspenze resp. ethanolický roztok kofeinu. V případě použití chloroformového roztoku, uvolní větší množství kofeinu membrána 2.
- Z vehikul použitých pro impregnaci se jako neúčinnější jeví nasycený chloroformový roztok.
- Při liberaci kofeinu z membrán je maximálních koncentrací kofeinu v akceptorové fázi dosaženo od 120. minuty v případě použití suspenze kofeinu a vodného roztoku. V případě ethanolickeho a chloroformového roztoku je maximální koncentrace dosaženo do již do 40 minut.

### 7.4. Liberace inkorporovaného kofeinu z membrán

- V ohledu maximální dosažené koncentrace ( $C_{max}$ ) je membrána 2 ve srovnání s membránou 3 schopná uvolnit větší množství kofeinu.
- Doba nutná pro dosažení maximální koncentrace je u všech vzorků shodně 180 minut.
- Množství skutečně uvolněného kofeinu dosahuje maximálně 2,2% celkového obsahu kofeinu v membránách.

### 7.5. Liberace kofeinu z impregnovaných membrán po dlouhodobé eluci

- Na množství uvolněného kofeinu má vedle složení membrán významný vliv složení média použitého k sycení.
- Největší adsorpční kapacitu vykazuje vzorek membrány 3 impregnovaný suspenzí kofeinu ve směsi propylenglykolu a vody.

## 8. Souhrn

---

Teoretická část práce je věnována polymeru chitosan a jeho derivátům, Podrobněji je charakterizována molekula polymeru, samostatně je popsána jeho rozpustnost a chemické modifikace. V další části je pojednána biokompatibilita a biodegradabilita chitosanu. Parametry elektrospínání chitosanu tuto kapitolu uzavírají.

Experimentální část je nejprve věnována stanovení vlhkosti ve vzorcích 3 rozdílných nanovláknenných membrán a jejich gravimetrickým změnám při uchování v exsikátoru. Vzorky membrán vážou vodu maximálně do 1,5% (m/m) a jsou navzájem málo odlišné.

Druhá část kvantifikuje změny ve složení sytících vehikul, kterými byla provedena impregnace vzorků nanomembrán. Největší množství kofeinu adsorbovala membrána 3, a to v případě obou sytících médií.

Následuje hodnocení množství kofeinu, které jsou testované membrány ze svého povrchu schopny uvolnit in vitro. V případě syčení membrán vodným roztokem kofeinu a suspenzí kofeinu je maximum následné liberace do akceptorové fáze dosaženo od 120. minuty. V případě ethanického a chloroformového sytícího roztoku je maximální koncentrace uvolněného kofeinu dosaženo již do 40 minut.

Vyhodnocení uvolnitelného množství kofeinu inkorporovaného do polymeru nanomembrán před zpracováním elektrospínáním je předmětem další kapitoly. Doba nutná pro dosažení maximální koncentrace je u všech vzorků shodně 180 minut. Množství skutečně uvolněného kofeinu dosahuje maximálně 2,2% celkového obsahu kofeinu v membránách.

Poslední úsek práce přináší celkový pohled na uvolňování impregnovaného i inkorporovaného kofeinu.

## 9. Abstract

---

The theoretical part of this work deals with chitosan polymer and its derivatives. A polymer molecule is described in more detail, its solubility and chemical modifications are described separately. In the next part biocompatibility and biodegradability of chitosan are dealt with. Parameters of the electrospinning of chitosan end this chapter.

The experimental part is first dedicated to the determination of aquosity in the samples of 3 different nanofiber membranes and to their gravimetric changes by keeping in the desiccator. The samples of membranes absorb water at the most up to 1,5% (m/m) and there is not a big difference among them.

The second part quantifies changes in the composition of the saturated excipients which were used for the impregnation of the samples of nanomembranes. The highest amount of caffeine was absorbed by the membrane 3, namely in case of both saturating media.

The evaluation of the amount of caffeine which the tested membranes are able to release from their surface in vitro follows. In case of the saturation of membranes by the aqueous solution of caffeine and by the caffeine suspension is the maximum of the subsequent liberation into the acceptor phase reached from the 120<sup>th</sup> minute. In case of the ethanolic and chloroform saturated solution is the maximal concentration of the released caffeine already reached within 40 minutes.

The evaluation of the releasable amount of caffeine incorporated into the polymer of nanomembranes before the electrospinning processing is the subject of the next chapter. The period necessary for reaching the maximum concentration is 180 minutes, the same for all samples. The amount of the really released caffeine reaches maximally 2,2% of the total amount of the caffeine in membranes.

The last part of the work brings the global view on the release of the impregnated and incorporated caffeine.

# 10. Použité zkratky a symboly

---

## 10.1. Běžné

HPLC	high performance liquid chromatography
CHIT	chitosan
PG	propylenglykol
PUR	polyuretan
SD	směrodatná odchylka
TRIS	trolaminový pufr (pH=7,1)

## 10.2. Měření liberace kofeinu

$C_{\max}$	maximální koncentrace kofeinu dosažená v daném pokusu; [mg/100ml]
$C_{nk}$	nekorigovaná koncentrace kofeinu; [mg/100ml]
$C_k$	korigovaná koncentrace kofeinu; [mg/100ml]
$C_{20}$	koncentrace kofeinu v čase $t=20\text{min}$ ; [mg/100ml]
$t$	čas; [h]
$V_0$	celkové množství akceptorové fáze [ml]
$\Delta V_{\text{dop}}$	množství doplňované akceptorové fáze; [ml]

# 11. Označení vzorků

		název pokusu, pro který byl daný vzorek použit	4.1. Stanovení obsahu vlhkosti v nanovlákněných membránách	
			syťící médium	
1	nasycený vodný roztok kofeinu	tento vzorek nebyl použit v žádném z pokusů		
2		liberace kofeinu z impregnovaných membrán po dlouhodobé eluci		
3		liberace kofeinu z impregnovaných membrán		
4	suspenze kofeinu ve směsi voda : propylenglykol (2:3)	tento vzorek nebyl použit v žádném z pokusů		
5		Liberace kofeinu z impregnovaných membrán po dlouhodobé eluci		
6		liberace kofeinu z impregnovaných membrán		
7	nasycený roztok kofeinu v ethanolu 96%	tento vzorek nebyl použit v žádném z pokusů		
8		liberace kofeinu z impregnovaných membrán		
9	nasycený roztok kofeinu v chloroformu	tento vzorek nebyl použit v žádném z pokusů		
10		liberace kofeinu z impregnovaných membrán		
11	nesyceno	liberace inkorporovaného kofeinu z membrá		
12		liberace inkorporovaného kofeinu z membrá		

Tab. 11. 1. Označení vzorků během pokusu<sup>9</sup>

<sup>9</sup> V celé práci jsou vzorky označovány kódem X.1. až X. 10. V uvedeném číselném kódu znamená X číselné označení membrány (tj. 2,3,6 dle tabulky 4.1.), číslo kódového označení je pořadovým číslem vzorku dané membrány. Toto označení je společné pro všechny úlohy, případné změny/výjimky jsou v textu řádně vyznačeny.

## 12. Literatura

---

1. **Beneš, Michal.** Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 1. chitosan, polyamid 6, polyurethan. Hradec Králové : autor neznámý, 2009.
2. **Hejazi, Radi a Mansoor, Amiji.** Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of controlled release.* 2003, Sv. 89 (str. 151-165).
3. **Kumar, M.N.V. Ravi, a další.** Chitosan Chemistry and Pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews.* 2004, Sv. 104 (str. 6017-6084).
4. **Rinaudo, Marguerite.** Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science.* 2006, Sv. 31 (str. 603-632).
5. **Pillai, C. K., Paul, Willi a Sharma, Chandra S.** Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science.* 2009, Sv. 34 (str. 641-678).
6. **Du, Jian a Hsieh, You-Lo.** PEGylation of chitosan for improved solubility and fiber formation via electrospinning. *Cellulose.* 2007, Sv. 14 (str.543-552).
7. **Muzzarelli, R.A. a Muzzarelli, C.** Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Advanced polymer science.* 2005, Sv. 186 (str. 151-209).
8. **Caiqin, Qin, a další.** Enzymatic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2002, Sv. 31 (str. 111-117).
9. **Lu, Shaojie, a další.** Preparation of Water-Soluble Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science.* 2004, Sv. 91 (str. 3497-3503).
10. **Issa, Mohamed M., Köping-Höggård, Magnus a Artursson, Per.** Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discovery Today: Technologies.* 2005, Sv. 2 (str. 1-6).
11. **Geng, Xinying, Kwon, Oh-Hyeong a Jang, Jinho.** Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials.* 2005, Sv. 26 (str. 5427-5432).

12. **Homayoni, Homa, Ravandi, Seyed Abdolkarim a Valizadeh, Masoumeh.** Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*. 2009, Sv. 77 (str. 656-661).
13. **Bhattarai, Narayan, a další.** Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*. 2005, Sv. 26 (str. 6176 - 6184).
14. **Ohkawa, a další.** Electrospinnign of chitosan. *Macromolecular rapid communications*. 2004, Sv. 25 (str. 1600-1605).
15. **De Vrieze, Sander, a další.** Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study. *Polymer Fibers*. 2007, Sv. 42 (str. 8029-8034).
16. **Desai, Keyur, a další.** Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers. *Biomacromolecules*. 2008, Sv. 9 (str. 1000-1006).