

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Andrea Orgoníková

ANALÝZA A CHARAKTERIZACE LIPOSOMŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍ  
ELEKTROFORÉZY

Analysis and characterization of liposomes using capillary electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2022

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 3. 5. 2022

Andrea Orgoníková

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá analýzou tří různých typů liposomů pomocí kapilární elektroforézy s UV-VIS a laserem indukovanou fluorescenční detekcí a využitím liposomů jako pseudostacionární fáze pro separace analytů metodou liposomální elektrokinetické chromatografie.

V rámci experimentů s liposomy DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE s enkapsulovaným 5-fluoruracilem byl v elektroferogramech úspěšně identifikován pík liposomů s enkapsulovaným 5-fluoruracilem a pík volného 5-fluoruracilu. Oba píky vykazovaly shodné absorpční spektrum v UV oblasti, čímž byla potvrzena jejich identita. Bylo tedy ověřeno, že kapilární elektroforéza s UV-VIS detekcí je použitelná pro separaci a detekci volného a enkapsulovaného léčiva, což je nezbytné pro stanovení účinnosti enkapsulace.

Sledováním změny efektivní mobility analytů po přidavku liposomů do základního elektrolytu byla hodnocena použitelnost zkoumaných liposomů v liposomální elektrokinetické chromatografii. Změna mobility byla pozorována u záporně nabitého 5-fluoruracilu a kladně nabitého tryptaminu a p-toluidinu. Absolutní hodnota efektivní mobility záporně nabitého 5-fluoruracilu se snížila vlivem interakcí s liposomy o 18,2 % a efektivní mobilita kladně nabitých analytů tryptaminu a p-toluidinu o 9,2 a 16 %.

Prázdné liposomy DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC s navázanou fluorescenční značkou byly na závěr analyzovány s využitím kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí. V rámci experimentů s těmito liposomy bylo zjištěno, že vložení napětí na kapiláru dochází k separaci dvou různých frakcí liposomů a snížení pH základního elektrolytu vedlo ke zmenšení poměru pohyblivější frakce vůči frakci méně pohyblivé. Bylo tedy prokázáno, že tuto detekční techniku je možné využít i pro detekci prázdných značených liposomů, což je důležité pro jejich charakterizaci.

## Klíčová slova

Liposomy, kapilární elektroforéza, liposomální elektrokinetická chromatografie

## **Abstract**

This diploma thesis deals with the analysis of three different types of liposomes using capillary electrophoresis with UV-VIS and laser induced fluorescence detection and the use of liposomes as a pseudostationary phase for analyte separations by liposome electrokinetic chromatography method.

In experiments with DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE liposomes encapsulating 5-fluoruracil, the peak of liposomes with encapsulated 5-fluoruracil and the peak of free 5-fluoruracil were successfully identified in the electropherograms. Both peaks showed the same absorption spectrum in the UV region, thus confirming their identity. It was proved that capillary electrophoresis with UV-VIS detection is useful for the separation and detection of free and encapsulated drug, which is necessary to determine the efficiency of encapsulation.

By monitoring the change of effective analyte mobility after the addition of liposomes to the background electrolyte the applicability of the investigated liposomes in liposome electrokinetic chromatography was evaluated. A change in mobility was observed for negatively charged 5-fluoruracil and positively charged tryptamine and p-toluidine. The absolute value of the effective mobility of negatively charged 5-fluoruracil decreased by 18.2 % due to interactions with liposomes and effective mobility of positively charged tryptamine and p-toluidine by 9.2 and 16 %.

Empty DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC liposomes with fluorescent label were finally analyzed using capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection. In experiments with these liposomes it was found that by applying voltage to the capillary two different fractions of liposomes are separated and lowering the pH of the background electrolyte led to a reduction in the ratio of more mobile fraction to the less mobile fraction. Thus, it has been shown that this detection technique can be also used for the detection of empty labeled liposomes, which is important for their characterization.

## **Keywords**

Liposomes, capillary electrophoresis, liposome electrokinetic chromatography

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu, vstřícný přístup a odbornou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Alici Tomníkové za cenné rady a pomoc při měření v laboratoři.

## Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	8
1 Cíl práce .....	10
2 Teoretická část .....	11
2.1 Liposomy .....	11
2.1.1 Složení liposomů .....	12
2.1.2 Rozdělení liposomů .....	12
2.1.3 Příprava liposomů .....	14
2.1.4 Stabilita liposomů .....	17
2.1.5 Využití liposomů v praxi .....	18
2.2 Analýza a charakterizace liposomů .....	18
2.2.1 Velikost a lamelarita .....	18
2.2.2 Účinnost enkapsulace .....	19
2.2.3 Kvantitativní složení .....	19
2.3 Proliposomy .....	20
2.4 Liposomy a kapilární elektroforéza .....	20
2.4.1 Stanovení permeability .....	21
2.4.2 Stanovení velikosti .....	21
2.4.3 Studium enkapsulovaných léčiv .....	22
2.5 Liposomální elektrokinetická chromatografie .....	23
3 Experimentální část .....	26
3.1 Použité chemikálie a instrumentace .....	26
3.1.1 Chemikálie .....	26
3.1.2 Instrumentace .....	26
3.1.3 Liposomy .....	27
3.2 Experimentální podmínky .....	28

3.2.1	Měření s CE UV-VIS .....	28
3.2.2	Měření s CE-LIF .....	28
3.3	Měření elektroosmotického toku .....	29
3.4	Měření mobility 5-fluoruracilu .....	30
3.5	Metoda LEKC .....	31
4	Výsledky a diskuze .....	32
4.1	Velikost a $\zeta$ -potenciál liposomů.....	32
4.2	Mobilita elektroosmotického toku .....	33
4.3	Mobilita 5-fluoruracilu.....	35
4.4	Měření s DPPC-DPPG-PEG2000-DMPE.....	36
4.4.1	Optimalizace metody měření s liposomy .....	36
4.5	Měření s DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE.....	40
4.6	Liposomální elektrokinetická chromatografie .....	43
4.6.1	Optimalizace podmínek.....	43
4.6.2	Efektivní mobilita analytů.....	44
4.7	Měření s DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC .....	47
5	Závěr .....	53
	Seznam literatury.....	55

## Seznam použitých zkratek a symbolů

AFM	mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CE-LIF	kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence)
cryo-TEM	kryo-transmisní elektronová mikroskopie (cryo transmission electron microscopy)
CTAB	hexadecyltrimethylamonium bromid (hexadecyltrimethylammonium bromide)
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
DMPC	dimyristoylfosfatidylcholin (dimyristoylphosphatidylcholine)
DMPG	dimyristoylfosfatidylglycerol (dimyristoylphosphatidylglycerol)
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin (dipalmitoylphosphatidylcholine)
DPPG	dipalmitoylfosfatidylglycerol (dipalmitoylphosphatidylglycerol)
DSPC	distearoylfosfatidylcholin (distearoylphosphatidylcholine)
DSPG	distearoylfosfatidylglycerol (distearoylphosphatidylglycerol)
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
GUV	obří unilamelární vezikuly (giant unilamellar vesicles)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
LEKC	liposomální elektrokinetická chromatografie (liposome electrokinetic chromatography)
LUV	velké unilamelární vezikuly (large unilamellar vesicles)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
MVL	multilamelární vezikuly (multilamellar vesicles)
NBDPC	fosfatidylcholin s navázaným nitrobenzoxadiazolem (phosphatidylcholine with nitrobenzoxadiazol)
NEDA	N-(1-naftylethylendiamin) (N-(1-naftylethylenediamine))
PC	fosfatidylcholin (phosphatidylcholine)
PE	fosfatidylethanolamin (phosphatidylethanolamine)



PEG	polyethylenglykol (polyethylene glycol)
PEG2000-DMPE	dimyristoylfosfatidylethanolamin s navázaným polyethylenglykolem (dimyristoylphosphatidylethanolamine with polyethylene glycol)
PI	fosfatidylinositol (phosphatidylinositol)
POPC	palmitoyloleoylfosfatidylcholin (palmitoyloleoylphosphatidylcholine)
$P_{ow}$	rozdělovací koeficient oktanol-voda (octanol-water partition coefficient)
PS	fosfatidylserin (phosphatidylserine)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SEC	vylučovací chromatografie (size-exclusion chromatography)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SUV	malé unilamelární vezikuly (small unilamellar vesicles)
TEM	transmisní elektronová mikroskopie (transmission electron microscopy)
5-FU	5-fluoruracil (5-fluorouracil)
$^{31}\text{P}$ NMR	fosfor-31 nukleární magnetická rezonance (phosphorus-31 nuclear magnetic resonance)
$T_c$	teplota fázové přechodu lipidů
$\mu_{eof}$	mobilita elektroosmotického toku
$v_{eof}$	rychlost elektroosmotického toku
$l_d$	délka kapiláry k detektoru
$l_c$	celková délka kapiláry
$U$	vložené napětí
$t_U$	délka vkládání napětí
$\mu_{po5}$ FU	pozorovaná mobilita 5-fluoruracilu
$\mu_{ef5}$ FU	efektivní mobilita 5-fluoruracilu
$c$	koncentrace
$A$	absorbance
$t_{mig}$	migrační čas
$\lambda$	vlnová délka
$I$	iontová síla

## **1 Cíl práce**

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat možnosti analýzy a charakterizace vybraných typů prázdných liposomů a liposomů s enkapsulovaným léčivem pomocí kapilární elektroforézy s absorpční detekcí v UV-VIS oblasti a laserem indukovanou fluorescenční detekcí. Dále bylo cílem této práce zhodnotit potenciál zkoumaných liposomů jako pseudostacionární fáze pro separace analytů metodou liposomální elektrokinetické chromatografie. Poznatky získané v rámci této práce budou sloužit jako vodítka pro další směřování výzkumu.

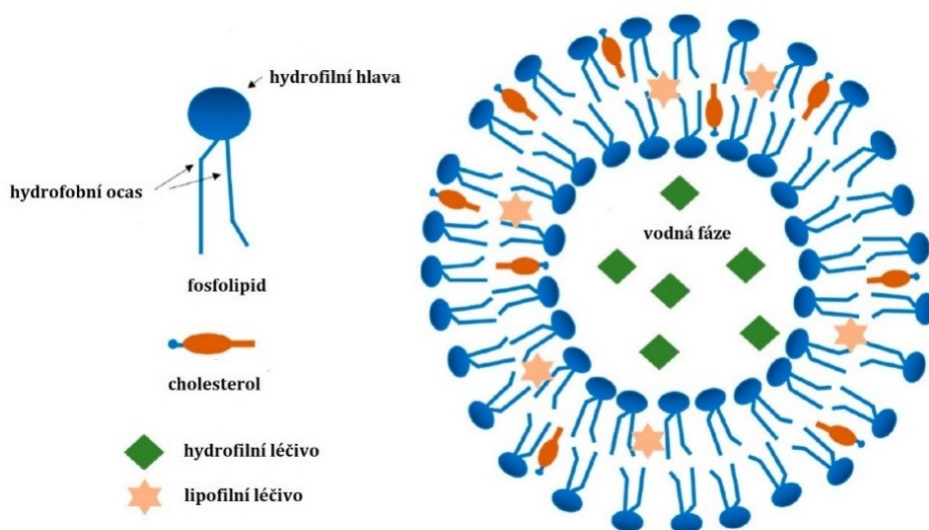
## 2 Teoretická část

### 2.1 Liposomy

Liposomy jsou malé sférické váčky tvořené z lipidů, které jsou od svého objevení v roce 1964 usilovně zkoumány, protože představují možnost jak lépe dodávat velké množství látek na cílová místa v lidském těle<sup>1-3</sup>. Liposomy jsou tvořeny amfifilními molekulami lipidů, které se ve vodném prostředí samy skládají za vzniku váčků, jež ve svém středu enkapsulují vodnou fázi, ve které jsou dispergovány<sup>4</sup>.

Mezi výhody liposomů patří jejich složení, díky čemuž jsou biokompatibilní, biologicky odbouratelné, netoxické a schopné enkapsulovat jak hydrofilní, tak i lipofilní léčiva (Obr. 1). Silně lipofilní léčiva jsou téměř vždy zachycena v lipidové dvojvrstvě, zatímco hydrofilní léčiva ve vodném kompartmentu uvnitř liposomu<sup>2</sup>. Účinnost enkapsulace lipofilních léčiv je vždy vyšší ve srovnání s léčivy hydrofilními<sup>5</sup>.

Liposomy jsou využívány jako transportní systém pro mnoho bioaktivních materiálů, mezi které patří například cytostatika, proteiny, peptidy, enzymy, DNA nebo vakcíny<sup>6</sup>. Enkapsulací léčiva do liposomu je léčivo chráněno před brzkou inaktivací a před enzymatickými procesy, které v organismu běžně probíhají. Řada léčiv, které se využívají k léčbě rakoviny, mají terapeutickou koncentraci velmi blízko koncentraci toxické. Využijí-li se liposomy k transportu těchto léčiv, sníží se expozice zdravé tkáně toxickému léčivu, což vede ke snížení nežádoucích účinků a zvýšení terapeutického indexu<sup>2,7</sup>.



Obr. 1 Stavba liposomu s enkapsulovaným hydrofilním a lipofilním léčivem. Převzato a upraveno z citace<sup>8</sup>.

I přes to, že se dají liposomy použít pro transport širokého množství látek, jejich použití v praxi není tak časté. Hlavním důvodem je jejich fyzikálně-chemická nestabilita daná oxidací a hydrolýzou fosfolipidů, nízká rozpustnost ve vodných roztocích, krátká doba cirkulace v lidském těle způsobená rychlou detekcí retikuloendotelovým systémem a únik enkapsulovaných léčiv<sup>9</sup>.

### **2.1.1 Složení liposomů**

Nejčastěji se při přípravě liposomů využívají přirozeně se vyskytující fosfolipidy, zejména glycerofosfolipidy a dále pak sfingolipidy, polysacharidy, steroly anebo syntetické lipidy, které vykazují na rozdíl od přirozeně se vyskytujících lipidů vyšší stabilitu. Molekula glycerofosfolipidu se skládá z glycerolu, na který jsou esterovými vazbami navázány dvě mastné kyseliny, které tvoří hydrofobní část. Hydrofobní část se může lišit délkou řetězce mastných kyselin a stupněm nasycení. Hydrofilní část tvoří navázaný zbytek kyseliny fosforečné, na niž je navázaná malá organická molekula. Tato molekula může být nabitá kladně, záporně, anebo může mít zwitteriontový charakter. Liposomy se nejčastěji připravují ze zwitteriontových fosfolipidů fosfatidylcholinu (PC) a fosfatidylethanolaminu (PE). Mezi záporně nabitými fosfolipidy patří fosfatidylserin (PS), kyselina fosfatidová a fosfatidylinositol (PI). Fosfatidylethanolamin bývá často modifikován navázáním molekuly polyethylenglykolu (PEG)<sup>4,10,11</sup>.

Jak již bylo řečeno, díky složení fosfolipidů dochází ve vodném prostředí ke spontánní tvorbě membrán. Polární části fosfolipidů dávají přednost interakci s vodným prostředím, zatímco jejich alifatické řetězce mastných kyselin jsou vodným prostředím odpuzovány a upřednostňují vzájemnou interakci<sup>7</sup>. Ve vodném prostředí je pro fosfolipidové dvojvrstvy energeticky příznivější vytvořit liposomy. Hydrofilní části fosfolipidů interagují s vnějším i vnitřním vodným prostředím, zatímco hydrofobní části molekul interagují mezi sebou, čímž se redukuje interakce s vodným prostředím<sup>12,13</sup>.

### **2.1.2 Rozdělení liposomů**

Liposomy se nejčastěji rozdělují podle velikosti a počtu fosfolipidových dvojvrstev v rámci liposomu (lamelarity). Podle počtu lamel se liposomy rozdělují na unilamelární, multilamelární a multivezikulární vezikuly<sup>11</sup>. Unilamelární vezikuly jsou tvořeny jednou fosfolipidovou dvojvrstvou, multilamelární vezikuly jsou tvořeny více fosfolipidovými dvojvrstvami a mají průměr větší než 0,5  $\mu\text{m}$  a multivezikulární vezikuly, jejichž průměr je

větší než 1  $\mu\text{m}$ , obsahují v rámci vezikuly další menší vezikuly<sup>11,14</sup>. Liposomy s jednou fosfolipidovou dvojrůstvou se pak podle velikosti dělí na malé unilamelární vezikuly (SUV), jejichž průměr je v rozmezí 20 – 100 nm, velké unilamelární vezikuly (LUV), které mají průměr v rozmezí 100 – 1000 nm a obří unilamelární vezikuly (GUV) s průměrem větším než 1000 nm (Obr. 2)<sup>4,11</sup>. Multilamelární vezikuly (MLV) mají průměry větší než 100 nm a obsahují obvykle 5 – 25 fosfolipidových dvojrůstev<sup>4,15</sup>.

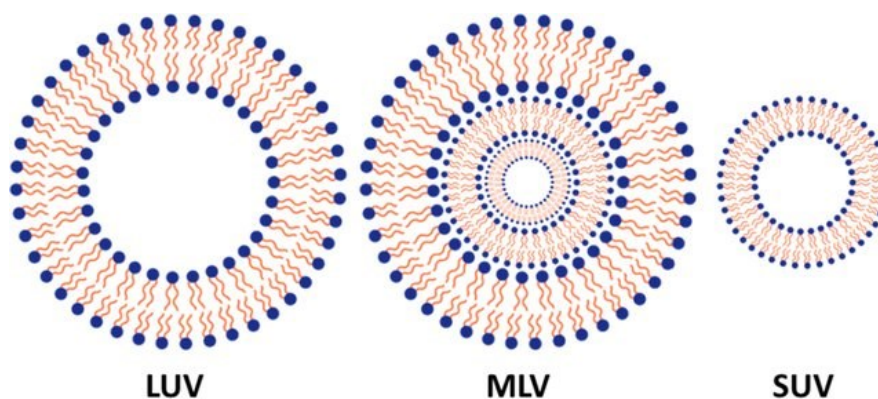
Pro enkapsulaci hydrofilních léčiv jsou nejvhodnější LUV, protože mají oproti MLV pouze jednu fosfolipidovou dvojrůstvu, a oproti SUV mnohem větší objem vodného roztoku uvnitř liposomu. Multilamelární vezikuly jsou naopak vhodnou volbou pro enkapsulaci hydrofobních léčiv, protože obsahují několik hydrofobních fosfolipidových dvojrůstev<sup>5</sup>.

Na základě složení a použití se liposomy dělí na konvenční, kationické, pH – sensitive, dlouho cirkulující a imunoliposomy<sup>1</sup>. Konvenční liposomy nazývané také první generace liposomů, jsou liposomy obsahující neutrální nebo záporně nabitě fosfolipidy, které se používají při studiu enkapsulace léčiv nebo se uplatňují jako modelové buněčné membrány. Často se liší ve svých vlastnostech, jako je složení, velikost, povrchový náboj a počet fosfolipidových dvojrůstev. Jejich doba cirkulace v krevním oběhu je poměrně krátká a dochází k jejich akumulaci v buňkách retikuloendotelového systému<sup>1,5,11</sup>. Kationické liposomy jsou vhodné pro transport záporně nabitých makromolekul, jako jsou DNA, RNA nebo oligonukleotidy, protože obsahují kladně nabitě fosfolipidy<sup>1,5</sup>. K prodloužení doby oběhu v lidském těle se používají dlouho cirkulující liposomy potažené polymerem polyethylenglykolem. Navázáním PEG se prodlouží cirkulace liposomu v krvi z několika minut na několik hodin. Čím delší řetězec PEG se použije, tím je doba cirkulace delší<sup>5,11</sup>. Liposomy citlivé na pH se v kyselém prostředí destabilizují, což se využívá k rychlému uvolnění léčiva a léčbě nádorů<sup>16</sup>. Poslední zmíněnou skupinu liposomů představují imunoliposomy. Jsou to liposomy na jejichž povrchu jsou navázány monoklonální protilátky nebo jejich fragmenty. Tyto modifikované liposomy pak mohou být vychytávány buňkami, které mají na svém povrchu specifický antigen pro danou protilátku. Nejčastěji se však kombinují dlouho cirkulující liposomy s imunoliposomy navázáním protilátek na PEG, který je vázaný na lipidech liposomu<sup>1,17</sup>.

Liposomy se mohou dále dělit na základě parametrů, které ovlivňují jejich chování in vivo. Mezi tyto parametry patří například tekutost fosfolipidové dvojrůstvy nebo povrchový náboj liposomů. Pro lipidy existuje charakteristická teplota fázového přechodu  $T_c$ , která je závislá na délce řetězců mastných kyselin, jejich stupni nasycení a iontové síle roztoku, ve kterém jsou lipidy rozpuštěny. Pod touto teplotou se nachází lipidy v gelovém

stavu, zatímco nad touto teplotou ve stavu fluidním. Tekutost fosfolipidové dvojvrstvy lze ovlivnit použitím fosfolipidů s odlišnou hodnotou  $T_c$ . Pokud se při přípravě liposomů použijí lipidy, jejichž  $T_c$  je vyšší než tělesná teplota lidského těla, bude fosfolipidová dvojvrstva méně tekutá, což povede k menšímu úniku léčiva z liposomu. Pokud se použijí lipidy, jejichž  $T_c$  bude nižší než tělesná teplota, budou liposomy náchylnější k úniku léčiva, protože jejich fosfolipidová dvojvrstva bude více tekutá<sup>11,18</sup>.

Povrchový náboj může ovlivnit interakci liposomů s cílovými buňkami. Mechanismus transportu liposomů do buňky je založen na jejich adsorpci k povrchu buňky a následné endocytóze. U záporně nabitých liposomů dochází k endocytóze rychleji, zatímco neutrální liposomy s cílovými buňkami výrazně neinteragují a léčivo tak uvolňují extracelulárně<sup>18,19</sup>.



*Obr. 2 Schématické znázornění jednotlivých typů liposomů<sup>20</sup>.*

### 2.1.3 Příprava liposomů

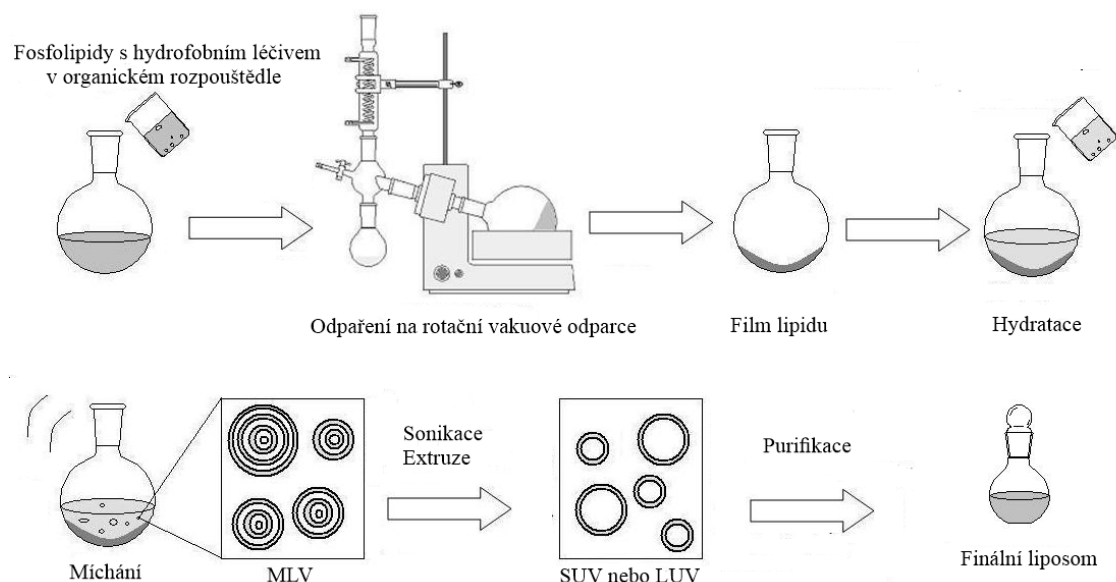
Existuje mnoho různých metod pro přípravu liposomů. Volba vhodné metody závisí na několika faktorech, jako je toxicita a koncentrace léčiva, jež má být enkapsulováno, typ roztoku, ve kterém mají být liposomy dispergovány, velikost liposomů, náklady na přípravu liposomů a také enkapsulační účinnost dané metody pro hydrofilní a hydrofobní léčiva<sup>7,21</sup>.

Hydratace lipidového filmu je jednou z nejpoužívanějších metod při přípravě liposomů<sup>22</sup>. Lipidy, ze kterých mají být liposomy připraveny, jsou nejdříve rozpuštěny v organickém rozpouštědle (nejčastěji chloroformu nebo methanolu) v baňce s kulatým dnem. Následně je organické rozpouštědlo odpařeno pomocí vakuové rotační odpařky, čímž vznikne na baňce tenký film lipidového filmu, který je dispergován ve vodě nebo pufru (Obr. 3). Hydrofilní léčiva, která se mají do liposomu enkapsulovat, se přidávají do vodného

pufry, zatímco hydrofobní léčiva se spolu s lipidy rozpouští v organickém rozpouštědle<sup>7,23</sup>. K jednoduššímu vytvoření fosfolipidové dvojvrstvy musí být během hydratace teplota lipidového filmu i teplota roztoku pufru nebo vody vyšší, než je teplota  $T_c$  lipidů. Intenzivním třepáním následně vznikají MLV různých velikostí<sup>22</sup>. Velikost vzniklých MLV a účinnost enkapsulace hydrofilního léčiva je silně ovlivněna dobou, po kterou se nechá lipidový film dispergovat<sup>23</sup>. Hydratace lipidového filmu patří k nejjednodušším metodám na přípravu liposomů, avšak účinnost enkapsulace hydrofilních léčiv činí u této metody pouhých 5 – 15%<sup>18</sup>. Homogenní unilamelární vezikuly o stejné velikosti se z nehomogenních MLV, které vznikají metodou hydratace lipidového filmu, mohou získat procesem sonikace nebo extruze<sup>7</sup>.

Extruze je nejjednodušší a nejčastější metoda, kterou se z MLV mohou připravit unilamelární liposomy. Během extruze dochází k protlačení lipidové suspenze skrze polykarbonátovou membránu s danou velikostí pórů. Po průchodu extrudérem vznikají homogenní liposomy, jejichž průměr je podobný velikosti pórů membrány. Výhodou extruze je dobrá reprodukovatelnost metody<sup>24</sup>.

Sonikace je druhou nejpoužívanější metodou pro zmenšení připravených liposomů. U této metody dochází k rozbití MLV pomocí ultrazvuku na menší jednodamelární nebo multilamelární vezikuly. Velikost vezikul je určena dobou, po kterou je lipidová suspenze sonifikována. Sonikaci lze provést pomocí sonikační sondy nebo sonikační lázně<sup>24</sup>. Problém, který se může vyskytnout při použití sonikační sondy, je znečištění lipidové suspenze materiálem, ze kterého je sonda vyrobena<sup>13</sup>. Hlavní výhodou sonikace oproti extruzi je její menší časová náročnost<sup>24</sup>.



Obr. 3 Schéma přípravy liposomů s využitím metody hydratace lipidového filmu. Převzato a upraveno z citace<sup>25</sup>.

Mezi další metody přípravy liposomů patří injekční metoda, která je založena na rychlém vstříkávání lipidové suspenze do vodné fáze. K výhodám této metody patří jednoduchost provedení a možnost přípravy velkého množství liposomů. Metoda vstříkávání ethanolu se používá k přípravě SUV. Typ liposomů, které touto metodou vznikají, závisí na koncentraci lipidů, rychlosti míchání, rychlosti vstříkávání lipidové suspenze, objemu ethanolu, pH vodné fáze a osmolalitě vodné fáze. Rychlejší míchání vodné fáze vede k přípravě homogennějších liposomů o menší velikosti, zatímco použití ethanolu o koncentraci větší než 50 % vede k přípravě liposomů o větší velikosti. K tvorbě liposomů nedochází, pokud je koncentrace ethanolu vyšší než 66 %. U této metody se za stálého míchání vstříkují do nadbytku vodné fáze lipidy rozpuštěné v ethanolu, čímž dojde k vystavení lipidů vodné fázi a tvorbě fosfolipidové dvojvrstvy. Ethanol se následně z vodného roztoku odstraňuje destilací. Nevýhodou této metody je nízká účinnost enkapsulace hydrofilních léčiv a omezená rozpustnost lipidů v ethanolu. Dalším problémem při použití ethanolu je, že ethanol s vodou tvoří azeotropní směs a je tedy velmi obtížné jej zcela odstranit<sup>22,26,27</sup>.

Alternativou metody vstříkávání ethanolu je metoda vstříkávání etheru, kdy se lipidy rozpuštěné v diethyletheru vstříkují do vodné fáze. Ether se následně z vodného roztoku liposomů odstraňuje zahřátím na teplotu 55 – 65 °C, čímž dojde k jeho odpaření. Vyšší



rozpuštěnost lipidů v etheru umožňuje připravit liposomy o vyšší koncentraci<sup>2,22,26</sup>.

Poslední zmíněnou metodou pro přípravu liposomů je emulgační metoda. Typickou emulgační metodou je technika, která se nazývá odpaření reverzní fáze. U této metody se lipidy rozpustí v organickém rozpouštědle, které se následně odpaří. Vzniklý film lipidů se opět rozpustí v organickém rozpouštědle, nejčastěji v diethyletheru. Následné přidání menšího množství vodné fáze k organické fázi s rozpuštěnými lipidy vede k tvorbě emulze vody a organické fáze. Odpařením organického rozpouštědla za sníženého tlaku dojde k tvorbě suspenze LUV. Hlavní výhodou emulgační metody je, že poskytuje vyšší enkapsulační účinnost ve srovnání s injekčními metodami<sup>22,23,28</sup>.

#### 2.1.4 Stabilita liposomů

Hlavním problémem při použití liposomů je jejich nízká fyzikální a chemická stabilita. Chemická stabilita liposomů je ovlivněna dvěma procesy, a to buď oxidací nebo hydrolyzou fosfolipidů. Oxidace probíhá snadněji u těch lipidů, které obsahují nenasycené mastné kyseliny. Při vyšší teplotě však může dojít k oxidaci i nasycených mastných kyselin<sup>29</sup>. Lipidy lze chránit před oxidací přidáním antioxidantů, zkrácením jejich doby výskytu na světlo nebo přípravou liposomů v prostředí dusíku nebo argonu<sup>23</sup>.

Stabilita liposomů může být ovlivněna i jejich velikostí, složením fosfolipidové dvojvrstvy, nábojem nebo způsobem přípravy. U menších liposomů dochází k snadnějšímu průchodu buněčnými membránami. Zároveň však dochází ke snížení účinnosti enkapsulace léčiva a zvýšení povrchové energie, což vede ke snížené stabilitě liposomů. Stabilitu fosfolipidové dvojvrstvy liposomu lze ovlivnit přidáním cholesterolu, který zároveň snižuje permeaci liposomu a únik enkapsulovaného léčiva<sup>9</sup>.

K zajištění delší stability se liposomy neuchovávají ve formě vodného roztoku, ale ve formě suchého prášku, který se získává procesem lyofilizace. Lyofilizace neboli sušení mrazem je metoda, během které se odstraňuje voda z roztoku liposomů při velmi nízkém tlaku. Lyofilizace představuje jedinou možnost, kterou lze použít k sušení liposomů zapouzdřujících termolabilní léčiva, která by mohla být zvýšenou teplotou degradována. Během sušení mrazem se k liposomům přidávají pomocné kryoprotektivní látky, aby nedocházelo k nežádoucímu úniku enkapsulovaných léčiv. Mezi tyto protektivní látky patří například trehalosa, sacharosa nebo glukosa<sup>2,11</sup>.

### 2.1.5 Využití liposomů v praxi

V současné době se liposomy používají zejména k léčbě rakoviny, plísňových infekcí, k transportu analgetik a při výrobě virových vakcín. Prvním produktem na bázi liposomů, který byl schválen v roce 1995 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv, je léčivo Doxil<sup>®</sup>. Tento přípravek, obsahující doxorubicin, se používá k léčbě rakoviny vaječníků a prsu<sup>30</sup>. Největší rozvoj však liposomy zaznamenaly s příchodem pandemie onemocnění Covid-19. Vakcíny od společnosti Pfizer/BioNTech i společnosti Moderna využívají k transportu mRNA do buněk kationické liposomy, které se záporně nabitými mRNA vytváří stabilní komplex. Liposom tak chrání nestabilní mRNA před rychlým rozpadem, ke kterému by v lidském organismu došlo<sup>31</sup>. Obě vakcíny jsou tvořeny syntetickými kationickými nebo ionizovatelnými lipidy, distearoylfosfatidylcholinem (DSPC) a cholesterolem, který zvyšuje stabilitu fosfolipidové dvojvrstvy. Zároveň je na jednom z lipidů u obou vakcín navázán PEG-2000, u kterého se předpokládá, že je zodpovědný za některé alergické reakce vůči těmto vakcínám<sup>31–33</sup>.

## 2.2 Analýza a charakterizace liposomů

K zajištění správného fungování liposomů jako transportního systému bioaktivních látek je nutné charakterizovat vlastnosti liposomů jako je velikost, lamelarita, povrchový náboj, kvantitativní složení a účinnost enkapsulace<sup>34</sup>. Mezi techniky, které se používají k analýze a charakterizaci liposomů, patří <sup>31</sup>P NMR, dynamický rozptyl světla (DLS), mikroskopie atomárních sil (AFM), fluorescenční spektroskopie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a další<sup>35</sup>.

### 2.2.1 Velikost a lamelarita

Velikost liposomů se nejčastěji stanovuje pomocí metod elektronové mikroskopie, DLS, AFM a vylučovací chromatografie (SEC)<sup>35</sup>. Hlavní metodou pro stanovení velikosti a lamelarity liposomů je transmisní elektronová mikroskopie (TEM). Obecnou nevýhodou TEM je, že při negativním barvení pomocí oxidu osmičelého nebo uranylacetátu dochází ke změnám ve stavbě liposomů<sup>34</sup>. Alternativou TEM je kryo-transmisní elektronová mikroskopie (cryo-TEM), u které nedochází k typickému barvení a fixaci vzorku jako u elektronové mikroskopie, a je to tedy metoda vhodnější pro analýzu liposomů. Ve zkratce se u cryo-TEM metody nanese na mikroskopickou mřížku tenký film vzorku liposomu, který se následně ponoří do chladicího média, čímž dojde k rychlému zesklotování, aniž by došlo

k nežádoucí krystalizaci. Zesklovatělý film liposomů se následně analyzuje pomocí mikroskopu při teplotě kapalného dusíku<sup>36</sup>.

Metoda DLS je založena na tom principu, že při průchodu paprsku laseru roztokem, který obsahuje liposomy, dochází k rozptylu záření do všech směrů v závislosti na velikosti a tvaru liposomů. Analýzou kolísání intenzity záření, které je způsobeno Brownovým pohybem makromolekul v roztoku, lze získat difúzní koeficienty, které souvisí s hydrodynamickou velikostí makromolekul<sup>37</sup>.

Dalšími metodami často využívanými pro stanovení velikosti liposomů jsou vylučovací chromatografie a vysokoúčinná vylučovací chromatografie, která má vůči SEC lepší reprodukovatelnost a účinnost separace. Obě tyto metody umožňují separovat liposomy od neenkapsulovaných analytů v roztoku a zároveň rozdělit liposomy do menších skupin na základě jejich podobné velikosti<sup>38</sup>. Analýza probíhá v koloně naplněné gelem s definovanou velikostí pórů a k separaci dochází díky rozdílné permeaci analytů do těchto pórů<sup>39</sup>. Interakce liposomů s gelem závisí na typu gelu, složení fosfolipidové dvojvrstvy liposomu a na enkapsulovaném analytu<sup>38</sup>. K nevýhodám SEC patří ztráta lipidů díky jejich adsorpci v gelu. Aby se těmto ztrátám zabránilo, před každou analýzou se gel nasýtí lipidy nejčastěji použitím malých sonikovaných liposomů<sup>38,40</sup>.

### 2.2.2 Účinnost enkapsulace

Účinnost enkapsulace je definována jako poměr množství enkapsulované látky v liposomu vůči celkovému množství látky (volné i enkapsulované)<sup>41</sup>. Ke stanovení účinnosti enkapsulace se nejdříve separuje volné léčivo od liposomem enkapsulovaného léčiva s využitím dialýzy, gelové filtrace nebo ultracentrifugace. Použití dialýzy je však časově náročné a při centrifugaci může docházet k destrukci liposomů a uvolnění enkapsulovaného léčiva<sup>42,43</sup>. Po separaci enkapsulovaného a volného léčiva se fosfolipidová dvojvrstva liposomů naruší, čímž dojde k uvolnění enkapsulované látky, jejíž množství se stanovuje pomocí fluorescenční spektroskopie, enzymových nebo elektrochemických metod<sup>35</sup>.

### 2.2.3 Kvantitativní složení

Většina metod, které se používají ke stanovení kvantitativního složení liposomů, je založena na vzniku barevných produktů, které se následně stanovují spektrofotometricky<sup>35,44</sup>. Bartlettův rozklad je metoda, která se používá pro stanovení

celkového obsahu fosfátu. Liposomy se při 160 °C zahřejí v kyselině sírové. Materiál je následně peroxidem vodíku oxidován na anorganický fosfát, který reaguje s molybdenem amonným za vzniku fosfomolybdenanu. Fosfomolybdenan se následně redukuje za vzniku modrého produktu, jehož absorbance se měří při vlnové délce 830 nm<sup>35,44</sup>.

Množství cholesterolu v liposomech lze stanovit enzymatickými metodami. Hydrolyzou esteru cholesterolu vzniká volný cholesterol, který se cholesterol oxidasou oxiduje za vzniku peroxidu vodíku. Peroxid vodíku následně reaguje s 4-aminoantipyrinem a fenolem za vzniku barevného produktu, jehož absorbance se měří při vlnové délce 500 nm<sup>35</sup>.

### 2.3 Proliposomy

Předešle zmíněné nevýhody liposomů (nízká fyzikální a chemická stabilita, únik enkapsulovaných léčiv, hydrolyza, oxidace a agregace liposomů) vedly v roce 1986 k objevení proliposomů. Proliposomy se na rozdíl od liposomů vyznačují vysokou stabilitou<sup>45,46</sup>. Jedná se o suché, volně tekoucí částice tvořené z léčiva, fosfolipidů a porézního prášku, které po kontaktu s vodnou fází nebo tělními tekutinami vytváří suspenzi liposomů<sup>45,47</sup>. Proliposomy jsou stejně jako liposomy složené z fosfolipidů, z nichž nejpoužívanější jsou hlavně fosfatidylcholin a fosfatidylglycerol. Navíc však proliposomy obsahují ještě ve vodě rozpustné porézní nosiče jako je například sorbitol, mannitol nebo mikrokrytalická celulóza<sup>45</sup>.

Příprava proliposomů zahrnuje rozpuštění lipidů s léčivem v organickém rozpouštědle. Roztok se následně plnicí trubicí přidává na porézní nosič v baňce vakuové rotační odparky za vzniku volně tekoucích částic. Druhá možnost přípravy proliposomů zahrnuje použití superkritického CO<sub>2</sub>. Do reakční nádoby se přidá roztok s rozpuštěnými lipidy, léčivem a porézní nosič. Za stálého míchání se do nádoby čerpá superkritický CO<sub>2</sub>, čímž dochází ke vzniku filmu léčiva a lipidů na povrchu částic porézního nosiče<sup>45,46,48</sup>.

### 2.4 Liposomy a kapilární elektroforéza

Kapilární elektromigrační metody jsou vhodné pro studium liposomů díky jejich typickým vlastnostem, jako je nízká spotřeba analytů, rychlá a účinná separace a vysoký stupeň automatizace<sup>4,49</sup>. Kapilární elektroforéza (CE) je metoda vhodná pro charakterizaci interakce mezi léčivem a liposomem, pro zkoumání účinnosti enkapsulace léčiv, pro studium úniku léčiv z liposomu a pro studium vlastností liposomů, jako je jejich velikost, povrchový

náboj a propustnost fosfolipidové dvojvrstvy<sup>4</sup>.

#### **2.4.1 Stanovení permeability**

Permeabilita liposomů je klíčový parametr, který musí být při studiu liposomů charakterizován, aby se předešlo nežádoucímu úniku enkapsulovaných látek z liposomů, během jejich cirkulace v lidském těle<sup>50</sup>. Tsukagoshi a kol. analyzovali liposomy připravené z dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC) s enkapsulovanými barvivy eosinem Y a rhodaminem B pomocí kapilární elektroforézy s chemiluminiscenční detekcí. Závislost stability a permeace liposomů na koncentraci enkapsulovaného pufru byla následně monitorována výskytem píků volného barviva a liposomem enkapsulovaného barviva na elektroferogramech. Experiment probíhal tak, že byly připraveny liposomy v 10 mM uhličitanovém pufru (pH = 9,0) s enkapsulovaným eosinem Y a uhličitanovým pufrům o různé koncentraci. Ze získaných elektroferogramů byl následně vypočítán poměr plochy píku volného eosinu Y vůči enkapsulovanému eosinu Y. Čím vyšší byl tento poměr, tím větší byla propustnost fosfolipidové membrány liposomu. Poměr ploch píku eosinu Y byl větší, pokud koncentrace enkapsulovaného uhličitanového pufru byla menší než koncentrace uhličitanového pufru, ve kterém byly liposomy dispergovány. Toto bylo vysvětleno snahou fosfolipidové membrány liposomu udržet osmotickou rovnováhu. Protože byla koncentrace uhličitanového pufru uvnitř liposomu menší, došlo k uvolnění vody z liposomu za účelem vyrovnání koncentrací, což vedlo ke smrštění liposomu a tedy uvolnění enkapsulovaného barviva<sup>51</sup>.

Franzen a kol. využili kapilární elektroforézu ke studiu účinnosti enkapsulace oxaliplatiny a k následnému studiu unikání léčiva z liposomu. K vyvolání zrychleného úniku léčiva byly liposomy sonikovány pomocí sonikační sondy. Na elektroferogramech bylo viditelné zvětšování píku volné oxaliplatiny a zmenšování píku enkapsulované oxaliplatiny s rostoucím časem sonikace. Franzen předpokládal, že úplné vymizení píku liposomů z elektroferogramu neznamena destruktci liposomů, ale spíše úplné uvolnění oxaliplatiny z liposomu. Pomocí DLS také zjistili, že s rostoucím časem sonikace došlo ke zmenšení liposomů<sup>52</sup>.

#### **2.4.2 Stanovení velikosti**

Kapilární elektroforéza není široce rozšířenou metodou pro stanovení velikosti liposomů<sup>4</sup>. Kapilární elektroforézu s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF)

využil Duffy a kol. ke studiu vlastností liposomů. K eliminaci elektroosmotického toku a snížení adsorpce liposomů na stěny kapiláry probíhalo měření v kapiláře pokryté poly(acryloylaminopropanolem). Liposomy připravené z PC, PS, PE a cholesterolu obsahovaly fluorescein o koncentraci  $10^{-6}$  M ve 2,5 mM tetraboritanu sodném (pH = 9,3). S využitím změřené korigované intenzity fluorescence, koncentrace fluoresceinu v liposomech a citlivosti detektoru byli schopni vypočítat zachycený objem v liposomu, ze kterého následně vypočítali poloměr liposomů<sup>53</sup>. Stanovení elektroforetické mobility liposomů pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí při vlnové délce 200 nm využila Wiedmer a kol. Velikost liposomů stanovili technikou DLS. Liposomy byly připraveny z palmitoyloleoylfosfatidylcholinu (POPC) a PS v různých molárních poměrech a dispergovány v 50 mM 2-(N-cyclohexylamino)ethansulfonové kyselině (pH = 9). Ze získaných hodnot elektroforetické mobility, velikosti liposomů a ze znalosti hodnoty viskozity pufru vypočítali náboj liposomů. Náboj liposomu byl tím větší, čím vyšší byl obsah záporně nabitých lipidů v liposomu<sup>54</sup>.

### 2.4.3 Studium enkapsulovaných léčiv

Kapilární elektroforézu lze využít i pro studium liposomů jako transportního systému léčiv a pro stanovení množství volného a liposomem enkapsulovaného léčiva<sup>4</sup>. Liposomy jsou často používány k transportu toxických léčiv, a proto je důležité nalézt metodu, kterou lze jednoduše a rychle stanovit množství volného a enkapsulovaného léčiva. Kromě CE lze využít k separaci další metody jako jsou ultracentrifugace, dialýza nebo extrakce v pevné fázi<sup>55</sup>.

Jako příklad použití kapilární elektroforézy k separaci volného a enkapsulovaného léčiva lze uvést publikaci, v níž se autoři zabývali separací léčiva doxorubicinu používaného k léčbě nádorů vaječníků. Separace probíhala v křemenné kapiláře a jako základní elektrolyt byl použit 20 mM fosfátový pufr s 10 % sacharosou (pH = 6,5). Stanovení volného doxorubicinu probíhalo změřením vzorku s přídavkem fluoresceinu jako vnitřního standardu. Fluorescein byl použit díky jeho dobré stabilitě ve fosfátovém pufru a díky vysokému absorpčnímu koeficientu. Množství volného doxorubicinu bylo následně stanoveno pomocí kalibrační závislosti. Ke stanovení celkového množství léčiva byl doxorubicin z liposomů uvolněn použitím detergentu<sup>55</sup>.

Jako další příklad lze uvést stanovení množství volných a enkapsulovaných oligonukleotidů pomocí CE. Pro enkapsulaci byly použity velké liposomy neutrálně,

popřípadě kladně nabitě. Neutrální liposomy totiž v elektrickém poli nemigrují, zatímco velké kladně nabitě liposomy migrují pomalu na opačnou stranu než záporně nabitě oligonukleotidy. Volné oligonukleotidy tak lze stanovit jejich migrací k anodě, čímž dojde k jejich oddělení od oligonukleotidů enkapsulovaných v liposomech, které migrovat nebudou, anebo budou migrovat na opačnou stranu směrem ke katodě. Pro stanovení celkového množství oligonukleotidů byly liposomy rozrušeny extrakcí směsí fenol-chloroform, a nebo použitím detergentu Triton X-100<sup>56</sup>.

## 2.5 Liposomální elektrokinetická chromatografie

Liposomy se mohou ve spojení s kapilární elektroforézou využít ve dvou různých uspořádáních. Kapilární elektrochromatografie, jež v sobě zahrnuje vlastnosti kapilární elektroforézy a HPLC, využívá liposomy k pokrytí stěny kapiláry za účelem vytvoření stacionární fáze. Aplikací napětí dochází ke vzniku elektroosmotického toku, který unáší mobilní fázi s analyty kapilárou. Neutrální analyty migrují s elektroosmotickým tokem (EOF) a k jejich rozdělení dochází díky jejich rozdílné distribuci mezi stacionární a mobilní fází. Nabitě sloučeniny jsou separovány jak díky distribuci mezi stacionární a mobilní fází, tak díky jejich rozdílným elektroforetickým mobilitám<sup>57-59</sup>. K pokrytí stěny křemenné kapiláry liposomy lze využít techniku, která je založena na silné interakci biotinu navázaného na fosfolipidech liposomu s proteinem avidinem, který je navázán na agarosovém gelu<sup>60</sup>. Liposomy s navázaným biotinem jsou však poměrně drahé a vzniklý komplex avidinu a biotinu v kapiláře vytváří další místo, se kterým můžou analyty přednostně interagovat<sup>61</sup>. Další možnosti pokrytí kapiláry zahrnují kovalentní navázání liposomů ke stěně křemenné kapiláry aktivované 4-nitrofenylchloroformiátem nebo jsou založeny na elektrostatické interakci záporně nabitých liposomů s kladně nabitou stěnou kapiláry, která je pokryta polymerem derivatizované agarosy<sup>62,63</sup>. K výhodám kapilární elektrochromatografie patří zejména vyšší separační účinnost, nízká spotřeba vzorků a nízké náklady na analýzu<sup>58</sup>.

Druhou metodou využívající spojení liposomů s kapilární elektroforézou je liposomální elektrokinetická chromatografie (LEKC). Tato metoda je založená na přidávání liposomů do základního elektrolytu, čímž dochází k vytvoření liposomální pseudostacionární fáze<sup>64</sup>. Metoda LEKC funguje na stejném principu jako micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). K rozdělení analytů dochází díky distribuci mezi vodnou mobilní fází a pseudostacionární liposomální fází<sup>65,66</sup>.

V roce 1996 se Nakamurovi a kol. povedlo poprvé využít LEKC metodu k separaci hydrofobních neutrálních analytů (bifenylu a naftalenu). Liposomy byly připraveny z dimyristoylfosfatidylcholinu (DMPC) a dimyristoylfosfatidylglycerolu (DMPG) v 10 mM Tris-HCl pufru s 50 mM NaCl (pH = 7,0). Bez přídavku liposomu do základního elektrolytu migrovaly oba analyty společně s EOF a nebylo možné je separovat. Přídavkem liposomu do základního elektrolytu došlo k migraci záporně nabitých liposomů směrem ke kladně nabitě elektrodě, zatímco EOF unášel základní elektrolyt směrem k záporně elektrodě. K separaci analytů došlo jejich rozdělením mezi mobilní a pseudostacionární liposomální fázi<sup>67</sup>.

Liposomální elektrokinetická chromatografie byla využita i pro separaci neutrálních steroidních hormonů. Jako pseudostacionární fáze byly využity záporně nabitě liposomy připravené z POPC, PS a cholesterolu. Záporně nabitě liposomy jsou pro LEKC metodu vhodnější, protože použitím liposomů se zwitteriontovým charakterem nedochází k dobré separaci nenabitých analytů. Je to dáno tím, že mobilita vzniklé liposomální pseudostacionární fáze je velmi podobná mobilitě vodné fáze uvnitř kapiláry. K měření byla využita nepokrytá křemenná kapilára i přes to, že u liposomů často dochází k adsorpci na stěnu kapiláry, což vede ke vzniku stacionární fáze. Předpokládá se však, že tato stacionární fáze však může mít pozitivní vliv na separaci nenabitých analytů<sup>68</sup>.

Hlavní využití metody LEKC je při studiu interakce léčiv s buněčnými membránami, protože jsou liposomy membránám strukturně velmi podobné<sup>69</sup>. Při formulaci léčiva hraje důležitou roli lipofilita, která umožňuje léčivu projít skrz fosfolipidovou dvojvrstvu membrán<sup>70</sup>. Pro stanovení lipofility se běžně využívá rozdělovací koeficient oktanol-voda  $P_{ow}$ , který však ke studiu interakce léčiva s membránami není příliš vhodný<sup>71</sup>. Nabitá léčiva interagují s membránami jak díky hydrofobním, tak díky elektrostatickým interakcím. Pro ionizované analyty je však  $P_{ow}$  nižší i přes to, že s liposomy díky elektrostatické interakci interagují více. Z toho důvodu je metoda LEKC pro studium interakce léčiv s buněčnými membránami vhodnější<sup>69</sup>.

Carozzino a Khaledi jsou autoři publikace, ve které se zabývali vlivem typu a koncentrace pufru, iontové síly a složení liposomu na interakci kladně nabitých a neutrálních analytů se záporně nabitými liposomy pomocí metody LEKC. Typ pufru, různá koncentrace pufru, rostoucí iontová síla ani změna složení liposomů neměly u neutrálních analytů vliv na rozdělovací koeficient. Naopak u kladně nabitých analytů s rostoucí iontovou silou došlo ke snížení rozdělovacího koeficientu. Je to dáno tím, že s větším množstvím protiiontů v roztoku dochází ke snížení elektrostatické interakce mezi analyty a liposomy.



Zároveň zvýšením obsahu záporně nabitých lipidů v liposomu dochází k nárůstu elektrostatické interakce mezi kladně nabitými analyty a záporně nabitými liposomy, což vede ke zvýšení rozdělovacího koeficientu<sup>69</sup>.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie a instrumentace

#### 3.1.1 Chemikálie

- Hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB) (Merck, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- Tetraboritan disodný dekahydrát p. a. (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- Hydroxid sodný p. a. (Penta, Praha, Česká republika)
- Kyselina octová 99% p. a. (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Octan sodný trihydrát p. a. (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Kyselina o-fosforečná 85% (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- p-toluidin 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- L-arginin hydrochlorid  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- L-tyrosin  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tryptamin  $\geq 97,5\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Thiomočovina 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Paracetamol (Zentiva, k. s., Praha, Česká republika)
- Abacavir (Zentiva, k. s., Praha, Česká republika)
- Adenin  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- N-(1-naftylethylendiamin) (NEDA)  $\geq 99\%$ , p. a. (Karl Roth, Karlsruhe, Německo)
- Tetraarginin trifluoroacetát (Bachem, Bubendorf, Švýcarsko)
- 17- $\beta$ -estradiol  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- 16:0 PG sodná sůl  $>99\%$  (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)
- 14:0 PEG-2000 PE amonná sůl  $>99\%$  (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)
- 16:0 PC  $>99\%$  (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)

#### 3.1.2 Instrumentace

- Kapilární elektroforéza 7100 s UV-VIS detekcí (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)

- Kapilární elektroforéza 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s laserem indukovanou fluorescenční detekcí Zetalif LED 480 nm (Picometrics, Francie)
- Křemenná kapilára, pokrytá vrstvou polyimidu o délce 50,0 cm, efektivní délka 41,5 cm s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)
- Křemenná kapilára, pokrytá vrstvou polyimidu o délce 63,5 cm, efektivní délka 42,5 cm (LIF) a 55,0 cm (UV-VIS) s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)
- Systém na přípravu deionizované vody Milli-Q (Millipore, Bedford, USA)
- pH metr 3540 pH & Conductivity Meter (Jenway, Staffordshire, UK)

### 3.1.3 Liposomy

Během experimentů byly používány tři typy liposomů, které se lišily ve svém složení a v koncentraci 5-fluoruracilu (5-FU), jenž byl enkapsulován ve vodném kompartmentu uvnitř liposomu. K enkapsulaci byl 5-FU zvolen z toho důvodu, že je záporně nabitý, vykazuje dostatečnou absorpci UV záření a na elektroferogramech by měl být viditelný jak enkapsulovaný, tak i volný. Liposomy byly připraveny skupinou prof. Ing. Františka Štěpánka, Ph.D. z Ústavu chemického inženýrství VŠCHT, konkrétně studentem Ing. Martinem Balouchem.

#### *DPPC-DPPG-PEG2000-DMPE*

Počáteční experimenty byly provedeny s liposomy, které byly dispergovány ve fosfátovém pufru o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  a které byly připraveny z dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC), dipalmitoylfosfatidylglycerolu (DPPG) a dimyristoylfosfatidylethanolaminu s navázaným polyethylenglykolem (PEG2000-DMPE) (8 : 1,8 : 0,2) o sumární koncentraci  $5 \text{ mg ml}^{-1}$  s enkapsulovaným 5-FU o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ .

#### *DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE*

Pro pozdější experimenty byly používány liposomy připravené z distearoylfosfatidylcholinu (DSPC), distearoylfosfatidylglycerolu (DSPG) a PEG2000-DMPE (7,5 : 2,2 : 0,3) o sumární koncentraci  $5 \text{ mg ml}^{-1}$  s enkapsulovaným 5-FU o koncentraci  $2 \text{ mg ml}^{-1}$ . Tyto liposomy byly dispergovány v roztoku obsahujícím 10 % sacharózu a glukonát vápenatý o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . Liposomy přidávané do základního elektrolytu u metody LEKC měly totožné

složení, avšak v sobě neměly enkapsulovaný žádný analyt.

#### *DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC*

Pro měření s CE-LIF byly použity liposomy připravené z DSPC, DSPG, PEG2000-DMPE a z PC s navázaným nitrobenzoxadiazolem (NBDPC) (7,5 : 2,2 : 0,3 : 0,05) o sumární koncentraci 5 mg ml<sup>-1</sup> s enkapsulovaným 5-FU o koncentraci 2 mg ml<sup>-1</sup>, popřípadě liposomy s totožným složením bez enkapsulovaného 5-FU. Tyto liposomy byly také dispergovány v roztoku obsahujícím 10 % sacharózu a glukonát vápenatý o koncentraci 1·10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup>.

## **3.2 Experimentální podmínky**

### **3.2.1 Měření s CE UV-VIS**

Měření s CE UV-VIS probíhalo v křemenné kapiláře o délce 50,0 cm, efektivní délce 41,5 cm a vnitřním průměru 50 μm. Na začátku každého dne měření byla kapilára promyta 10 minut hydroxidem sodným o koncentraci 1 mol l<sup>-1</sup> a 10 minut deionizovanou vodou. Před každým měřením byla kapilára promyta 2 minuty základním elektrolytem do odpadní vialky a 1 minutu základním elektrolytem do vialky se základním elektrolytem. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 5 s. Na kapiláru bylo vkládáno napětí o velikosti -30 kV a roztok v kapiláře byl zároveň mobilizován tlakem 5 kPa aplikovaným na vstupním konci kapiláry. Kazeta s kapilárou byla termostatována na teplotu 25 °C a elektroferogramy byly zaznamenávány při vlnové délce 200 nm.

Jako základní elektrolyt (BGE) byl použit fosfátový pufr (pH = 7,0) o koncentraci 1·10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup> s obsahem CTAB o koncentraci 2·10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>, případně tetraboritan sodný (pH = 9,1) o koncentraci 1·10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup> s obsahem CTAB o koncentraci 2·10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>.

### **3.2.2 Měření s CE-LIF**

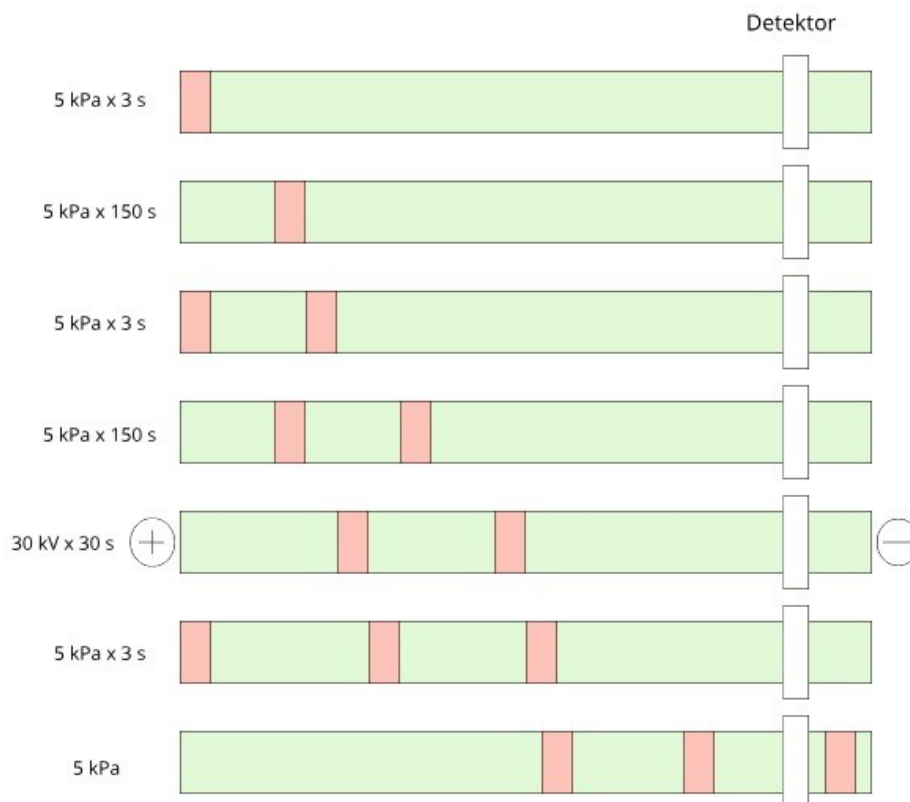
Na začátku každého dne měření byla kapilára promyta 10 minut hydroxidem sodným o koncentraci 1 mol l<sup>-1</sup> a 10 minut deionizovanou vodou. Před každým měřením byla kapilára promyta 3 minuty hydroxidem sodným o koncentraci 1 mol l<sup>-1</sup>, 30 s deionizovanou vodou, 1 minutu základním elektrolytem do odpadní vialky a 1 minutu základním elektrolytem do vialky se základním elektrolytem. Kazeta s kapilárou byla termostatována na teplotu 25 °C. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr (pH = 7,0) o koncentraci 1·10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup>.

### 3.3 Měření elektroosmotického toku

Pro stanovení závislosti mobility elektroosmotického toku na koncentraci CTAB v základním elektrolytu byla použita metoda Williamse a Vigha, kterou se do kapiláry dávkuje 3 zóny markeru elektroosmotického toku<sup>72</sup>. Jako marker EOF byla použita thiomochovina o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup> rozpuštěná v deionizované vodě. První zóna thiomochoviny byla dávkována tlakem 5 kPa po dobu 3 s. Tato zóna byla poté tlakem 5 kPa po dobu 150 s zasunuta do kapiláry. Druhá zóna thiomochoviny byla nadávkována a zasunuta do kapiláry stejně jako zóna předešlá. Následně bylo na kapiláru vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s. Nakonec byla nadávkována třetí zóna thiomochoviny a zóny byly tlakem 5 kPa protlačeny skrze detektor (Obr. 4). Všechna měření byla provedena třikrát. Na základě času průchodu jednotlivých zón detektorem byla vypočítána mobilita EOF podle následující rovnice:

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{(t_3 - 2t_2 + t_1) l_d l_c}{t_U U t_3} \quad (1)$$

kde  $t_1$  je čas průchodu první zóny thiomochoviny detektorem [s],  $t_2$  čas průchodu druhé zóny thiomochoviny detektorem [s],  $t_3$  čas průchodu třetí zóny thiomochoviny detektorem [s],  $l_d$  délka kapiláry k detektoru [m],  $l_c$  celková délka kapiláry [m],  $t_U$  čas, po který bylo na kapiláru vkládáno napětí [s] a  $U$  vkládané napětí [V].



Obr. 4 Schéma měření EOF. Marker EOF thiomocovina o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ . BGE tetraboritan sodný ( $\text{pH} = 9,1$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s obsahem CTAB v rozsahu koncentrací  $0,01 \cdot 10^{-3} - 20 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ .

### 3.4 Měření mobility 5-fluoruracilu

Pro stanovení závislosti efektivní mobility 5-FU na koncentraci CTAB v základním elektrolytu byl do kapiláry dávkován tlakem 5 kPa po dobu 5 s vzorek obsahující 5-FU o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  a thiomocovinu o koncentraci  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Na kapiláru bylo následně vloženo napětí  $-30 \text{ kV}$ . Všechna měření pro různé koncentrace CTAB v základním elektrolytu byla provedena třikrát. Na základě migračních časů 5-FU a thiomocoviny byla vypočítána efektivní mobilita 5-FU podle následujících rovnic:

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{l_d l_c}{t_{\text{thio}} U} \quad (2)$$

$$\mu_{\text{po5 FU}} = \frac{l_d l_c}{t_{5 \text{ FU}} U} \quad (3)$$

$$\mu_{\text{ef 5FU}} = \mu_{\text{po5 FU}} - \mu_{\text{eof}} \quad (4)$$

kde  $\mu_{\text{eof}}$  je mobilita EOF [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ],  $\mu_{\text{po5 FU}}$  pozorovaná mobilita 5-FU [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ],  $\mu_{\text{ef5 FU}}$  efektivní mobilita 5-FU [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ],  $l_d$  délka kapiláry k detektoru [m],  $l_c$  celková délka kapiláry [m],  $t_{\text{thio}}$  migrační čas thiomochoviny [s],  $t_{5 \text{ FU}}$  migrační čas 5-FU [s] a  $U$  vkládané napětí [V].

### 3.5 Metoda LEKC

Během metody LEKC byl do kapiláry dávkován vzorek analytu s přidavkem thiomochoviny tlakem 5 kPa po dobu 5 s. Na kapiláru bylo následně vloženo napětí o velikosti  $-30$  kV a roztok v kapiláře byl zároveň mobilizován tlakem 5 kPa aplikovaným na vstupním konci kapiláry. Jako BGE byl použit fosfátový pufr ( $\text{pH} = 7,0$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s obsahem CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Na základě migračních časů analytů a thiomochoviny byla vypočítána efektivní mobilita analytů stejně, jako je uvedeno v kapitole 3.4. Následně byla změřena efektivní mobilita stejných analytů s tím rozdílem, že byly do BGE přidány liposomy tak, aby jejich koncentrace byla 0,1, 0,2 nebo 0,3  $\text{mg ml}^{-1}$ . Pro metodu LEKC byly používány prázdné liposomy, které byly připraveny z DSPC, DSPG a PEG2000-DMPE (7,5 : 2,2 : 0,3) o sumární koncentraci 5  $\text{mg ml}^{-1}$ . Všechna měření byla provedena třikrát.

## 4 Výsledky a diskuze

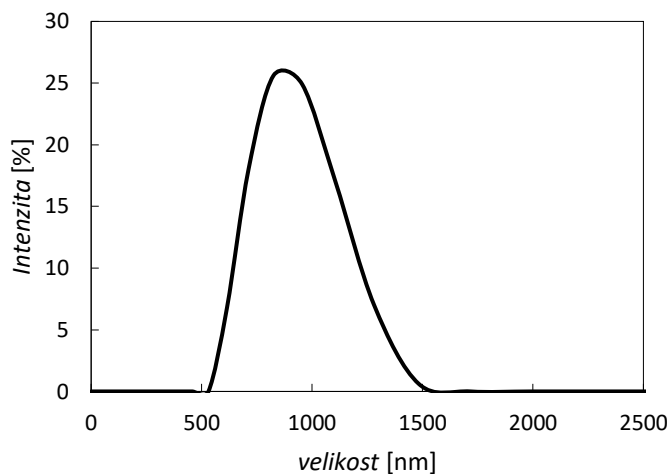
### 4.1 Velikost a $\zeta$ -potenciál liposomů

Výsledky z měření velikosti liposomů a jejich  $\zeta$ -potenciálu pomocí metody DLS byly laskavě poskytnuty Ing. Martinem Balouchem z Ústavu chemického inženýrství VŠCHT. Při přípravě liposomů DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE a DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC byla při extruzi lipidová suspenze protlačena skrze polykarbonátovou membránu s póry o velikosti 400 nm. Velikost vzniklých liposomů by tak měla být po extruzi menší, popřípadě rovna 400 nm (Obr. 5 a 6). Z Tab. 1 je však patrné, že je velikost liposomů DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE mnohem větší. V roztoku pufru totiž dochází ke vzájemné adhezi liposomů, což se projevuje větší velikostí liposomů při měření DSL metodou. V případě liposomů DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC k adhezi nedošlo a jejich velikost je skutečně menší než 400 nm. Rozdíl v chování obou typů liposomů může být způsobem přítomností fluorescenční značky na povrchu částic, která jejich adhezi potlačuje. Oba typy liposomů vykazují negativní  $\zeta$ -potenciál, což je pro kapilární elektroforézu důležitá informace, která potvrzuje, že budou podle předpokladu migrovat směrem k anodě.

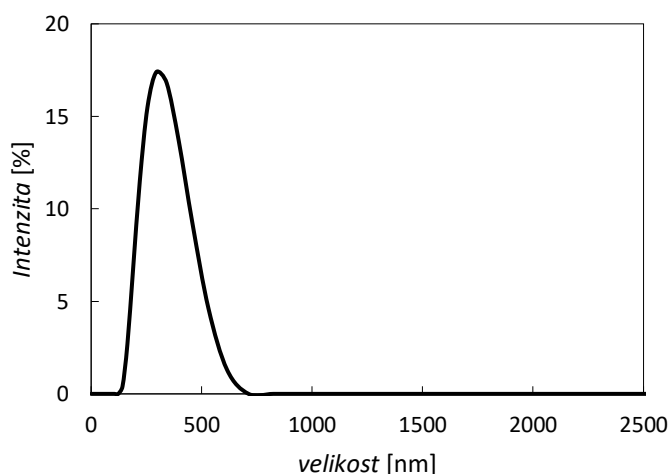
Tab 1. Medián velikosti a medián  $\zeta$ -potenciálu ze tří měření vzorku liposomů.

Typ liposomů	$d$ [nm]	SD [nm]	RSD [%]	$\zeta$ -poten. [mV]	SD [mV]	RSD [%]
DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE	906,8	85,9	9,5	-11,2	0,2	1,8
DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE- NBDPC	320,9	23,8	7,4	-37,8	1,4	3,8





Obr. 5 Intenzitní distribuce velikosti liposomů DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE.

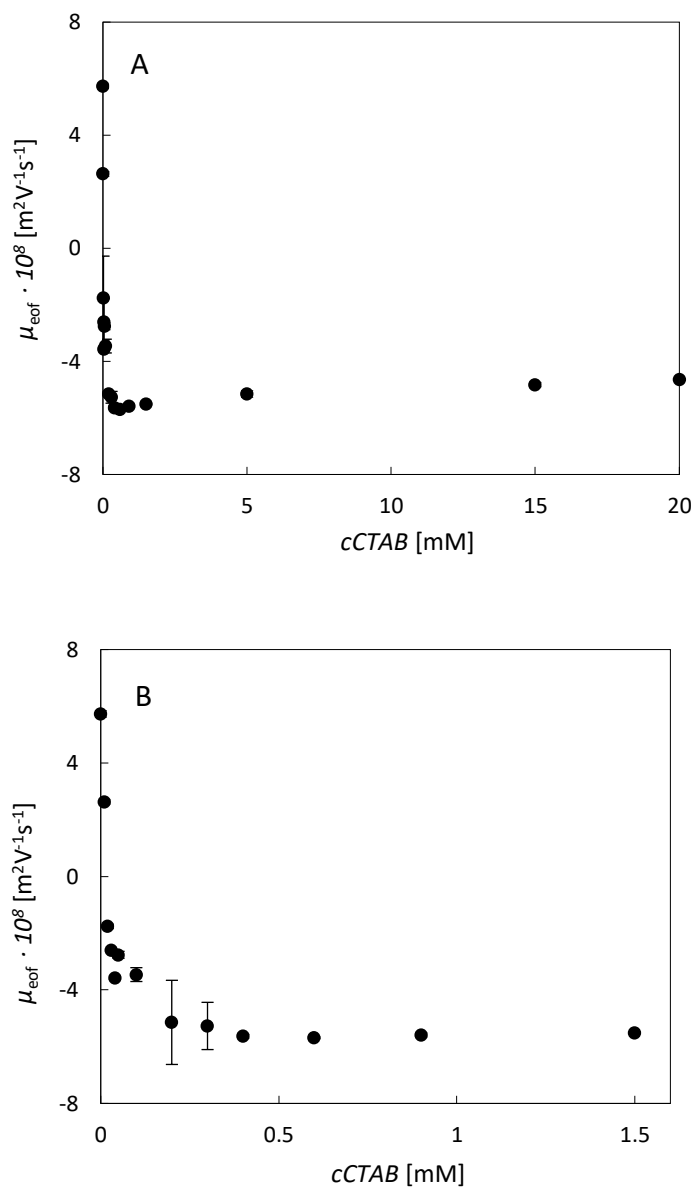


Obr. 6 Intenzitní distribuce velikosti liposomů DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC.

## 4.2 Mobilita elektroosmotického toku

Při elektroforetických separacích v klasickém uspořádání, s anodou na vstupním konci kapiláry a elektroosmotickým tokem směřujícím ke katodě, migrují záporně nabitě látky proti směru EOF zpět ke vstupnímu konci kapiláry. Pokud je jejich mobilita vysoká, mohou vymigrovat z kapiláry jejím vstupním koncem, aniž by prošly detektorem. Pokud je jejich mobilita nižší, EOF je strhne s sebou směrem ke katodě, nicméně jejich migrační časy mohou být velmi dlouhé. Při separacích záporně nabitých látek se proto často přistupuje k obrácení směru EOF. V této práci byly studovány záporně nabitě liposomy, v některých případech společně se záporně nabitým 5-FU, proto byl směr EOF obrácen přidáním povrchově aktivní látky CTAB do základního elektrolytu. Pro lepší pochopení dějů

v kapiláře byl tedy nejprve zkoumán vliv koncentrace CTAB na mobilitu EOF (Obr. 7). S rostoucí koncentrací CTAB v základním elektrolytu došlo k obrácení katodické mobility EOF na anodickou mezi hodnotami koncentrace CTAB  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $2 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>. Anodická mobilita EOF dosáhla maximální hodnoty při koncentraci  $6 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>. Při této koncentraci byla stěna kapiláry již zcela pokryta CTAB. S dalším zvýšením koncentrace CTAB v základním elektrolytu došlo k mírnému zpomalení anodického EOF způsobenému zvyšující se iontovou silou základního elektrolytu.

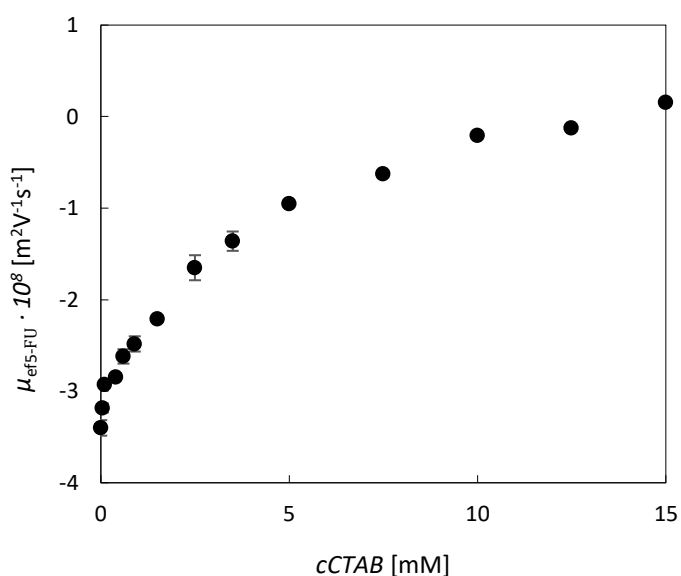


Obr. 7 A: Závislost mobility EOF na koncentraci CTAB v základním elektrolytu. B: Detail pro nízké koncentrace CTAB v základním elektrolytu. Měření bylo provedeno metodou uvedenou v kapitole 3.3. Koncentrace thiomochoviny 1 mg ml<sup>-1</sup>. BGE tetraboritan sodný (pH = 9,1) o koncentraci 1·10<sup>-2</sup> mol l<sup>-1</sup> s obsahem CTAB v rozsahu koncentrací 0,01·10<sup>-3</sup> – 20·10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup>.

### 4.3 Mobilita 5-fluoruracilu

Jelikož v některých experimentech byl do liposomů enkapsulován 5-FU, byla v rámci přípravných experimentů změřena jeho pozorovaná mobilita v BGE o různé koncentraci CTAB. Z pozorované mobility 5-FU a mobility EOF byla následně vypočtena efektivní

mobilita 5-FU (Obr. 8). Z Obr. 8 je viditelné, že 5-FU vykazuje zápornou efektivní mobilitu, což odpovídá jeho aniontové povaze, a s rostoucí koncentrací CTAB dochází k jeho zpomalování vlivem tvorby kladně nabitých micel a jeho interakce s nimi. Kritická micelární koncentrace CTAB ve vodě je  $9 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  (cit. 73). Ke zpomalování 5-FU dochází však již při nejnižších koncentracích CTAB, tj.  $5 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . K poklesu mobilit dochází obecně také vlivem rostoucí iontové síly, v takto nízkých koncentracích CTAB je však jeho vliv na celkovou iontovou sílu BGE zanedbatelný. Je tedy zřejmé, že 5-FU interaguje i s volnými molekulami CTAB, ještě před vznikem micel.



Obr. 8 Závislost efektivní mobility 5-FU na koncentraci CTAB v základním elektrolytu. Měření bylo provedeno metodou uvedenou v kapitole 3.4. Koncentrace 5-FU  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ . BGE tetraboritan sodný ( $\text{pH} = 9,1$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s obsahem CTAB v rozsahu koncentrací  $0,01 \cdot 10^{-3} - 15 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ .

## 4.4 Měření s DPPC-DPPG-PEG2000-DMPE

### 4.4.1 Optimalizace metody měření s liposomy

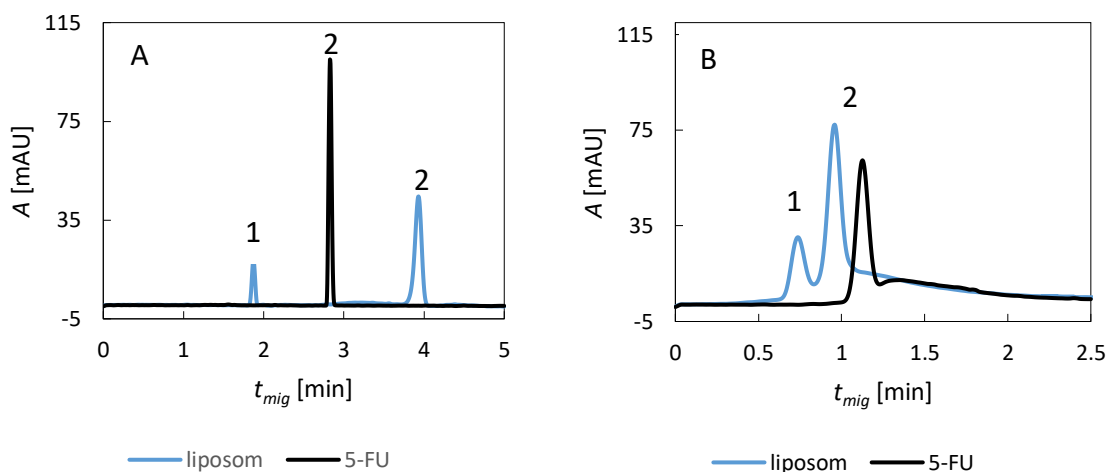
Na začátku experimentů s liposomy bylo nutné najít vhodný BGE a vhodné experimentální podmínky. K měření byly použity liposomy připravené z DPPC, DPPG a PEG2000-DMPE o sumární koncentraci  $5 \text{ mg ml}^{-1}$  s enkapsulovaným 5-FU o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ . Prvním vyzkoušeným BGE byl tetraboritan sodný ( $\text{pH} = 9,1$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . S tímto BGE byly změřeny elektroferogramy vzorku samotného 5-FU

o koncentraci  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  a vzorku liposomů, ke kterému byla přidána thiomocovina jako marker EOF o koncentraci  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $5 \text{ s}$ . Na kapiláru bylo následně buď vloženo napětí  $30 \text{ kV}$  (Obr. 9A), nebo byl vzorek posunut do kapiláry tlakem  $10 \text{ kPa}$  po dobu  $120 \text{ s}$ , následně bylo na kapiláru aplikováno napětí  $30 \text{ kV}$  po dobu  $30 \text{ s}$  a zóny vzorku byly tlakem  $10 \text{ kPa}$  mobilizovány skrze detektor (Obr. 9B). Na Obr. 9A je viditelné, že v tomto systému je rychlý EOF, jelikož migrační čas thiomocoviny je necelé dvě minuty. V obou případech se objevuje pík, jehož spektrum odpovídá 5-FU (Obr. 10), a který má delší migrační čas než thiomocovina. To je v souladu se záporným nábojem 5-FU a kladnou polaritou vloženého napětí. V případě vzorku s liposomem dochází k výraznému prodloužení migračního času 5-FU a také rozmytí jeho zóny. To by mohlo být způsobeno mimo jiné interakcí 5-FU s liposomy. Pokud by liposomy migrovaly v anodickém směru rychleji než 5-FU, prodlužovala by jejich interakce migrační čas 5-FU. Liposomy se často sorbují na vnitřní stěnu kapiláry. Druhým možným vysvětlením prodloužení migračního času je interakce 5-FU s liposomy adsorbovanými na stěnu kapiláry.

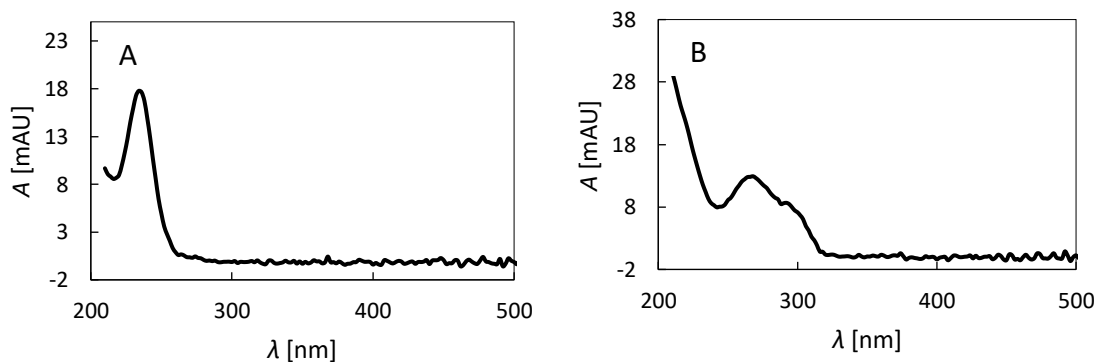
Při experimentu na Obr. 9A bylo napětí vloženo po celou dobu experimentu. V některých případech může v průběhu měření docházet k výraznému rozmytí zón, takže v detektoru již nemusí být rozeznatelné. Pro zobrazení stavu po kratším čase od vložení napětí, je možno použít typ experimentu, jehož výsledek je na Obr. 9B. Napětí se vloží jen na krátký časový úsek a zóny se následně mobilizují vložением tlaku na vstupní konec kapiláry, díky čemuž projdou detektorem. Na Obr. 9B však není přítomen žádný pík, který by bylo možno přisoudit liposomům ani po pouhých  $30 \text{ s}$  vložení napětí.

Při dalším experimentu byl obrácen směr EOF. Do tetraboritanu sodného ( $\text{pH} = 9,1$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  byl přidán CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . V tomto případě byla použita negativní polarita napětí, díky tomu měl 5-FU kratší migrační čas než thiomocovina. Při obou typech experimentu (Obr. 11A a 11B) se před píkem 5-FU (2) objevil další pík, který by mohl odpovídat liposomu s enkapsulovaným 5-FU. Pík volného 5-FU vykazoval absorpční spektrum charakteristické pro 5-FU v UV oblasti, avšak pík, který by mohl odpovídat liposomu s enkapsulovaným 5-FU, nevykazoval žádnou absorpci záření v UV oblasti. Tetraboritan sodný má coby základní elektrolyt některé výhodné vlastnosti při běžných analytických aplikacích. Při studiu složitějších systémů zahrnujících vzájemné interakce jejich složek a podobně je však problematický, protože vytváří různé klastry a komplexy. Proto byl na závěr vyzkoušen jako BGE fosfátový pufr ( $\text{pH} = 7,0$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s kladnou polaritou napětí (Obr. 12). Z Obr. 12 je patrné, že se

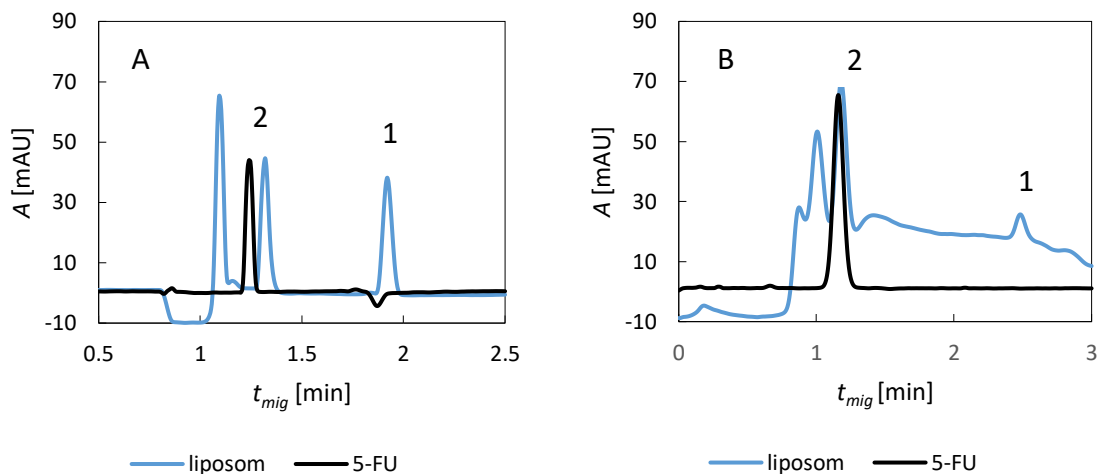
na elektroferogramech vzorku liposomů nachází opět pík 5-FU (2) a pík thiomochoviny (1), ale nenachází se tam žádný jiný jasně rozlišitelný pík, který by odpovídal liposomu s enkapsulovaným 5-FU. Z tohoto důvodu byl pro další měření s liposomy DPPC-DPPG-PEG2000-DMPE používán jako BGE tetraboritan sodný (pH = 9,1) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ .



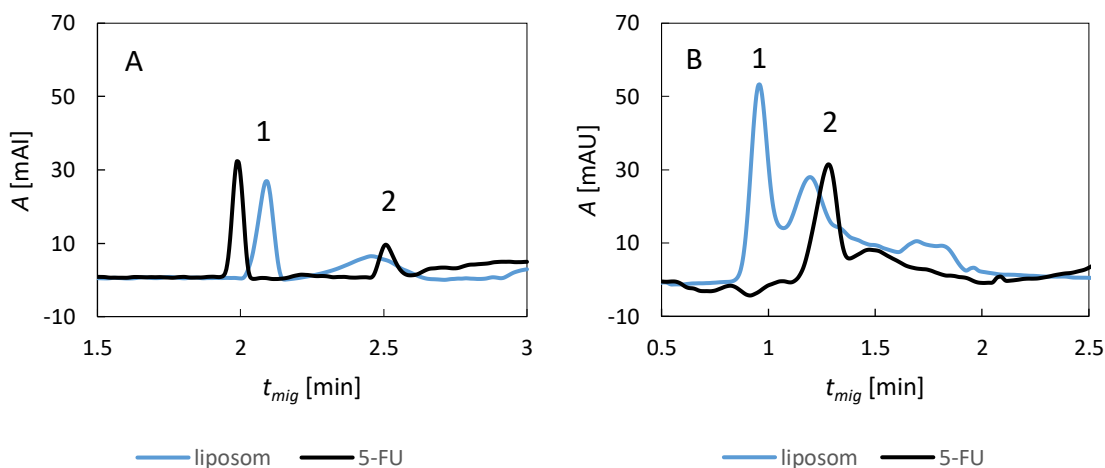
Obr. 9 Elektroferogram vzorku liposomu s enkapsulovaným 5-FU s přidavkem thiomochoviny a elektroferogram samotného 5-FU. Koncentrace 5-FU  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  a thiomochoviny  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Pík (1) thiomochovina, pík (2) volný 5-FU. BGE tetraboritan sodný (pH = 9,1) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ , UV detekce 200 nm. A: hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), separační napětí 30 kV, B: hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), vzorek zasunut do kapiláry (10 kPa, 120 s), separační napětí (30 kV, 30 s), zóny vzorku mobilizovány skrze detektor tlakem 10 kPa.



Obr. 10 Absorpční spektra thiomochoviny a volného 5-FU z elektroferogramu na Obr. 9. A: absorpční spektrum thiomochoviny, B: absorpční spektrum volného 5-FU.



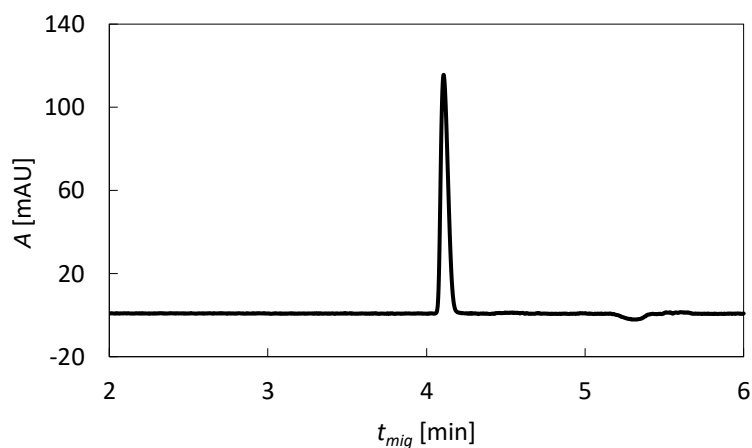
Obr. 11 Elektroferogram vzorku liposomu s enkapsulovaným 5-FU s přidavkem thiomocoviny a elektroferogram samotného 5-FU. Koncentrace 5-FU  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  a thiomocoviny  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Pík (1) thiomocovina, pík (2) volný 5-FU. BGE tetraboritan sodný ( $\text{pH} = 9,1$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s obsahem CTAB  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , UV detekce 200 nm. A: hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), separační napětí  $-30 \text{ kV}$ , B: hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), vzorek zasunut do kapiláry (10 kPa, 120 s), separační napětí ( $-30 \text{ kV}$ , 30 s), zóny vzorku mobilizovány skrze detektor tlakem 10 kPa.



Obr. 12 Elektroferogram vzorku liposomu s enkapsulovaným 5-FU s přidavkem thiomocoviny a elektroferogram samotného 5-FU. Koncentrace 5-FU  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$  a thiomocoviny  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Pík (1) thiomocovina, pík (2) volný 5-FU. BGE fosfátový pufr ( $\text{pH} = 7,0$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ , UV detekce 200 nm. A: hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), separační napětí 30 kV, B: hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), vzorek zasunut do kapiláry (10 kPa, 120 s), separační napětí (30 kV, 30 s), zóny vzorku mobilizovány skrze detektor tlakem 10 kPa.

#### 4.5 Měření s DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE

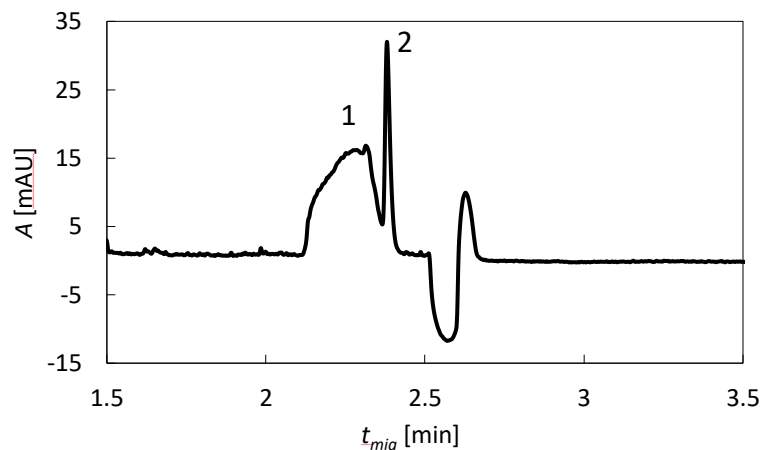
K identifikaci píku liposomů, připravených z DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE, v elektroferogramech byl nejdříve změřen elektroferogram samotného 5-FU (Obr. 13).



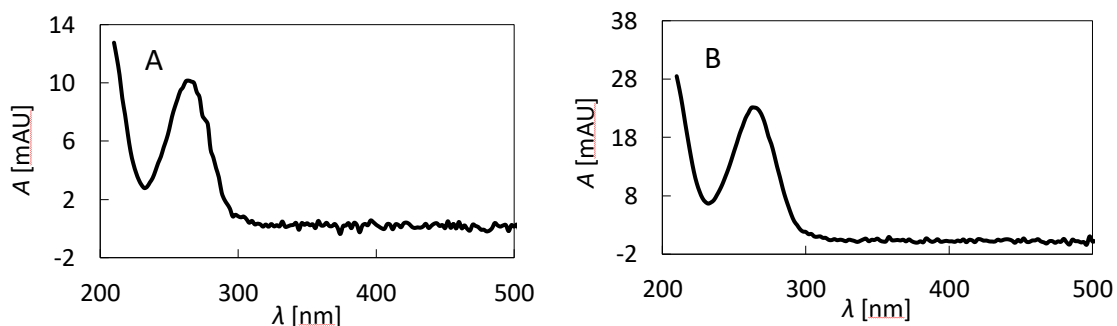
Obr. 13 Elektroferogram vzorku samotného 5-FU. Hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), separační napětí  $-30$  kV, koncentrace 5-FU  $0,5$  mg ml<sup>-1</sup>, BGE fosfátový pufr (pH = 7,0) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  mol l<sup>-1</sup> s obsahem CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>, UV detekce 200 nm.

Následně byl změřen elektroferogram směsi, která obsahovala vzorek prázdného liposomu a vzorek liposomu s enkapsulovaným 5-FU smíšené v objemovém poměru 1:1. Pík (1) na elektroferogramu odpovídá liposomu s enkapsulovaným 5-FU a pík (2) odpovídá volnému 5-FU (Obr. 14). Oba tyto píky vykazovaly absorpční spektrum 5-FU v UV oblasti (Obr. 15).





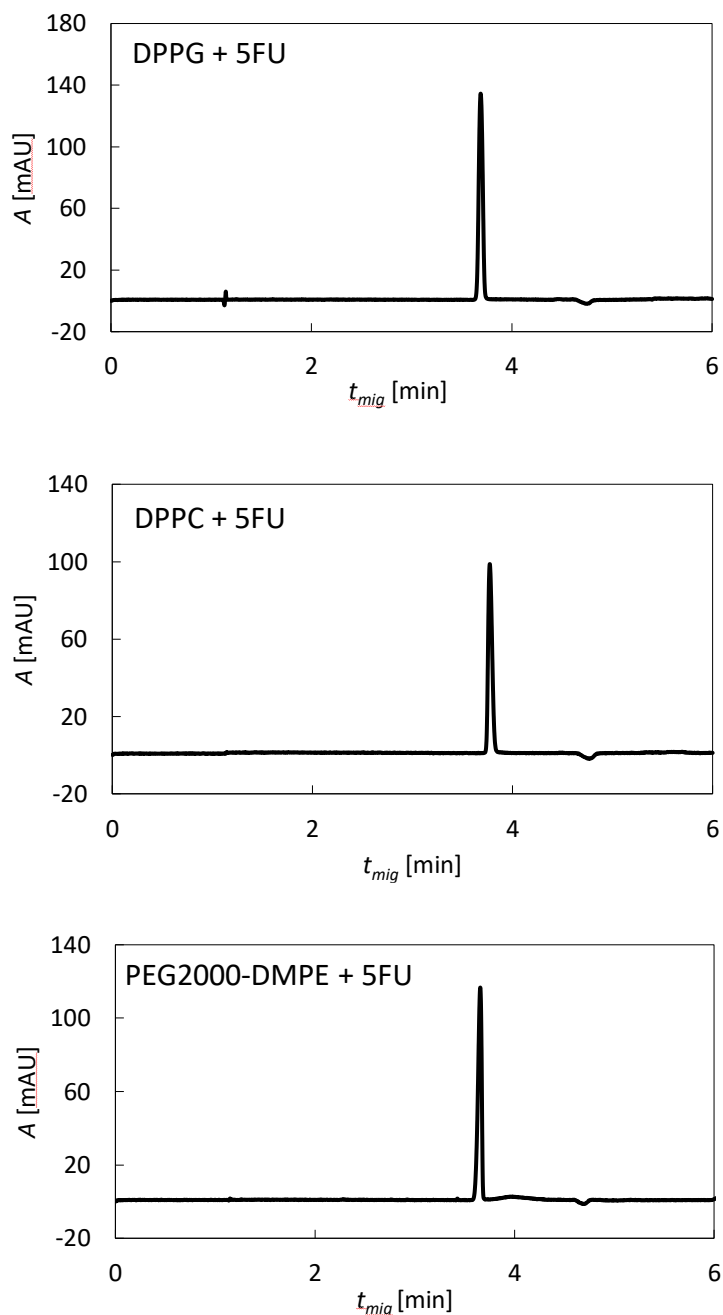
Obr. 14 Elektroferogram směsi obsahující vzorek prázdného liposomu a vzorek liposomu s enkapsulovaným 5-FU smíšené v objemovém poměru 1:1. Pík (1) liposom s enkapsulovaným 5-FU, pík (2) volný 5-FU. Hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), separační napětí  $-30$  kV, BGE fosfátový pufr (pH = 7,0) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  mol  $l^{-1}$  s obsahem CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$ , UV detekce 200 nm.



Obr. 15 A: Absorpční spektrum píku (1) z Obr. 14, B: Absorpční spektrum píku (2) z Obr. 14.

K ověření předpokladu, že pík (1) z Obr. 14 patří liposomu s enkapsulovaným 5-FU a pík (2) volnému 5-FU, byly změřeny elektroferogramy vzorků samotných lipidů DPPG, DPPC a PEG2000-DMPE, ze kterých byly liposomy připraveny (Obr. 16). Ke každému vzorku lipidů byl přidán 5-FU. Na získaných elektroferogramech bylo patrné, že se před píkem 5-FU nenachází žádný jiný pík, a lze tedy předpokládat, že pík (1) na Obr. 14 patří liposomu s enkapsulovaným 5-FU, nikoli nějakému druhu asociátu některého z lipidů s 5-FU.

Při porovnání Obr. 13, 14 a 16 je zřejmé, že v přítomnosti liposomů se výrazně zkrátí migrační čas 5-FU, zatímco přítomnost jednotlivých lipidů ovlivnila migrační čas pouze mírně. Příčina tohoto jevu není zřejmá. Jedním z možných vysvětlení je interakce volného 5-FU s povrchem rychle migrujících liposomů, která by urychlila jeho migraci.



Obr. 16 Elektroferogramy jednotlivých lipidů. Pík na elektroferogramech patří 5-FU. Hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s), separační napětí  $-30$  kV, koncentrace jednotlivých lipidů  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ , koncentrace 5-FU  $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ , BGE fosfátový pufr ( $\text{pH} = 7,0$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s obsahem CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ , UV detekce 200 nm.

V rámci experimentů s DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE byly pozorovány liposomy obsahující enkapsulovaný 5-FU, což bylo potvrzeno porovnáním spekter píků. Prázdné liposomy nebyly detegovány, pravděpodobně kvůli jejich slabé absorpci UV záření.

## **4.6 Liposomální elektrokinetická chromatografie**

### **4.6.1 Optimalizace podmínek**

Při metodě LEKC jsou liposomy přidávány do základního elektrolytu. Díky tomu, že byl k dispozici velmi malý objem vzorku prázdných liposomů, bylo nutné pokusit se snížit jeho spotřebu. Namísto klasických vialek o objemu 600  $\mu\text{l}$ , které se běžně pro BGE používají, je možné využít kónické vialky určené pro vzorky, případně skleněné inserty do klasických vialek. V těchto nádobkách se používají objemy v řádu desítek mikrolitrů. Použitím vialek s menším objemem by tak došlo ke snížení spotřeby vzorku liposomů. Zároveň však při každém měření dochází k elektrolyze BGE a může docházet k adsorpci liposomů na stěny vialek. Pokud je výrazně menší objem BGE ve vialce, změna složení způsobená elektrolyzou i změna koncentrace volných liposomů způsobená jejich adsorpcí se projeví násobně výrazněji a rychleji. Bylo tedy nutno ověřit, jaký vliv má použití menšího objemu BGE v konkrétních podmínkách této práce. Pro optimalizaci podmínek byla změřena efektivní mobilita 5-FU podle metody uvedené v kapitole 3.5 pro různé typy vialek se základním elektrolytem bez přídavku liposomů (Tab. 2) a s přídavkem liposomů (Tab. 3). Objem BGE byl v normálních vialkách 600  $\mu\text{l}$ , v kónických vialkách 200  $\mu\text{l}$  a ve skleněných insertech 150  $\mu\text{l}$ . Z Tab. 2 i 3 je viditelné, že v sérii tří měření dochází pro všechny typy vialek k postupnému zvyšování absolutní hodnoty efektivní mobility 5-FU. Relativní odchylky mobility získané při následných měřeních jsou nejmenší pro normální vialky, ve kterých byl použit největší objem BGE. Platí to pro BGE s přídavkem i bez přídavku liposomů. Toto zjištění podporuje hypotézu, že posun hodnot je dán postupnou degradací BGE způsobenou elektrolyzou. Přidáním liposomů do základního elektrolytu došlo ke snížení absolutní hodnoty efektivní mobility 5-FU u všech tří měření v sérii při použití normálních vialek se skleněnými inserty. Naproti tomu v normálních polypropylenových vialkách byly naměřeny prakticky stejné hodnoty mobility 5-FU jako bez liposomů. V případě polypropylenových kónických vialek se absolutní hodnota efektivní mobility 5-FU dokonce mírně zvýšila. To může být způsobeno tím, že u skleněných insertů dochází k mnohem menší adsorpci liposomů na stěnu vialek. Naopak u polypropylenových normálních a kónických vialek může být adsorpce větší, což

vede k tomu, že se v BGE nachází menší koncentrace volných liposomů, se kterými může 5-FU interagovat. Vialky se skleněnými inserty byly z toho důvodu následně použity pro BGE u metody LEKC.

Tab. 2 Vypočítaná efektivní mobilita 5-FU pro různé typy vialek se základním elektrolytem. BGE: fosfátový pufr ( $pH = 7,0$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s obsahem CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ .

č. měření	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^9 [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$			$\Delta\mu_{\text{eff}} [\%]$		
	kónické (200 $\mu\text{l}$ )	inserty (150 $\mu\text{l}$ )	normální (600 $\mu\text{l}$ )	kónické (200 $\mu\text{l}$ )	inserty (150 $\mu\text{l}$ )	normální (600 $\mu\text{l}$ )
1	-5,08	-5,13	-5,03			
2	-5,63	-5,66	-5,18	-10,8	-10,3	-3,0
3	-5,92	-5,80	-5,21	-16,5	-13,1	-3,6

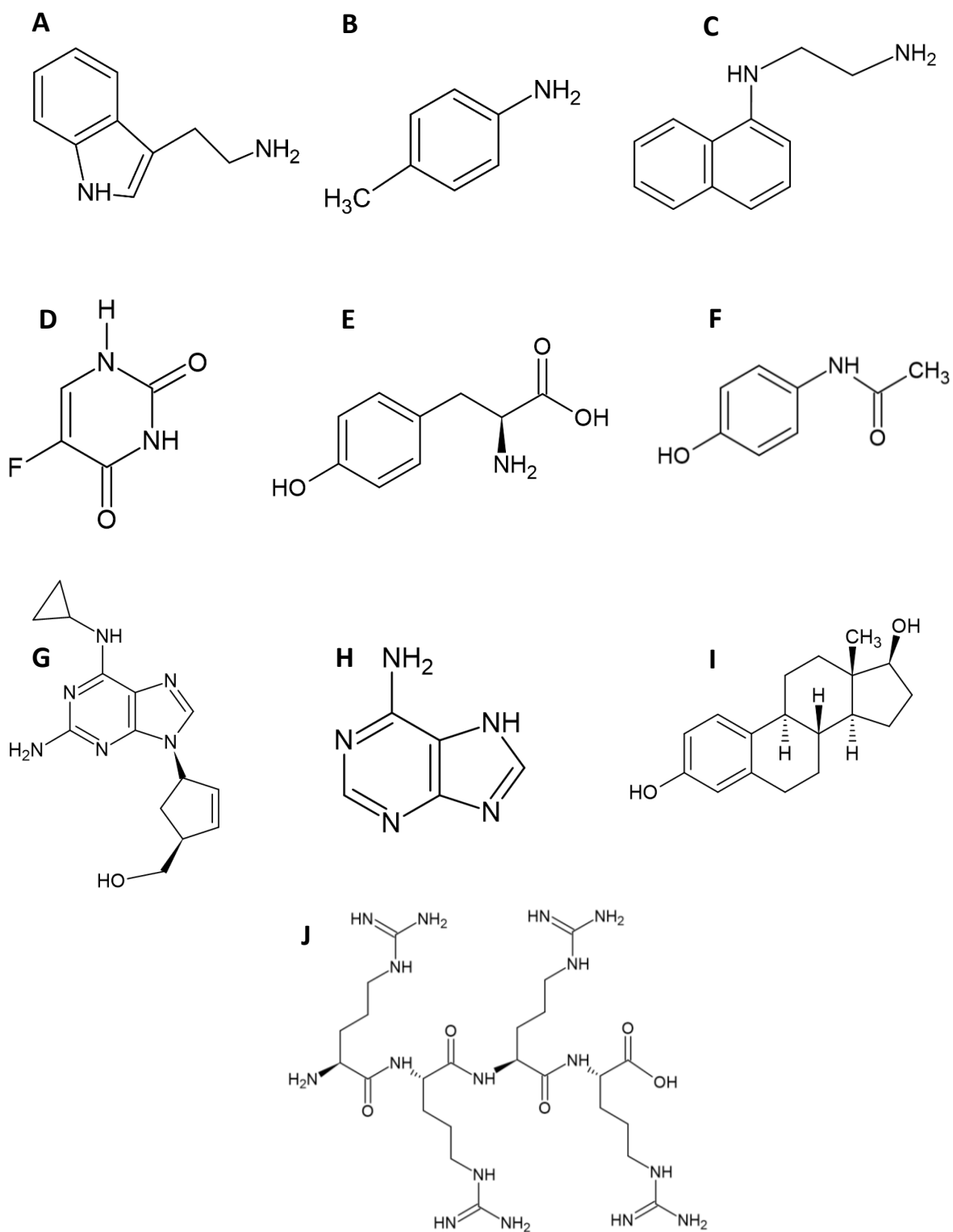
Tab. 3 Vypočítaná efektivní mobilita 5-FU pro různé typy vialek se základním elektrolytem. BGE: fosfátový pufr ( $pH = 7,0$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s obsahem CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  a liposomy o koncentraci  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

č. měření	$\mu_{\text{eff}} \cdot 10^9 [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}]$			$\Delta\mu_{\text{eff}} [\%]$		
	kónické (200 $\mu\text{l}$ )	inserty (150 $\mu\text{l}$ )	normální (600 $\mu\text{l}$ )	kónické (200 $\mu\text{l}$ )	inserty (150 $\mu\text{l}$ )	normální (600 $\mu\text{l}$ )
1	-5,77	-4,35	-5,06			
2	-5,95	-4,63	-5,15	-3,1	-6,4	-1,8
3	-6,36	-4,90	-5,16	-10,2	-12,6	-2,0

#### 4.6.2 Efektivní mobilita analytů

Přínosem metody LEKC je možnost zvýšení selektivity separací prostřednictvím interakcí analytů s liposomy. Aby mohla být metoda k tomuto účelu využita, musí analyty interagovat s liposomy. Analyty s podobnými mobilitami pak musí s liposomy interagovat různě silně, aby mohly jejich interakce přispět k jejich separaci. Za účelem hodnocení použitelnosti zkoumaných liposomů pro LEKC byly interakce některých analytů s liposomy sledovány prostřednictvím změny jejich efektivní mobility v závislosti na koncentraci liposomů v základním elektrolytu podle metody uvedené v kapitole 3.5. Z kladně nabitých analytů byly vyzkoušeny tryptamin, p-toluidin, NEDA a tetraarginin. Ze záporně nabitých analytů pak 5-fluoruracil, L-tyrosin a paracetamol a z látek neutrálních abacavir, adenin a 17- $\beta$ -estradiol. Struktury použitých analytů jsou ukázány na Obr. 17 a jejich koncentrace

jsou uvedeny v Tab. 4. Ke každému analytu byla přidána thiomocovina jako marker EOF tak, aby její výsledná koncentrace ve vzorku byla  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ .



Obr. 17 Struktura jednotlivých analytů testovaných v metodě LEKC. A: tryptamin, B: p-toluidin, C: NEDA, D: 5-FU, E: L-tyrosin, F: paracetamol, G: abacavir, H: adenin, I: 17-β-estradiol a J: tetraarginin.

Liposomy byly přidávány do BGE tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 0,1 mg ml<sup>-1</sup>. Pro p-toluidin byla vyzkoušena i vyšší koncentrace liposomů v BGE, a to 0,2 a 0,3 mg ml<sup>-1</sup>. Vyšší koncentrace liposomů nebyly použity z toho důvodu, že v elektroferogramech docházelo ke vzniku velkého množství spiků. Přídavek liposomů do základního elektrolytu ovlivnil efektivní mobilitu 5-fluoruracilu, tryptaminu a p-toluidinu (Tab. 5). Efektivní mobilita 5-FU se díky jeho interakci se záporně nabitými liposomy snížila o 18,2 %. Je zřejmé, že absolutní hodnota efektivní mobility liposomů byla výrazně nižší než absolutní hodnota efektivní mobility 5-FU. Tryptamin a p-toluidin jsou látky kladně nabitě a migrují tedy proti směru migrace liposomů. Zároveň se záporně nabitými liposomy elektrostaticky interagují, čímž dochází ke zpomalení jejich efektivní mobility. Efektivní mobilita tryptaminu se snížila o 9,2 % a efektivní mobilita p-toluidinu o 16 %. Efektivní mobilita p-toluidinu byla oproti efektivním mobilitám ostatních analytů měřena i při vyšší koncentraci liposomů v BGE. Látky neutrální migrovaly s markerem EOF thiomocovinou a přídavek liposomů do základního elektrolytu nevedl ke změně jejich efektivní mobility, a tedy ani k separaci nenabitého analytu a thiomocoviny.

Provedené experimenty ukázaly, že studované liposomy v principu mohou být použity pro optimalizaci separace některých kladně nebo záporně nabitých látek. Interakce testovaných látek s liposomy nebyly extrémně silné, nicméně změna mobility o 10 nebo téměř 20 % v případě 5-FU může pro separaci analytů v některých případech postačovat.

*Tab. 4 Koncentrace jednotlivých analytů vyzkoušených v metodě LEKC.*

kladně nabitě	<i>c</i> [mg ml <sup>-1</sup> ]	záporně nabitě	<i>c</i> [mg ml <sup>-1</sup> ]	neutrální	<i>c</i> [mg ml <sup>-1</sup> ]
tryptamin	0,01	5-fluoruracil	0,5	abacavir	0,05
p-toluidin	0,05	L-tyrosin	0,1	adenin	0,05
NEDA	0,05	paracetamol	0,05	17-β-estradiol	0,25
tetraarginin	0,05				

Tab. 5 Vypočítané mediány efektivní mobility 5-fluoruracilu, tryptaminu a p-toluidinu.

	$C_{liposom}$ [mg ml <sup>-1</sup> ]	medián $\mu_{ef} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	SD $\cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	RSD [%]	$\Delta\mu_{ef}$ [%]
5-fluoruracil	0	- 5,66	0,35	6,25	
	0,1	- 4,63	0,28	5,94	+18,2
tryptamin	0	25,2	0,25	0,99	
	0,1	22,9	0,38	1,65	-9,2
p-toluidin	0	1,25	0,04	3,34	
	0,1	1,26	0,04	3,07	+0,8
	0,2	1,19	0,05	4,45	-4,8
	0,3	1,05	0,39	38,1	-16,0

#### 4.7 Měření s DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC

Vzhledem k tomu, že s použitím UV absorpční detekce se nepodařilo detegovat prázdné liposomy, byly provedeny experimenty s použitím detekce fluorescenční. Pro měření s CE-LIF byly použity prázdné liposomy DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC o sumární koncentraci 5 mg ml<sup>-1</sup>. Na PC těchto liposomů byl navázán nitrobenzoxadiazol, který fungoval jako fluorescenční značka pro LIF detektor. Pro prvotní měření s těmito liposomy byly použity experimenty, při kterých se dávkoval vzorek tradičně na konci kapiláry vzdálenějším od detektoru. Zóna vzorku byla následně tlakem zasunuta do kapiláry a na kapiláru se na krátký časový úsek vložilo napětí. Nakonec byly zóny vzorku tlakem mobilizovány skrze detektor. V tomto uspořádání nebylo dosaženo uspokojivých výsledků. Jednou z příčin mohla být adsorpce liposomů na vnitřní stěnu kapiláry. Aby se zkrátila doba pobytu liposomů v kapiláře a dráha, kterou musejí kapilárou urazit, bylo přistoupeno k dávkování liposomů na konci kapiláry, který se nachází blíže k detektoru. Při dávkování vzorků na opačný konec kapiláry je obvykle nutné rovněž obrátit polaritu vloženého napětí. V tomto případě bylo vkládáno kladné napětí, což znamená, že na konci kapiláry, kam byly dávkovány liposomy, se nacházela katoda. EOF v tomto uspořádání směřoval ke katodě, tedy směrem od detektoru ke konci, na který byl dávkován vzorek. Záporně nabitě liposomy migrovaly proti směru EOF k anodě, a tedy od konce, kam byly dávkovány, k detektoru. Jednotlivé experimenty byly provedeny se 3 různými BGE o rozdílném pH a iontové síle.

Pro jednotlivé BGE byla vypočítána iontová síla, mobilita EOF a rychlost EOF, které jsou uvedeny v Tab. 6. Z Tab. 6 je patrné, že snížením pH dochází ke snížení rychlosti EOF. To je v souladu s tím, že kyselé pufrы nepodporují disociaci silanolových skupin křemenné kapiláry, čímž dochází ke snížení povrchového náboje vnitřní stěny kapiláry a ke vzniku pomalého EOF. Zrychlení EOF u acetátového pufru oproti fosfátovému pufru lze vysvětlit iontovou silou, která je u acetátového pufru menší. S nižší iontovou silou je hodnota  $\zeta$ -potenciálu vyšší, což vede k rychlejšímu EOF.

Tab. 6 Vypočítaná iontová síla, mobilita EOF a rychlost EOF pro jednotlivé typy pufrů.

Koncentrace všech pufrů  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ .

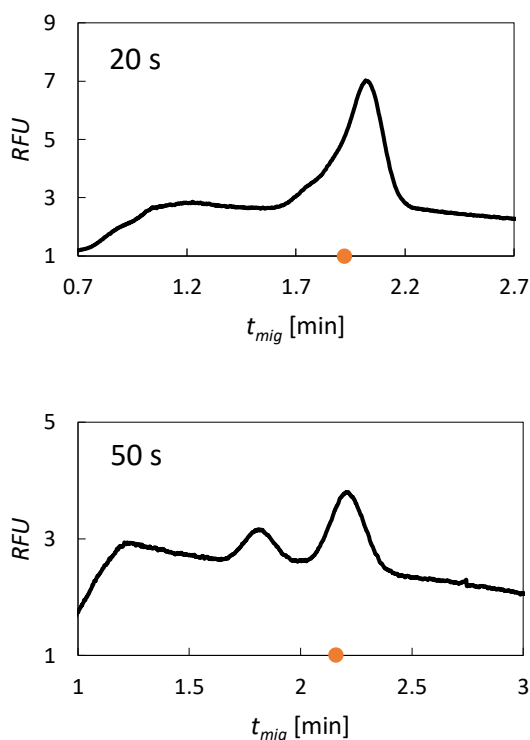
	$I [\text{mmol l}^{-1}]$	$\mu_{\text{eof}} \cdot 10^8$ [ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$v_{\text{eof}} \cdot 10^4$ [ $\text{m s}^{-1}$ ]
Fosfátový pufr pH = 7,0	20	2,32	7,32
Fosfátový pufr pH = 6,4	14	2,18	6,87
Acetátový pufr pH = 5,5	8,5	3,13	9,85
Acetátový pufr pH = 4,7	5	2,65	8,34
Kys. fosforečná pH = 2,6	7,6	0,58	1,82

Pro interpretaci výsledků měření je důležité znát alespoň přibližnou polohu EOF v elektroferogramu. Při měření EOF byla jako neutrální marker použita thiomocovina, která byla detegována UV detektorem. Liposomy však byly detegovány pomocí LIF, který pro thiomocovinu signál neposkytuje. Proto byl čas, ve kterém procházela zóna thiomocoviny LIF detektorem, dopočítána na základě znalosti rychlosti EOF, rychlosti průtoku v kapiláře při mobilizaci zón tlakem a dalších experimentálních parametrů. Tento vypočítaný čas EOF byl v elektroferogramech označen oranžovou tečkou. Jelikož se jedná o relativně komplikovaný výpočet zahrnující řadu proměnných, je při hodnocení výsledků nutno brát v potaz určitou nejistotu takto vypočítaného času EOF.

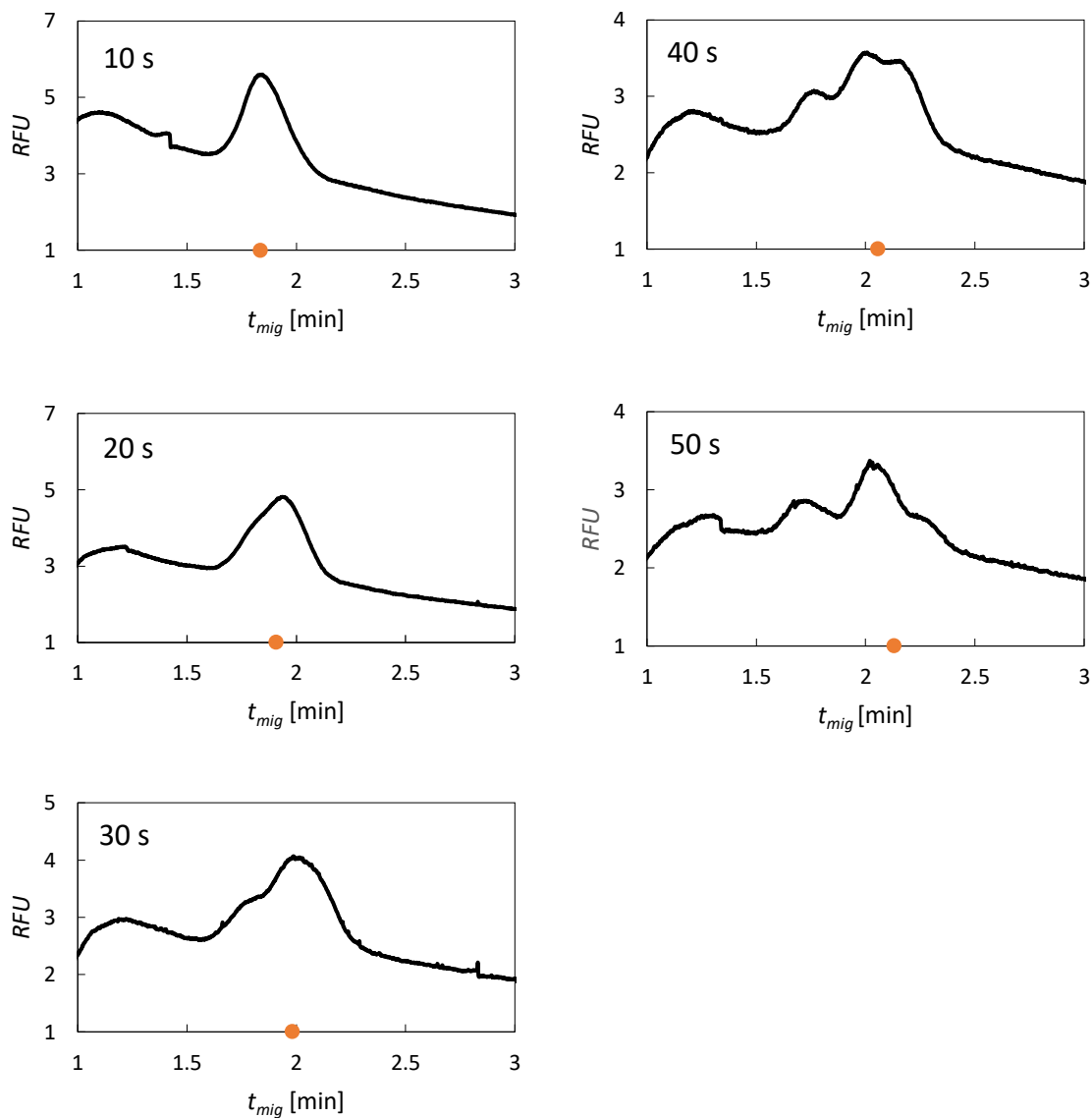
Na Obr. 18 jsou elektroferogramy vzorku prázdných liposomů, měřené pro různě dlouhou dobu vkládání napětí na kapiláru při použití fosfátového pufru jako BGE (pH = 7,0) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . Pokud bylo na kapiláru vkládáno napětí po dobu 20 s nacházel se na elektroferogramu jeden pík, který se v podstatě překrýval s časem EOF. Při vložení napětí na kapiláru po dobu 50 s došlo k separaci vzorku liposomů na dvě různé frakce. Obě se pohybovaly v opačném směru než EOF, tedy jako anionty. Jedna velmi pomalu, druhá výrazně rychleji. Na Obr. 19 a 20 jsou elektroferogramy pro stejné experimenty, při kterých



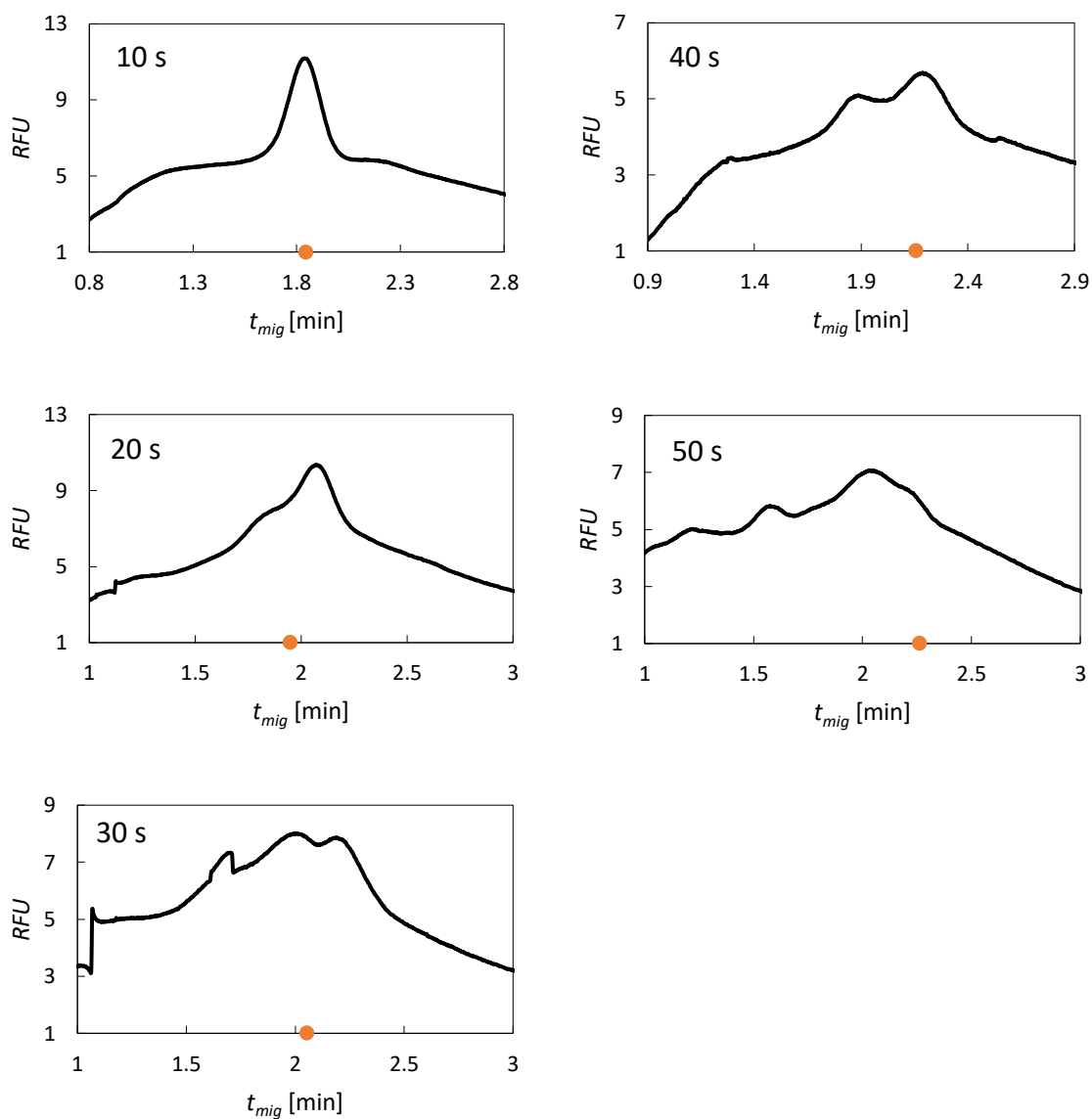
byly použity BGE o nižším pH a to fosfátový pufr (pH = 6,4) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  a acetátový pufr (pH = 5,5) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . Stejně jako v předešlém případě dochází k migraci liposomů směrem k anodě a s delším časem vkládání napětí k separaci dvou frakcí liposomů. Z elektroferogramů na Obr. 18 a 19 je patrné, že se s klesajícím pH zmenšuje poměr pohyblivější frakce liposomů vůči frakci méně pohyblivé. Tento trend je patrný i na Obr. 21, kdy byl použit jako BGE acetátový pufr o ještě nižším pH (pH = 4,7) a o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . To by mohlo být sníženým stupněm disociace fosfátových skupin fosfolipidů tvořících liposomy. Na závěr byla použita jako BGE kyselina fosforečná (pH = 2,6) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . Elektroferogramy z těchto měření obsahovaly velké množství spiků a nebylo v nich možné identifikovat žádné píky, které by odpovídaly liposomům.



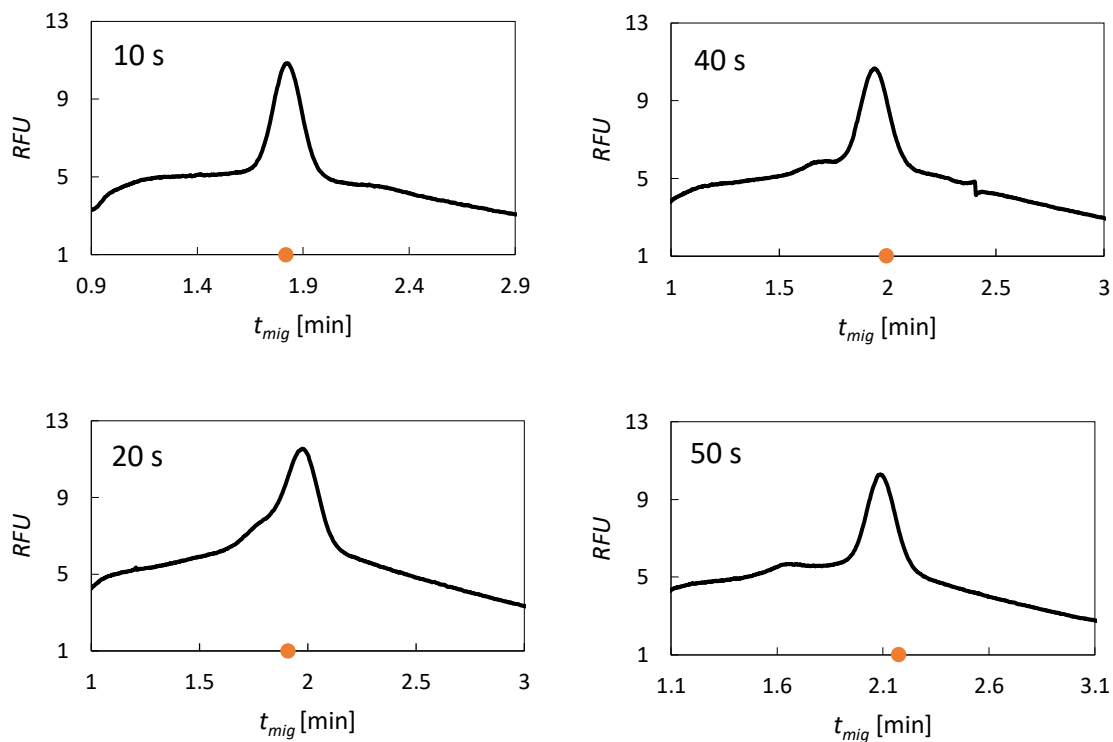
Obr. 18 Elektroferogramy vzorku prázdného liposomu s různou dobou vkládání napětí. Hydrodynamické dávkování ( $-5 \text{ kPa}$ ,  $5 \text{ s}$ ), vzorek zasunut do kapiláry ( $-5 \text{ kPa}$ ,  $30 \text{ s}$ ), separační napětí ( $20 \text{ kV}$  po dobu  $20$  a  $50 \text{ s}$ ), vzorek mobilizován skrz detektor tlakem  $-5 \text{ kPa}$ . BGE fosfátový pufr (pH = 7,0) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ . EOF označen oranžovou tečkou.



Obr. 19 Elektroferogramy vzorku prázdného liposomu s různou dobou vkládání napětí. Hydrodynamické dávkování ( $-5$  kPa, 5 s), vzorek zasunut do kapiláry ( $-5$  kPa, 30 s), separační napětí (20 kV po dobu 10 – 50 s), vzorek mobilizován skrz detektor tlakem  $-5$  kPa. BGE fosfátový pufr ( $pH = 6,4$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  mol  $l^{-1}$ . EOF označen oranžovou tečkou.



Obr. 20 Elektroferogramy vzorku prázdného liposomu s různou dobou vkládání napětí. Hydrodynamické dávkování ( $-5$  kPa, 5 s), vzorek zasunut do kapiláry ( $-5$  kPa, 30 s), separační napětí (20 kV po dobu 10 – 50 s), vzorek mobilizován skrz detektor tlakem  $-5$  kPa. BGE acetátový pufr ( $pH = 5,5$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  mol  $l^{-1}$ . EOF označen oranžovou tečkou.



Obr. 21 Elektroferogramy vzorku prázdného liposomu s různou dobou vkládání napětí. Hydrodynamické dávkování ( $-5$  kPa, 5 s), vzorek zasunut do kapiláry ( $-5$  kPa, 30 s), separační napětí (20 kV po dobu 10 – 50 s), vzorek mobilizován skrz detektor tlakem  $-5$  kPa. BGE acetátový pufr ( $pH = 4,7$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2}$  mol  $l^{-1}$ . EOF označen oranžovou tečkou.

## 5 Závěr

V rámci této diplomové práce byly zkoumány možnosti využití kapilární elektroforézy s UV-VIS a LIF detekcí pro separaci a detekci prázdných liposomů a liposomů s enkapsulovaným léčivem. Během experimentů s liposomy DPPC-DPPG-PEG2000-DMPE s enkapsulovaným 5-FU byly testovány základní elektrolyty různého složení. Jako vhodný základní elektrolyt pro měření byl nakonec vybrán tetraboritan sodný ( $\text{pH} = 9,1$ ) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  s CTAB o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Při analýze liposomů s tímto základním elektrolytem se před píkem volného 5-FU objevoval další pík, který pravděpodobně patřil liposomům s enkapsulovaným 5-FU. Dalšími studovanými liposomy byly liposomy připravené z DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE s enkapsulovaným 5-FU. V rámci experimentů byl v elektroferogramu identifikován pík odpovídající liposomům s enkapsulovaným 5-FU i pík volného 5-FU, což bylo potvrzeno porovnáním absorpčních spekter obou píků.

Následně byl zkoumán potenciál liposomů DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE jako pseudostacionární fáze pro separace analytů metodou LEKC na základě změny efektivní mobility analytů po přidavku liposomů do základního elektrolytu. Bylo testováno několik kladně nabitých, záporně nabitých i neutrálních analytů. Interakcí s liposomy došlo ke změně efektivní mobility u záporně nabitého 5-FU a kladně nabitých analytů tryptaminu a p-toluidinu. Efektivní mobilita záporně nabitého 5-FU byla snížena o 18,2 % a efektivní mobilita kladně nabitého tryptaminu a p-toluidinu o 9,2 a 16 %. U neutrálních analytů nedošlo ke změně efektivní mobility přidáním liposomů do základního elektrolytu.

Na závěr byla kapilární elektroforéza s LIF detekcí použita pro analýzu prázdných liposomů DSPC-DSPG-PEG2000-DMPE-NBDPC obsahujících fluorescenční značku. Pro měření byla zvolena metoda, při které se nadávkovaný vzorek liposomů tlakem zasune do kapiláry, následně se na krátký časový úsek vloží na kapiláru napětí a poté se zóny vzorku tlakem mobilizují skrze detektor. V rámci experimentů bylo zjištěno, že vložením napětí dochází k separaci dvou různých frakcí liposomů. Snížením  $\text{pH}$  základního elektrolytu došlo ke zmenšení poměru pohyblivější frakce liposomů vůči frakci méně pohyblivé.

Tato práce sloužila jako základ pro další výzkum v oblasti analýzy a využití liposomů v kapilární elektroforéze. Cílem bylo především prověřit realizovatelnost různých výzkumných směrů. Poznatky lze stručně shrnout následovně: Kapilární elektroforézu s UV-VIS detekcí lze použít k separaci a detekci volného léčiva od liposomů s enkapsulovaným léčivem, což je základem pro stanovení účinnosti enkapsulace.

V kombinaci s LIF detekcí je možné separovat a detegovat také prázdné liposomy bez enkapsulovaného léčiva, což je důležité pro charakterizaci liposomů jako takových. Co se týče možnosti využití zkoumaných liposomů jako pseudostacionární fáze pro LEKC, bylo zjištěno, že mobilita několika testovaných analytů se díky interakcím s liposomy mění. Ačkoli se změna mobility pohybuje do 20 %, je v principu možné tuto metodu využít v některých případech pro optimalizaci problematických separací.

## Seznam literatury

- (1) Storm, G.; Crommelin, D. J. A. Liposomes: Quo Vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today* **1998**, *1* (1), 19–31. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(98\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(98)00007-8).
- (2) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Res Lett* **2013**, *8* (1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- (3) Daraee, H.; Etemadi, A.; Kouhi, M.; Alimirzalu, S.; Akbarzadeh, A. Application of Liposomes in Medicine and Drug Delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2016**, *44* (1), 381–391. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>.
- (4) Franzen, U.; Østergaard, J. Physico-Chemical Characterization of Liposomes and Drug Substance–Liposome Interactions in Pharmaceutics Using Capillary Electrophoresis and Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1267*, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.018>.
- (5) Has, C.; Sunthar, P. A Comprehensive Review on Recent Preparation Techniques of Liposomes. *Journal of Liposome Research* **2020**, *30* (4), 336–365. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>.
- (6) Carugo, D.; Bottaro, E.; Owen, J.; Stride, E.; Nastuzzi, C. Liposome Production by Microfluidics: Potential and Limiting Factors. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 25876. <https://doi.org/10.1038/srep25876>.
- (7) Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as Nanomedical Devices. *IJN* **2015**, 975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>.
- (8) Lee, M.-K. Liposomes for Enhanced Bioavailability of Water-Insoluble Drugs: In Vivo Evidence and Recent Approaches. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (3), 264. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030264>.
- (9) Nakhaei, P.; Margiana, R.; Bokov, D. O.; Abdelbasset, W. K.; Jadidi Kouhbanani, M. A.; Varma, R. S.; Marofi, F.; Jaharian, M.; Beheshtkhoo, N. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 705886. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>.
- (10) Large, D. E.; Abdelmessih, R. G.; Fink, E. A.; Auguste, D. T. Liposome Composition in Drug Delivery Design, Synthesis, Characterization, and Clinical Application. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *176*, 113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>.
- (11) Guimarães, D.; Cavaco-Paulo, A.; Nogueira, E. Design of Liposomes as Drug Delivery System for Therapeutic Applications. *International Journal of Pharmaceutics* **2021**, *601*, 120571. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>.

- (12) Roberts, M. A.; Locascio-Brown, L.; MacCrehan, W. A.; Durst, R. A. Liposome Behavior in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (19), 3434–3440. <https://doi.org/10.1021/ac9603284>.
- (13) Isalomboto Nkanga, C.; Murhimalika Bapolisi, A.; Ikemefuna Okafor, N.; Werner Maçedo Krause, R. General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. In *Liposomes - Advances and Perspectives*; Catala, A., Ed.; IntechOpen, **2019**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84255>.
- (14) Giuliano, C. B.; Cvjetan, N.; Ayache, J.; Walde, P. Multivesicular Vesicles: Preparation and Applications. *ChemSystemsChem* **2021**, *3* (2). <https://doi.org/10.1002/syst.202000049>.
- (15) Farooque, F.; Wasi, M.; Mughees, M. M. Liposomes as Drug Delivery System: An Updated Review. *J. Drug Delivery Ther.* **2021**, *11* (5-S), 149–158. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i5-S.5063>.
- (16) Paliwal, S. R.; Paliwal, R.; Vyas, S. P. A Review of Mechanistic Insight and Application of PH-Sensitive Liposomes in Drug Delivery. *Drug Delivery* **2015**, *22* (3), 231–242. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.882469>.
- (17) Eloy, J. O.; Petrilli, R.; Trevizan, L. N. F.; Chorilli, M. Immunoliposomes: A Review on Functionalization Strategies and Targets for Drug Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *159*, 454–467. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.085>.
- (18) Sharma, A. Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, *154* (2), 123–140. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00135-X).
- (19) Miller, C. R.; Bondurant, B.; McLean, S. D.; McGovern, K. A.; O'Brien, D. F. Liposome–Cell Interactions in Vitro: Effect of Liposome Surface Charge on the Binding and Endocytosis of Conventional and Sterically Stabilized Liposomes. *Biochemistry* **1998**, *37* (37), 12875–12883. <https://doi.org/10.1021/bi980096y>.
- (20) Gonzalez Gomez, A.; Hosseinidoust, Z. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6* (5), 896–908. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00357>.
- (21) Popovska, O.; Simonovska, J.; Kavrakovski, Z.; Rafajlovska, V. An Overview: Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* **2013**, *3* (3), 182–189.
- (22) Šturm, L.; Poklar Ulrih, N. Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *IJMS* **2021**, *22* (12), 6547. <https://doi.org/10.3390/ijms22126547>.
- (23) Vemuri, S.; Rhodes, C. T. Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: A Review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **1995**, *70* (2), 95–111. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](https://doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7).
- (24) Lapinski, M. M.; Castro-Forero, A.; Greiner, A. J.; Ofoli, R. Y.; Blanchard, G. J. Comparison of Liposomes Formed by Sonication and Extrusion: Rotational and



- Translational Diffusion of an Embedded Chromophore. *Langmuir* **2007**, *23* (23), 11677–11683. <https://doi.org/10.1021/la7020963>.
- (25) Arajo Lopes, S. C. de; Santos Giuberti, C. dos; Ribeiro, T. G.; Santos Ferreira, D. dos; Amaral Leite, E.; Cristina, M. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. In *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*; Rangel, L., Ed.; InTech, **2013**. <https://doi.org/10.5772/55290>.
- (26) Kanda, H.; Katsube, T.; Wahyudiono; Goto, M. Preparation of Liposomes from Soy Lecithin Using Liquefied Dimethyl Ether. *Foods* **2021**, *10* (8), 1789. <https://doi.org/10.3390/foods10081789>.
- (27) Gouda, A.; Sakr, O. S.; Nasr, M.; Sammour, O. Ethanol Injection Technique for Liposomes Formulation: An Insight into Development, Influencing Factors, Challenges and Applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2021**, *61*, 102174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>.
- (28) Cortesi, R. Preparation of Liposomes by Reverse-Phase Evaporation Using Alternative Organic Solvents. *Journal of Microencapsulation* **1999**, *16* (2), 251–256. <https://doi.org/10.1080/026520499289220>.
- (29) Grit, M.; Crommelin, D. J. A. Chemical Stability of Liposomes: Implications for Their Physical Stability. *Chemistry and Physics of Lipids* **1993**, *64* (1–3), 3–18. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90053-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90053-6).
- (30) Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (4), 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
- (31) Attia, M. A.; Essa, E. A.; Elebyary, T. T.; Faheem, A. M.; Elkordy, A. A. Brief on Recent Application of Liposomal Vaccines for Lower Respiratory Tract Viral Infections: From Influenza to COVID-19 Vaccines. *Pharmaceutics* **2021**, *14* (11), 1173. <https://doi.org/10.3390/ph14111173>.
- (32) Gregoriadis, G. Liposomes and mRNA: Two Technologies Together Create a COVID-19 Vaccine. *Medicine in Drug Discovery* **2021**, *12*, 100104. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2021.100104>.
- (33) Schoenmaker, L.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; Verbeke, R.; Kersten, G.; Jiskoot, W.; Crommelin, D. J. A. mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *International Journal of Pharmaceutics* **2021**, *601*, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>.
- (34) Chen, C.; Zhu, S.; Huang, T.; Wang, S.; Yan, X. Analytical Techniques for Single-Liposome Characterization. *Anal. Methods* **2013**, *5* (9), 2150. <https://doi.org/10.1039/c3ay40219c>.
- (35) Edwards, K.; Baeumner, A. Analysis of Liposomes. *Talanta* **2006**, *68* (5), 1432–1441. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.031>.
- (36) Almgren, M.; Edwards, K.; Karlsson, G. Cryo Transmission Electron Microscopy of Liposomes and Related Structures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*

- Engineering Aspects* **2000**, 174 (1–2), 3–21. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00516-1](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00516-1).
- (37) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys Rev* **2016**, 8 (4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (38) Grabielle-Madelmont, C.; Lesieur, S.; Ollivon, M. Characterization of Loaded Liposomes by Size Exclusion Chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2003**, 56 (1–3), 189–217. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(03\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(03)00059-9).
- (39) Sun, Y.; Shi, Q.-H.; Zhang, L.; Zhao, G.-F.; Liu, F.-F. Adsorption and Chromatography. In *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier, **2011**; pp 665–679. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00123-9>.
- (40) Ruyschaert, T.; Marque, A.; Duteyrat, J.-L.; Lesieur, S.; Winterhalter, M.; Fournier, D. Liposome Retention in Size Exclusion Chromatography. *BMC Biotechnol* **2005**, 5 (1), 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-11>.
- (41) Zhang, X.-M.; Patel, A. B.; de Graaf, R. A.; Behar, K. L. Determination of Liposomal Encapsulation Efficiency Using Proton NMR Spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* **2004**, 127 (1), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2003.09.013>.
- (42) Zhang, G.; Sun, J. Lipid in Chips: A Brief Review of Liposomes Formation by Microfluidics. *IJN* **2021**, Volume 16, 7391–7416. <https://doi.org/10.2147/IJN.S331639>.
- (43) Ohnishi, N.; Yamamoto, E.; Tomida, H.; Hyodo, K.; Ishihara, H.; Kikuchi, H.; Tahara, K.; Takeuchi, H. Rapid Determination of the Encapsulation Efficiency of a Liposome Formulation Using Column-Switching HPLC. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 441 (1–2), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.019>.
- (44) Kanášová, M.; Nesměrák, K. Systematic Review of Liposomes' Characterization Methods. *Monatsh Chem* **2017**, 148 (9), 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-1994-9>.
- (45) Singh, N.; Kushwaha, P.; Ahmad, U.; Abdullah, M. Proliposomes: An Approach for the Development of Stable Liposome. *Ars Pharm* **2019**, 60 (4), 231–240. <https://doi.org/10.30827/ars.v60i4.8517>.
- (46) Muneer, S.; Masood, Z.; Butt, S.; Anjum, S.; Zainab, H.; Anwar, N.; Ahmad, N. Proliposomes as Pharmaceutical Drug Delivery System: A Brief Review. *J Nanomed Nanotechnol* **2017**, 08 (03). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000448>.
- (47) Manjula, D.; Shabaraya, A.; Somashekar, S. Topical Delivery of Fenoprofen Proliposomes: Preparation, Evaluation and In Vitro Release. *Int. J. Pharm. Sci. Invent.* **2014**, 3 (8), 6–12.
- (48) Manani, H.; Prajapati, B.; Patel, R. Review of Preliposomes as Novel Drug Delivery System. *Pharma Innovation* **2015**, 4 (3), 61–67.

- (49) Wiedmer, S. K.; Shimmo, R. Liposomes in Capillary Electromigration Techniques. *ELECTROPHORESIS* **2009**, *30* (S1), S240–S257. <https://doi.org/10.1002/elps.200900061>.
- (50) Nasr, G.; Greige-Gerges, H.; Elaissari, A.; Khreich, N. Liposomal Membrane Permeability Assessment by Fluorescence Techniques: Main Permeabilizing Agents, Applications and Challenges. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *580*, 119198. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119198>.
- (51) Tsukagoshi, K.; Okumura, Y.; Nakajima, R. Migration Behavior of Dyestuff-Containing Liposomes in Capillary Electrophoresis with Chemiluminescence Detection. *Journal of Chromatography A* **1998**, *813* (2), 402–407. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00376-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00376-8).
- (52) Franzen, U.; Nguyen, T. T. T. N.; Vermehren, C.; Gammelgaard, B.; Østergaard, J. Characterization of a Liposome-Based Formulation of Oxaliplatin Using Capillary Electrophoresis: Encapsulation and Leakage. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55* (1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.037>.
- (53) Duffy, C. F.; Gafoor, S.; Richards, D. P.; Admadzadeh, H.; O’Kennedy, R.; Arriaga, E. A. Determination of Properties of Individual Liposomes by Capillary Electrophoresis with Postcolumn Laser-Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (8), 1855–1861. <https://doi.org/10.1021/ac0010330>.
- (54) Wiedmer, S. K.; Hautala, J.; Holopainen, J. M.; Kinnunen, P. K. J.; Riekkola, M.-L. Study on Liposomes by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **2001**, *22* (7), 1305–1313. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200105\)22:7<1305::AID-ELPS1305>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:7<1305::AID-ELPS1305>3.0.CO;2-Q).
- (55) Ansar, S. M.; Jiang, W.; Mudalige, T. Direct Quantification of Unencapsulated Doxorubicin in Liposomal Doxorubicin Formulations Using Capillary Electrophoresis. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *549* (1–2), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.019>.
- (56) Chen, D.; Cole, D. L.; Srivatsa, G. S. Determination of Free and Encapsulated Oligonucleotides in Liposome Formulated Drug Product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2000**, *22* (5), 791–801. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00243-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00243-0).
- (57) Bilek, G.; Kremser, L.; Blaas, D.; Kenndler, E. Analysis of Liposomes by Capillary Electrophoresis and Their Use as Carrier in Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography B* **2006**, *841* (1–2), 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.031>.
- (58) Colón, L. A.; Reynolds, K. J.; Alicea-Maldonado, R.; Fermier, A. M. Advances in Capillary Electrochromatography. *Electrophoresis* **1997**, *18* (12–13), 2162–2174. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181207>.
- (59) Yan, C.; Xue, Y.; Wang, Y. Capillary Electrochromatography. In *Capillary Electromigration Separation Methods*; Elsevier, **2018**; pp 209–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809375-7.00009-5>.

- (60) Wiedmer, S. K.; Riekkola, M.-L.; Jussila, M. S. Phospholipids and Liposomes in Liquid Chromatographic and Capillary Electromigration Techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2004**, *23* (8), 562–582. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.03.001>.
- (61) Lokajová, J.; Tiala, H.; Viitala, T.; Riekkola, M.-L.; Wiedmer, S. K. Covalent Binding of Phospholipid Vesicles on Fused Silica Capillaries for Electrochromatography. *Soft Matter* **2011**, *7* (13), 6041. <https://doi.org/10.1039/c1sm05372h>.
- (62) Mao, X.; Kong, L.; Li, X.; Guo, B.; Zou, H. Unilamellar Liposomes Covalently Coupled on Silica Gel for Liquid Chromatography. *Anal Bioanal Chem* **2003**, *375* (4), 550–555. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1721-0>.
- (63) Örnskov, E.; Ullsten, S.; Söderberg, L.; Markides, K. E.; Folestad, S. Method for Immobilization of Liposomes in Capillary Electrophoresis by Electrostatic Interaction with Derivatized Agarose. *Electrophoresis* **2002**, *23* (19), 3381–3384. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200210\)23:19<3381::AID-ELPS3381>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200210)23:19<3381::AID-ELPS3381>3.0.CO;2-4).
- (64) Burns, S. T.; Khaledi, M. G. Rapid Determination of Liposome–Water Partition Coefficients (K<sub>lw</sub>) Using Liposome Electrokinetic Chromatography (LEKC). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *91* (7), 1601–1612. <https://doi.org/10.1002/jps.10119>.
- (65) Wang, Y.; Sun, J.; Liu, H.; Liu, J.; Zhang, L.; Liu, K.; He, Z. Predicting Skin Permeability Using Liposome Electrokinetic Chromatography. *Analyst* **2009**, *134* (2), 267–272. <https://doi.org/10.1039/B807497F>.
- (66) Terabe, S.; Kim, J.-B. MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY. In *Encyclopedia of Analytical Science*; Elsevier, **2005**; pp 1–10. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00372-1>.
- (67) Nakamura, H.; Sugiyama, I.; Sano, A. Liposome Electrokinetic Chromatography as a Novel Tool for the Separation of Hydrophobic Compounds. *Anal. Sci.* **1996**, *12* (6), 973–975. <https://doi.org/10.2116/analsci.12.973>.
- (68) Wiedmer, S. K.; Jussila, M. S.; Holopainen, J. M.; Alakoskela, J.; Kinnunen, P. K. J.; Riekkola, M. Cholesterol-containing Phosphatidylcholine Liposomes: Characterization and Use as Dispersed Phase in Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Sep. Science* **2002**, *25* (7), 427–437. [https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20020501\)25:7<427::AID-JSSC427>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20020501)25:7<427::AID-JSSC427>3.0.CO;2-#).
- (69) Carrozzino, J. M.; Khaledi, M. G. Interaction of Basic Drugs with Lipid Bilayers Using Liposome Electrokinetic Chromatography. *Pharm Res* **2004**, *21* (12), 2327–2335. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-7685-3>.
- (70) Liu, Z.; Wang, S.; Hu, M. Oral Absorption Basics. In *Developing Solid Oral Dosage Forms*; Elsevier, **2009**; pp 263–288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00011-4>.

- (71) Liu, X.; Testa, B.; Fahr, A. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. *Pharm Res* **2011**, *28* (5), 962–977. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0303-7>.
- (72) Williams, B. A.; Vigh, G. Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (7), 1174–1180. <https://doi.org/10.1021/ac950968r>.
- (73) Li, W.; Zhang, M.; Zhang, J.; Han, Y. Self-Assembly of Cetyl Trimethylammonium Bromide in Ethanol-Water Mixtures. *Front. Chem. China* **2006**, *1* (4), 438–442. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0069-y>.