

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické technologie



Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 6.

Nanofiber membranes as carriers of drugs 6.

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Mgr. Hana Bidmonová

Konzultant rigorózní práce:
doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové 2010

Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji.

Děkuji doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc., Mgr. Pavlu Berkovi, p. Janě Fendrichové
za odborné vedení a pomoc při vypracování předkládané rigorózní práce.

OBSAH

OBSAH.....	4
1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1 Shrnutí poznatků diplomové práce.....	8
3.2 Použití nanovláknenných materiálů v medicíně a ve farmacii	9
3.2.1 Cílené podání léčiv do organismu	9
3.2.2 Lékařská protetika.....	11
3.2.3 Podložky pro růst tkání.....	12
3.2.4 Antiadhezivní membrány.....	13
3.2.5 Obvazový materiál	13
3.2.6 Ochranné pomůcky	14
3.2.7 Kosmetické přípravky	14
3.3 Nanovláknenné materiály v transportních systémech léčiv a tkáňovém inženýrství.....	15
3.3.1 Vlastnosti matric umožňující jejich použití	15
3.3.2 Vlastnosti materiálů matric	15
3.3.3 Požadavky na matrice.....	16
3.3.4 Výroba matric.....	17
3.3.5 Tradiční matrice a matrice vznikající in situ.....	18
3.3.6 Začlenění léčiva a bioaktivních látek do matrice	19
3.4 Konkrétní studie inkorporace látky do elektospininígem připravené matrice a uvolňování látky z matrice.....	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1 Suroviny	25
4.2 Testovaný materiál	25
4.3 Přístroje.....	26
4.4 Příprava roztoků, suspenzí.....	26
4.4.1 Příprava tromethamolového pufru.....	26
4.4.2 Příprava směsi propylenglykol : čištěná voda	27
4.4.3 Příprava roztoku kofeinu ve směsi propylenglykol : čištěná voda	27

4.4.4	Příprava vodného roztoku kofeinu.....	27
4.4.5	Příprava ethanolové disperze kofeinu	27
4.4.6	Příprava chloroformové disperze kofeinu	28
4.4.7	Příprava mobilní fáze pro HPLC stanovení kofeinu.....	28
4.4.8	Příprava kofeinových standardů.....	28
4.5	Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách.....	29
4.6	Sycení membrán léčivem	29
4.6.1	Sycení membrán léčivem z vodného prostředí	30
4.6.2	Sycení membrán léčivem z nevodného prostředí	32
4.6.3	Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán	33
4.7	Liberace léčiva z membrán	34
4.7.1	Krátkodobá liberace	34
4.7.2	Dlouhodobá liberace	36
4.7.3	HPLC stanovení kofeinu	36
5.	DOKUMENTACE	40
5.1	Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách.....	40
5.2	Sycení membrán léčivem	43
5.3	Liberace léčiva z membrán	44
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	67
6.1	Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách.....	67
6.2	Sycení membrán léčivem	68
6.2.1	Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán	72
6.3	Liberace léčiva z membrán	75
6.3.1	Krátkodobá liberace	75
6.3.2	Dlouhodobá liberace	78
7.	ZÁVĚRY.....	83
8.	SOUHRN.....	86
9.	ABSTRACT.....	87
10.	SEZNAM GRAFŮ.....	88
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	89
12.	SEZNAM TABULEK.....	90
13.	SEZNAM ZKRATEK.....	91
14.	POZNÁMKY	94
15.	SEZNAM LITERATURY	95

1. ÚVOD

V souvislosti s farmacií a medicínou se předpokládá uplatnění nanovlákných membrán zejména v oblasti distribuce léčiv, tkáňovém inženýrství a tvorbě implantátů, dále také jako obvazový materiál, ochranné oděvy a pomůcky.

Na katedře farmaceutické technologie UK-FAF začal v akademickém roce 2008/2009 v rámci společného projektu s firmou Elmarco výzkum vybraných fyzikálních a biofarmaceutických vlastností nanovlákných membrán. V první fázi firma Elmarco zaslala k testování membrány vyrobené z různých druhů polymerů a výzkum se tedy zabýval hodnocením základních vlastností membrán v závislosti na druhu použitého polymerního materiálu. Součástí tohoto projektu se v akademickém roce 2008/2009 stalo několik diplomových prací ^{1, 2, 3, 4}.

Výzkum nadále pokračuje, v letošním akademickém roce 2009/2010 jsou na toto téma vyhotoveny další diplomové a také nové rigorózní práce. Na základě výsledků prvního kola testování a především po vyhodnocení liberačně-permeačního pokusu byly v laboratořích firmy Elmarco vyrobeny a následně zadány k testování membrány, které obsahovaly z výroby inkorporované léčivo. Předmětem této části výzkumu se stalo hodnocení sorpčních a liberačních vlastností membrán, zvláště jejich schopnosti inkorporované léčivo uvolnit, popřípadě další množství léčiva přijmout, ale zcela jinou cestou, než byla použita při zavedení léčiva inkorporací při výrobním procesu ve firmě, a následně toto množství uvolnit.

Tato rigorózní práce představuje další část širšího výzkumu na UK-FAF. Doplnuje a navazuje na diplomovou práci na téma Nanovlákné membrány jako nosiče léčiv ², kterou jsem vypracovala v loňském akademickém roce. ^{Chyba! Záložka není definována.} Předmětem předkládané práce je studium nanovlákných membrán z chitosanu, lišících se navzájem plošnou hmotností a majících v sobě z výroby inkorporovaný kofein.

2. CÍL PRÁCE

Práce navazuje na dosavadní výzkum katedry farmaceutické technologie v oblasti studia nanovláknenných membrán a rozšiřuje teoretické informace a především experimentální výsledky předešlých prací.

Teoretická část má za úkol poskytnout bližší informace o použití nanovláknenných membrán ve farmacii a medicíně, zejména v oblasti targetingu a distribuci léčiv a v tkáňovém inženýrství.

Cílem experimentální části je získání nových poznatků o nanovláknenných membránách z hlediska jejich schopnosti přijmout a následně uvolnit ze své struktury léčivo. Jednalo se o posouzení:

- Uvolňování léčiva z membrán, do nichž bylo léčivo vpraveno při výrobě elektrospinningem.
- Návrhu na zavedení léčiva do membrány zcela jiným způsobem, než který byl použit při inkorporaci léčiva v poloprovozních podmínkách firmy.
- Pokusu o sycení membrán pomocí médií s léčivem pro zjištění schopnosti membrán pojmout další množství léčiva kromě toho, které membrána obsahuje z výroby.
- Uvolňování impregnovaného léčiva z membrán.
- Jako předběžný, doplňkový cíl byl začleněn experiment pro stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách pro zjištění, zda vlastnosti membrán a získané výsledky mohou být při práci ovlivněny vzdušnou vlhkostí.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Shrnutí poznatků diplomové práce

Diplomová práce na téma Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv ²Chyba!
Záložka není definována. se zabývala charakteristikou membrán vyrobených z polyvinylalkoholu, chitosanu a kyseliny (D,L) polymléčné. Od každého druhu membrány byly hodnoceny dvě řady vzorků, jedna řada představovala materiál, který byl radiačně sterilizován, a druhá řada materiál, který nebyl radiačně sterilizován.

Práce poskytla přehled informací především o elektrospiningu, metodě výroby nanovláken, jeho historii, principu, parametrech, typech technického uspořádání a materiálech pro zvlákňování. Dále podala obecné informace o vlastnostech a možném použití nanovláken, charakterizovala netkané textílie a polymery, ze kterých byly vyrobeny testované nanovláknenné membrány.

Pro testování membrán byly do zmíněné diplomové práce vybrány k hodnocení mechanických vlastností tahové zkoušky, k hodnocení hydrofilně-lipofilního charakteru povrchu zkouška na smáčivost a měření kontaktního úhlu, k hodnocení sorpčně-liberačního chování zkouška na nasákavost a liberačně-permeační pokus.

Tahové vlastnosti membrán byly ovlivněny předchozí radiační sterilizací a orientací měřeného materiálu. Žádné pravidelnosti z hlediska měřených vlastností nebyly zaznamenány. Některá membrána sterilizací tahově zeslábla a některá zesílila. Stejně tomu bylo při hodnocení směru měření, některá membrána byla ve směru podélném tahově silnější a některá naopak ve směru příčném. Při zkoušce na smáčivost se všechny tři membrány jevily jako vodou nesmáčivé a voda na jejich povrchu utvořila kapku, zatímco lipofilní tekutina se zcela vsákla. Na základě srovnání hodnot kontaktního úhlu bylo zjištěno u všech tří membrán, že se sterilizací materiál stává hydrofilnějším. Při zkoušce na nasákavost byly všechny tři membrány schopné pojmout určité množství hydrofilní kapaliny. Při liberačně-permeačním pokusu všechny tři membrány ve srovnání s kontrolou poskytovaly nižší koncentrace kofeinu v akceptorové fázi a uvolňování a následný průnik kofeinu brzdily.

Získané výsledky byly předány firmě Elmarco, která informace vyhodnotila a vyrobila pro pokračující výzkum další nanovláknenné membrány. Tyto membrány

jsou ze stejného polymerního materiálu, konkrétně chitosanu, liší se navzájem plošnou hmotností a mají v sobě z výroby inkorporovaný kofein. Jmenované membrány jsou předmětem předkládané rigorózní práce.

3.2 Použití nanovláknenných materiálů v medicíně a ve farmacii

Nanovláknenné membrány mají uplatnění v cílené distribuci léčiv, v lékařské protetice jako podložky pro růst tkání, v tkáňovém inženýrství, dále jako obvazový materiál, filtrační pomůcky a ochranné pomůcky, také jako kosmetické přípravky.⁵

3.2.1 Cílené podání léčiv do organismu

Transportní aplikační soustavy, drug delivery systems, představují pokročilý způsob přívodu léčiv do organismu a jsou schopné léčivo usměrnit na místo anebo k místu jeho účinku, čímž významně snižují jeho přítomnost v ostatních pro léčbu nedůležitých částech organismu. Jedná se tedy o cílení, směřování léčiva a spuštění liberace léčiva v určité oblasti.⁶

Jako perspektivní se pro systémy cíleného podání léčiv jeví nanovláknenné membrány mající rozměry podobné extracelulární matrix, které hrají důležitou roli při transportu léčiv. Tyto systémy ve formě nanovláken jsou stále v počátečním stádiu zkoumání. Nanovláknenné membrány tvoří trojrozměrnou matici (lešení neboli kostru), do níž je inkorporováno léčivo či jiné agens nízkomolekulární nebo vysokomolekulární povahy. Systémy mohou být navrženy takovým způsobem, aby poskytly rychlé, okamžité, opožděné nebo jinak upravené, řízené uvolňování léčiva. Vlastnosti systému, především jeho kinetiku uvolňování léčivé látky, ovlivňuje na jedné straně výběr materiálu, technika elektrospiningu, metoda zavedení léčiva a na straně druhé plocha povrchu léčiva a plocha nosiče.⁷

Materiálem a následně nosičem léčiva mohou být nedegradabilní polymery, u nichž k uvolňování léčiva dochází především difúzí. Mnohem populárnější jsou, stejně jako v tkáňovém inženýrství, biodegradabilní polymery, u kterých uvolňování léčiva probíhá jednak difúzí a jednak degradací nosiče a u kterých je díky jejich degradaci eliminována následná explantace, tedy zpětné vyjmutí systému, a je sníženo zatěžování organismu. V některých případech může vést uvolňování léčiva dvěma souběžně probíhajícími způsoby, difúzí a degradací polymeru, k příliš rychle uvolněné dávce a nárůstu koncentrace léčiva k toxickým hodnotám. Aby se takovým

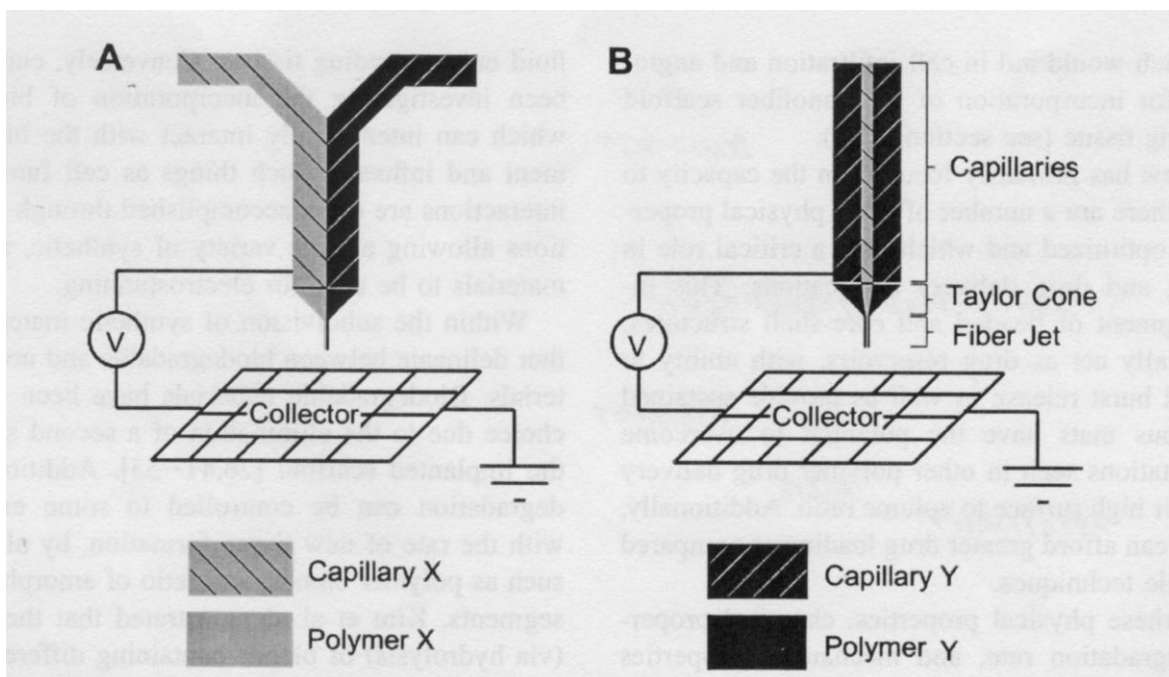
situacím zabránilo, je při sestavování systému třeba upravit rychlost uvolňování léčiva v relaci k rychlosti degradace nosiče.⁷

Škála léčiv a ostatních látek inkorporovaných na nosiče je poměrně pestrá díky velkému výběru polymerů pro výrobu membrán elektrospiningem a různým metodám elektrospiningu, jejichž příklady uvádí **Tab. 1**. Nejčastěji se ve výzkumu jedná o inkorporaci antibiotika, protinádorové látky, proteinů nebo DNA, RNA anebo suspenze obsahující živé buňky.⁷

polymer	rozpuštědlo	typ elektrospiningu	aplikace
polykaprolakton-obal	2,2,2-trifluorethanol	koaxiální uspořádání	podání albuminu
polyethylenglykol-jádro	voda		
polykaprolakton-obal	chloroform a DMF	koaxiální uspořádání	podání albuminu
polyethylenglykol-obal			
dextran-jádro	voda		
PLGA, PLA, PEG-b-PLA	DMF	prosté uspořádání	podání cefalosporinu
PLGA	dichlormethan	prosté uspořádání	podání paklitaxelu
PLGA, PEG-PLLA	chloroform	prosté uspořádání	podání karmustinu

Tab. 1: Příklady elektrospiningem zvlákněných polymerů a jejich využití v aplikaci léčiv⁷

Vpravení, zavedení léčiva, drug loading, může proběhnout několika způsoby, při nichž může být léčivo a nosný materiál různě mísen a mohou vzniknout různé struktury. První možností je napojení částic léčiva na povrch nanovlákněné membrány, např. ponořením zvlákněného polymeru do roztoku léčiva a zavedením léčiva pomocí adsorbce. Druhou možností je formace polymeru a léčiva do nanovlákněné struktury, kdy konečný produkt obsahuje dva druhy nanovláken vzájemně proložené. Třetí možností je vpravení léčiva do taveniny nebo roztoku polymeru, kdy po elektrostatickém zvláknění vznikne jeden druh dvousložkových vláken. Čtvrtou možností je elektrospiningem převedení polymeru do tubulární formy, v jejímž středovém prostoru jsou zapouzdřeny částičky léčiva.⁵



Obr. 1: Ukázka elektrospínungu dle uspořádání ⁷

Pro aplikační systémy léčiv a také pro tkáňové inženýrství má velký potenciál metoda pro zavedení léčiva nazvaná elektrospínung s koaxiálním uspořádáním znázorněná na **Obr. 1 B**. Při této metodě je menší kapilára, kterou protéká polymerní roztok s léčivem, obklopena větší kapilárou, již protéká další polymerní roztok. Při tomto uspořádání jsou menší vlákna s léčivem obalena, enkapsulována, většími vlákny a vzniká struktura nazvaná core-shell.⁷

3.2.2 Lékařská protetika

Nanovláknenné materiály mají uplatnění při konstrukci umělých náhrad částí lidského těla, měkkých tkání jako jsou krevní cévy, vaskulární, prsní nebo nervová tkáň, a také tvrdších tkání jako chrupavka nebo kost, nověji také rohovka, kůže, šlachy a vazy.

Nanovláknenná trojrozměrná síť poskytne konstrukci, do níž jsou nasazeny buňky. Buňky rostou, organizují se a během týdnů až měsíců vytvoří tkáňovou náhradu připravenou pro transplantaci. Nanostruktura s velkým množstvím vzájemně propojených pórů a se značnou plochou povrchu velmi příznivě působí na vrůstání tkáně, na připojení buněk do systému a na transport živin a odpadních látek.

Pro regeneraci nebo nahrazení kostí, svalů, kůže a také nervů získávají stále větší oblibu nanovláknenné konstrukce založené na kolagenu nebo peptidech.

Tyto molekuly tvořící přirozeně lidskou tkáň podporují růst buněk, eliminují riziko odmítnutí náhrady lidským organismem a jimi vytvořená konstrukce může být časem biologicky odbourána a tělem postupně nahrazena.

Kromě použití nanovláken jako konstrukce pro tkáňové náhrady mohou vlákna tvořit tenkou pórovitou membránu na tkáňovém protetickém přípravku. Nanovláknenný film pracuje jako mezifáze mezi náhradou a lidskou tkání, příznivě ovlivňuje procesy probíhající na spojení a snižuje riziko selhání náhrady po implantaci. Jednou z možností negativní reakce tkáně na náhradu je opouzdření implantátu v jizvové tkáni. Je to častý problém u ortopedických implantátů jako umělé kyčle nebo nervových náhrad jako elektrické sond, kdy dojde k obalení náhrady a její povrch tak nemůže komunikovat se sousední tkání, nemůže být zahájen proces hojení, který zahrnuje odvod tělesných tekutin, proteinů a nežádoucích druhů buněk na rozhraní náhrada - tkáň. Náhrada tím ztrácí svou funkčnost – nervový implantát nedokáže reagovat s vodivou nervovou tkání a elektrické sondy implantované do CNS nemají schopnost měřit či stimulovat funkce nervové buňky, ortopedický implantát je nedostatečně propojen se sousední kostí a tak je snížena účinnost implantace. Tento problém, jak probíhající výzkumy ukazují, by mohl být odstraněn použitím uhlíkových nanovláken. Tato nanovlákna jsou kompatibilní s lidskou tkání a v kompozitních implantátech z polykarbonátůretanu podporují organizaci kostních buněk, zvyšují funkci nervových náhrad a snižují tvorbu tkáňových jizev.^{5,7}

3.2.3 Podložky pro růst tkání

Nanovláknenné materiály mohou sloužit jako podložky pro růst tkání a zaujmout tak roli přirozené extracelulární matrix, protože svou nanostrukturou připomínají její rozměry a napodobují její biologickou funkci.

Podstatou úspěšné regenerace tkání je připojení buněk na vláknennou konstrukci a jejich organizace kolem nanovláken, která poskytnou vhodnou podložku pro osazení, přesun a hlavně růst buněk. Nanovlákna poskytují vhodné podmínky pro depozici a bujení buněk, mají rezervy pro tkáňové opravy a nahrazovací procedury. Optimální konstrukce vytváří buňkám budoucí tkáně přátelské prostředí, podporuje růst téměř všudypřítomných nervových buněk a musí být schopna reagovat na změny prostředí.

Velká pozornost je věnována konstrukcím se syntetickými biopolymery a biologicky odbouratelnými polymery. Jedná se především o konstrukce založené

na proteinech a peptidech, které oproti syntetickým konstrukcím nevyvolávají v organismu imunitní odpověď nebo zánět a které mohou být použity v tkáních, jež nesnesou syntetické materiály vytvářející nevhodné prostředí pro růst buněk. Peptidy mají možnost se samoorganizovat do struktur jako vlákna, trubičky, archy, tenké vrstva a mohou tak buňkám vytvářet příznivé klima, na čemž se podílí jejich schopnost reagovat na změny pH, mechanické síly, teploty, tlaku, světla, elektrického a magnetického pole.

V budoucnu se očekává přínos vláknenné konstrukce založené na peptidech v oblasti nervového poškození. Konstrukce by měla být médiem, na kterém porostou neurony do vláken pro vzájemnou komunikaci a pro založení funkčních synapsí. Využita by měla být jako podložka pro růst náhradních nervových buněk pro oběti poranění míchy a ostatních forem nervového poškození.⁵

3.2.4 Antiadhezivní membrány

Nanovláknenná membrána získaná elektrostatickým zvlákňováním může sloužit jako antiadhezivní materiál, chránící sousední tkáň od slepení při pooperačním hojení a zabraňující následkům srůstu jizvové tkáně např. v důsledku adheze v dutině břišní a pánvi se mohou způsobit neplodnost nebo ucpání střeva.

Při srovnání s již používanými antiadhezivními materiály z celulózy nebo hyaluronanu se nanovláknenná membrána jeví jako flexibilnější, snáze drží, nemá tendenci se lepit k mokré chirurgické rukavici a velkou předností je, že mohou být díky matici jako nosiči aplikována přímo tkáním antibiotika, léky podporující hojení, léky proti bolesti, zánětu a to v menším množství, než které by bylo potřebné u ostatních způsobů aplikace léčiv, a zároveň je matrice schopná toto množství uvolnit kontinuálně, trvale, což eliminuje několikanásobné podávání léčiv a snižuje zátěž pro pacienta.

Při testování nanovláknenného materiálu in vivo na krysách bylo dokázáno, že materiál redukuje tkáňové srůsty a snižuje pevnost a soudržnost adheze. V současné době je materiál klinicky zkoušen u lidí.⁵

3.2.5 Obvazový materiál

Elektrospiningem získaná nanovlákna mohou sloužit jako obvazový materiál při ošetření zranění, popálenin kůže a při zástavě krvácení. Oproti klasickým obvazovinám mají spoustu výhod. Vlákna mohou být pomocí elektrického pole

stříkána přímo na ránu, kde vytvoří vláknitý obvaz. Další předností je, že ránu nejen chrání, ale také hojí, urychlují tvorbu kůže a snižují výskyt jizvové tkáně. Velikost pórů v membránách je dost malá na to, aby zachytily aerosolové částičky a chránily tak ránu před průnikem bakterií. Měrný povrch membrán je obrovský a vysoce účinný pro adsorpci kapalin a podání dermatologických léčiv.⁵

3.2.6 Ochranné pomůcky

Pro výrobu ochranných pomůcek, jako jsou ochranné roušky, respirátory a oděvy, se v probíhajících výzkumech jeví při srovnání s aktuálně používanými pomůckami jako výhodnější nanovláknenné materiály.

Materiál pro výrobu ochranných pomůcek by měl být lehký, prodyšný, příjemný na nošení a přitom vysoce účinný, propustný pro vodu a vodní páru, nepropustný a vysoce reaktivní pro jedovaté látky a patogenní mikroorganismy, nerozpustný ve všech rozpouštědlech. Většinu z toho splňují nanovláknenné materiály.

Materiály díky svým nanorozměrům zabraňují prostupu většině škodlivých chemických a biologických látek a zachycují ve své struktuře bakterie a viry, které jsou v rozsahu velikostí mikrometrů až nanometrů. Zaručují pohodlnější a efektivnější nošení, i pro dlouhodobé použití, jelikož nanovláknena tvoří jen malou část pomůcky, a díky svému měrnému povrchu dokáží být při své nízké hmotnosti velmi účinné. Konkrétně byl vyvinut nanovláknenný materiál pro masky, který se skládá z méně než 2 % materiálu a více než 98 % představuje vzduch.

Při testování vykazují nanovláknenné materiály díky vysoké pórovitosti a malé velikosti pórů značnou efektivitu v zachycování látek v aerosolové formě a díky velké ploše povrchu minimální impedanci k rozptýlu vlhké páry.⁵

3.2.7 Kosmetické přípravky

V kosmetice jsou tradičně používány krémy, masti, pleťové vody a mléka, obsahující pevné nebo kapalné částice, které mají oproti vláknitým materiálům tu výhodu, že pronikají při aplikaci na kůži. Přesto jsou pro kosmetické účely zkoušeny nanovláknenné pleťové masky pro hojení pleti, čištění pleti a pro další léčebné účely.⁵

3.3 Nanovláknenné materiály v transportních systémech léčiv a tkáňovém inženýrství

Systémy pro aplikaci léčiv s cílem uvolnění léčiva v určité části lidského těla a materiály pro tkáňové inženýrství k náhradě či usnadnění růstu poškozených nebo nemocných buněk využívají kombinaci přírodních a syntetických polymerních nanomateriálů s buňkami, bioaktivními molekulami a léčivy.

Základním stavebním kamenem jsou polymerní mikro- a nanokonstrukce (scaffolds, počestěně skafoldy), které zajišťují interakci s extracelulární matrix a s buňkami a které uskutečňují řízené uvolňování léčiv nebo bioaktivních látek podporujících buněčný růst a tvorbu tkání.⁸

3.3.1 Vlastnosti matric umožňující jejich použití

Polymerní konstrukce má podobu trojrozměrné sítě a mikrovláknennou až nanovláknennou strukturu zajišťující velký měrný povrch. Má vysoce porézní strukturu se systémem vzájemně propojených pórů. Svými rozměry a mechanickými vlastnostmi napodobuje přirozenou tkáň. Matrice může zastávat funkci nosiče léčiva na základě své schopnosti přijmout do své struktury léčivé látky a následně je uvolnit. Ideální konstrukce je biokompatibilní, zcela resorbovatelná sousedními tkáněmi, s řízenou degradační a resorpční rychlostí, zajišťuje kontrolovanou distribuci léčiv a bioaktivních látek, zlepšuje a řídí regenerační proces probíhající v poškozené tkáni.⁹

3.3.2 Vlastnosti materiálů matric

Používaný materiál musí být bezpečný a netoxický, biokompatibilní a nevyvolávající přílišnou imunitní reakci, popřípadě také biodegradabilní. Musí mít vhodné mechanické vlastnosti a příhodné vlastnosti pro výrobu za vzniku skafoldů s velkým povrchem vysoce porézní struktury.

Materiály mající výše uvedenou charakteristiku můžeme rozdělit na přírodní polymery, jako jsou algináty, kolageny, hyaluronáty, chitosany, různé typy želatiny a fibrinu a syntetické polymery jako polyestery, polyamidy, polyakryláty, jejich kopolymery a směsi.

Výběr materiálu závisí na jeho budoucí aplikaci. Uplatnění nacházejí jak přírodní tak syntetické polymerní matrice. Poslední dobou roste význam syntetických polymerů typu poly- α -hydroxykyselin jako polymléčná kyselina, polyglykolová

kyselina a jejich kopolymery. Výhoda spočívá v jejich biodegradabilitě, neboť se hydrolyticky rozloží na oligomery a monomery rozpustné ve vodě a snadno odstranitelné z místa aplikace. Navíc je rychlost jejich degradace vyhovující v porovnání s rychlostí růstu tkání, což umožňuje postupnou přirozenou obnovu tkáně bez složitosti a dlouhodobých komplikací spojených s některými materiálově odlišnými implantáty.⁸

3.3.3 Požadavky na matrice

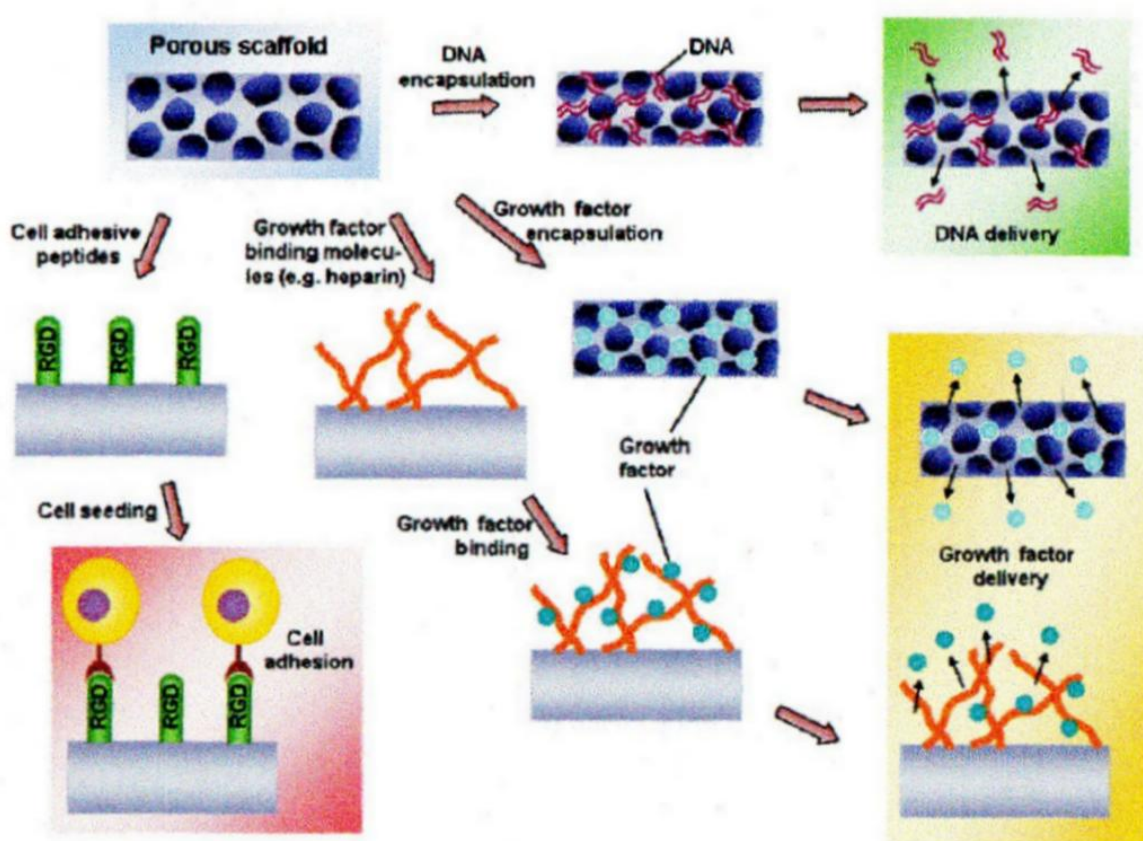
Mechanické vlastnosti nanokonstrukce by měly odpovídat a přizpůsobit se vlastnostem tkáně, ve které budou působit. Měly by být odolné proti kompresivní a tahové síle, aniž by došlo k ovlivnění jejich biomechanické charakteristiky a k poškození buněk nebo látek, které skafoldy nesou. Nanokonstrukce by měla maximálně napodobit endogenní prostředí obklopující buňky, to znamená podobat se struktuře extracelulární matrix.

Nanokonstrukce používané v tkáňovém inženýrství by měly být schopny spojit buňky do tkání, zajistit buněčnou interakci, podílet se na signalizaci týkající se rozvoje a morfogeneze buněk a na nutričním a odpadovém transportu. Dále by skafold měl podporovat buněčnou adhezi a proliferaci, usnadnit kontakt mezi buňkami a pomáhat při migraci buněk.

Konstrukce používané v aplikačních systémech léčiv a bioaktivních molekul by měly mít určitou kapacitu, loading capacity, to znamená množství látky, které je konstrukce schopná pojmout. Látka může být rozmístěna homogenně v celé matici nebo jen odděleně na určitém místě pro prostor limitující uvolňování. Skafold by měl látku ve své struktuře dostatečně vázat a přitom v čase potřeby umožnit její uvolnění, jinými slovy afinita látka a tkáň by měla být vyšší ve srovnání s afinitou látka a konstrukce. Matrice by neměla inkorporovanou látku nijak pozměnit a měla by pro látku po definovanou dobu zaručit stálost struktury, aktivity a stabilitu za fyziologické teploty. Konstrukce by měla látku uvolnit cíleně a řízeně, aby bylo dosaženo terapeutických koncentrací pro léčbu po požadovanou dobu a na požadovaném místě.

Konstrukce používané pro doručení léčiv nebo bioaktivních molekul vážou tyto látky do své struktury díky vlastnostem povrchu a díky povrchovým interakcím dokáží spolupracovat s okolními buňkami, urychlují adhezi a infiltraci buněk a uvolňují vpravené látky. V některých případech nemusí být interakce povrchu dostatečné anebo je třeba ještě více podpořit vlastnosti povrchu konstrukce, je možné provést

různé úpravy povrchu typu fyzikální adsorbce nebo chemické modifikace. Pomocí fyzikální adsorbce nebo chemickou modifikací kovalentní vazbou mohou být na skafold připojeny ligandy např. kolagen, želatina, tzv. buňky kotvící proteiny jako fibronectin a z nich odvozené krátké peptidické sekvence, kyselina hyaluronová, heparin, galaktóza a laktóza. Tyto látky modulují povrch pro navázání zamýšlené aktivní látky a jejich ukázka je znázorněna na **Obr. 2**.^{8,10}

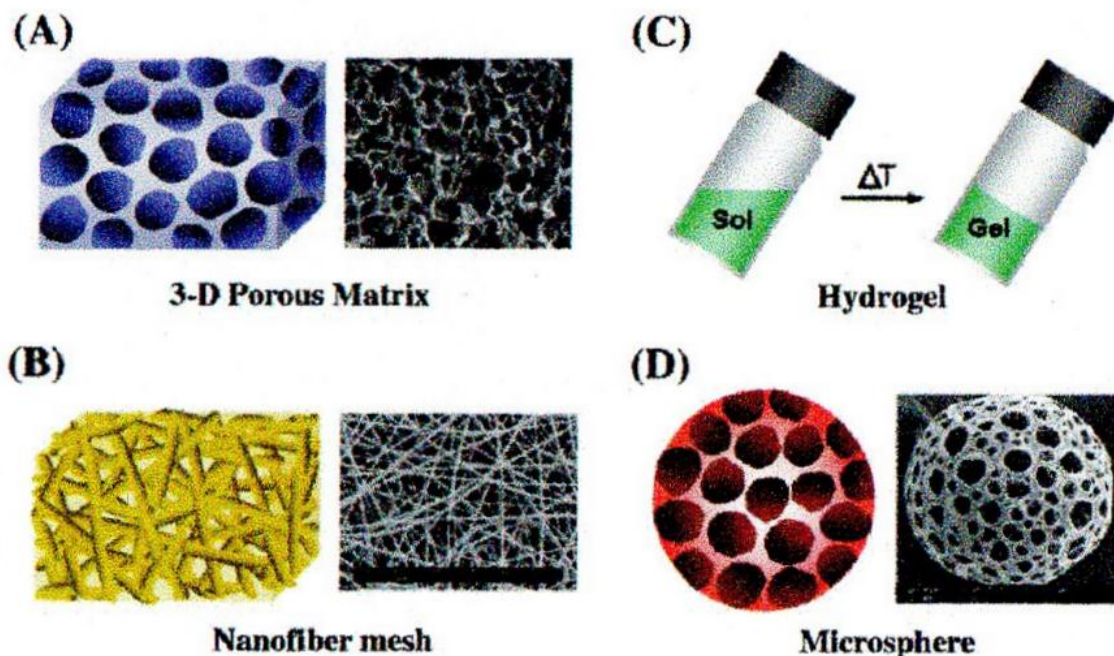


Obr. 2: Ukázka modifikace povrchu matrice pro navázání aktivní látky¹⁰

3.3.4 Výroba matric

Jsou různé způsoby výroby polymerní nanokonstrukce a výběr vhodné metody je dán především charakterem budoucí aplikace. Hlavní metodou výroby nanovláknenných matric je elektrostatické zvlákňování. Mezi ostatní konvenční metody výroby skafoldů patří plstění vláken, tmelení vláken pomocí druhého polymeru, výroba využívající lyofilizaci, odlévání s vyloučením částic, vysokotlakové zpracování, napěnění s vyloučením částic, metoda využívající fázovou separaci a nověji také rychlé vytváření prototypu využívající model zhotovený na počítači.

Použitím těchto metod může mít konstrukce podobu tuhého nebo tekutého porézního skafoldu např. tuhé pěny, podobu nanovláken, mikrosfér nebo hydrogelu, jejichž ukázka je na **Obr. 3.**¹⁰



Obr. 3: Ukázka různých forem polymerní matrice¹⁰

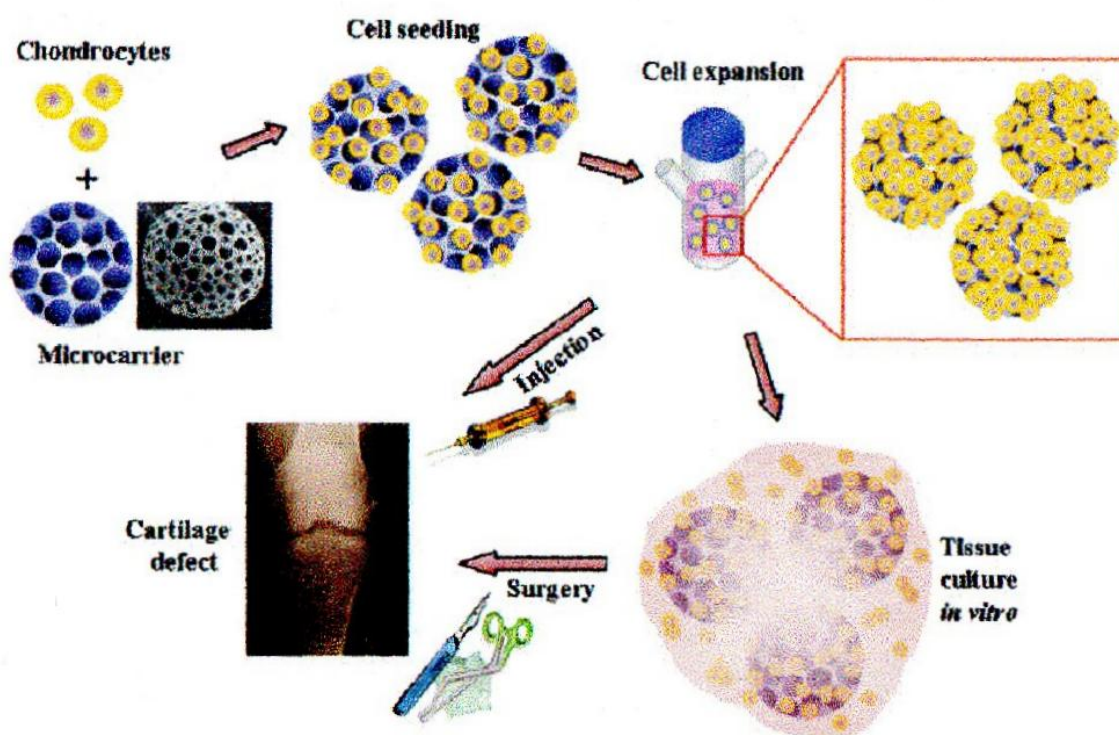
3.3.5 Tradiční matrice a matrice vznikající in situ

Jako tradiční konstrukce jsou označovány skafoldy zhotovené před zavedením do těla neboli matrice předem vyrobené např. nanovláknenná matrice připravená elektrostatickým zvlákněním. Na rozdíl od konstrukcí vznikajících in situ požadují pro implantaci polymerního nosiče chirurgický zákrok.

Konstrukce vznikající in situ jsou představovány materiály vhodnými pro aplikaci injekcí, kdy struktura skafoldů vzniká až v příslušné tkáni po zavedení injekce. Jedná se o hydrogely, které tvoří za běžných pokojových podmínek roztok a mohou být kombinovány s požadovanými buňkami, bioaktivními molekulami a léčivy. Po injekční aplikaci se vlivem změny podmínek přetvoří na gel, který utvoří skafold se zakotvenými buňkami nebo látkami. Jejich nevýhodou je, že se vytvořený gel ředí tělními tekutinami, rozpouští se a ztrácí mechanickou soudržnost, to znamená neschopnost zajistit buňkám strukturální podporu po celou dobu obnovy tkáně. Příkladem polymerů schopných přechodu sol-gel jsou přírodní materiály jako

alginát, fibrin nebo želatina a syntetické materiály jako poly-(N-isopropylakrylamid), triblokové kopolymery PEO-PPO-PEO nebo PLGA-PEO-PLGA.

Kombinací dvou výše uvedených konstrukcí jsou mikrosféry, které jsou předem vyrobené a aplikovatelné injekcí. Tento porézní nosič může být naočkován kmenovými buňkami a následně do poškozené tkáně aplikován injekcí, nebo in vitro kultivován a po rozmnožení buněk implantován jako nově vytvořená tkáň. Možnosti použití jsou znázorněny na **Obr. 4**, kdy byly při poškození chrupavky zkoušeny mikrosféry z PLGA s inkorporovanými chondrocyty.¹⁰



Obr. 4: Matrice tvořená mikrosférami z PLGA obsahující chondrocyty¹⁰

3.3.6 Začlenění léčiva a bioaktivních látek do matrice

Konstrukce používané v tkáňovém inženýrství mohou nést kmenové buňky, nebo bioaktivní molekuly, jako jsou proteiny typu růstových faktorů a dalších bílkovinných látek podporující proliferaci a diferenciaci buněk. Proteiny zaváděné do scaffoldů mají sklon k nestabilitě během inkorporace do matrice a jejich funkce může být narušena v důsledku pro ně nepříznivých podmínek při formování a následné manipulaci s matricí. Dalším nedostatkem je jejich rychlé odbourání ve tkáni po uvolnění z matrice. Proto jsou proteiny zaváděné do polymerních nosičů v některých

případech nahrazovány geny, které příslušné proteiny kódují, nebo živými buňkami, které proteiny secernují. DNA nebo RNA inkorporovaná do matrice naprogramuje buněčné chování.¹⁰

Konstrukce používané v aplikaci léčiv nesou látky o malé molekulové hmotnosti, nejčastěji se jedná o antibiotika, protinádorové látky, léčiva proti bolestem a zánětu, léčiva snižující reakci těla na implantát a podporující jeho přijetí, atd.¹⁰

Zavedení látky do nanokonstrukce může být realizováno několika způsoby a obecně je můžeme rozdělit na metodu ukotvení látky na skafold a na metodu zachycení látky dovnitř skafoldu. Základní schéma při začlenění látky do matrice je znázorněno na **Obr. 5**. Obě metody představují odlišnou strategii s různým způsobem výroby skafoldu se začleněnou látkou lišící se především rozdílnými procesními podmínkami, které mohou mít vliv na stabilitu, následnou funkci začleněné látky a také na její uvolňování z matrice. Základním úkolem při výběru vhodné výrobní strategie je tedy zajistit, aby nedošlo k poškození zavedené látky.⁸

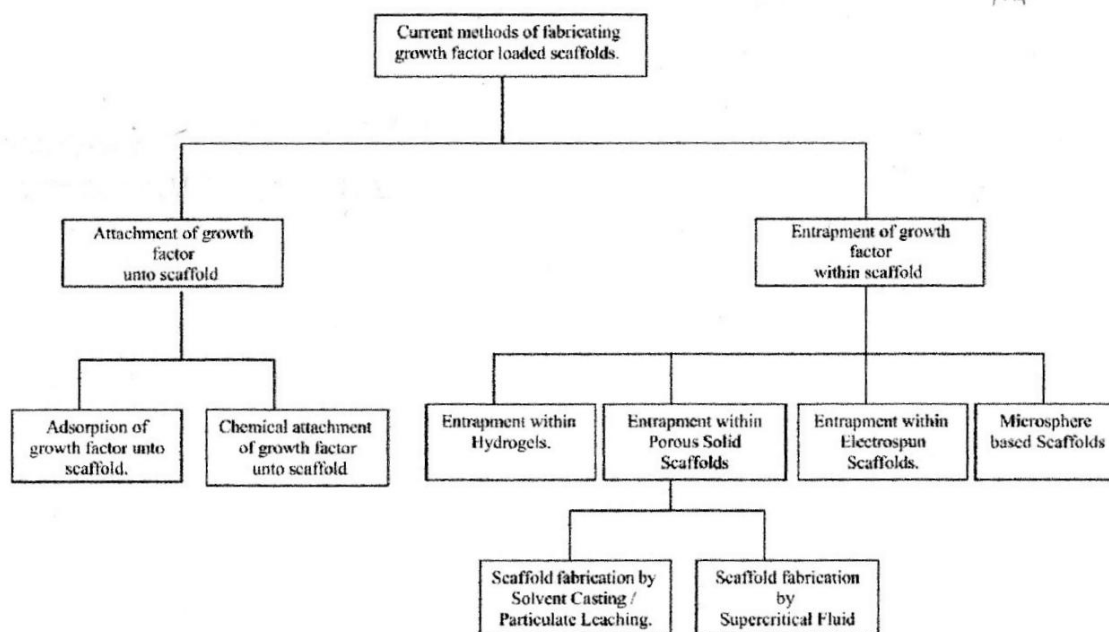


Fig. 1.

Obr. 5: Schéma zavedení látky do matrice⁸

Metoda upevnění látky na skafold zahrnuje imobilizaci látky na povrch již vyrobené konstrukce cestou chemicko-fyzikální, to je adsorbci látky na povrch matrice využitím nejčastěji iontových interakcí, nebo cestou chemickou, to je síťováním a kovalentní vazbou látky s povrchem matrice.⁸

Metoda zachycení látky dovnitř skafoldu představuje inkorporaci látky během výroby matrice. To znamená začlenění látky do polymeru ještě před vlastním formováním skafoldu. Pro každou techniku výroby konstrukce je odlišný způsob mísení polymeru s látkou.⁸

Látky mohou být do nebo na skafold zavedeny přímo, bez obalu (tzv. nahé), nebo se nejdříve začlení do mikrosfér a teprve poté následuje inkorporace systému mikrosféra-látka do matrice. Druhý způsob je využíván při podání DNA nebo růstového faktoru, kdy se tímto krokem zvýší stabilita molekuly a prolouhuje se uvolňování.^{8,10}

3.4 Konkrétní studie inkorporace látky do elektrospinningem připravené matrice a uvolňování látky z matrice

Nejčastěji se ve výzkumu jedná o inkorporaci antibiotika, protinádorové látky, antiflogistika, proteinů nebo DNA, RNA anebo suspenze obsahující živé buňky.

Elektrospinningem s koaxiálním uspořádáním byly získány živé biosuspenze obalené vlákny. Konkrétně byly připraveny živé buňky enkapsulované v polydimethylsiloxanových vláknech. Ve srovnání s kontrolními buňkami přežila elektrostatické zvlákňování poměrná část buněk. Na těchto buňkách, ve srovnání s kontrolou, nezanechal proces elektrospiningu za určité časové období žádné pozorovatelné rozdíly ani v morfologii ani ve fyziologii.¹¹

Použitím již výše zmíněného koaxiálního uspořádání byly dále získány proteiny obalené nanovláknem např. do polykaprolaktonových vláken byl enkapsulován albumin. V tomto konkrétním případě bylo zjištěno, že struktura core-shell snižuje efekt prvotního „burst“ startovacího úseku masivního uvolnění látky z nanovláknenné sítě a uvolňování má tedy rovnoměrnější a trvalejší charakter.¹² Dalším příkladem inkorporace léčiva do matrice a následným uvolňováním látky je příprava mikrosfér obsahujících albumin, které byly elektrospinningem enkapsulovány do vláken kyseliny polymléčné. Ve srovnání s uvolňováním albuminu z „nahých“ mikrosfér bylo obalením mikročástic vlákny dosaženo prolongovaného uvolňování a byl také

eliminován efekt prvotního „burst“ startovacího úseku masivního uvolnění látky z nanovláknenné matrice.¹³

Poměrně značná část výzkumných prací se věnuje uvolňování antibiotik z nanovláknenné membrány. Studováno bylo uvolňování tetracyklinu z matrice založené na kopolymeru ethylenu a vinylacetátu (PEVA), z matrice vytvořené z kyseliny polyléčné (PLA) a jejich směsné membrány. Nanovláknena s inkorporovaným ATB vznikla zvlákněním roztoku polymeru a léčiva v chloroformu s přísadkou methanolu. Byl sledován charakter uvolňování LČ vzhledem k složení matrice, přičemž matrice z PEVA uvolnila tetracyklin rychleji než membrána PLA nebo směsná membrána PEVA/PLA. Ve srovnání s komerčně dostupnými aplikačními systémy obsahujícími tetracyklin typu fólií nebo nití např. Actisite® uvolňovaly elektrospinningem připravené materiály rovnoměrně ATB po dobu 5 dní bez jakéhokoliv počátečního „burst“ úseku a to především díky své mnohonásobně větší ploše povrchu.¹⁴

Mezi další práce zabývající se uvolňováním antibiotik patří studium řízeného uvolňování hydrofilního antibiotika Mefoxinu®, s účinnou látkou cefoxitin sodný, z nanovláken kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Při testování byla sledována nejen liberace léčiva a jeho antimikrobní účinek, ale také jeho inkorporace do matrice a z toho plynoucí vlastnosti membrány, především její struktura a bioaktivita. Matrice s ATB vznikla elektrostatickým zvlákněním roztoku polymeru a ATB v dimethylformamidu a v závislosti na koncentraci LČ v polymerním roztoku vznikly různé vláknenné struktury. Při 5% koncentraci léčiva v roztoku vznikla kompletně vláknitá struktura a při nižší až nulovém obsahu LČ měla vlákna korálovou strukturu, bead-and-string. Během první hodiny inkubace při teplotě 37 °C bylo uvolněna maximální koncentrace ATB. Použitím blokového kopolymeru PEG-b-PLA se snížilo uvolněné množství v první hodině inkubace a prolongovalo se uvolňování LČ až na jeden týden. Použitím těchto membrán s ATB bylo dosaženo více jak 90% inhibice růstu bakterie *Staphylococcus aureus*.¹⁵

Dále bylo studováno možné použití chemoterapeutika Biteral®, s účinnou látkou ornidazol, které bylo zakotveno na polykaprolaktonovou membránu, v prevenci pooperačních břišních srůstů a infekcí. Na membránu bylo LČ začleněno adsorbci, to znamená ponořením zvlákněného polymeru do roztoku léčiva. Bylo zjištěno, že matrice s LČ ve srovnání s matricí bez LČ a ve srovnání s kontrolou neobsahující

žádný nosič redukuje rozsah a soudržnost abdominálních srůstů a podporují proces hojení.¹⁶

Velmi perspektivní jsou výzkumy v oblasti aplikace protinádorových léčiv. Systémy založené na nanovlákních se jeví jako schopné překonat některé nedostatky v současné době používaných micelárních a lipozomových soustav, jakým je například omezené množství léčiva, které lze do systému inkorporovat. Byla testována membrána se začleněnou protinádorovou látkou paklitaxel, konkrétně se jednalo o nanovlákní kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové. Při inkorporaci LČ na nosič bylo zavedeno přes 90 % léčiva, které se následně řízeně uvolňovalo po dobu více než 60 dní. Během 72 hodin pokusu látka usmrtila až 70 % nádorových buněk a z toho vyplývající hodnota IC50 byla srovnatelná s komerčně dostupným LP Taxol®.¹⁷

Další zkoušenou protinádorovou látkou v nanovlákních aplikačních systémech byl karmustin (BCNU). Léčivo a polymer, konkrétně diblokový kopolymer ethylenglykolu a kyseliny mléčné, byly převedeny do roztoku chloroformu a následně elektrostaticky zvlákněny. Ve srovnání s membránou bez léčiva, která nemá žádný inhibiční vliv na růst rakovinotvorných buněk, membrána s léčivem brzdí růst nádorových buněk a vykazuje protinádorovou aktivitu po dobu více než 72 hodin, zatímco volné léčivo bez použití membrány jako nosiče ztratí účinek během 48 hodin. Proto se nanovlákní BCNU/PEG-PLLA jeví jako vhodná pro pooperační chemoterapii nádorů.¹⁸

Perspektivní jsou nanovlákněné systémy obsahující bioaktivní molekuly jako proteiny a DNA. Konkrétně byla studována rychlost uvolňování proteinu z nanovlákněné core-shell struktury, v níž byla obalem vlákna polykaprolaktonu a jádro obsahovalo bovinní albumin. Zjistilo se, že rychlost uvolňování, i množství látky vpravené při zvláknění roste s dodávaným množstvím proteinu do roztoku, ze kterého vznikne jádro, a s přidáním PEG do roztoku, který dá vzniknout obalu. Se změnou těchto podmínek byli vědci schopni měnit dobu, po kterou se bude protein uvolňovat od jednoho týdne do jednoho měsíce.¹⁹

Příkladem inkorporace genové informace do matrice je začlenění DNA do membrány PLGA. DNA nebyla zavedena do membrány přímo, ale nejdříve byla enkapsulována do micel složených z triblokového kopolymeru PLA-PEG-PLA, které jí poskytly ochranu při procesu elektrospínání. Během sedmidenní liberace uvolnila membrána zhruba 20 % enkapsulované DNA, která byla schopná přenosu genové

informace transfekcí. Zatímco „nahá“ DNA zavedená do matrice bez ochranných micel podlehl během elektrospiningu degradaci a nebyla tudíž schopná předat genovou informaci cílovým buňkám.²⁰

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny

Ethanol 96%	Kulich, Hradec Králové
Chloroform 99,9%	Sigma-Aldrich, Praha
Kofein ČL 2009	Kulich, Hradec Králové
Kyselina chlorovodíková 35%	Penta, Chrudim
Kyselina mravenčí 98%	Lach-Ner, Neratovice
Methanol pro HPLC (Methanol Chromasolv [®])	Sigma-Aldrich, Praha
Propylenglykol ČL 2009	Kulich, Hradec Králové
Tromethamol (Trizma)	Sigma-Aldrich, Praha
Voda čištěná	UK-FaF, Hradec Králové
Voda pro HPLC	UK-FaF, Hradec Králové

Uvedené komerčně dostupné látky odpovídaly deklarované jakosti dle norem výrobců, resp. dodavatelů.

4.2 Testovaný materiál

Testované nanovlákněné membrány byly vyrobeny v poloprovozních podmínkách a dodány firmou Elmarco. Jednalo se o membrány vyrobené technologií Nanospider[®]. Při výrobě došlo k elektrostatickému zvláknění roztoku chitosanu obsahujícího kofein. Chitosanová vlákna s inkorporovaným kofeinem byla zakotvena na modré tkaninové podložce a dále překryta elektrospínáním zvlákněnou vrstvou polyuretanu (PUR). Chitosanová vrstva obsahuje 5 % léčiva. Vzorky se liší plošnou hmotností jednotlivých vrstev. Konkrétně popisuje složení chitosanové vrstvy **Tab. 2** a složení membrán **Tab. 3**.

vzorek membrány	gramáž [g/m ²]	
	chitosan	kofein
1	0,57	0,03
2	1,14	0,06
3	1,90	0,10

Tab. 2: Složení chitosanové vrstvy

vzorek membrány	gramáž [g/m ²]	
	chitosan	polyurethan
1	0,6	0,3
2	1,2	0,3
3	2,0	0,3

Tab. 3: Složení membrán

4.3 Přístroje

Analytické váhy Sartorius 2004 MP	Sartorius, Německo
Centrifuga Hettich EBA 20	Hettich, Německo
Digitální fotoaparát Olympus Lens C-765 AF ZOOM 6,3-63 mm	Olympus, Japonsko
Digitální pH-metr GRYF 209L	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod
HPLC sestava	Agilent Technologies, USA
Agilent Technologies 1200 Series	
UV/VIS Detektor VWD G1414B	
Termostat TCC G1316A	
Autosampler ALS 1329A	
Degasser G1379B	
Izokratická pumpa G1310A	
Termostat BT50	Laboratorní přístroje, Praha
Ultrazvuková lázeň	Tesla, Vráble
Vodní Lázeň Grant JB series; typ JB5	Grant Instruments, Velká Británie

4.4 Příprava roztoků, suspenzí

4.4.1 Příprava tromethamolového pufru

Pufr pH 7,1 byl použit jednak pro přípravu kofeinových standardů a jednak jako akceptorové médium při liberaci kofeinu z membrán.

Složení:

Azid sodný 0,02 g

Tromethamol 24,00 g

Voda pro HPLC 1000,00 g

Kyselina chlorovodíková na pH 7,1

Postup: Pevné podíly byly naváženy a rozpuštěny v příslušné hmotnosti vody pro HPLC. Pomocí kyseliny chlorovodíkové bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,1 za použití digitálního pH-metru.

4.4.2 Příprava směsi propylenglykol : čištěná voda

Směs byla použita jako akceptorové médium při liberaci kofeinu z membrán.

Složení:

Propylenglykol 60,0 g

Voda čištěná 40,0 g

Postup: Propylenglykol (PG) a čištěná voda (H₂O) byly smíchány v poměru 3 : 2.

4.4.3 Příprava roztoku kofeinu ve směsi propylenglykol : čištěná voda

Roztok byl použit k sycení membrán kofeinem.

Složení:

Kofein 5,0 g

Propylenglykol 57,0 g

Voda čištěná 38,0 g

Postup: Navážený kofein byl rozetřen ve třecí misce a suspendován ve směsi propylenglykol (PG) : voda čištěná (H₂O) v poměru 3 : 2. Byla získána 5 % suspenze kofeinu ve směsi PG : H₂O, která byla centrifugována rychlostí 3000 otáček / min po dobu 10 min. Čirá horní vrstva byla oddělena a použita jako nasycený roztok kofeinu pro sycení membrán.

4.4.4 Příprava vodného roztoku kofeinu

Roztok byl použit k sycení membrán kofeinem.

Složení:

Kofein 0,01 g

Voda čištěná 100,17 g

Postup: Navážený kofein byl rozetřen ve třecí misce a dispergován v čištěné vodě.

4.4.5 Příprava ethanolové disperze kofeinu

Disperze byla použita k sycení membrán kofeinem a představovala nasycený roztok s odváženým 5% přebytkem kofeinu.

Složení:

Ethanol 96% 48,99 g

Kofein 1,01 g

Postup: Navážený kofein byl rozetřen ve třecí misce a dispergován v ethanolu.

4.4.6 Příprava chloroformové disperze kofeinu

Disperze byla použita k syčení membrán kofeinem a představovala nasycený roztok s odváženým 5% přebytkem kofeinu.

Složení:

Chloroform 43,55 g

Kofein 6,45 g

Postup: Navážený kofein byl rozetřen ve třecí misce a dispergován v chloroformu.

4.4.7 Příprava mobilní fáze pro HPLC stanovení kofeinu

Byla použita směs vody pro HPLC a methanolu pro HPLC v poměru 75 : 25 s obsahem 0,2 % kyseliny mravenčí.

Složení:

Kyselina mravenčí 98% 2,04 g

Methanol pro HPLC 249,49 g

Voda pro HPLC 748,47 g

Postup: Kyselina mravenčí byla rozpuštěna ve směsi methanolu pro HPLC s vodou pro HPLC. Mobilní fáze byla před naplněním do chromatografické soustavy odplyněna pomocí ultrazvuku po dobu 10 minut.

4.4.8 Příprava kofeinových standardů

Kofeinové standardy byly použity pro sestavení kalibrační přímky při HPLC stanovení kofeinu. Koncentrace standardů byla 7,5mg/100ml; 3,750mg/100ml; 1,875mg/100ml; 0,9375mg/100ml; 0,4690mg/100ml; 5,0mg/100ml; 0,1mg/100ml.

Navážka kofeinu: 0,0150 g

Postup: Navážka 0,0150 g kofeinu byla rozpuštěna ve 100 ml tromethanolového pufru. Tím byl získán základní roztok o koncentraci 15,0 mg / 100 ml. Kofeinové standardy byly připraveny postupným ředěním základního roztoku.

4.5 Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách

Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách bylo provedeno na základě zjišťování rozdílu hmotnosti membrán na vzduchu a po vysušení v exsikátoru.

Pro zkoušku bylo použito od každé membrány deset vzorků, každý o velikosti 18 x 20 mm. Membrány byly nařezány na zmíněnou velikost, ihned zváženy (první vážení) na analytických vahách a následně vloženy do exsikátoru.

Po 12 a 22 hodinovém pobytu v exsikátoru byly opět zváženy (druhé a třetí vážení). Konkrétní hodnoty hmotnosti membrán v příslušných časech jsou uvedeny v **Tab. 4 až Tab. 6** v části **5. DOKUMENTACE**. Vypočtené hodnoty průměrného hmotnostního úbytku jednotlivých membrán jsou uvedeny v **Tab. 10** v části **6. VÝSLEDKY A DISKUZE**.

Zvážené vzorky membrán byly použity pro další pokusy, konkrétně **4.6 Syčení membrán léčivem** a **4.7 Liberace léčiva z membrán**.

4.6 Syčení membrán léčivem

Membrány již z výroby obsahovaly inkorporované léčivo, konkrétně kofein. Na základě této skutečnosti se naskytlo několik otázek - zda jsou membrány vůbec schopné pojmout další množství léčiva, tedy kofeinu, a to cestou fyzikální adsorbce, to znamená zcela jiným způsobem, než jakým bylo léčivo vpraveno při výrobě, a pokud ano, tak o jak velké množství kofeinu se jedná.

Podstatou tohoto experimentu je vystavení membrány syticímu kapalnému vehikulu s kofeinem. Předpokládá se, že se určité množství léčiva deponuje do membrány, a toto množství se pak určí gravimetricky, to znamená zvážením membrány před impregnací a dále po vyschnutí a odpaření rozpouštědla, rozdílem těchto dvou vážení získáme hmotnost adsorbovaného léčiva.

Pokud budeme hovořit o syčení, popřípadě impregnaci membrán médiem s léčivem, jedná se o pracovní název, zavedený pro účely rigorózní práce, a myslíme tím ponoření membrány do kapalného média obsahujícího léčivo, během kterého se léčivo povrchově zakotví na membráně.

V první fázi byla jako syticí média vybrána vodná vehikula obsahující jako modelové léčivo kofein, konkrétně se jednalo o vodný roztok kofeinu a nasycený roztok kofeinu ve směsi PG : H₂O. Po vyhodnocení výsledků impregnace membrán

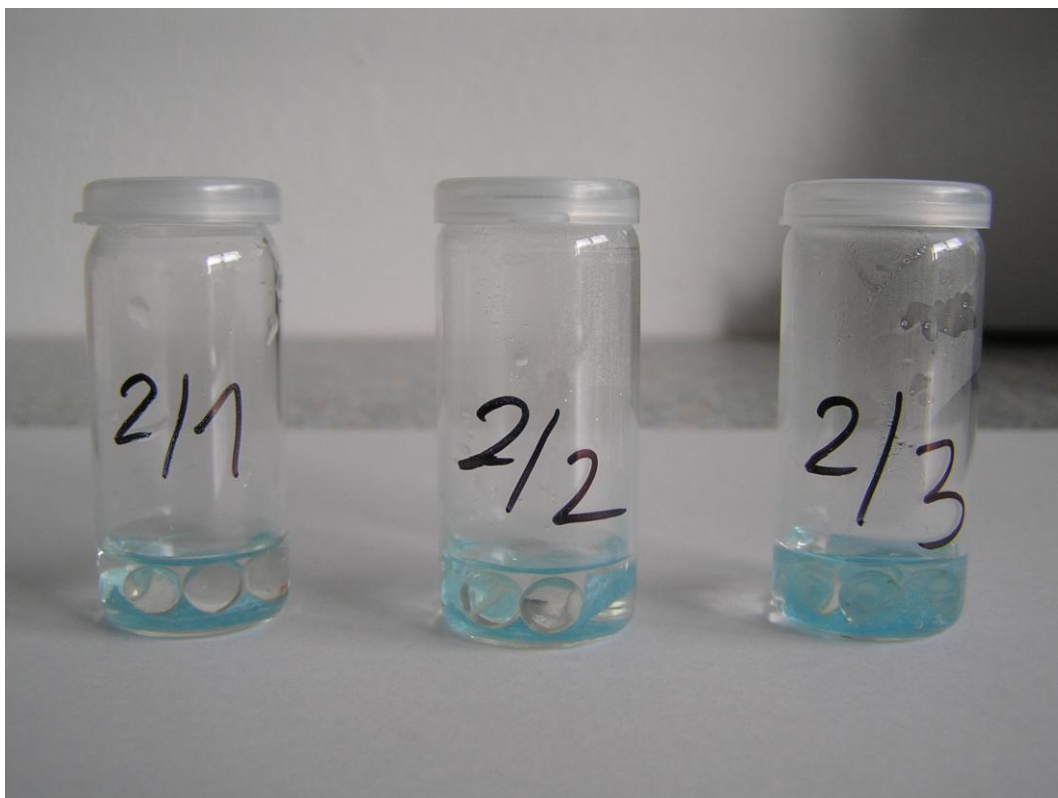
z vodného prostředí byla přidána nevodná prostředí obsahující kofein, jmenovitě chloroformová a ethanolová disperze kofeinu, a jednak byl zařazen experiment **4.6.3 Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán.**

Všechna použitá sytící média jsou popsána v části **4.4 Příprava roztoků, suspenzí.**

4.6.1 Syčení membrán léčivem z vodného prostředí

Pro pokus byly použity jako sytící média 0,01% roztok kofeinu ve vodě a nasycený roztok kofeinu ve směsi PG : H₂O původně připravený jako 5% suspenze. Jako zkoušený materiál byly použity vzorky membrán z úlohy **4.5 Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách**, u kterých již byla ze jmenované zkoušky známa hmotnost. Od každé membrány byly zkoušeny tři vzorky ve vodném roztoku kofeinu a tři vzorky v roztoku kofeinu ve směsi PG : H₂O.

Membrána o rozměrech 18 x 20 mm byla pomocí pinzety vložena do média o objemu 2,0 ml vytemperovaného na teplotu 37 °C. Tyčinkou s plochým zakončením byl z membrány vytlačen vzduch a membrána byla zatížena pěti skleněnými kuličkami, aby bylo zajištěno úplné ponoření. Takto připravený vzorek byl ponechán 12 hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Ukázka tímto způsobem připravené lékovky je znázorněna na **Obr. 6.**



Obr. 6: Lékovky s vloženou membránou v sytícím médiu



Obr. 7: Technické uspořádání při namáčení membrán po předešlém sycení

Po 12 hodinách uchování v termostatu byla z média pomocí pinzety vyjmuta membrána, která byla rychle omyta ve třech po sobě jdoucích kádinkách s čištěnou vodou, následně byla membrána ponechána vykapat a přebytečná voda byla odsáta přiložením rohu membrány k filtračnímu papíru. Poté byla membrána položena na Petriho misku, ponechána volně uschnout na vzduchu, a pak vložena do exsikátoru. Konkrétní technické uspořádání při této fázi pokusu je znázorněno na **Obr. 7**. Po 12 hodinách v exsikátoru byla membrána zvážena. Hodnoty hmotností impregnovaných membrán kofeinem ve srovnání s hmotnostmi původních neimpregnovaných membrán jsou uvedeny v **Tab. 7** až **Tab. 9** v části **5. DOKUMENTACE**. Průměrné hodnoty hmotnosti kofeinu adsorbovaného na membránách jsou uvedeny v **Tab. 11** v části **6. VÝSLEDKY A DISKUZE**.

Po vyjmutí membrány byl u všech zkoušených soustav odebrán pipetou vzorek o objemu 0,7 ml, který byl vložen do vialky a analyzován na HPLC, podrobněji úloha **4.6.3 Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán**.

4.6.2 Syčení membrán léčivem z nevodného prostředí

Pro pokus byly použity jako sytící média ethanolová disperze kofeinu a chloroformová disperze kofeinu a jako zkoušený nanovláknenný materiál vzorky membrán z úlohy **4.5 Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách**, u kterých již byla ze jmenované zkoušky známa hmotnost. Od každé membrány byly zkoušeny dva vzorky v ethanolovém a dva vzorky v chloroformovém prostředí.

Membrána o rozměrech 18 x 20 mm byla pomocí pinzety vložena do média o objemu 2,0 ml vytemperovaného na teplotu 37 °C. Tyčinkou s plochým zakončením byl z membrány vytlačen vzduch a membrána byla zatížena pěti skleněnými kuličkami, aby bylo zajištěno celkové ponoření zkoušeného vzorku v médiu. Takto připravený vzorek byl ponechán po dobu 12 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.

Po 12 hodinách uchování v termostatu byla z média pomocí pinzety vyjmuta membrána, která byla omyta ve třech po sobě jdoucích kádinkách s čištěnou vodou, což je znázorněno na **Obr. 8**. Následně byla membrána ponechána vykapat a přebytečná voda byla odsáta přiložením rohu membrány k filtračnímu papíru. Poté byla membrána položena na Petriho misku, ponechána volně uschnout na vzduchu, a pak vložena do exsikátoru. Po 12 hodinách v exsikátoru byla membrána zvážena. Hodnoty hmotností impregnovaných membrán kofeinem

ve srovnání s hmotnostmi původních neimpregnovaných membrán jsou uvedeny v **Tab. 7 až Tab. 9** v části **5. DOKUMENTACE**.

Průměrné hodnoty hmotnosti kofeinu adsorbovaného na membránách jsou uvedeny v **Tab. 11** v části **6. VÝSLEDKY A DISKUZE**.



Obr. 8: Máčení membrán po předchozím sycení membrán

4.6.3 Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán

Na základě rozdílného vzhledu membrán po sycení chloroformovým roztokem, kdy bylo vizuálně patrné, že se kofein do membrány adsorboval, a jiných membrán po sycení vodnými médii, u kterých na membránách zakotvený kofein patrný nebyl, byl zařazen doplňkový pokus stanovit množství kofeinu v sytícím médiu po předešlé impregnaci membrán. Tento experiment byl uvažován jako zdroj porovnávacích údajů ke gravimetrickému stanovení množství kofeinu adsorbovaného na membrány a měl doplnit a ucelit výsledky získané vážením.

Po ukončení pokusu **4.6.1 Sycení membrán léčivem z vodného prostředí** byly ze sytícího média vyjmuty membrány. Z impregnačního roztoku, kterým byl vodný roztok kofeinu a roztok kofeinu ve směsi PG : H₂O, byl odebrán vzorek o objemu 0,7 ml. U těchto odebraných vzorků bylo provedeno HPLC stanovení

obsahu kofeinu v médiu po sycení membrán, pracovně označeno jako zbytek po sycení membrán.

Množství kofeinu obsažené v médiu po sycení membrán je uvedeno v závislosti na druhu použitého sytícího prostředí v **Tab. 13** a v **Tab. 14** v části **6. VÝSLEDKY A DISKUZE**.

Koncentraci kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán, konkrétně z ethanolové a chloroformové disperze kofeinu, nebylo možné z technických důvodů určit. Odebrané vzorky, dříve než byly analyzovány na HPLC, nedopatřením vyschly.

4.7 Liberace léčiva z membrán

Liberační pokus byl uskutečněn pro zjištění schopnosti membrán uvolnit ze své struktury léčivo. Jedná o eluci membrán vehikulem, ve kterém se stanoví množství kofeinu uvolněné membránou, konkrétně pomocí HPLC.

Jako testované membrány byly vzaty jednak membrány přímo od výrobce bez jakékoliv úpravy, tedy s léčivem inkorporovaným do materiálu membrán před jeho zpracováním elektrospinningem, a jednak membrány impregnované, to znamená s adsorbovaným kofeinem z experimentu **4.6 Sycení membrán léčivem**. Jako rozpouštědlo, ve kterém budou membrány eluovány a které bude sloužit jako akceptorové prostředí pro uvolněný kofein, byl vybrán tromethamolový pufr pH 7,1 a směs PG : H₂O v poměru 3 : 2, jejichž příprava je uvedena v části **4.4 Příprava roztoků, suspenzí**.

Při liberačním pokusu byly zvoleny dva způsoby hodnocení výsledků z důvodu získání více charakteristik, totiž jak velké množství kofeinu konkrétní membrána maximálně uvolní, jak vypadá liberační křivka a kolik kofeinu membrána uvolní na počátku liberace a kolik na konci, dále jak se liší množství kofeinu uvolněné membránou v řádu několika hodin a v řádu několika dnů.

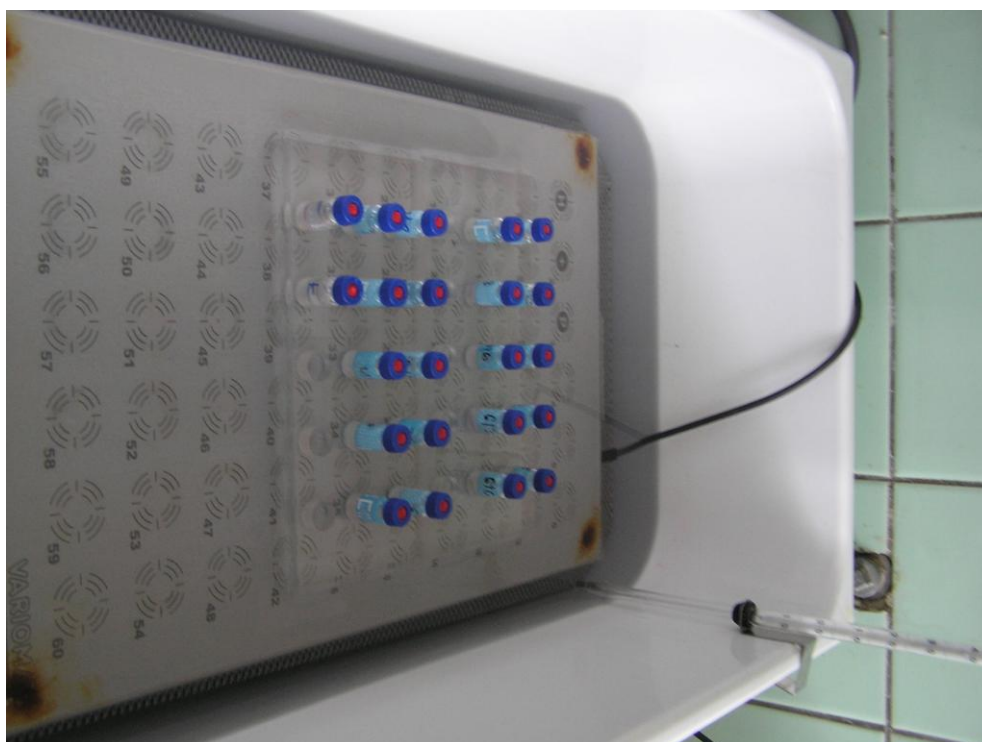
4.7.1 Krátkodobá liberace

Při liberaci byly testovány nejdříve membrány s adsorbovaným kofeinem z úlohy **4.6 Sycení membrán léčivem**, následně pak membrány s inkorporovaným kofeinem od výrobce, dále tedy žádným způsobem upravené. Jako jednotné rozpouštědlo byl vybrán dle povahy liberované látky tromethamolový pufr pH 7,1.

Vzorek membrány o velikosti 18 x 20 mm byl vložen pomocí pinzety do vialky, do které bylo přidáno 1,5 ml tromethamolového pufru. Tímto způsobem připravená

vialka byla vložena do vodní lázně temperované na teplotu 37 °C. Ukázka vodní lázně s vloženými vialkami je znázorněna na **Obr. 9**. V časech 20, 40, 60, 120 a 180 minut od počátku pokusu, to znamená od přidání pufru do vialky a vložení do vodní lázně, byl odebrán reprezentativní vzorek o objemu 100 µl, který byl pro následné HPLC stanovení upraven, konkrétně zředěn 500 µl tromethamolového pufru. Objem vialky byl po každém odběru vždy doplněn na počáteční objem, to znamená, že bylo pokaždé do vialky dodáno 100 µl tromethamolového pufru.

Reprezentativní vzorek byl zajištěn opakovaným nasátím a vypuštěním média z pipety a až na potřetí byl odebrán konečný vzorek pro analýzu.



Obr. 9: Vialky s membránami vložené do vodní lázně při krátkodobém liberačním pokusu

Stejným postupem byly připraveny a stejným podmínkám pokusu byly vystaveny kontrolní vzorky. Kontrolní vzorek neobsahoval testovanou membránu, ale jen mikronizovaný kofein a k němu přidáný 1,5 ml tromethamolového pufru. Množství dispergovaného kofeinu bylo zhruba stejné jako množství kofeinu, které membrány adsorbovaly při syčení z chloroformové disperze. Konkrétně kontrola K1 obsahovala 0,01135 g kofeinu, kontrola K2 0,01174 g kofeinu, kontrola K3 0,01162 g kofeinu a kontrola K4 0,01178 g kofeinu.

Údaje z liberačního pokusu jsou spolu s grafickým vyjádřením obsahem **Protokolů 1 až 22** a jsou uvedeny v části **5. DOKUMENTACE**.

Výsledky liberace, přehled hodnot množství uvolněného kofeinu v závislosti na druhu membrány a sytícího média jsou zaneseny v **Tab. 15** a v **Tab. 16** v části **6. VÝSLEDKY A DISKUZE**.

4.7.2 Dlouhodobá liberace

Při dlouhodobé liberaci byly v jednotném rozpouštědle, kterým byla směs PG : H₂O v poměru 3 : 2, eluovány pouze membrány s adsorbovaným kofeinem.

Vzorek membrány o velikosti 18 x 20 mm byl vložen pomocí pinzety do skleněné lahvičky spolu s 1,5 ml směsi PG : H₂O. Lahvička se vzorkem byla vložena do termostatu se stálou teplotou 37 °C. Testované vzorky byly za dané teploty eluovány 5 dní a každý den s nimi bylo protřepáno. Po uplynutí stanovené doby eluce byl vzorek membrány z lahvičky vyndán a z média byl odebrán reprezentativní vzorek o objemu 0,6 µl, který byl analyzován na obsah z membrány uvolněného kofeinu metodou HPLC.

Reprezentativní vzorek byl zajištěn opakovaným nasátím a vypuštěním média z pipety a až na potřetí byl odebrán konečný vzorek pro analýzu.

4.7.3 HPLC stanovení kofeinu

Metoda HPLC byla použita v pokusu **4.7.1 Krátkodobá liberace** a **4.7.2 Dlouhodobá liberace** pro stanovení množství kofeinu uvolněného z nanomembrán.

4.7.3.1 Mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu pro HPLC a vody pro HPLC v poměru 25 : 75 s obsahem 0,2 % kyseliny mravenčí, jejichž příprava je uvedena v části **4.4 Příprava roztoků, suspenzí**.

4.7.3.2 Podmínky HPLC analýzy

Části a označení analytického setu jsou uvedeny v části **4.3 Přístroje**.



Obr. 10: Analytický set Agilent Technologies

Kolona: Agilent Technologies ZORBAX Eclipse Plus C18
kolona o délce 150 mm, průměru 4,6 mm,
s oktadecylsilanovým sorbentem o velikosti částic 5 μm

Předkolona: Agilent Technologies ZORBAX Eclipse Plus C18
předkolona o délce 12,5 mm, průměru 4,6 mm, zrnitostí 5 μm

Detekce: spektrofotometrická při 272 nm

Teplota kolony: 30 °C

Průtok mobilní fáze: 1 ml/min

Max. tlak: 400 atm

Min. tlak: 0 atm

Délka analýzy: 7,5 min

Objem nanášeného vzorku: 20 μl

Stálost naměřené hodnoty byla ověřována vzorkem standardního roztoku, který byl dávkován před, v polovině a po stanovení každé série vzorků. Vzorek vody byl zařazený za účelem promytí systému před a po stanovení každé série vzorků a také po každém ze dvou nejkoncentrovanějších standardních roztocích, které vnášely do systému vysokou koncentraci analytu.

4.7.3.3 Kalibrační přímka kofeinu

Pro sestavení kalibrační křivky byly použity standardní roztoky o koncentracích 7,5mg/100ml; 3,750mg/100ml; 1,875mg/100ml; 0,9375mg/100ml; 0,4690mg/100ml; 5,0mg/100ml; 0,1mg/100ml, které byly připraveny dle návodu

4.4.8 Příprava kofeinových standardů.

Každý kalibrační roztok byl proměřen a na základě získaných dat byla sestrojena kalibrační křivka (**Graf 1**). Parametry přímky byly stanoveny metodou lineární regrese. Kalibrační přímka a její parametry jsou uvedeny:

Regresní funkce: $y = kx + q$

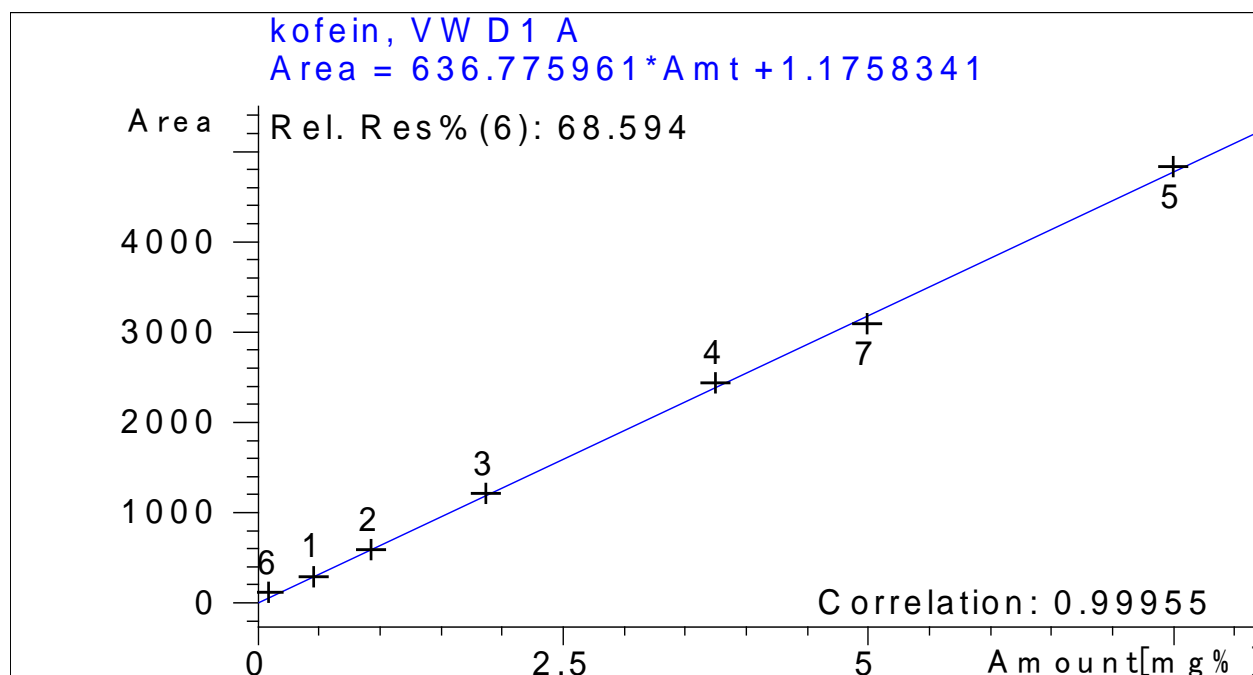
Výsledná rovnice: $y = 636,78x + 1,18$

kde y...plocha píku kofeinu

x...koncentrace kofeinu (mg/100ml)

Koeficient korelace r 0,99955

Závislost plochy píku na koncentraci byla prokázána se spolehlivostí 99,95 %.



Graf 1: Kalibrační přímka kofeinu

4.7.3.4 Zpracování dat z HPLC stanovení

HPLC stanovením kofeinu v odebraných vzorcích z liberačních pokusů byla získána primární data, která byla vyjádřena jako nekorigovaná koncentrace c_{nk} . Pomocí počítačového programu byl nekorigovaný údaj přepočten na údaj korigované koncentrace c_k , zohledňující průběžný odběr vzorků, doplňování čisté akceptorové fáze o objemu ΔV_{dop} , ředění odebraných vzorků a objem akceptorové fáze na počátku pokusu V_o . Získané údaje byly vyjádřeny množstvím kofeinu, který se uvolnil z membrány do akceptorového média Q_t [μg] a jako množství kofeinu uvolněného membránou o ploše 1 cm^2 do akceptorové fáze Q_t [$\mu g/cm^2$].

Byla vynesena kumulativní časová závislost množství uvolněného kofeinu a s využitím metody lineární regrese vypočteny příslušné hodnoty směrnice rovnovážného průběhu liberace, které číselně odpovídají hodnotám fluxů J .

5. DOKUMENTACE

5.1 Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách

číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hmotnost před sejmutím ochranné vrstvy [g]	0,0125	0,0120	0,0118	0,0131	0,0117	0,0118	0,0118	0,0116	0,0124	0,0116
hmotnost po sejmutí ochranné vrstvy [g]	0,0122	0,0117	0,0112	0,0126	0,0111	0,0112	0,0114	0,0111	0,0122	0,0113
hmotnost po 12 hod v exsikátoru [g]	0,0119	0,0115	0,0112	0,0124	0,0108	0,0109	0,0113	0,0110	0,0120	0,0108
rozdíl hmotnosti počáteční a po 12 hod v exsikátoru [g]	0,0003	0,0002	0,0000	0,0002	0,0003	0,0003	0,0001	0,0001	0,0002	0,0005
úbytek hmotnosti po 12 hod [%]	2,52	1,74	0,00	1,61	2,78	2,75	0,88	0,91	1,67	4,63
hmotnost po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0122	0,0115	0,0109	0,0125	0,0110	0,0111	0,0114	0,0110	0,0120	0,0111
rozdíl hmotnosti počáteční a po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0000	0,0002	0,0003	0,0001	0,0001	0,0001	0,0000	0,0001	0,0002	0,0002
úbytek hmotnosti po 22 hod [%]	0,00	1,74	2,75	0,80	0,91	0,90	0,00	0,91	1,67	1,80

Tab. 4: Hodnoty hmotnosti vzorků při vážení membrány 1

číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hmotnost před sejmutím ochranné vrstvy [g]	0,0125	0,0116	0,0132	0,0136	0,0124	0,0127	0,0126	0,0136	0,0105	0,0129
hmotnost po sejmutí ochranné vrstvy [g]	0,0118	0,0112	0,0126	0,0128	0,0119	0,0122	0,0121	0,0130	0,0100	0,0123
hmotnost po 12 hod v exsikátoru [g]	0,0118	0,0110	0,0125	0,0128	0,0119	0,0122	0,0121	0,0130	0,0100	0,0122
rozdíl hmotnosti počáteční a po 12 hod v exsikátoru [g]	0,0000	0,0002	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
úbytek hmotnosti po 12 hod [%]	0,00	1,82	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82
hmotnost po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0118	0,0110	0,0125	0,0128	0,0118	0,0122	0,0121	0,0130	0,0100	0,0122
rozdíl hmotnosti počáteční a po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0000	0,0002	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
úbytek hmotnosti po 22 hod [%]	0,00	1,82	0,80	0,00	0,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 5: Hodnoty hmotnosti vzorků při vážení membrány 2

číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hmotnost před sejmutím ochranné vrstvy [g]	0,0130	0,0136	0,0129	0,0119	0,0118	0,0125	0,0123	0,0135	0,0128	0,0134
hmotnost po sejmutí ochranné vrstvy [g]	0,0120	0,0128	0,0121	0,0108	0,0111	0,0118	0,0115	0,0129	0,0121	0,0128
hmotnost po 12 hod v exsikátoru [g]	0,0120	0,0128	0,0119	0,0107	0,0108	0,0117	0,0113	0,0126	0,0120	0,0126
rozdíl hmotnosti počáteční a po 12 hod v exsikátoru [g]	0,0000	0,0000	0,0002	0,0001	0,0003	0,0001	0,0002	0,0003	0,0001	0,0002
úbytek hmotnosti po 12hod [%]	0,00	0,00	1,68	0,93	2,78	0,85	1,77	2,38	0,83	1,59
hmotnost po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0121	0,0124	0,0120	0,0109	0,0108	0,0117	0,0113	0,0125	0,0119	0,0125
rozdíl hmotnosti počáteční a po 22 hod v exsikátoru [g]	-0,0001	0,0004	0,0001	-0,0001	0,0003	0,0001	0,0002	0,0004	0,0002	0,0003
úbytek hmotnosti po 22 hod [%]	-0,83	3,23	0,83	-0,92	2,78	0,85	1,77	3,20	1,68	2,40

Tab. 6: Hodnoty hmotnosti vzorků při vážení membrány 3

Vysvětlivka:

hmotnost počáteční = hmotnost po sejmutí ochranné vrstvy

5.2 Sycení membrán léčivem

sytící médium	vodný roztok kofeinu			roztok kofeinu v PG : H ₂ O			ethanolická disperze kofeinu		chloroformová disperze kofeinu	
číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hmotnost po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0122	0,0115	0,0109	0,0125	0,0110	0,0111	0,0114	0,0110	0,0120	0,0111
hmotnost po impregnaci [g]	0,0121	0,0116	0,0113	0,0126	0,0111	0,0112	0,0115	0,0112	0,0253	0,0237
rozdíl hmotnosti před a po impregnaci [g]	-0,0001	0,0001	0,0004	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002	0,0133	0,0126

Tab. 7: Hodnoty hmotnosti membrány 1 po impregnaci

sytící médium	vodný roztok kofeinu			roztok kofeinu v PG : H ₂ O			ethanolická disperze kofeinu		chloroformová disperze kofeinu	
číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hmotnost po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0118	0,0110	0,0125	0,0128	0,0118	0,0122	0,0121	0,0130	0,0100	0,0122
hmotnost po impregnaci [g]	0,0118	0,0110	0,0125	0,0129	0,0120	0,0122	0,0122	0,0131	0,0242	0,0270
rozdíl hmotnosti před a po impregnaci [g]	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0002	0,0000	0,0001	0,0001	0,0142	0,0148

Tab. 8: Hodnoty hmotnosti membrány 2 po impregnaci

syťící médium	vodný roztok kofeinu			roztok kofeinu v PG : H ₂ O			ethanolická disperze kofeinu		chloroformová disperze kofeinu	
číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
hmotnost po 22 hod v exsikátoru [g]	0,0121	0,0124	0,0120	0,0109	0,0108	0,0117	0,0113	0,0125	0,0119	0,0125
hmotnost po impregnaci [g]	0,0121	0,0128	0,0120	0,0109	0,0109	0,0117	0,0113	0,0126	0,0249	0,0273
rozdíl hmotnosti před a po impregnaci [g]	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0001	0,0130	0,0148

Tab. 9: Hodnoty hmotnosti membrány 3 po impregnaci

Vysvětlivka:

rozdíl hmotnosti před a po impregnaci = hmotnost adsorbovaného kofeinu

5.3 Liberace léčiva z membrán

Každý protokol je označen číslem membrány, číslem vzorku membrány a příslušným druhem média, ve kterém byla daná membrána sycena.

Značení médií:

H ₂ O	vodný roztok kofeinu
PG : H ₂ O	roztok kofeinu ve směsi propylenglykol a voda
CH ₃ CH ₂ OH	ethanolická disperze kofeinu
CHCl ₃	chloroformová disperze kofeinu

Protokol 1

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

$V_o = 1,5$

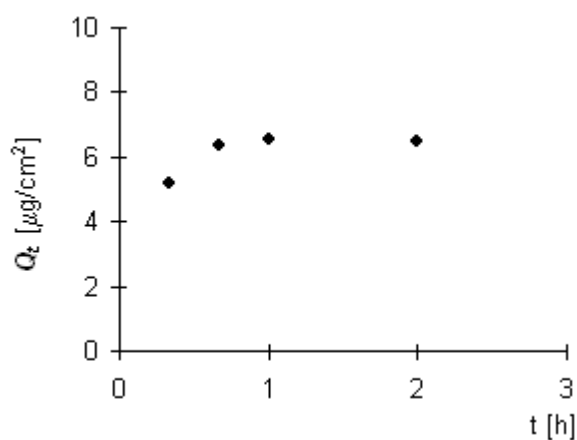
membrána 1

médium H_2O

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,346	0,1	0,346	5,2	5,2
0,666	0,400	0,1	0,423	6,3	6,3
1	0,410	0,1	0,438	6,6	6,6
2	0,402	0,1	0,431	6,5	6,5
3	0,509	0,1	0,538	8,1	8,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,333	5,2	5,8
0,666	6,3	6,0
1	6,6	6,1
2	6,5	6,7

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 0,572832$
Abs. člen	$q = 5,572164$
Korelační koef.	$r = 0,641718$



Protokol 2

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

$V_o = 1,5$

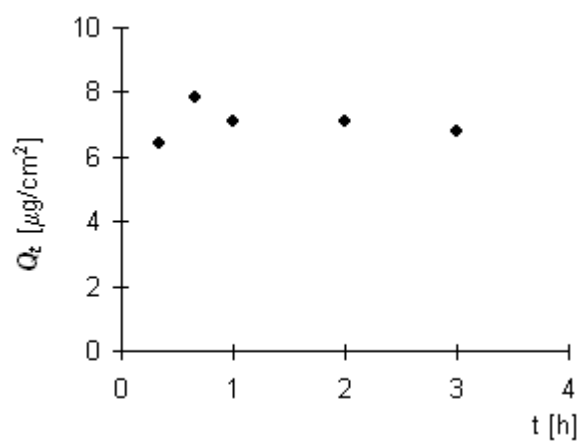
membrána 1

médium PG:H₂O

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,429	0,1	0,429	6,4	6,4
0,666	0,496	0,1	0,524	7,9	7,9
1	0,437	0,1	0,472	7,1	7,1
2	0,443	0,1	0,474	7,1	7,1
3	0,420	0,1	0,452	6,8	6,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	6,4	6,4
0,666	7,9	7,9
1	7,1	7,1
2	7,1	7,1
3	6,8	6,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = -0,07192
Abs. člen	q = 7,154335
Korelační koef.	r = -0,14841



Protokol 3

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

$V_o = 1,5$

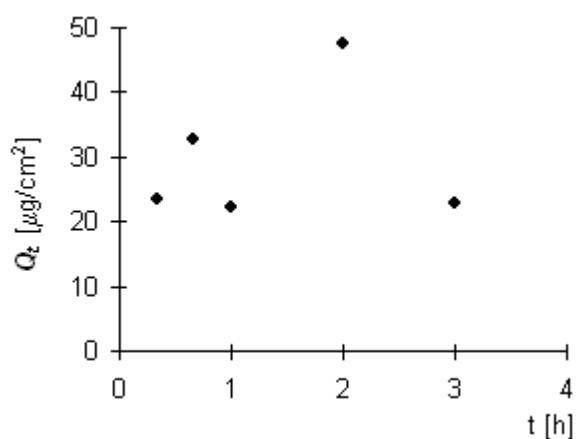
membrána 1

médium $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	1,555	0,1	1,555	23,3	23,3
0,666	2,069	0,1	2,172	32,6	32,6
1	1,339	0,1	1,483	22,3	22,3
2	3,073	0,1	3,172	47,6	47,6
3	1,313	0,1	1,525	22,9	22,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,333	23,3	28,1
0,666	32,6	28,6
1	22,3	29,1
2	47,6	30,7
3	22,9	32,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,567469$
Abs. člen	$q = 27,52813$
Korelační koef.	$r = 0,157572$



Protokol 4

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

$V_o = 1,5$

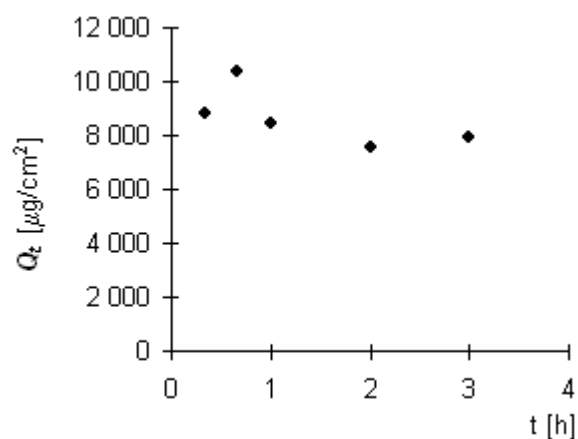
membrána 1

médium CHCl_3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	585,370	0,1	585,370	8 780,6	8 780,6
0,666	649,865	0,1	688,890	10 333,3	10 333,3
1	515,390	0,1	561,316	8 419,7	8 419,7
2	465,877	0,1	503,298	7 549,5	7 549,5
3	494,358	0,1	527,912	7 918,7	7 918,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,333	8780,6	9298,5
0,666	10333,3	9080,6
1	8419,7	8862,0
2	7549,5	8207,6
3	7918,7	7553,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = -654,424
Abs. člen	q = 9516,42
Korelační koef.	r = -0,66283



Protokol 5

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

$V_o = 1,5$

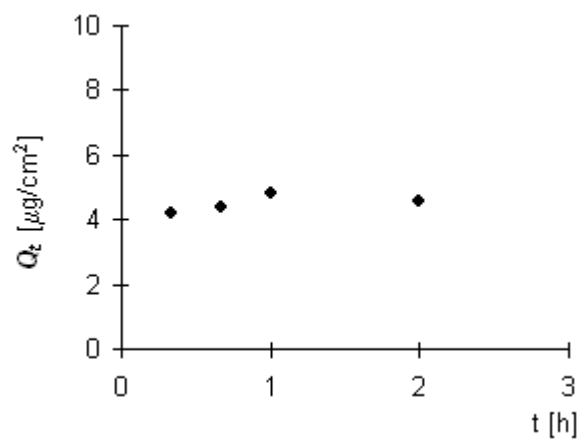
membrána 2

médium H_2O

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,278	0,1	0,278	4,2	4,2
0,666	0,276	0,1	0,294	4,4	4,4
1	0,301	0,1	0,320	4,8	4,8
2	0,283	0,1	0,304	4,6	4,6
3	0,309	0,1	0,330	4,9	4,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	4,2	4,4
0,666	4,4	4,4
1	4,8	4,5
2	4,6	4,7
3	4,9	4,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 0,197387$
Abs. člen	$q = 4,291275$
Korelační koef.	$r = 0,54199$



Protokol 6

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

$V_o = 1,5$

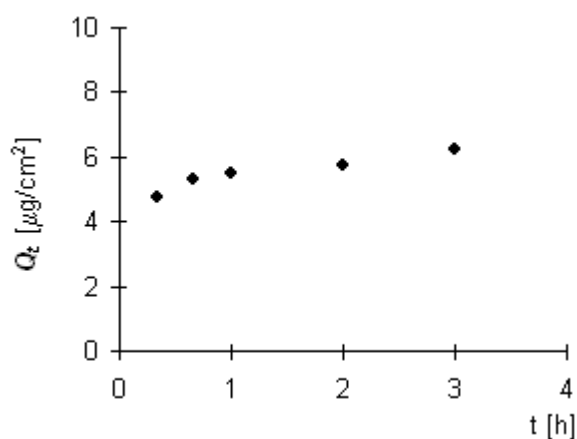
membrána 2

médium PG:H₂O

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,317	0,1	0,317	4,8	4,8
0,666	0,332	0,1	0,353	5,3	5,3
1	0,342	0,1	0,365	5,5	5,5
2	0,360	0,1	0,385	5,8	5,8
3	0,390	0,1	0,416	6,2	6,2

t	$Q_t(\text{exp})$	$Q_t(\text{teor})$
0,333	4,8	4,8
0,666	5,3	5,3
1	5,5	5,5
2	5,8	5,8
3	6,2	6,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,481101
Abs. člen	q = 4,834154
Korelační koef.	r = 0,955557



Protokol 7

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

$V_o = 1,5$

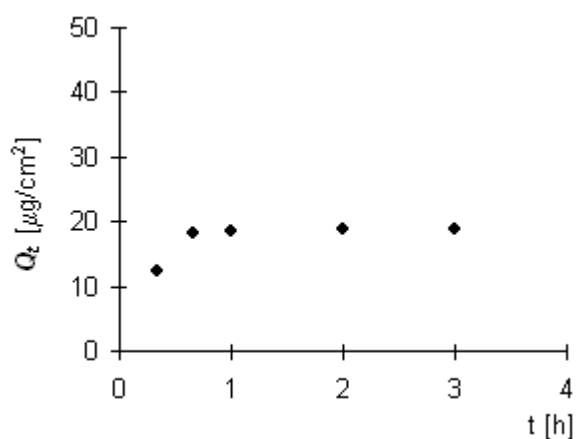
membrána 2

médium $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,822	0,1	0,822	12,3	12,3
0,666	1,165	0,1	1,220	18,3	18,3
1	1,153	0,1	1,234	18,5	18,5
2	1,176	0,1	1,258	18,9	18,9
3	1,168	0,1	1,252	18,8	18,8

t	$Q_t(\text{exp})$	$Q_t(\text{teor})$
0,333	12,3	15,7
0,666	18,3	16,2
1	18,5	16,7
2	18,9	18,3
3	18,8	19,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 1,553514$
Abs. člen	$q = 15,18226$
Korelační koef.	$r = 0,601386$



Protokol 8

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

$V_o = 1,5$

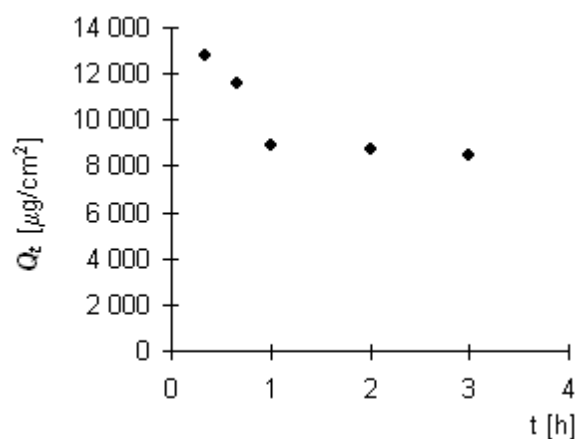
membrána 2

médium CHCl_3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	853,204	0,1	853,204	12 798,1	12 798,1
0,666	713,260	0,1	770,140	11 552,1	11 552,1
1	539,545	0,1	590,887	8 863,3	8 863,3
2	541,060	0,1	580,452	8 706,8	8 706,8
3	525,227	0,1	563,924	8 458,9	8 458,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,333	12798,1	11625,8
0,666	11552,1	11142,0
1	8863,3	10656,7
2	8706,8	9203,8
3	8458,9	7750,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = -1452,89
Abs. člen	q = 12109,58
Korelační koef.	r = -0,80364



Protokol 9

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

$V_o = 1,5$

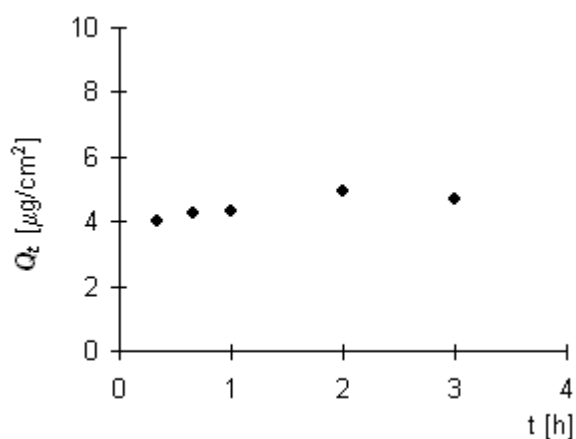
membrána 3

médium H_2O

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,266	0,1	0,266	4,0	4,0
0,666	0,267	0,1	0,284	4,3	4,3
1	0,269	0,1	0,288	4,3	4,3
2	0,309	0,1	0,329	4,9	4,9
3	0,291	0,1	0,312	4,7	4,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,333	4,0	4,1
0,666	4,3	4,2
1	4,3	4,3
2	4,9	4,6
3	4,7	4,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,28261$
Abs. člen	$q = 4,043426$
Korelační koef.	$r = 0,833303$



Protokol 10

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

$V_o = 1,5$

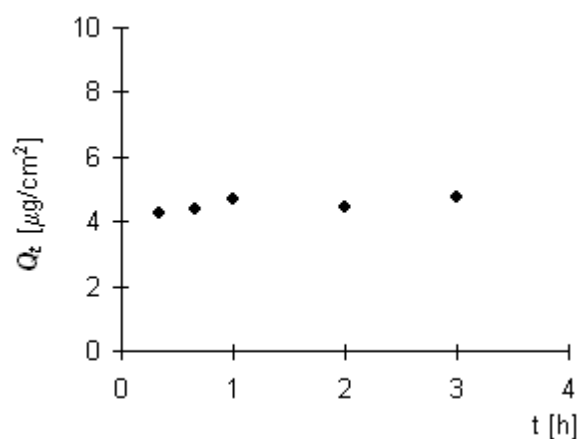
membrána 3

médium PG:H₂O

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,282	0,1	0,282	4,2	4,2
0,666	0,275	0,1	0,294	4,4	4,4
1	0,292	0,1	0,311	4,7	4,7
2	0,275	0,1	0,296	4,4	4,4
3	0,297	0,1	0,317	4,8	4,8

t	$Q_t(\text{exp})$	$Q_t(\text{teor})$
0,333	4,2	4,4
0,666	4,4	4,4
1	4,7	4,4
2	4,4	4,6
3	4,8	4,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,138517
Abs. člen	q = 4,30741
Korelační koef.	r = 0,712737



Protokol 11

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

$V_o = 1,5$

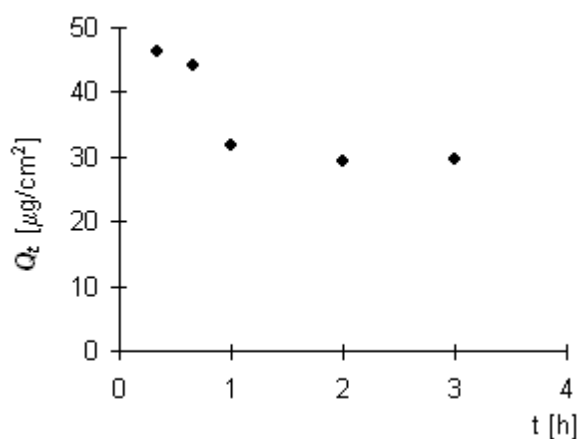
membrána 3

médium $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	3,091	0,1	3,091	46,4	46,4
0,666	2,728	0,1	2,934	44,0	44,0
1	1,916	0,1	2,112	31,7	31,7
2	1,804	0,1	1,945	29,2	29,2
3	1,855	0,1	1,985	29,8	29,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
0,333	46,4	42,8
0,666	44,0	40,7
1	31,7	38,7
2	29,2	32,5
3	29,8	26,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = -6,15328$
Abs. člen	$q = 44,81063$
Korelační koef.	$r = -0,80854$



Protokol 12

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

$V_o = 1,5$

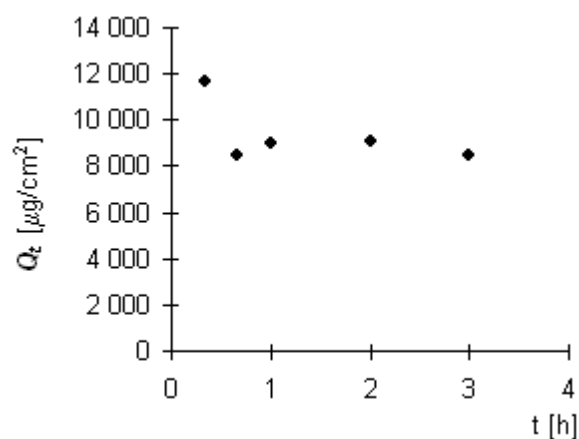
membrána 3

médium CHCl_3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	778,727	0,1	778,727	11 680,9	11 680,9
0,666	513,778	0,1	565,693	8 485,4	8 485,4
1	560,870	0,1	598,583	8 978,7	8 978,7
2	562,343	0,1	602,249	9 033,7	9 033,7
3	525,500	0,1	565,650	8 484,7	8 484,7

t	$Q_t(\text{exp})$	$Q_t(\text{teor})$
0,333	11680,9	10067,8
0,666	8485,4	9838,4
1	8978,7	9608,2
2	9033,7	8919,1
3	8484,7	8230,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = -689,082
Abs. člen	q = 10297,28
Korelační koef.	r = -0,56146



Protokol 13

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

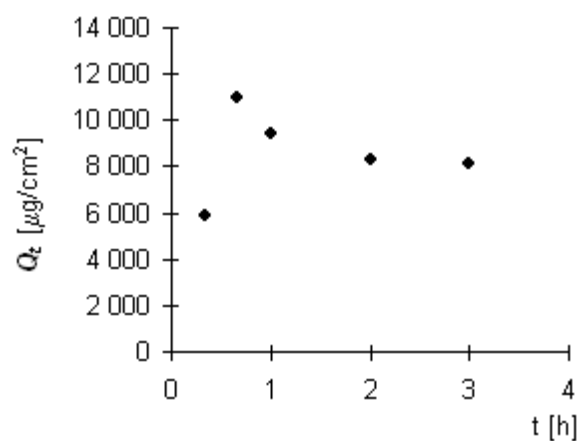
$V_o = 1,5$

kontrola 1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	394,255	0,1	394,255	5 913,8	5 913,8
0,666	704,196	0,1	730,480	10 957,2	10 957,2
1	579,585	0,1	628,284	9 424,3	9 424,3
2	509,682	0,1	551,567	8 273,5	8 273,5
3	506,514	0,1	543,285	8 149,3	8 149,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	5913,8	8568,5
0,666	10957,2	8560,7
1	9424,3	8552,9
2	8273,5	8529,6
3	8149,3	8506,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = -23,3014$
Abs. člen	$q = 8576,231$
Korelační koef.	$r = -0,01371$



Protokol 14

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

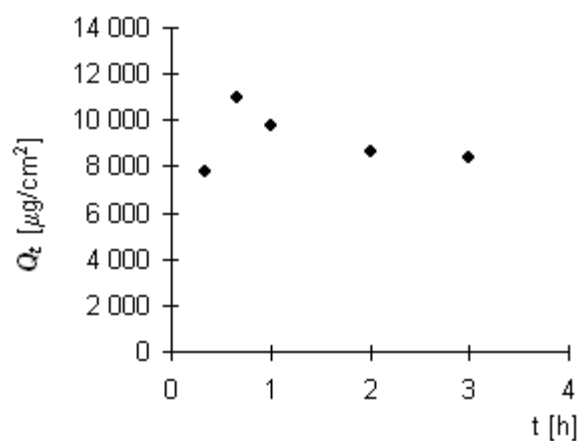
$V_o = 1,5$

kontrola 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	517,899	0,1	517,899	7 768,5	7 768,5
0,666	697,781	0,1	732,307	10 984,6	10 984,6
1	599,937	0,1	648,758	9 731,4	9 731,4
2	534,624	0,1	577,875	8 668,1	8 668,1
3	521,100	0,1	559,625	8 394,4	8 394,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	7768,5	9468,9
0,666	10984,6	9356,7
1	9731,4	9244,1
2	8668,1	8907,1
3	8394,4	8570,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = -337,013$
Abs. člen	$q = 9581,142$
Korelační koef.	$r = -0,29039$



Protokol 15

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

$V_o = 1,5$

membrána 1

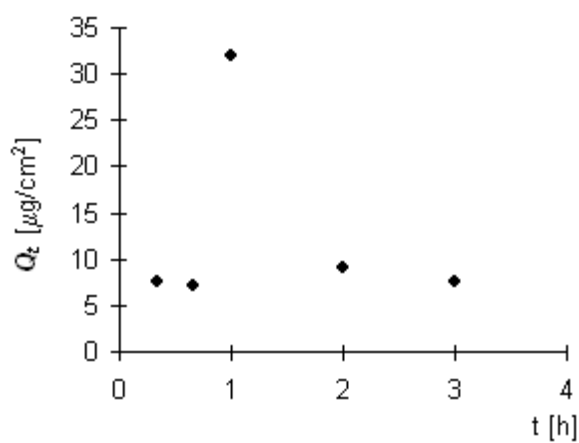
vzorek 1

nesyceno

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,499	0,1	0,499	7,5	7,5
0,666	0,443	0,1	0,477	7,1	7,1
1	2,096	0,1	2,128	31,9	31,9
2	0,461	0,1	0,603	9,0	9,0
3	0,463	0,1	0,503	7,5	7,5

t	$Q_t(exp)$	$Q_t(teor)$
0,333	7,5	14,5
0,666	7,1	13,9
1	31,9	13,3
2	9,0	11,6
3	7,5	9,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = -1,78658$
Abs. člen	$q = 15,12923$
Korelační koef.	$r = -0,18027$



Protokol 16

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

$V_o = 1,5$

membrána 1

vzorek 2

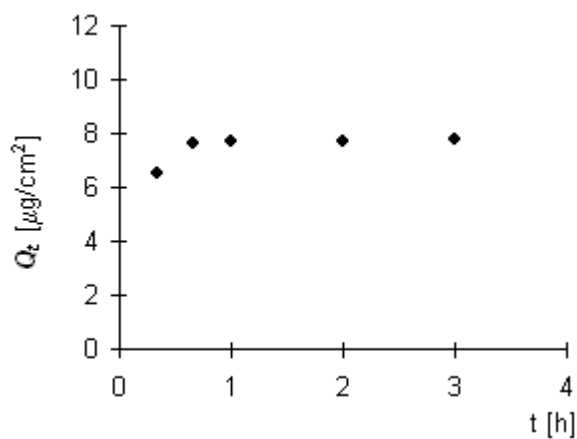
nesyceno

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,436	0,1	0,436	6,5	6,5
0,666	0,477	0,1	0,506	7,6	7,6
1	0,480	0,1	0,514	7,7	7,7
2	0,478	0,1	0,513	7,7	7,7
3	0,482	0,1	0,517	7,7	7,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	6,5	6,5
0,666	7,6	7,6
1	7,7	7,7
2	7,7	7,7
3	7,7	7,7

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,290825$
Abs. člen	$q = 7,048162$
Korelační koef.	$r = 0,616215$



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

$V_o = 1,5$

membrána 2

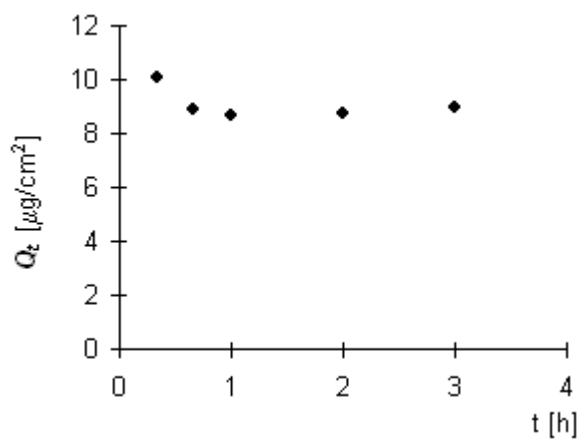
vzorek 1

nesyceno

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,671	0,1	0,671	10,1	10,1
0,666	0,547	0,1	0,591	8,9	8,9
1	0,537	0,1	0,576	8,6	8,6
2	0,547	0,1	0,585	8,8	8,8
3	0,558	0,1	0,597	9,0	9,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	10,1	9,3
0,666	8,9	9,2
1	8,6	9,2
2	8,8	8,9
3	9,0	8,7

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = -0,23111$
Abs. člen	$q = 9,387412$
Korelační koef.	$r = -0,44029$



Protokol 18

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

$V_o = 1,5$

membrána 2

vzorek 2

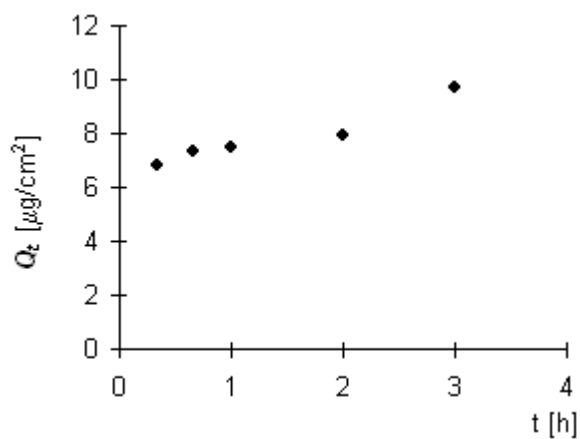
nesyceno

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,456	0,1	0,456	6,8	6,8
0,666	0,459	0,1	0,489	7,3	7,3
1	0,468	0,1	0,500	7,5	7,5
2	0,494	0,1	0,527	7,9	7,9
3	0,614	0,1	0,649	9,7	9,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	6,8	6,8
0,666	7,3	7,2
1	7,5	7,5
2	7,9	8,4
3	9,7	9,4

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,973367$
Abs. člen	$q = 6,501913$
Korelační koef.	$r = 0,955699$



Protokol 19

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

$V_o = 1,5$

membrána 3

vzorek 1

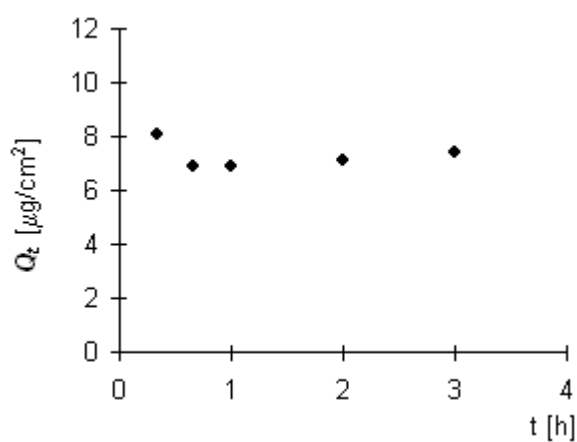
nesyceno

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,539	0,1	0,539	8,1	8,1
0,666	0,425	0,1	0,461	6,9	6,9
1	0,427	0,1	0,458	6,9	6,9
2	0,442	0,1	0,472	7,1	7,1
3	0,464	0,1	0,496	7,4	7,4

t	$Q_t(\text{exp})$	$Q_t(\text{teor})$
0,333	8,1	7,3
0,666	6,9	7,3
1	6,9	7,3
2	7,1	7,2
3	7,4	7,2

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = -0,06165$
Abs. člen	$q = 7,362385$
Korelační koef.	$r = -0,13422$



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

$V_o = 1,5$

membrána 3

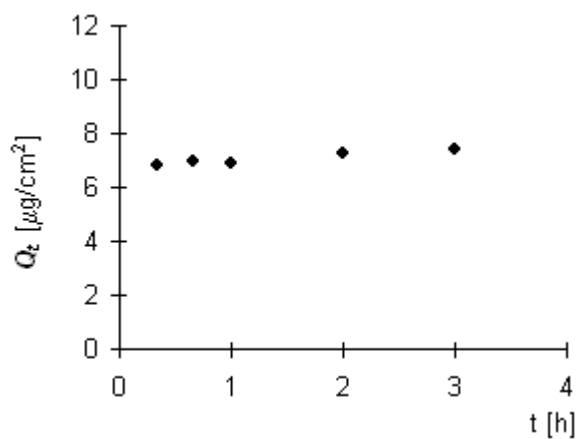
vzorek 2

nesyceno

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	0,455	0,1	0,455	6,8	6,8
0,666	0,432	0,1	0,462	6,9	6,9
1	0,430	0,1	0,461	6,9	6,9
2	0,451	0,1	0,482	7,2	7,2
3	0,462	0,1	0,494	7,4	7,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	6,8	6,8
0,666	6,9	6,9
1	6,9	7,0
2	7,2	7,2
3	7,4	7,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,222875$
Abs. člen	$q = 6,749599$
Korelační koef.	$r = 0,987436$



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

$V_o = 1,5$

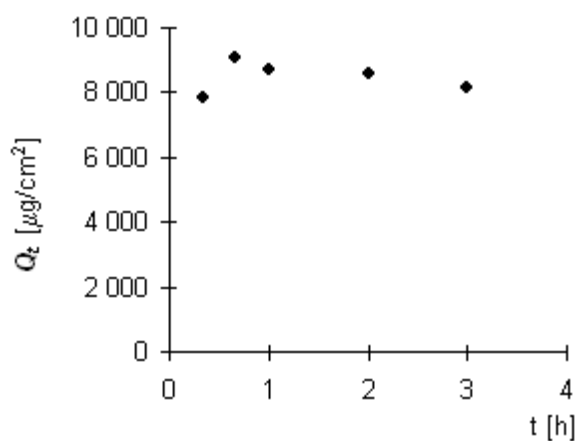
kontrola 3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	523,138	0,1	523,138	7 847,1	7 847,1
0,666	569,422	0,1	604,297	9 064,5	9 064,5
1	538,269	0,1	578,555	8 678,3	8 678,3
2	535,379	0,1	573,949	8 609,2	8 609,2
3	505,773	0,1	544,036	8 160,5	8 160,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	7847,1	8531,7
0,666	9064,5	8513,1
1	8678,3	8494,3
2	8609,2	8438,3
3	8160,5	8382,3

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = -56,0397$
Abs. člen	$q = 8550,375$
Korelační koef.	$r = -0,12884$



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

$V_o = 1,5$

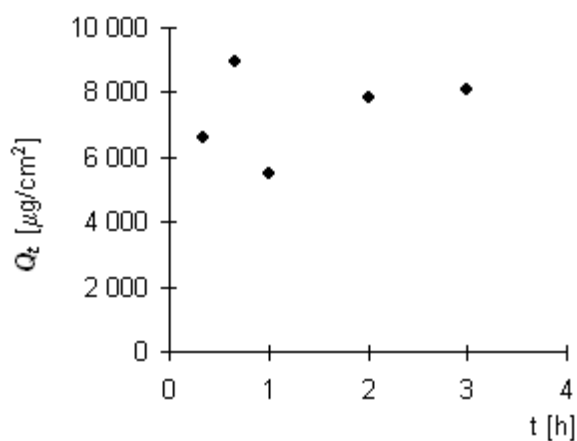
kontrola 4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
0,333	440,686	0,1	440,686	6 610,3	6 610,3
0,666	565,365	0,1	594,744	8 921,2	8 921,2
1	325,798	0,1	365,448	5 481,7	5 481,7
2	499,024	0,1	523,388	7 850,8	7 850,8
3	505,129	0,1	540,022	8 100,3	8 100,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
0,333	6610,3	6970,3
0,666	8921,2	7102,2
1	5481,7	7234,5
2	7850,8	7630,6
3	8100,3	8026,7

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 396,1118$
Abs. člen	$q = 6838,385$
Korelační koef.	$r = 0,31953$



6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách

Ze získaných hodnot hmotnosti vzorků membrány před sušením a po sušení, uvedených v **Tab. 4** až **Tab. 6** v části **5. DOKUMENTACE**, byly vypočteny hmotnostní úbytky, z nichž byl získán průměrný hmotnostní úbytek [%]. Hodnoty průměrného hmotnostního úbytku příslušné membrány jsou zaznamenány v **Tab. 10**.

U membrán byl sledován jednak rozdíl mezi jednotlivými váženími, to znamená, zda se vlhkost v membráně snižuje během celé doby pokusu nebo jen v jeho první polovině, a jednak celková vlhkost obsažená v membránách sledovaná pomocí průměrného hmotnostního úbytku.

Na základě výsledků vážení, **Tab. 4** až **Tab. 6**, je možné u všech tří membrán konstatovat, že rozdíly mezi hmotnostmi vzorků před sušením a po 12 hod sušení jsou minimální. Při porovnání hmotností vzorků po 12 hod sušení s hmotností po 22 hod sušení jsou rozdíly nepatrné až nulové, což naznačuje dosažení rovnovážného stavu, kdy se vlhkost obsažená v membráně dále probíhajícím sušením nesnižuje.

Při porovnání průměrných hmotnostních úbytků v **Tab. 10** je zřejmé, že nejvíce vzdušné vlhkosti obsahuje membrána 3 a nejméně membrána 2.

Odchytky v hodnotách, které se vyskytly při zpracování výsledků vážení z vážení membrán, např. záporné hodnoty, mohly být způsobeny vlivem nepřesností během vážení, popřípadě přenosem vzorku z exsikátoru na analytické váhy.

membrána	průměrný hmotnostní úbytek po 12 hod v exsikátoru [%]	průměrný hmotnostní úbytek po 22 hod v exsikátoru [%]
1	1,95	1,15
2	0,34	0,35
3	1,28	1,50

Tab. 10: Hodnoty průměrného hmotnostního úbytku membrán po sušení v exsikátoru

Na základě hodnoty průměrného hmotnostního úbytku je zřejmé, že membrány do jisté míry přijímají vodu ze vzdušné vlhkosti. Maximální vypočtená hodnota průměrného hmotnostního úbytku, to je 1,5 %, je ovšem nepatrná a pro

další manipulaci s membránami nebyla považována za významnou. Proto při dalších pokusech nebyl vliv vzdušné vlhkosti na vlastnosti membrán uvažován a při práci s nimi za daných laboratorních podmínek nehrozí, že jsou do systému zanášeny vlivem vzdušné vlhkosti chyby.

6.2 Sycení membrán léčivem

Ze získaných hodnot hmotnosti vzorků membrány před impregnací a po impregnaci membrán kofeinem, uvedených v **Tab. 7** až **Tab. 9** v části **5. DOKUMENTACE** v závislosti dle použitého sytícího média, bylo vypočteno, jako rozdíl dvou výše zmíněných hodnot hmotností, množství kofeinu, které se deponovalo do membrány. Z jednotlivých hodnot hmotností adsorbovaného kofeinu byla získána průměrná hmotnost adsorbovaného kofeinu uvedená v **Tab. 11**.

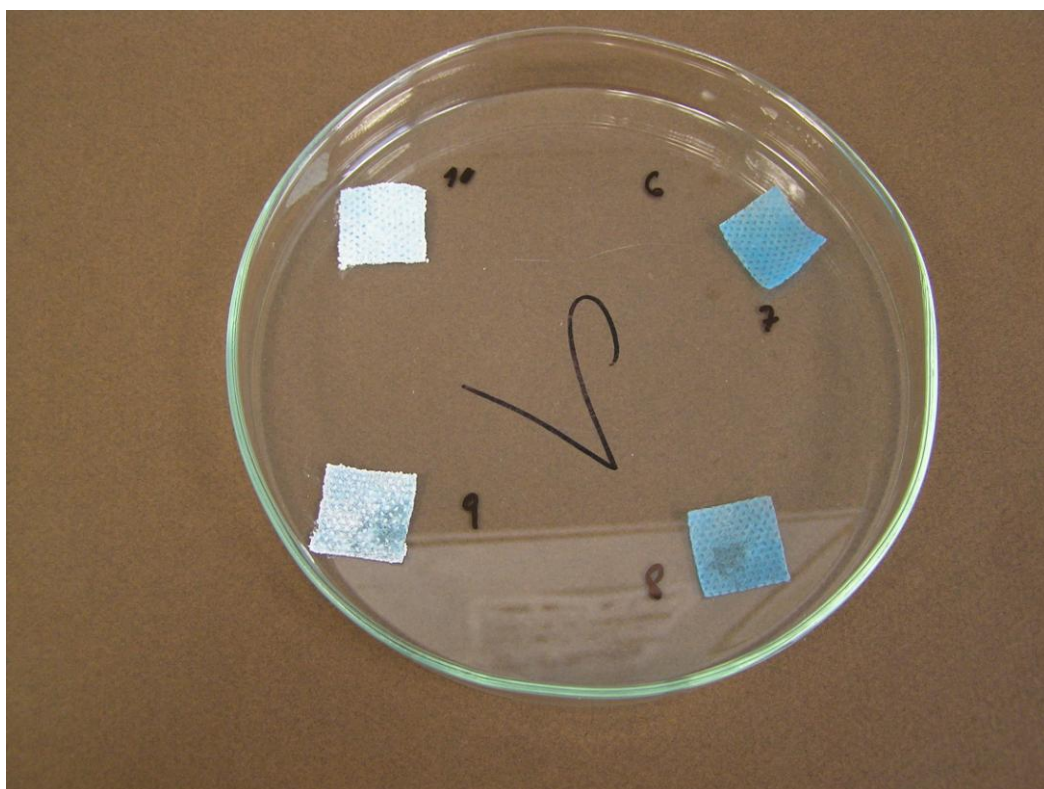
sytící médium	průměrná hmotnost adsorbovaného kofeinu [g]			
	vodný roztok kofeinu	roztok kofeinu v PG:H ₂ O	ethanolická disperze kofeinu	chloroformová disperze kofeinu
membrána 1	0,0001	0,0001	0,0002	0,0130
membrána 2	0,0000	0,0001	0,0001	0,0145
membrána 3	0,0001	0,0000	0,0001	0,0139

Tab. 11: Hodnoty průměrné hmotnosti kofeinu adsorbovaného na membránách

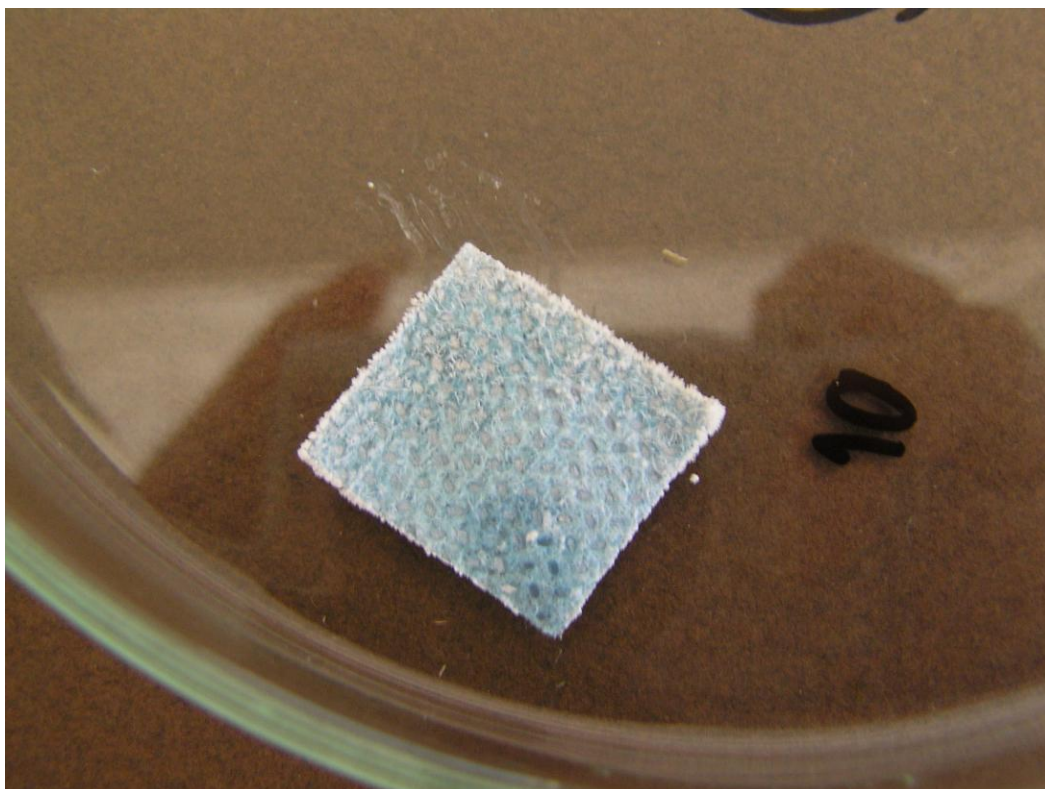
Při porovnání jednotlivých hodnot průměrné hmotnosti adsorbovaného kofeinu, uvedených v **Tab. 11**, je patrné, že všechny membrány jsou schopné fyzikálně zachytit ve své struktuře určité množství kofeinu. Toto množství se značně liší, závisí na druhu sytícího média a pohybuje se mezi 0,0 g kofeinu až 0,0145 g kofeinu. Nejvíce kofeinu jsou všechny tři membrány schopné pojmout v kontaktu s chloroformovou disperzí kofeinu. Jedná se o množství kofeinu řádově o dvě desetinná místa větší než v případě vodného roztoku kofeinu, roztoku kofeinu v PG : H₂O nebo ethanolové disperze kofeinu.

Adsorbce kofeinu na membránách sycených z chloroformové disperze byla zjištěna jak na základě výsledků vážení, tak vizuálně. Po vysušení a odpaření rozpouštědla byly tyto membrány zcela bílé, pokryté adsorbovaným kofeinem. Vzhled membrán s adsorbovaným kofeinem po usušení je naobrazen na **Obr. 11**, na němž jsou vpravo membrány sycené z ethanolového prostředí (stejně vypadaly membrány

sycené z vodného prostředí), a vlevo jsou membrány sycené z chloroformové disperze. Detail membrány s adsorbovaným kofeinem za použití sytícího média chloroformové disperze kofeinu je na **Obr. 12**.



Obr. 11: Vzhled membrán s adsorbovaným kofeinem



Obr. 12: Detail membrány po sycení chloroformovou disperzí kofeinu

Zajímavé je srovnání hmotnosti adsorbovaného kofeinu M_k s hmotností membrány M_m , popřípadě s hmotností inkorporovaného kofeinu M_i , které je uvedeno v **Tab. 12**. Membrány ponořené do vodného roztoku kofeinu, roztoku kofeinu v PG : H₂O nebo ethanolické disperze kofeinu jsou schopné fyzikálně zachytit množství kofeinu, které odpovídá maximálně pouze 2 % jejich hmotnosti, uvedeno v **Tab. 12** jako poměr M_k / M_m . Při kontaktu membrán s chloroformovou disperzí kofeinu dokáží membrány pojmout více než, co samy váží, jak v **Tab. 12** vyznačuje poměr M_k / M_m . Toto množství adsorbovaného kofeinu je u všech tří membrán mnohonásobně vyšší než množství kofeinu inkorporovaného při zvláknění.

Z výsledků gravimetrického měření, uvedených v **Tab. 11**, vyplývá, že membrány ponořené do vodného média s léčivem určité množství tohoto léčiva adsorbují. Po vyhodnocení níže popsaného dílčího měření **4.6.3 Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán** bylo zjištěno, že se koncentrace kofeinu ve vodném roztoku a ve směsi PG : H₂O po sycení membrán nesnížila a membrány v případě těchto vehikul kofein neadsorbují. Z důvodu nejasnosti toho, které výsledky jsou správné, byly pro další experiment, konkrétně pro liberaci léčiva z membrán, brány do úvahy rozdílné výsledky obou zmíněných pokusů.

membrána	M_m [g]	syťící médium	M_k [g]	poměr M_k / M_m [%]	M_i [g]
1	0,0115	vodný roztok kofeinu	0,0001	0,9	0,000011
		roztok kofeinu v PG : H ₂ O	0,0001	0,9	
		ethanolická disperze kofeinu	0,0002	1,7	
		chloroformová disperze kofeinu	0,0130	113,0	
2	0,0119	vodný roztok kofeinu	0,0000	0,0	0,000022
		roztok kofeinu v PG : H ₂ O	0,0001	0,8	
		ethanolická disperze kofeinu	0,0001	0,8	
		chloroformová disperze kofeinu	0,0145	121,8	
3	0,0118	vodný roztok kofeinu	0,0001	0,8	0,000360
		roztok kofeinu v PG : H ₂ O	0,0000	0,0	
		ethanolická disperze kofeinu	0,0001	0,8	
		chloroformová disperze kofeinu	0,0139	117,8	

Tab. 12: Srovnání průměrné hmotnosti adsorbovaného kofeinu s průměrnou hmotností membrány a hmotností inkorporovaného kofeinu

Vysvětlivky:

M_m	průměrná hmotnost membrány po 22 hod v exsikátoru [g]
M_k	průměrná hmotnost kofeinu adsorbovaného na membránu [g]
M_i	hmotnost inkorporovaného kofeinu zavedeného při zvláknění, vypočtená na základě faktu, že membrána obsahuje 5 % léčiva [g]

6.2.1 Koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán

V případě membrán ponořených do vodného roztoku kofeinu a roztoku kofeinu v PG : H₂O, u nichž nebyl vizuálně patrný adsorbovaný kofein, byl zařazen pokus stanovení koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán jako doplňkový k možnému upřesnění výsledků stanovení množství kofeinu adsorbovaného na membránách vážením.

Pomocí HPLC stanovení byla určena koncentrace kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán a označena jako c_z v jednotkách mg/100 ml. Pro porovnání jednotlivých výsledků byla zavedena veličina M_z , představující zbytkové množství kofeinu neboli hmotnost kofeinu v médiu o objemu 2 ml po sycení membrán.

Zbytkové množství kofeinu M_z bylo vypočteno pomocí c_z :

$$M_z = 2 \times c_z / 100$$

Konkrétní hodnoty c_z a M_z jsou uvedeny dle použitého sytícího média v **Tab. 13** a v **Tab. 14**. Ukázalo se, že předpokládaná situace, kdy se koncentrace kofeinu v médiu po sycení sníží a kofein se do membrány adsorbuje, při použití vodných sytících médií nenastala. Zbytkové množství kofeinu v sytícím médiu se naopak nepatrně zvýšilo, což by mohlo znamenat, že vazby mezi inkorporovaným kofeinem a membránou jsou jen velmi slabé a působení vodného prostředí obsahujícího kofein tyto vazby rozruší, v membráně inkorporovaný kofein se vylouží do prostředí původně zamýšleného jako sytící a kofein z kapalného prostředí do membrány nepřechází.

sytící médium vodný roztok kofeinu							
membrána/ vzorek	c _z [mg/100ml]	M _z [mg]	průměr M _z [mg]	M _o [mg]	M _i [mg]		
1/1	13,8492	0,28	0,26	0,2	0,011		
1/2	12,7677	0,26					
1/3	12,2166	0,24					
2/1	14,0943	0,28	0,24		0,2	0,022	
2/2	12,1299	0,24					
2/3	10,5832	0,21					
3/1	14,0298	0,28	0,27			0,2	0,360
3/2	12,4480	0,25					
3/3	13,7262	0,27					

Tab. 13: Koncentrace kofeinu ve vodném roztoku kofeinu po impregnaci membrán

Vysvětlivky:

- c_z zbytková koncentrace kofeinu neboli koncentrace kofeinu v médiu po sycení membrán, stanovená pomocí HPLC [mg/100ml]
- M_z zbytkové množství kofeinu neboli hmotnost kofeinu v médiu o objemu 2 ml po sycení membrán, vypočtená na základě c_z [mg]
- M_o počáteční hmotnost kofeinu neboli hmotnost kofeinu v médiu o objemu 2 ml před sycením membrán [mg]
- M_i hmotnost inkorporovaného kofeinu zavedeného při zvláknění, vypočtená na základě faktu, že membrána obsahuje 5 % léčiva [mg]

syťící médium roztok kofeinu v PG : H ₂ O					
membrána/ vzorek	c _z [mg/100ml]	M _z [mg]	průměr M _z [mg]	M _o [mg]	M _i [mg]
1/4	547,2235	10,94	10,94	původně jako suspenze 100 mg	0,011
1/5	547,9561	10,96			
1/6	546,5818	10,93			
2/4	542,9332	10,86	10,85		0,022
2/5	543,4538	10,87			
2/6	541,1361	10,82			
3/4	543,3439	10,87	10,86		0,36
3/5	541,2139	10,82			
3/6	544,4699	10,89			

Tab. 14: Koncentrace kofeinu v roztoku kofeinu v PG : H₂O po impregnaci membrán

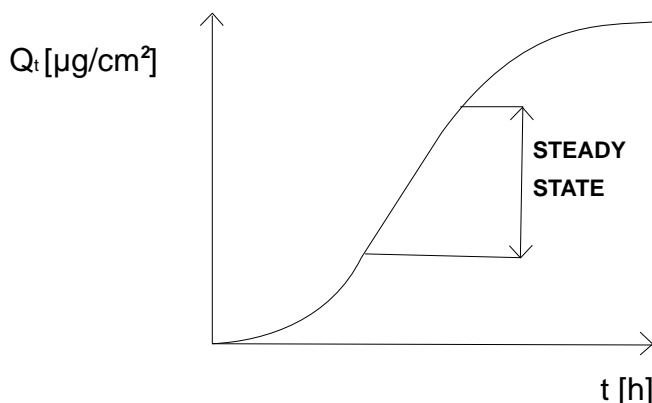
Vysvětlivky:

- c_z zbytková koncentrace kofeinu neboli koncentrace kofeinu v médiu po sycení membrán, stanovená pomocí HPLC [mg/100ml]
- M_z zbytkové množství kofeinu neboli hmotnost kofeinu v médiu o objemu 2 ml po sycení membrán, vypočtená na základě c_z [mg]
- M_o počáteční hmotnost kofeinu neboli hmotnost kofeinu v médiu o objemu 2 ml před sycením membrán [mg]
- M_i hmotnost inkorporovaného kofeinu zavedeného při zvláknění, vypočtená na základě faktu, že membrána obsahuje 5 % léčiva [mg]

6.3 Liberace léčiva z membrán

6.3.1 Krátkodobá liberace

Teoretický průběh liberace léčiva z membrány znázorňuje **Obr. 13**. Přímková část grafu je úsek, který liberaci charakterizuje v ustáleném stavu, „steady state“.



Obr. 13: Průběh ideální permeační křivky

Při komentáři hodnot Q_t a průběhu grafů v **Protokolech 1 až 22** je v našem případě patrné, že hodnoty uvolněného množství kofeinu velmi kolísají, je jich v daných případech málo a neposkytují možnost nalezení lineárního úseku. Pro charakterizaci liberace byl tedy vybrán jiný parametr, který porovnává uvolněné množství kofeinu z jednotlivých membrán v určitém čase.

První časový interval pro hodnocení liberace byl vybrán tak, aby v sobě zahrnoval nejmenší chybu měření danou počtem odběru vzorků a zároveň aby zahrnoval počáteční mohutnost liberace. Znamená to uvažovat interval o takovém počtu hodin, při kterém ještě liberace probíhá, ale nepřechází do rovnovážné větve končícího procesu směřujícího k vyrovnání s limitní hodnotou. Pro hodnocení byla zvolena hodnota Q_{60} , to znamená množství léčiva, které se uvolní z membrány do jedné hodiny od počátku pokusu.

Druhý časový interval byl vybrán tak, abychom mohli posoudit, co se při liberačním pokusu děje po uplynutí dalšího časového období, tedy zda membrány dále uvolňují kofein, nebo zda se množství uvolněného kofeinu již dále nemění, nebo se mění jen nepatrně, anebo membrány v dynamické rovnováze váží uvolněný kofein zpět do své struktury. Pro takové hodnocení byla vzata hodnota Q_{max} ,

to znamená maximální množství léčiva, které se z membrány uvolnilo za celkovou dobu pokusu, to je za tři hodiny.

Hodnoty Q_{60} a Q_{\max} v závislosti na druhu membrány a použitého sytícího média jsou uvedeny v **Tab. 15**, ve které jsou zaznamenány údaje pro impregnované membrány, a v **Tab. 16**, ve které jsou zaneseny údaje pro neimpregnované membrány. Dále jsou ve zmíněných tabulkách uvedeny hodnoty hmotnosti celkově navázaného kofeinu v membránách M_c , které tedy představují součet hmotnosti kofeinu inkorporovaného M_i a hmotnosti kofeinu adsorbovaného M_k uvedených v předchozí **Tab. 12**.

Při pohledu na výsledky liberace, **Tab. 15** a **Tab. 16**, jsou membrány schopné uvolnit poměrnou část léčiva, které v sobě obsahují po inkorporaci z výroby a které navázaly do své struktury v předchozím pokusu **4.6 Sycení membrán léčivem**. Je patrné, že membrány kofein do své struktury váží, ale zároveň jej ve své struktuře neudrží pevně a navázaný kofein může být následně opět uvolněn. Na základě vypočteného poměru Q_{\max}/M_c uvolní membrány od 1,0 % do 75,0 % celkově navázaného kofeinu.

V případě impregnovaných membrán platí pro všechny tři membrány, že nejméně kofeinu se uvolní z membrán impregnovaných vodným roztokem kofeinu a roztokem kofeinu v PG : H₂O. Množství o jeden řád vyšší se uvolní z membrán sycených ethanolicou disperzí kofeinu a až o tři řády více se uvolní z membrán impregnovaných chloroformovou disperzí kofeinu.

Při liberačním pokusu s neimpregnovanými membránami bylo množství uvolněného kofeinu pro všechny tři membrány zhruba stejné a srovnatelné s množstvím kofeinu, který se uvolnil z membrán sycených vodným roztokem kofeinu nebo roztokem kofeinu v PG : H₂O.

Na základě získaných hodnot Q_{60} a Q_{\max} uvolní jak impregnované tak neimpregnované membrány většinové množství kofeinu v první hodině liberačního pokusu a během dalších dvou hodin experimentu se toto množství mění jen nepatrně. U některých membrán je hodnota Q_{\max} vyšší než hodnota Q_{60} a membrány tedy ještě kofein uvolňují. U dalších membrán je hodnota Q_{\max} nižší než hodnota Q_{60} , což může být vysvětleno nejen chybou při měření, ale také tendencí membrány zpětně poutat do své struktury uvolněný kofein.

Z důvodu možného uplatnění dvou různých pohledů na jednu věc jsou v **Tab. 15** v případě membrán syčených z vodného roztoku kofeinu a roztoku kofeinu v PG : H₂O uváděny v příslušných kolonkách dvě různé hodnoty množství celkově vázaného kofeinu (v příslušné tabulce psáno kurzívou). Jedná se o dokumentování skutečnosti, kdy gravimetrické měření pro zjištění hmotnosti adsorbovaného kofeinu v pokusu **4.6 Syčení membrán léčivem** nebylo v souladu s výsledky HPLC stanovení obsahu kofeinu v syčícím médiu po impregnaci membrán. Proto byly pro diskuzi výsledků do další úvahy brány v potaz obě možné varianty hodnot množství celkově vázaného kofeinu. První ze dvou uvedených hodnot odpovídá situaci, při které membrána určité množství kofeinu adsorbovala. Druhá ze dvou uvedených hodnot odpovídá situaci, kdy membrána žádný kofein při ponoření do vodného média neadsorbovala a obsahuje tedy pouze kofein inkorporovaný při zvláknění.

membrána	syčící médium	Q ₆₀ [μg]	Q _{max} [μg]	M _c [μg]	poměr Q _{max} /M _c [%]
1	<i>vodný roztok kofeinu</i>	6,6	8,1	<i>110,8</i> 10,8	<i>7,3</i> 75,0
	<i>roztok kofeinu v PG : H₂O</i>	7,1	6,8	<i>110,8</i> 10,8	<i>6,1</i> 63,0
	ethanolická disperze kofeinu	22,3	22,9	210,8	10,9
	chloroformová disperze kofeinu	8419,7	7918,7	13010,8	60,9
2	<i>vodný roztok kofeinu</i>	4,8	4,9	<i>21,6</i> 21,6	<i>22,7</i> 22,7
	<i>roztok kofeinu v PG : H₂O</i>	5,5	6,2	<i>121,6</i> 21,6	<i>5,1</i> 28,7
	ethanolická disperze kofeinu	18,5	18,8	121,6	15,5
	chloroformová disperze kofeinu	8863,3	8458,9	14521,6	58,3
3	<i>vodný roztok kofeinu</i>	4,3	4,7	<i>460,0</i> 360,0	<i>1,0</i> 1,3
	<i>roztok kofeinu v PG : H₂O</i>	4,7	4,8	<i>360,0</i> 360,0	<i>1,3</i> 1,3
	ethanolická disperze kofeinu	31,7	29,8	460,0	6,5
	chloroformová disperze kofeinu	8978,7	8484,7	14260,0	59,5
kontrola 1		9424,3	8149,3	11350,0	71,8
kontrola 2		9731,4	8394,4	11740,0	71,5

Tab. 15: Hodnoty Q₆₀ a Q_{max} pro impregnované membrány

membrána/ vzorek	Q ₆₀ [μg]	průměr Q ₆₀ [μg]	Q _{max} [μg]	průměr Q _{max} [μg]	M _c [μg]	poměr Q _{max} /M _c [%]
1/1	31,9	7,7	7,5	7,6	10,8	70,4
1/2	7,7		7,7			
2/1	8,6	8,1	9,0	9,4	21,6	43,5
2/2	7,5		9,7			
3/1	6,9	6,9	7,4	7,4	360,0	2,1
3/2	6,9		7,4			
kontrola 3	8678,3		8160,5		11620,0	70,2
kontrola 4	5481,7		8100,3		11780,0	68,8

Tab. 16: Hodnoty Q_{60} a Q_{max} pro neimpregnované membrány

6.3.2 Dlouhodobá liberace

U membrán ponořených do vodného roztoku kofeinu a roztoku kofeinu v PG : H₂O, u nichž nebyl vizuálně patrný adsorbovaný kofein, byl zařazen dlouhodobý liberační pokus. Na rozdíl od membrán sycených chloroformovou disperzí kofeinu obsahovaly tyto membrány podstatně menší množství kofeinu, které se nemuselo uvolnit během krátkodobé liberace, a proto byly zmíněné membrány podrobeny dlouhodobé eluci.

Při HPLC stanovení kofeinu ve vzorcích z dlouhodobé liberace se některé hodnoty koncentrací výrazně lišily od ostatních hodnot, proto jsme celou sadu vzorků nechali analyzovat ještě jednou. Získali jsme dvě sady výsledků, které se číselnými hodnotami lišily o jeden řád. Abychom se mohli přiklonit k výsledkům první nebo druhé sady, bylo zařazeno třetí měření.

Analyzované vzorky byly tedy metodou HPLC proměřeny třikrát, byly tak získány tři sady měření, které se navzájem svými hodnotami lišily. Hodnoty pro všechna tři měření jsou uvedeny v **Tab. 17** a v **Tab. 18** dle použitého sytícího média. Při zpracování výsledků jsme sadu, která se výrazně lišila od ostatních dvou, nepovažovali za reprezentativní a dále počítali s hodnotami dvou souhlasných měření. Bylo tomu tak také proto, že druhé a třetí měření vykazují podobný jev, kdy chod závislostí znázorněný v **Grafu 2** a **Grafu 3** je stále stejný.

Pomocí HPLC stanovení byla určena koncentrace kofeinu v akceptorovém médiu po dlouhodobé eluci membrán a označena jako c_{DL} v jednotkách mg/100 ml. Pro porovnání jednotlivých výsledků byla zavedena veličina M_{DL} , představující množství kofeinu neboli hmotnost kofeinu uvolněného z membrány do akceptorového média o objemu 1,5 ml při dlouhodobé liberaci.

Množství uvolněného kofeinu M_{DL} bylo vypočteno pomocí c_{DL} :

$$M_{DL} = 1,5 \times c_{DL} / 100$$

Při porovnání jednotlivých membrán na základě **Tab. 17** a **Tab. 18** za použití sytícího vodného roztoku kofeinu uvolní nejméně kofeinu membrána 1 a nejvíce membrána 3, v případě roztoku kofeinu ve směsi PG : H₂O uvolní nejméně kofeinu opět membrána 1 a nejvíce membrána 2.

V případě membrán sycených z vodného roztoku kofeinu a roztoku kofeinu v PG : H₂O jsou v **Tab. 17** a v **Tab. 18** v příslušných kolonkách z důvodu dvou různých pohledů na jednu věc dvě různé hodnoty množství celkově vázaného kofeinu. Jedná se o dokumentování skutečnosti, kdy gravimetrické měření pro zjištění hmotnosti adsorbovaného kofeinu v pokusu **4.6 Sycení membrán léčivem** nebylo v souladu s výsledky HPLC stanovení obsahu kofeinu v sytícím médiu po impregnaci membrán. Proto byly pro diskuzi výsledků do další úvahy brány v potaz obě možné varianty hodnot množství celkově vázaného kofeinu. První ze dvou uvedených hodnot odpovídá situaci, při které membrána určité množství kofeinu adsorbovala. Druhá ze dvou uvedených hodnot odpovídá situaci, kdy membrána žádný kofein při ponoření do vodného média neadsorbovala a obsahuje tedy pouze kofein inkorporovaný při zvláknění.

Ukázalo se, že při dlouhodobé liberaci nedokáží membrány uvolnit větší množství léčiva M_{DL} , popřípadě veškeré množství celkově vázaného kofeinu, než uvolní v případě krátkodobé liberace M_{KL} .

syceno z vodného roztoku kofeinu	měření	C_{DL} [mg/100ml]	M_{DL} [μg]	M_c [μg]	M_{DL} / M_c [%]	M_{KL} [μg]
membrána 1	první měření	0,0334	--	110,8 10,8	--	8,1
	druhé měření	0,0253	0,38		0,3 3,5	
	třetí měření	0,0236	0,35		0,3 3,2	
membrána 2	první měření	5,7899	--	21,6 21,6	--	4,9
	druhé měření	0,2088	3,13		14,5 14,5	
	třetí měření	0,0389	0,58		2,7 2,7	
membrána 3	první měření	5,1074	--	460,0 360,0	--	4,7
	druhé měření	0,3691	5,54		1,2 1,5	
	třetí měření	0,2139	3,21		0,7 0,9	

Tab. 17: Množství uvolněného kofeinu při dlouhodobé liberaci za použití sytícího média vodného roztoku kofeinu

Vysvětlivky:

C_{DL} koncentrace kofeinu v akceptorovém médiu po skončení dlouhodobé liberace, stanovená pomocí HPLC [mg/100ml]

M_{DL} hmotnost kofeinu v akceptorovém médiu o objemu 1,5 ml po skončení dlouhodobé liberace, vypočtená na základě C_{DL} [μg]

M_c hmotnost celkově navázaného kofeinu, součet hmotnosti kofeinu inkorporovaného a adsorbovaného [μg]

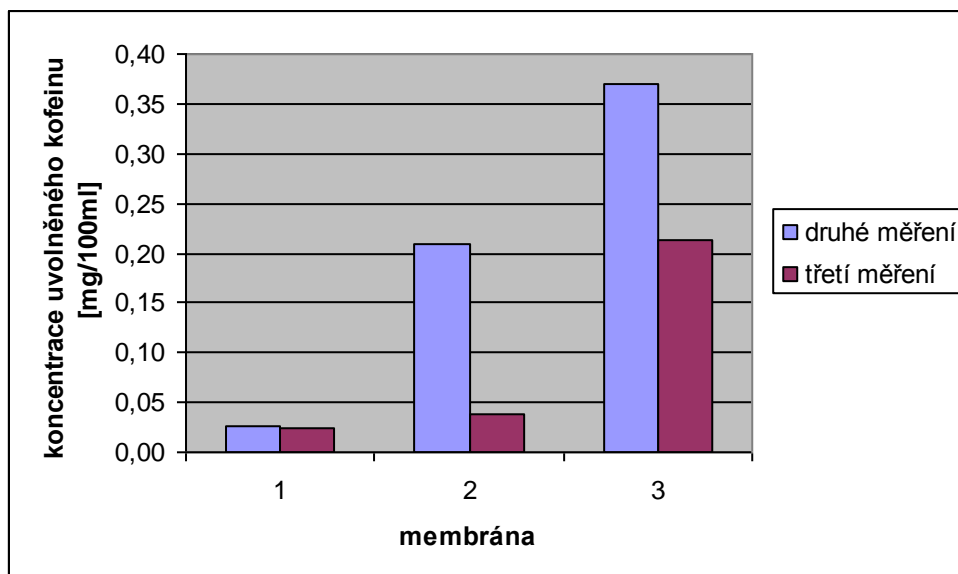
M_{KL} hmotnost kofeinu uvolněného při krátkodobém liberačním pokusu [μg]

syceno z roztoku kofeinu v PG:H ₂ O	měření	c _{DL} [mg/100ml]	M _{DL} [μg]	M _c [μg]	M _{DL} /M _c [%]	M _{KL} [μg]
membrána 1	první měření	1,1388	--	110,8 10,8	--	6,8
	druhé měření	0,1201	1,80		1,6 16,7	
	třetí měření	0,0764	1,15		1,0 10,6	
membrána 2	první měření	6,2289	--	121,6 21,6	--	6,2
	druhé měření	0,6899	10,35		8,5 47,9	
	třetí měření	0,5286	7,93		6,5 36,7	
membrána 3	první měření	4,5828	--	360,0 360,0	--	4,8
	druhé měření	0,2365	3,55		1,0 1,0	
	třetí měření	0,1410	2,12		0,6 0,6	

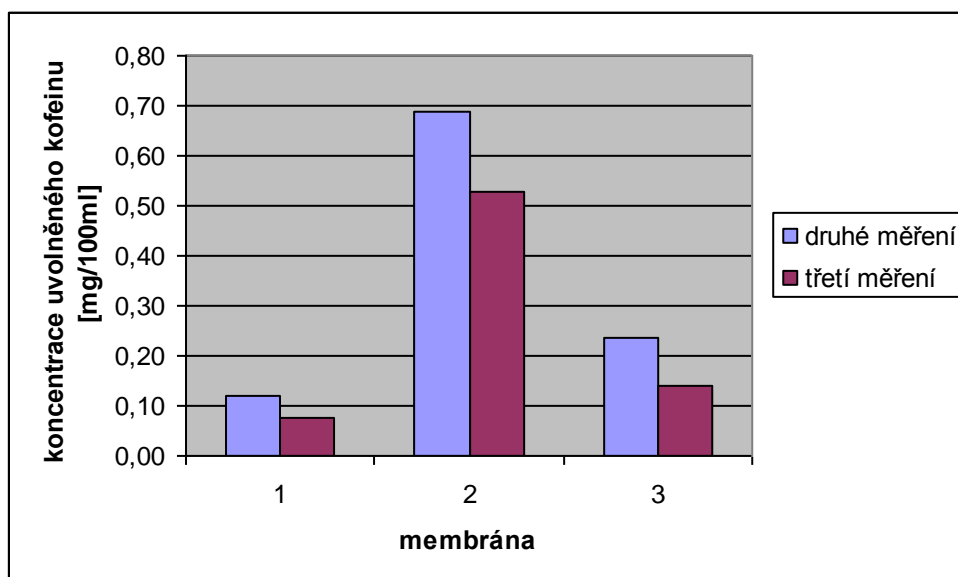
Tab. 18: Množství uvolněného kofeinu při dlouhodobé liberaci za použití sytícího média roztoku kofeinu v PG : H₂O

Vysvětlivky:

- c_{DL} koncentrace kofeinu v akceptorovém médiu po skončení dlouhodobé liberace, stanovená pomocí HPLC [mg/100ml]
- M_{DL} hmotnost kofeinu v akceptorovém médiu o objemu 1,5 ml po skončení dlouhodobé liberace, vypočtená na základě c_{DL} [μg]
- M_c hmotnost celkově navázaného kofeinu, součet hmotnosti kofeinu inkorporovaného a adsorbovaného [μg]
- M_{KL} hmotnost kofeinu uvolněného při krátkodobém liberačním pokusu [μg]



Graf 2: Srovnání hodnot druhého a třetího měření dlouhodobé liberace za použití sytícího média vodného roztoku kofeinu



Graf 3: Srovnání hodnot druhého a třetího měření dlouhodobé liberace za použití sytícího média roztoku kofeinu v PG : H₂O

7. ZÁVĚRY

1. Stanovení obsahu vzdušné vlhkosti v membránách

Všechny tři membrány do jisté míry přijímají vodu ze vzdušné vlhkosti, kterou při uchování v exsikátoru pozbývají. Maximální vypočtená hodnota průměrného hmotnostního úbytku membrán byla 1,5 % hmotnostních. Tato maximální hodnota byla pro účely následujících experimentů považována za nízkou a vliv vzdušné vlhkosti na vlastnosti membrán za daných laboratorních podmínek nevýznamný. Při uchování membrán a při práci s membránami proto nejsou vyžadovány žádné speciální podmínky.

Průměrný hmotnostní úbytek po 22 hod v exsikátoru u membrány 1 činil 1,15 %, u membrány 2 byl 0,35 % a v případě membrány 3 činil 1,50 % hmotnostních.

2. Syčení membrán léčivem

Všechny tři membrány jsou schopné fyzikálně zachytit ve své struktuře určité množství kofeinu. Množství adsorbovaného kofeinu se značně liší a závisí na druhu sytícího média. Nejvíce kofeinu pojmu všechny tři membrány v kontaktu s chloroformovou disperzí kofeinu. Jedná se o množství, které představuje 1,1 až 1,2 násobek jejich hmotnosti a které mnohonásobně převyšuje množství kofeinu inkorporovaného při zvláknění. V případě dalších sytících médií, vodného roztoku kofeinu, roztoku kofeinu v PG : H₂O nebo ethanolové disperze kofeinu adsorbují membrány takové množství kofeinu, které odpovídá maximálně 2 % jejich hmotnosti.

Hodnota průměrné hmotnosti adsorbovaného kofeinu membránou 1 je za použití sytícího média vodného roztoku kofeinu 0,0001 g, v případě roztoku kofeinu v PG : H₂O 0,0001 g, v případě ethanolové disperze kofeinu 0,0002 g a v případě chloroformové disperze kofeinu 0,0130 g.

Průměrná hmotnost kofeinu adsorbovaného membránou 2 činí za použití sytícího média vodného roztoku kofeinu 0,0000 g, v případě roztoku kofeinu v PG : H₂O 0,0001 g, v případě ethanolové disperze kofeinu 0,0001 g a v případě chloroformové disperze kofeinu 0,0145 g.

Průměrná hmotnost kofeinu adsorbovaného membránou 3 je za použití sytícího média vodného roztoku kofeinu 0,0001 g, v případě roztoku kofeinu

v PG : H₂O 0,0000 g, v případě ethanolové disperze kofeinu 0,0001 g a v případě chloroformové disperze kofeinu 0,0139 g.

Po ukončení pokusu sycení membrán byla měřena koncentrace kofeinu v sytícím vodném médiu. Předpoklad, že se koncentrace kofeinu v médiu sníží a membrány adsorbují určité množství kofeinu, nebyl potvrzen. Koncentrace kofeinu ve vodném médiu po sycení membrán se dokonce nepatrně zvýšila, u membrány 1 z 0,2 mg na 0,26 mg, u membrány 2 z 0,2 mg na 0,24 mg, u membrány 3 z 0,2 mg na 0,27 mg. Tato skutečnost ukazuje na tendenci membrán v prostředí o relativně nízké koncentraci kofeinu žádný kofein neadsorbovat a naopak inkorporovaný kofein uvolnit.

Na základě rozdílného výsledku HPLC stanovení koncentrace kofeinu ve vodném médiu po impregnaci membrán a výsledku gravimetrie při zjišťování množství na membránách adsorbovaného kofeinu byly pro další navazující experiment a jeho diskuzi aplikovány obě možné varianty pohledu na množství celkově vázaného kofeinu v membránách.

3. Krátkodobá liberace léčiva z membrán

Všechny tři membrány dokáží ze své struktury uvolnit inkorporovaný a také adsorbovaný kofein. Na základě vypočteného poměru Q_{\max}/M_c uvolní membrány od 1,0 % do 75,0 % celkově navázaného kofeinu.

V případě impregnovaných membrán uvolní nejméně kofeinu právě ty, které byly syceny vodným roztokem kofeinu a roztokem kofeinu v PG : H₂O, o jeden řád více se uvolní z membrán sycených ethanolickou disperzí kofeinu a až o tři řády více uvolní membrány impregnované chloroformovou disperzí kofeinu.

Membrána 1 sycená Kof + H₂O uvolní Q_{\max} o hodnotě 8,1 µg, sycená Kof + PG : H₂O uvolní Q_{\max} o hodnotě 6,8 µg, sycená Kof + CH₃CH₂OH uvolní Q_{\max} o hodnotě 22,9 µg, sycená Kof + CHCl₃ uvolní Q_{\max} o hodnotě 7918,7 µg.

Membrána 2 sycená Kof + H₂O uvolní Q_{\max} o hodnotě 4,9 µg, sycená Kof + PG : H₂O uvolní Q_{\max} o hodnotě 6,2 µg, sycená Kof + CH₃CH₂OH uvolní Q_{\max} o hodnotě 18,8 µg, sycená Kof + CHCl₃ uvolní Q_{\max} o hodnotě 8458,9 µg.

Membrána 3 sycená Kof + H₂O uvolní Q_{\max} o hodnotě 4,7 µg, sycená Kof + PG : H₂O uvolní Q_{\max} o hodnotě 4,8 µg, sycená Kof + CH₃CH₂OH uvolní Q_{\max} o hodnotě 29,8 µg, sycená Kof + CHCl₃ uvolní Q_{\max} o hodnotě 8484,7 µg.

Všechny tři neimpregnované membrány uvolní zhruba stejné množství kofeinu. Toto množství je zhruba srovnatelné s množstvím, které uvolní membrány sycené vodným roztokem kofeinu nebo roztokem kofeinu v PG : H₂O. Membrána 1 uvolní Q_{\max} o hodnotě 7,6 µg, membrána 2 uvolní Q_{\max} o hodnotě 9,4 µg a membrána 3 uvolní Q_{\max} o hodnotě 7,4 µg.

Na základě tohoto měření se dá usuzovat, že převážná většina kofeinu uvolněného z membrán sycených Kof + H₂O a Kof + PG : H₂O je charakteru inkorporovaného při zvláknění a že množství kofeinu, které tyto membrány inkorporovaly adsorbci, bylo téměř nulové a tudíž zanedbatelné. Tento fakt potvrzuje výsledky experimentu **4.6.3 Koncentrace kofeinu v syticím médiu po impregnaci membrán**, kdy se množství kofeinu ve vodném médiu po sycení membrán nesnížilo, ale dokonce nepatrně zvýšilo.

4. Dlouhodobá liberace léčiva z membrán

Membrány vystavené dlouhodobé liberaci jsou schopné uvolnit ze své struktury kofein. Ve srovnání s krátkodobým liberačním pokusem je pouze ve dvou případech uvolněné množství kofeinu při dlouhodobé liberaci větší než množství uvolněné při krátkodobé liberaci, přesto toto množství nedosahuje hodnoty celkově vázaného kofeinu. Membrány tudíž nejsou schopné ani za delší časové období uvolnit větší, popřípadě veškeré množství vázaného kofeinu.

V případě vodného roztoku kofeinu uvolní membrána 1 v prvním měření 0,38 µg a ve druhém měření 0,35 µg kofeinu. Membrána 2 uvolní v prvním měření 3,13 µg a ve druhém měření 0,58 µg kofeinu. Membrána 3 uvolní v prvním měření 5,54 µg a ve druhém měření 3,21 µg kofeinu.

Za použití roztoku kofeinu v PG : H₂O uvolní membrána 1 v prvním měření 1,80 µg a ve druhém měření 1,15 µg kofeinu. Membrána 2 uvolní v prvním měření 10,35 µg a ve druhém měření 7,93 µg kofeinu. Membrána 3 uvolní v prvním měření 3,55 µg a ve druhém měření 2,12 µg kofeinu.

Membrány jsou schopné při dlouhodobé liberaci uvolnit od 0,3 % do 47,9 % celkově vázaného kofeinu.

8. SOUHRN

Práce se zabývá hodnocením sorpčních a liberačních vlastností nanovláknenných membrán připravených elektrostatickým zvlákňováním roztoku chitosanu obsahujícího 5 % léčiva, překrytého vrstvou polyuretanu. Je podán základní přehled použití nanovláknenných membrán ve farmacii a medicíně, zejména jejich charakteristika a aplikace v distribuci léčiv a tkáňovém inženýrství.

Byla testována schopnost třech rozdílných membrán přijmout a následně uvolnit ze své struktury modelové léčivo. Jednalo se o kofein inkorporovaný do membrán ve firmě Elmarco Liberec, a kofein, který byl do membrán vpraven ponořením membrány do kapalného roztoku s touto látkou.

Při sycení membrán v médiích s léčivem byl potvrzen předpoklad, že membrány jsou schopné, kromě podílu inkorporovaného před elektrospiningem, pojmout další množství kofeinu a to zcela odlišným způsobem. Všechny tři membrány adsorbují ponořením do médií obsahující kofein určité množství léčiva, jehož hodnota je závislá na druhu použitého média. V případě využití chloroformové disperze adsorbují membrány více kofeinu, než samy váží.

V liberačním pokusu uvolňovaly hodnocené membrány jak uvnitř inkorporovaný, tak na povrchu adsorbovaný kofein. Při krátkodobé liberaci trvající tři hodiny uvolnily neimpregnované membrány cca od 2 % do 70 % hmotnosti inkorporovaného kofeinu. Zhruba stejné množství, představující pouze inkorporovaný podíl kofeinu, liberuje z membrán sycených z vodného prostředí. Impregnované membrány v případě chloroformové disperze jako sytícího média uvolní zhruba 60 % celkově vázaného kofeinu. Při srovnání vlastností membrán v krátkodobé a dlouhodobé 5denní liberaci bylo zjištěno, že membrány nejsou schopné ani za delší časové období uvolnit větší, popřípadě veškeré množství kofeinu.

9. ABSTRACT

Thesis deals with the evaluation of absorption and the release properties of the nanofibre membranes that were prepared using electrospinning of chitosan solution with the contents of 5 % of a drug and covered with polyurethane layer. Thesis brings a survey about the use of nanofibre membranes in pharmacy and medicine, especially their characteristics and application at drug delivery and distribution and in tissue engineering.

The ability of three different membranes to accept and release caffeine as a model drug from their structure was investigated. The caffeine was incorporated into the membranes in company Elmarco, Liberec, or it was impregnated in the membranes using absorption from solutions containing drug. A hypothesis concerned with ability of membranes to accept a part of caffeine by another mechanism than an amount incorporated before electrospinning was confirmed.

All of three membranes were immersed in media containing caffeine and they adsorbed the drug in quantity dependent on the sort of liquid medium. At the use of the chloroform dispersions of caffeine, membranes adsorbed more than a mass of membranes themselves.

In the set of release experiments of membranes the released amount of caffeine incorporated inside as well as caffeine adsorbed on the surface was evaluated. During a short-term release (three hours experiment), non-impregnated membranes released from 2 % to 70 % of the weigh of incorporated caffeine. Almost the same among of caffeine that was incorporated in was released from membranes saturated in aqueous media. The membranes impregnated in chloroform dispersion delivered approximately 60% of caffeine that is totally bound. In the comparison with the properties of membranes at long-term (5 days lasting) release experiment was found that membranes were not able to release higher amount or the whole amount of caffeine regardless the time course.

10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační přímka kofeinu	38
Graf 2: Srovnání hodnot druhého a třetího měření dlouhodobé liberace za použití sytícího média vodného roztoku kofeinu	82
Graf 3: Srovnání hodnot druhého a třetího měření dlouhodobé liberace za použití sytícího média roztoku kofeinu v PG : H ₂ O	82

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Ukázka elektrospiningu dle uspořádání ⁷	11
Obr. 2: Ukázka modifikace povrchu matrice pro navázání aktivní látky ¹⁰	17
Obr. 3: Ukázka různých forem polymerní matrice ¹⁰	18
Obr. 4: Matrice tvořená mikrosférami z PLGA obsahující chondrocyty ¹⁰	19
Obr. 5: Schéma zavedení látky do matrice ⁸	20
Obr. 6: Lékovky s vloženou membránou v sytícím médiu	31
Obr. 7: Technické uspořádání při namáčení membrán po předešlém sycení.....	31
Obr. 8: Máčení membrán po předchozím sycení membrán.....	33
Obr. 9: Vialky s membránami vložené do vodní lázně při krátkodobém liberačním pokusu.....	35
Obr. 10: Analytický set Agilent Technologies.....	37
Obr. 11: Vzhled membrán s adsorbovaným kofeinem.....	69
Obr. 12: Detail membrány po sycení chloroformovou disperzí kofeinu.....	70
Obr. 13: Průběh ideální permeační křivky.....	75

12. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Příklady elektrospiningem zvlákněných polymerů a jejich využití v aplikaci léčiv ⁷	10
Tab. 2: Složení chitosanové vrstvy	25
Tab. 3: Složení membrán	26
Tab. 4: Hodnoty hmotnosti vzorků při vážení membrány 1	40
Tab. 5: Hodnoty hmotnosti vzorků při vážení membrány 2	41
Tab. 6: Hodnoty hmotnosti vzorků při vážení membrány 3	42
Tab. 7: Hodnoty hmotnosti membrány 1 po impregnaci	43
Tab. 8: Hodnoty hmotnosti membrány 2 po impregnaci	43
Tab. 9: Hodnoty hmotnosti membrány 3 po impregnaci	44
Tab. 10: Hodnoty průměrného hmotnostního úbytku membrán po sušení v exsikátoru	67
Tab. 11: Hodnoty průměrné hmotnosti kofeinu adsorbovaného na membránách	68
Tab. 12: Srovnání průměrné hmotnosti adsorbovaného kofeinu s průměrnou hmotností membrány a hmotností inkorporovaného kofeinu	71
Tab. 13: Koncentrace kofeinu ve vodném roztoku kofeinu po impregnaci membrán	73
Tab. 14: Koncentrace kofeinu v roztoku kofeinu v PG : H ₂ O po impregnaci membrán	74
Tab. 15: Hodnoty Q ₆₀ a Q _{max} pro impregnované membrány	77
Tab. 16: Hodnoty Q ₆₀ a Q _{max} pro neimpregnované membrány	78
Tab. 17: Množství uvolněného kofeinu při dlouhodobé liberaci za použití sytícího média vodného roztoku kofeinu	80
Tab. 18: Množství uvolněného kofeinu při dlouhodobé liberaci za použití sytícího média roztoku kofeinu v PG : H ₂ O	81

13. SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotikum
AUC	plocha pod křivkou
C _{DL}	koncentrace kofeinu v akceptorovém médiu po skončení dlouhodobé liberace, stanovená pomocí HPLC
C _k	korigovaný koncentrační údaj, zohledňující průběžný odběr a doplňování akceptorové fáze
C _{nk}	nekorigovaná koncentrace
C _z	zbytková koncentrace kofeinu neboli koncentrace kofeinu v médiu po sycení membrán, stanovená pomocí HPLC
ΔV_{dop}	objem odebírané a přidávané fáze
DMF	N,N-dimethylformamid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
J	flux, tok permeantu v ustáleném stavu
Kof + CHCl ₃	chloroformová disperze kofeinu
Kof + CH ₃ CH ₂ OH	ethanolová disperze kofeinu
Kof + H ₂ O	vodný roztok kofeinu
Kof + PG : H ₂ O	roztok kofeinu ve směsi propylenglykola voda
LČ	léčivo
LP	léčivý přípravek

M_c	hmotnost celkově navázaného kofeinu, součet hmotnosti kofeinu inkorporovaného a adsorbovaného
M_{DL}	hmotnost kofeinu v akceptorovém médiu o objemu 1,5 ml po skončení dlouhodobé liberace, vypočtená na základě c_{DL}
M_i	hmotnost inkorporovaného kofeinu zavedeného při zvláknění, vypočtená na základě faktu, že membrána obsahuje 5 % léčiva
M_k	průměrná hmotnost kofeinu adsorbovaného na membránu
M_{KL}	hmotnost kofeinu uvolněného při krátkodobém liberačním pokusu
M_m	průměrná hmotnost membrány po 22 hod v exsikátoru
M_o	počáteční hmotnost kofeinu neboli hmotnost kofeinu v médiu o objemu 2 ml před syčením membrán
M_z	zbytkové množství kofeinu neboli hmotnost kofeinu v médiu o objemu 2 ml po syčení membrán, vypočtená na základě c_z
PEG, PEO	polyethylenglykol neboli polyethylenoxid
PEVA	kopolymer ethylenu a vinylacetátu
PG	propylenglykol
PLA	kyselina polymléčná

PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové
PLLA	kyselina poly-(L)mléčná
PPO	polypropylenoxid
PUR	polyuretan
Q_{60}	množství léčiva, které se uvolní z membrány do jedné hodiny od počátku krátkodobého liberačního pokusu
Q_{max}	maximální množství léčiva, které se z membrány uvolní za celkovou dobu krátkodobého liberačního pokusu, to je za tři hodiny
$Q_t = Q_{t(exp)} [\mu g / cm^2]$	skutečné množství liberantu uvolněné membránou o ploše $1 cm^2$ do akceptorové fáze
$Q_t [\mu g]$	skutečné množství liberantu uvolněné membránou do akceptorové fáze
$Q_{t(teor)} [\mu g / cm^2]$	množství liberantu uvolněné membránou o ploše $1 cm^2$ do akceptorové fáze, odečtené z regresivní křivky
t	čas
V_o	objem akceptorové fáze

14. POZNÁMKY

enkapsulace je pojem převzatý z anglicky psané literatury a ve farmaceutické technologii označuje proces obalení léčiva nebo jiného agens odlišným materiálem. Vzniklé těleso je uvnitř tvořeného jádrem (dření) a vně pokryto stěnou (obalem). Pojem rovněž zahrnuje koncentrické opouzdrnění nějakého materiálu jiným polymerem, včetně vytvoření vláken opouzdrněných jiným polymerem při zpracování koaxiální extruzí.

sycení, popřípadě impregnaci membrán médiem s léčivem je pracovní název zavedený pro účely rigorózní práce a označující postup ponoření a namáčení membrány v médiu obsahující léčivo, během kterého se léčivo povrchově zakotví na membráně

inkorporovaný kofein je kofein vpravený do materiálu membrány převedením léčiva do roztoku nebo taveniny polymeru, z něhož je následně membrána získána, v daném případě procesem elektrostatického zvláknění (chráněný postup firmy Elmarco)

adsorbovaný nebo impregnovaný kofein, kofein vpravený do membrány, respektive na vlákna membrány adsorpcí z kapalného média obsahujícího kofein

15. SEZNAM LITERATURY

- ¹ BIDMONOVÁ, Hana. *Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 2. Polyvinylalkohol, chitosan, kyselina (D,L) polymléčná*. [s.l.], 2009. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové . Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.
- ² BENEŠ, Michal. *Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 1. Chitosan, polyamid 6, polyurethan*. [s.l.], 2009. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové . Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.
- ³ KREJČOVÁ, Markéta. *Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv. 3. Polyurethan, polyvinylalkohol, polykaprolakton, polyakrylonitril*. [s.l.], 2009. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové . Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.
- ⁴ IHRACZKÁ, Jana. *Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 4. Polyethylentetrafluorethylen, polyamid 6/12, polyaramid, želatina*. [s.l.], 2009. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové . Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.
- ⁵ RŮŽIČKOVÁ, Jana. *Elektrostatické zvlákňování nanovláken. 2. nezměněné vyd.* Liberec : Technická univerzita v Liberci, v květnu 2006. 54 s. ISBN 80-7372-066-3.
- ⁶ KOMÁREK, Pavel, RABIŠKOVÁ, Miloslava, et al. *Technologie léků*. třetí, přepracované a doplněné vydání. Praha : Galén, 2006. 399 s. ISBN 8072624237.
- ⁷ SILL, Travis J., VON RECUM, Horst A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *ScienceDirect : Biomaterials* [online]. May 2008, vol. 29, is. 13 [cit. 2010-01-10], s. 1989-2006.
- ⁸ SOKOLSKY-PAPKOV, Mariana, et al. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *ScienceDirect : Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. May 2007, vol. 59, is. 4-5 [cit. 2010-01-10], s. 187-206.
- ⁹ BIONDI, Marco, et al. Controlled drug delivery in tissue engineering. *ScienceDirect : Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. January 2008, vol. 60, is. 2 [cit. 2010-01-10], s. 229-242.
- ¹⁰ CHUNG, Hyun J., PARK, Tae G. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *ScienceDirect : Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. May 2007, vol. 59, is. 4-5 [cit. 2010-01-10], s. 249-262.
- ¹¹ TOWNSEND-NICHOLSON, Andrea, JAYASINGHE, Suwan N. Cell electrospinning: a unique biotechnique for encapsulating living organism for generating aktive biological microthreads/scaffolds. *Biomacromolecules* [online]. December 2006, vol. 7, is. 12 [cit. 2010-01-10], s. 3364-3369.

-
- ¹² ZHANG, Y. Z., et al. Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly(epsilon-caprolactone) nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules* [online]. April 2006, vol. 7, is. 4 [cit. 2010-01-10], s. 1049-1057.
- ¹³ QI, Hongxu, et al. Encapsulation of drug reservoirs in fiber by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment. *Biomacromolecules* [online]. August 2006, vol. 7, is. 8 [cit. 2010-01-10], s. 2327-2330.
- ¹⁴ KENAWY, El-Refaie, et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *ScienceDirect : Journal of Controlled Release* [online]. May 2002, vol. 81, is. 1-2 [cit. 2010-01-10], s. 57-64.
- ¹⁵ KIM, Kwangsok, et al. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *ScienceDirect : Journal of Controlled Release* [online]. July 2004, vol. 98, is. 1 [cit. 2010-01-10], s. 47-56.
- ¹⁶ BÖLGEN, N., et al. In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. May 2007, vol. 81B, is. 2 [cit. 2010-01-10], s. 530-543.
- ¹⁷ XIE, Jingwei, WANG, Chi-Hwa. Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharmaceutical Research* [online]. August 2006, vol. 23, is. 8 [cit. 2010-01-10], s. 1817-1826.
- ¹⁸ XU, Xiuling, et al. BCNU-loaded PEG-PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against Glioma C6 cells. *ScienceDirect : Journal of Controlled Release* [online]. September 2006, vol. 114, is. 3 [cit. 2010-01-10], s. 307-316.
- ¹⁹ JIANG, Hongliang, et al. Modulation of protein release from biodegradable core-shell structured fibers prepared by coaxial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. October 2006, vol. 79, is. 1 [cit. 2010-01-10], s. 50-57.
- ²⁰ LIANG, Dehai, et al. In vitro non-viral gene delivery with nanofibrous scaffolds. *Nucleic Acids Research* [online]. November 2005, vol. 33, is. 19 [cit. 2010-01-10], s. 170.