

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

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**



**KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE**

**STUDIJNÍ OBOR: FARMACIE**

**Průnik nanočástic sublingvální membránou 3**  
**Permeation of Nanoparticles Across Sublingual Membrane 3**

**Michaela Šašurová**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, květen 2014



Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

-----

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Mgr. Pavlu Berkovi za konzultační činnost, rady, připomínky a čas, který věnoval mé práci a také Doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné zásahy a cenné poznatky.

Mé poděkování za spolupráci a zpestření chvílí v laboratoři patří v neposlední řadě také mé kamarádce a kolegyni Lence Horejšové.

# OBSAH

ABSTRAKT .....	3
ABSTRACT .....	4
1 ÚVOD .....	5
2 ZADÁNÍ PRÁCE.....	7
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Sublingvální podání.....	8
3.2 Anatomie dutiny ústní a její funkce .....	8
3.3 Lidský jazyk jako orgán .....	9
3.4 Sliny a slinné žlázy.....	10
3.5 Sublingvální podání léčiv .....	11
3.6 Nanočástice, nanotechnologie .....	13
3.7 Nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeon.....	19
3.8 Použité metody měření.....	19
3.8.1 Fluorescenční mikroskop.....	19
3.8.2 Stanovení velikosti částic metodou DLS.....	21
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
4.1 Suroviny a materiál .....	23
4.2 Přístroje .....	24
4.3 Zpracování biologického materiálu.....	24
4.4 Složení a příprava pufrů .....	25
4.5 Měření hodnoty pH disperze nanočástic .....	27
4.6 DLS stanovení velikosti nanočástic v disperzi.....	28

4.7	Desintegrace agregátů .....	29
4.8	Permeační pokusy.....	29
4.9	Příprava vzorků pro kalibraci.....	31
4.10	Stanovení nanočástic v kalibračních a permeačních vzorcích .....	33
4.11	Fluorescenční mikroskopie .....	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	34
5.1	Hodnoty pH nanočásticových disperzí.....	34
5.2	Velikost částic v disperzích měřená metodou DLS .....	35
5.2.1	Pozorování nanočásticových agregátů fluorescenčním mikroskopem.....	47
5.3	Kalibrační přímky.....	49
5.4	Zhodnocení permeačních pokusů.....	51
5.4.1	Tloušťky membrán .....	51
5.4.2	Srovnání metod fixace membrány – lepidlo vs silikon .....	52
5.5	Pozorování sublingválních membrán po permeacích fluorescenčním mikroskopem.....	57
6	ZÁVĚRY .....	63
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	64
8	LITERATURA.....	65
9	PŘÍLOHY.....	68

## ABSTRAKT

Teoretická část se zabývá popisem dutiny ústní, jazyka a slinných žláz z anatomického a fyziologického hlediska. Zachycuje problematiku sublingválního podávání léčiv. Přes stručnou historii oboru nanotechnologie se dostává k charakteristice nanočástic jako základních stavebních prvků nanostruktur. Popisuje výrobu a vlastnosti nanočástic, uvádí výhody použití nanočástic jako systému pro podávání léčiva, ale upozorňuje také na jejich možnou toxicitu. V závěru teoretické části jsou shrnuty a charakterizovány principy a metody měření použité při experimentech.

V experimentální části jsou popsány a vyhodnoceny permeační pokusy *in vitro*. V těchto permeacích byl sledován průnik nanočástic značených Chromeonem 470 přes prasečí sublingvální membránu o ploše 1 cm<sup>2</sup> z donorové fáze o pH 6,6 do fáze akceptorové o pH 7,4. Pro permeační pokusy byly použity čerstvé i dlouhodobě zmrazené sublingvální membrány fixované v difúzních Franzových celách vteřinovým lepidlem nebo silikonem. Před zahájením permeačních pokusů byla charakterizována velikost nanočástic pomocí metody dynamického rozptylu světla.

Bylo ověřeno, že dvě testované techniky fixace membrány v difúzní komůrce nemají statisticky významný vliv na množství proniklých nanočástic.

**Klíčová slova:** sublingvální podání, nanotechnologie, nanočástice, fluorescenční mikroskopie, Chromeon 470, *in vitro* permeace, Franzova komůrka

## **ABSTRACT**

The theoretical part describes anatomical and physiological aspects of the oral cavity, tongue and salivary glands. It captures the issue of sublingual administration of drugs. Through a brief history of nanotechnology it comes to characterize nanoparticles as basic building blocks of nanostructures. It describes the production and properties of nanoparticles, shows the advantages of using nanoparticles as a drug delivery system, but also point out their potential toxicity. At the end of the theoretical part principles and methods of measurement used in the experiments are summarized and characterized.

In the experimental part *in vitro* permeation experiments are described and evaluated. Permeation of nanoparticles marked Chromeon 470 through porcine sublingual membrane in area of 1 cm<sup>2</sup> from the donor phase of pH 6.6 to acceptor phase pH 7.4 was observed in these experiments. For the permeation experiments were used both fresh and long-term frozen sublingual membranes fixed in Franz diffusion cells with glue or silicone urease. Before starting the permeation experiments the size of nanoparticles or agglomerates were characterized using dynamic light scattering and by fluorescence microscopy.

It was verified that the two evaluated methods of fixing of membranes in diffusion cells have no statistically significant influence on the quantity of permeated nanoparticles.

**Keywords:** sublingual administration, nanotechnology, nanoparticles, fluorescence microscopy, Chromeon 470, *in vitro* permeation, Franz cell



# 1 ÚVOD

Nanočástice, jejich vytváření a manipulace s nimi, tedy nanotechnologie, bezpochyby představují jeden z nejbouřlivěji se rozvíjejících oborů lidské činnosti. Chceme – li v této oblasti úspěšně pracovat, musíme přijmout nová pravidla a zákonitosti odlišné oproti těm, na které jsme zvyklí z běžné experimentální praxe ve fyzice, chemii nebo biochemii. Charakteristickými znaky této oblasti lidské činnosti jsou víceoborovost a překrývání, případně úplné vymizení hranic mezi participujícími vědeckými odvětvími (1).

Nanotechnologie nalézá uplatnění v mnoha odvětvích a ani zdravotnické obory nejsou výjimkou. Pokrok při vývoji zařízení pracujících v oblasti nanometrů, intenzivní využívání nanomateriálů a výrobních nanotechnologií jsou slibnou perspektivou pro brzkou implementaci při vývoji léků i v lékařské praxi (2).

Rozvoj farmakokinetiky a biofarmacie v druhé polovině minulého století byl podnětem k vývoji nových lékových forem. V posledních přibližně padesáti letech je možné pozorovat ve farmaceutické technologii přechod od kusových lékových forem (např. tablet, tobolek) k vývoji násobných částicových forem (pelet, mikročástic, nanočástic).

Od nanočásticových forem se očekává především účinnější a bezpečnější farmakoterapie nádorových onemocnění, která spočívá v tom, že se léčivo lépe dostane do postižené tkáně nebo orgánu a bude tam efektivněji působit na zhoubné buňky, čímž se výrazně sníží jeho nežádoucí účinky na zdravou tkáň. Volbou metody přípravy a aktivizací povrchu částic je možné je nasměřovat na různé cíle. Očekává se od nich využití při řízeném transportu cytostatik, specifickém doručení antibiotik a antiparazitik do místa účinku, v perorálních lékových transportních systémech pro inzulin, proteiny, geny, pro vakcíny i při topické aplikaci. Lze očekávat, že nanočásticové lékové systémy najdou v terapii chorob své nezastupitelné postavení a částečně vytěsní dosud používané konvenční lékové formy, které s nimi nejsou srovnatelné ani z hlediska farmakokinetiky, ani z hlediska farmakodynamiky (3).

Na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové je studiu nanočástic věnována pozornost v posledních několika letech.

Předkládaná diplomová práce se zabývá fluorescenčně značenými nanočásticemi Chromeon 470 a jejich *in vitro* průnikem přes prasečí sublingvální membránu.

## 2 ZADÁNÍ PRÁCE

Základním zadáním experimentu této diplomové práce bylo realizovat a vyhodnotit dva bloky *in vitro* pokusů s cílem zjistit permeační schopnost nanočástic značených fluorescenčním barvivem Chromeon 470 přes prasečí sublingvální membránu.

Pro první blok *in vitro* pokusů použít dlouhodobě zmrazené prasečí sublingvální membrány, v druhém bloku pokusů pracovat s čerstvě vypreparovanými prasečími membránami.

Pro experimentální náplň práce byly zadány tyto úkoly:

1. Stanovit hodnoty pH disperzí nanočástic fluorescenčně značených Chromeonem.
2. Změřit velikost nanočástic, resp. aglomerátů zastoupených v disperzích metodou DLS.
3. Vyhodnotit agregační stav disperzí s nanočásticemi fluorescenční mikroskopií
4. Provést permeační experimenty a kvantifikovat výsledky permeačních pokusů s kofeinem a nanočásticemi.
5. Vyhodnotit vliv zmrazení sublingvální membrány oproti membráně nativní na tloušťku vzorků membrán.
6. Vyhodnotit vliv metody fixace sublingvální membrány v difúzní komůrce na permeační charakteristiky.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Sublingvální podání

Zevní prostředí je zdrojem minerálních látek, živin a dalších látek a také místem, kam jsou odstraňovány produkty metabolismu. Orgány, které se podílejí na přípravě potravy k přenesení (vstřebání) do krve a lymfy a na vlastním vstřebávání jsou sdruženy v trávicí ústrojí. Gastrointestinální trakt (GIT) je rozdělen na určité prostory, jimiž musí potrava projít, její zbytky jsou vyloučeny mimo tělo. Tyto prostory lze pro zjednodušení dělit na tyto části:

1. horní GIT (ústa, jícen, žaludek)
2. střední GIT (tenké střevo)
3. dolní GIT (tlusté střevo)
4. jako čtvrtá část jsou uváděny akcesorní orgány podílející se na funkci GIT, ale ležící mimo vlastní trávicí trubici – slinné žlázy, játra, pankreas (4).

V problematice sublingválního podávání léčiv hraje největší roli horní část gastrointestinálního traktu. Konkrétněji bude popsán především jazyk a slinné žlázy a jejich úloha v dutině ústní.

### 3.2 Anatomie dutiny ústní a její funkce

Dutina ústní (*cavum oris*) sahá od štěrbiny ústní (*rima oris*) až k zúžení na přechodu do hltanu, které se nazývá úžina hltanová (*isthmus faucium*). Dutina ústní je vpředu a zevně ohraničena rty (*labia oris*) a tvářemi (*buccae*); strop dutiny ústní tvoří patro (*palatum*). Spodinu úst vyztužuje *musculus (m.) mylohyoideus*, na jehož horní (ústní) ploše je *m. geniohyoideus* a na spodní ploše přední bříško *m. digastricus*. Na svalovém dnu ústním je sliznice. Uprostřed spodiny úst je jazyk (*lingua*), na který sliznice spodiny úst přechází. Zuby a dásněmi je vpředu a zevně oddělena předsíň dutiny ústní (*vestibulum oris*), za kterou je vlastní dutina ústní (5).

Vlastní dutina ústní (*cavum oris propria*) je uložena za oblouky zubními; patří do ní zuby (*dentes*), jazyk, patro, mandle patrová (*tonsilla palatina*) a slinné žlázy (*glandulae oris*). *Cavum oris* přechází úžinou hltanovou do hltanu (5).

Ústa jsou místem, kde se potrava dostává do prvního kontaktu s trávicím traktem. Probíhá zde její hrubé mechanické zpracování (žvýkání) a zároveň je chutí, čichem a dotykem získávána informace o jejích kvalitách. Mechanická příprava potravy spočívá v jejím rozměňování pomocí zubů a jazyka a tvorbě soust (*bolus*), která jsou obalována do ochranné vrstvy mucinu. Potrava se zde také částečně rozpouští ve slinách a začíná vyrovnávání její teploty s teplotou těla (4).

### 3.3 Lidský jazyk jako orgán

Jazyk (*lingua*) je protáhlý, svalnatý orgán, který vyplňuje skoro celou ústní dutinu. Přední dvě třetiny jazyka leží v dutině ústní a tvoří tak *pars oralis linguae* nebo *corpus linguae*, zadní třetina je masivnější, je postavena skoro vertikálně tvoří *pars pharyngae linguae* nebo také *radix linguae* (6).

Základem jazyka jsou příčně pruhované svaly kryté sliznicí. V rozsahu hřbetu a hrotu jazyka sliznice vybíhá v početné bradavky (*papillae linguales*). Epitelovou vrstvu sliznice tvoří vrstevnatý dlaždicovitý epitel, který na povrchu bradavek rohovatí a je z jazyka plynule stírán (6).

Na hřbetu a hrotu jazyka přítomné čtyři typy papil zvětšují povrch sliznice, zdrsňují jej. Některé papily jsou opatřeny chuťovými pohárky. Podslizniční vazivo je výrazněji vytvořeno pouze na spodní ploše jazyka. Díky tomu je zde sliznice dobře pohyblivá a prosvítají jí jazykové žíly. Na hřbetu jazyka naopak podslizniční vazivo zcela chybí a sliznice srůstá s tuhou vazivovou blánou obalující svaly jazyka, *aponeurosis linguae*. Sliznice je zde proto nepohyblivá. Pro sublingvální podání je významná (6).

Jazyk je orgánem chuti, jednoho z tradičních pěti lidských smyslů. Po desetiletí panovala shoda na názoru, že existují čtyři základní chuti: sladká, slaná, kyselá a hořká. V posledních letech vědci potvrdili ještě pátou chuť – umami, kterou v potravinách vytváří glutamát sodný. V současné době se navrhuje uznat ještě šestou chuť – tukovou (7). Často se uvádí, že například sladkou chuť vnímáme jen špičkou jazyka, slanou chuť jeho přední částí, hořkou chuť jeho zadní částí a kyselou chuť po stranách jazyka. Pravdou je, že všechny chutě vnímáme celou plochou jazyka, ale některé jeho části mohou být na určité typy chutí citlivější (8).

### 3.4 Sliny a slinné žlázy

Slinné žlázy úst jsou četné žlázy s vývody do dutiny ústní. Stavebně se odlišují drobné slinné žlázy, uložené jako tubulosní až tuboalveolární rozvětvené žlásky ve slizničním a podslizničním vazivu, a velké slinné žlázy, vysunuté jako kompaktní větší orgány dále od sliznice a ústící samostatnými velkými vývody na povrch sliznice. K velkým slinným žlázám patří žláza příušní (*glandula parotis*), žláza podčelistní (*glandula submandibularis*) a žláza podjazyková (*glandula sublingualis*). Žlázy jsou tvořeny aciny, na které navazují vsunuté vývody. Stěny acinů a vývodů jsou tvořeny jednovrstevným epitelem, jehož buňky jsou navzájem spojeny pomocí *tight junctions*. V buňkách acinů se nacházejí sekreční váčky. Do stromatu žláz vstupují nervová vlákna sympatiku a parasympatiku. Tkáň má poměrně bohaté cévní zásobení (4) (5).

**Sliny** jsou sekretem slinných žláz. Funkce slin je výsledkem jejich složení. Hlenovité látky (muciny) činí sousta kluzkými a tím umožňují jejich polykání, usnadňují pohyby při žvýkání a artikulaci. Součástí potravy se ve slinách zčásti rozpouštějí, což je předpokladem účinnosti chuťových podnětů a čištění úst a zubů. Sliny obsahují malé množství chloridu sodného, jsou hypotonické a jsou uzpůsobeny pro intermitentní oplachování chuťových receptorů během přijímání potravy. Enzym  $\alpha$ -amyláza (ptyalin) zahajuje trávení škrobů již v ústech.

Imunoglobulin A a lysozym slouží k imunitní obraně. Vysoký obsah hydrogenuhličitanů pufruje sliny na pH přibližně 7,0, které odpovídá optimálnímu pH pro amylázu, a mimoto umožňuje pufrvat polykanými slinami kyselou žaludeční šťávu, která se dostala do jícnu. Tuto úlohu má i značná sekrece slin, která předchází zvracení, při kterém by žaludeční kyselina mohla poškodit zubní sklovinu. Produkce slin výrazně souvisí s obsahem vody v těle, a proto při nedostatku vody vysychají ústa a hltan; to přispívá k pocitu žízně, která je důležitá pro bilanci tekutin v těle (9).

V závislosti na stupni stimulace je secernováno 0,1 až 4 mililitrů slin za minutu, což celkově odpovídá 0,5 – 1,5 litru slin denně. Tvorba slin probíhá ve dvou stupních. V acinech se tvoří primární slina, která má podobné elektrolytové složení jako plazma a je potom ve vývodných kanálcích modifikována v sekundární slinu a stává se tak hypotonickou. Sekrece slin (z 95% uskutečňována velkými slinnými žlázami) je spouštěna reflexně. Podněty jsou vůně a chuť potravin, mechanické doteky ústní sliznice, žvýkání i nevolnost. Důležité jsou také podmíněné reflexy. Sekreci slin tlumí spánek a dehydratace (9).

### **3.5 Sublingvální podání léčiv**

Sublingvální podání znamená umístění léčiva pod jazyk, odkud se spodní plochou jazyka a spodinou ústní dostává léčivo přímo do krve. Rozpuštěná látka rychle proniká do sítě kapilárních cév ve sliznici jazyka a následně je transportována obličejovými, vnitřními krčními a brachiocefalickými žilami do systémového oběhu. Absorpcí z dutiny ústní se léčivo vyhýbá jaternímu first - pass metabolismu, sublingvální podání má však mnoho dalších výhod (viz dále). Systémové podání léčiva sublingvální cestou vzniklo z požadavku poskytnout pacientovi okamžitý nástup farmakologického efektu podaného léčivého přípravku (10).

Absorpční potenciál ústní sliznice je ovlivněn schopností léčiva rozpouštět se v tucích a vodě ( $\log P$  2 až 4), permeabilitou roztoku, ionizačním potenciálem ( $pK_a > 2$  pro kyseliny a  $pK_a < 10$  pro báze), molekulovou hmotnostní látky ( $M_r$  menší

jak 500). Některé látky (např. glycerol trinitrát) se ukázaly být lépe absorbovatelné při snižování pH nosiče, zatímco s přechodem do zásaditějšího pH svoji schopnost absorpce snižovaly (10).

Hlavním mechanismem absorpce je pasivní difúze přes lipidní membránu; sublingvální plocha snadno absorbuje látky. Hnací silou je rozdíl koncentrací léčiva na obou stranách membrány. Jakmile koncentrační gradient vymizí, difúze ustává. Difúzí přes lipidní membránu pronikají lipofilní látky, zatímco látky hydrofilní jsou absorbovány skrz membránové kanálky naplněné vodou. Buňky ústního epitelu a pokožky jsou také schopné absorbovat látky endocytózou. Rychlost absorpce sublingvální cestou je asi 3 až 10krát rychlejší než při orálním podání, v rychlosti ji překoná pouze injekční a inhalační forma podávaného přípravku (10) (11).

Sublingvální podávání přípravků má mnoho výhod. Již zmíněná rychlost absorpce a okamžitý nástup účinku jsou hojně využívané v pohotovostních stavech, mnohdy zachraňujících lidský život (astma, infarkt myokardu). Vstřebáváním léčiva z dutiny ústní se účinná látka dostává přímo do systémového oběhu, vyhýbá se tak jaternímu first-pass metabolismu a také degradaci působením kyselého prostředí a enzymů ve střední části gastrointestinálního traktu. Pro dosažení požadovaného účinku stačí menší dávky podávaného léčiva, léčivo se rozpouští i bez zapíjení, pouze ve slinách. Pacient se vyvaruje bolesti spojené s injekčním podáním. Lze také snadno a rychle ukončit podávání podjazykového léku, např. po dosažení požadovaného účinku, dříve než při projevu nežádoucích účinků. Tato forma podávání je také snadno přístupná dětem, lidem, kteří nejsou schopni polknout tabletu nebo u nemocí s projevy zvracení (12).

Sublingvální cesta podání se nehodí pro látky, které mají nepříjemnou chuť. Během podání pacient nesmí jíst, pít, kouřit nebo mluvit. Toto místo není vhodné pro podání léčiv s prodlouženým uvolňováním, látek s nevhodným ionizačním potenciálem a větších objemů léčiv. K přerušení absorpce léčiva dochází při



spolknutí tablety či jejím vyjmutím z dutiny ústní, nehodí se tak pro nespolupracující pacienty nebo pacienty v bezvědomí (12).

Jedním z nejznámějších, běžně užívaných léčiv podávaných sublingválně je glycerol trinitrát – velmi efektivní, silný vasodilatátor při akutních srdečních obtížích. Poskytuje symptomatickou úlevu během jedné až dvou minut. Dobré výsledky při kontrole komorové srdeční frekvence vykazuje také sublingválně podávaný verapamil – antagonist vápníkových kanálů předepisovaný při hypertenzi či supraventrikulární arytmií. Uspokojivé sublingvální absorpce bylo dosaženo také u deoxykortizonu acetátu, morfinu, kaptoprilu, nifedipinu a 17  $\beta$ -estradiolu. Výzkum prokázal, že sublingvální podání 17  $\beta$ -estradiolu vyžaduje pouze čtvrtinu dávky podávané orálně. V případě, že je asenapin – antipsychotikum používané k léčbě schizofrenie a bipolární poruchy – podáván sublingválně, dosahuje jeho biologická dostupnost až 35 procent, zatímco při orálním podání pouze méně jak 2 procenta. Vhodnou volbou pro pacienty s cystickou fibrózou je imunosupresivum takrolimus, který poskytuje jisté farmakokinetické výhody při sublingválním podání – rychlá absorpce, dobrá permeabilita, dostatečná biodostupnost. Další možností, v dnešní době populární je substituční nikotinová terapie. Sublingvální nikotinové preparáty se staly vhodnou alternativou při odvykání kouření (10) (11).

Přípravky pro sublingvální podání však nejsou dostupné pouze ve formě rychle rozpustných tablet. Využívá se také tenkých hydrofilních filmů vyráběných z polymerů, sprejů, pastilek, lízátek, žvýkacích gum, past a ústních vod. Na trhu jsou takové formy sublingválních přípravků, které jsou vhodné jak pro malé děti, tak pro starší pacienty a také pro pacienty s polykacími obtížemi (13).

### **3.6 Nanočástice, nanotechnologie**

Slovo „nano“ pochází z řečtiny a znamená malost, vzdáleněji trpaslík. Jako nanotechnologie se obecně označuje obor vědy, výzkumu a vývoje, který se zabývá cíleným vytvářením a využíváním struktur materiálů v měřítku několika nanometrů alespoň v jednom rozměru (0,1 nm až 100 nm). Konstrukčními prvky

nanotechnologie jsou molekuly i samotné atomy. Nanotechnologie zahrnují oblasti vědy a technologie, jejichž cílem je přesné ovládnání jednotlivých atomů a molekul tak, aby vznikl objekt nebo struktura s novými vlastnostmi (elektrickými, optickými, fyzikálními apod.), které lze pochopit a ovládnout (14) (15).

Prvním průkopníkem této vědní disciplíny byl americký vědec a nositel Nobelovy ceny za fyziku Richard Philips Feynman. Ve své přednášce *There's Plenty of Room at the Bottom* zmínil v roce 1959 možnost manipulace s molekulami a atomy. Tehdy nazýval tento obor mikrotechnologií. Termín nanotechnologie se objevil později v roce 1974. Japonský fyzik Taniguchi jím označil novou měřicí metodu, která umožňovala výrobu součástek s přesností na nanometry. V 70. letech na tyto myšlenky navázal americký fyzik K. E. Drexler, který ve svém článku o molekulárním inženýrství navrhl využít proteiny jako základní stavební kameny. Současně upozornil na pozitivní i negativní stránky molekulární nanotechnologie (16).

Jedním z nejvýznamnějších objevů 80. let se staly přístroje na pozorování a manipulaci s atomy a molekulami, konkrétně rastrovací tunelový mikroskop a mikroskop atomárních sil. Pokrok stále pokračoval, od výroby čipů velké integrace s rozměry 100 nm, přes obrábění povrchů s přesností na nanometry, až po využití nanostruktur v medicíně a biotechnologiích (16).

**Nanočástice** jsou základním stavebním prvkem nanostruktur. Jsou charakterizovány velikostí od 1 do 100 nm alespoň v jednom směru, a určitým prostorovým uspořádáním. Zatímco atomy jsou menší než nanometr (do jednoho nanometru se „vejde“ asi šest atomů uhlíku či deset atomů vodíku), velikost většiny molekul, tj. skupin atomů poutaných chemickou vazbou, sahá od nanometru výše. Některé molekuly jsou tedy nanostrukturami. Mohou obsahovat desítky až stovky atomů. Nanočástice mohou vytvářet nanodrátky, nanotrubičky, nanokompozity, keramické nebo jiné tenké filmy nebo vrstvy (17) (18).

Významnou charakteristikou je obrovský nárůst poměru plochy povrchu k objemu částic nanomateriálu. Tento poměr velmi silně ovlivňuje většinu

chemických a fyzikálních vazeb na hranicích částic v materiálu. Rozdílné jsou také vazby nanočástic se základní hmotou kompozitních materiálů (18).

V uplynulých dvaceti letech se zjistilo, že nanočástice mají celou řadu jiných užitečných vlastností, než jen ty, které jsou dány jejich chemickým složením. Tyto vlastnosti se mohou zásadně lišit od předpokládaného chemického nebo fyzikálního chování ve srovnání s podobnými materiály, složenými ze struktur větší velikosti. U nanočástic a nanomateriálů byly pozorovány změny mechanických vlastností, a to pevnosti (např. uhlíkové nanotrubičky jsou stokrát pevnější než ocel, ale šestkrát lehčí), tvrdosti (nanočástice používané v metalurgii jsou zodpovědné za zvyšování tvrdosti a životnosti kovů), tažnosti, superplasticity apod. Dochází ke změnám vlastností magnetických, elektrických, optických (např. oblast, ve které dochází k maximální absorpci fotonů, se liší pro různě velké částice, a proto se v závislosti na velikosti mohou částičky zlata jevit jako červené, modré nebo zlaté) a řady dalších. Tyto změny vlastností jsou důsledkem charakteristicky malé velikosti nanostruktur, případně vyplývají z jejich vysoké uspořádanosti či prostorové orientace (17) (18) (19).

Bylo také zjištěno, že změny v teplotách tání kovů jsou funkcí velikosti jejich částic. S klesající velikostí částic dochází k poklesu bodu tání až o několik set stupňů (například rozdíl v teplotě tání zlata v kompaktním stavu a ve formě nanočástic o velikosti 2 nm je 1000 stupňů) (17) (18) (19).

Principiálně existují dva základní rozdílné **způsoby výroby nanočástic**. Prvním je dezintegrace chemické sloučeniny nebo přírodní suroviny mechanickým dělením agregátů. Druhý způsob spočívá v tvorbě chemické sloučeniny o malé velikosti částic nukleací a růstem zárodku. Jinými slovy nanočástice vznikají principem zmenšování, „top-down“ (odshora dolů) nebo zvětšování, bottom-up (odzdola nahoru). První postup výroby se někdy označuje jako fyzikální, druhý jako chemický. Společnou snahou obou postupů je kontrolovaně vytvářet nanočástice a nanostruktury stejného tvaru a velikosti (19).

V současnosti převládají výrobní postupy „top-down“. Podle některých zdrojů je mnohem snadnější možnost přípravy nanočástic metodou „bottom-up“ (20) (21). Současné top-down technologie pracují na dolní hranici v rozměrech 10 nm až 100 nm (19).

Výrobní postupy bottom-up začínají se stavbou funkčního nanostrukturního celku u nejmenších částic hmoty, u jednotlivých atomů a molekul. Z nich se skládají součásti, které tvoří další složky komplikovanějších systémů. Metody bottom-up se přirozeně uplatňují v přírodě při vytváření biologických struktur, dosažená velikost se dnes pohybuje pouze v rozmezí asi 2 až 10 nm. Využívají kontrolované chemické reakce a jsou proto levnější než metody litografické. Často se také využívá přirozené schopnosti jednotlivých složek vzájemně se rozpoznávat, strukturovat, samosestavovat a samoorganizovat. Umožňují přípravu velmi malých částic, které jsou jen stěží dostupné rozdrobňovacími metodami (19).

**Stabilita nanočástic** je velmi důležitá a nezbytná ve vztahu k jejich dalšímu využití. Z hlediska své velikosti jsou nanočástice podskupinou koloidních částic. Pro komerční použití jsou k dispozici jak v podobě prášků, tak z nich připravených aplikačních suspenzí, resp. disperzí nanočástic. Suspenze bývají vodné, lihové, případně na bázi jiných organických rozpouštědel (18) (21).

Stabilitu nanočástic v disperzích ovlivňuje několik faktorů, například stupeň disperzity, koncentrace disperzích částic či disperzní prostředí. Pojmem stabilita lze označit schopnost disperzních soustav bránit se průběhu procesů vedoucích ke změně jejich struktury, stupně disperzity či charakteru rozdělení částic podle rozměrů (22).

Lze rozlišovat mezi sedimentační a agregátní stálostí. Sedimentační stálost představuje stabilitu soustavy vůči snížení potenciální energie částic disperzní fáze při jejich sedimentaci působením gravitační síly. Agregátní stálost představuje schopnost soustavy klást odpor procesům, které vedou ke snížení povrchové energie rozhraní částic disperzní fáze s disperzním prostředím. Jako procesy

vedoucí ke snížení povrchové energie mezifázových rozhraní se uplatňuje koalescence (srůstání částic), koagulace (agregace částic) a tzv. Ostwaldovo zrání. Při koalescenci je celkové snížení povrchové energie způsobeno zmenšením plochy fázového rozhraní. Při koagulaci, zejména v těch případech, kdy mezi částicemi zůstávají zbytkové mezivrstvy disperzního prostředí, dochází ke zmenšování velikosti povrchové energie v důsledku částečného nasycení nevykompenzovaných molekulárních sil na povrchu částic. Ostwaldovo zrání je zapříčiněno tím, že při velkém zakřivení fázového rozhraní je rozpustnost velmi malých částic značně větší než rozpustnost částic větších. Jestliže tedy budou v systému přítomny částice různých velikostí, pak malé částice budou mít tendenci se rozpouštět, což zároveň bude podporovat růst částic větších. Díky tomuto jevu se distribuce velikosti částic během jejich růstu zužuje (21).

Na rozdíl od pravých roztoků jsou koloidní systémy agregátně nestálé a koloidně dispergovaná látka se poměrně snadno vylučuje z roztoku už působením nepatrných vnějších vlivů. V koloidním systému se pak vytváří sraženina, která je agregátem původních částic. Koloidní soustavy mají značně rozdílnou agregátní stálost, některé vydrží pouze několik sekund, jiné mohou existovat déle. K vlivům způsobujícím agregaci řadíme ohřívání, zmrazování, intenzivní míchání či přidávání elektrolytů do koloidní soustavy. Účinným stabilizačním faktorem koloidních částic je strukturně mechanická bariéra, která souvisí s tvorbou adsorpčních vrstev nízkomolekulárních či vysokomolekulárních povrchově aktivních látek (deriváty celulosy, glykosidy, bílkoviny, a další, tzv. ochranné koloidy) na fázovém rozhraní. Tyto látky lyofilizují povrch a jsou tímto schopné zajistit vysokou stabilitu částic disperzní fáze vůči agregaci (21).

**Výhody** použití nanočástic k podávání léčiva jsou spojeny s rozmanitými cestami podání včetně orálního, nosního, nitroočního, injekčního atd. Nanočástice jsou schopny vázat látky uvnitř sebe i na svou vnější strukturu (hydrofilní i hydrofobní) a přitom nepřijít o svoje výhodné vlastnosti. Mohou pronikat do tkání a materiálů, kam se částice jiných rozměrů nedostanou. Toho je využíváno jak pro pasivní, tak aktivní cílení léčiv. Nanočástice mohou kontrolovat a napomáhat

uvolňování léčiva během transportu a zacílení (targeting). Může být pozměněna také distribuce a následná clearance nanočásticových léčiv z těla, a tím může být dosaženo zvýšení terapeutické účinnosti léku a snížení vedlejších účinků. Nanočástice mohou sloužit jako nosiče pro transport některých obtížně vstřebatelných léčiv (perorálně podaný heparin, inzulin, hormony) do míst pro ně absorpčně přijatelnějších nebo mohou léčivou látku dopravit do cíle jejího terapeutického působení. Léky proteinového či peptidového charakteru, zabudované v nanočásticích, jsou chráněny před degradací enzymy a lépe procházejí přes membrány. Důležité je, že peptidy, polysacharidy a glykoproteiny jsou pomaleji degradovány, než když jsou volně v roztoku (3) (23).

Vyplnit informační deficit o zdravotních rizicích v nanotechnologiích se snaží obor **nanotoxikologie**. Je zatím v začátcích a je považován i za brzdu rozvoje. Jsou-li ovšem nové formy jinak často netoxických látek uváděny do životního prostředí ve velkém množství, je třeba se komplexně zajímat o důsledky těchto aktivit. Často se ukazuje, že změna tvaru, velikosti nebo dalších vlastností chemicky identických nanočástic má zásadní vliv na jejich toxicitu. Nanočástice se od částic větších rozměrů liší především schopností snadno pronikat do lidského organismu, do řady tkání, včetně mozku, ale někdy i přes buněčnou membránu (24).

Těchto unikátních vlastností lze úspěšně využívat v různých vědních oblastech, například v biomedicíně či farmakologii, ale nese to s sebou i jistá rizika spojená s některými toxickými účinky, např. oxidační poškození biologicky důležitých molekul (DNA, RNA, proteiny, lipidy) (24).

Při studiu nežádoucích účinků nanomateriálů jsou v popředí zájmu zejména kardiovaskulární, neurodegenerativní a karcinogenní účinky či vliv na imunitu. Téměř každý používá produkt, který se dotkl nanotechnologie, je tedy možné, že případné dopady na zdraví mohou být velkého rozsahu. Nevýhodou použití nanočástic jsou vyšší výrobní náklady produktů a dostupnost technického zázemí potřebného pro jejich výrobu. Přesto je využití nanotechnologií a nanomateriálů velmi rozsáhlé (25).

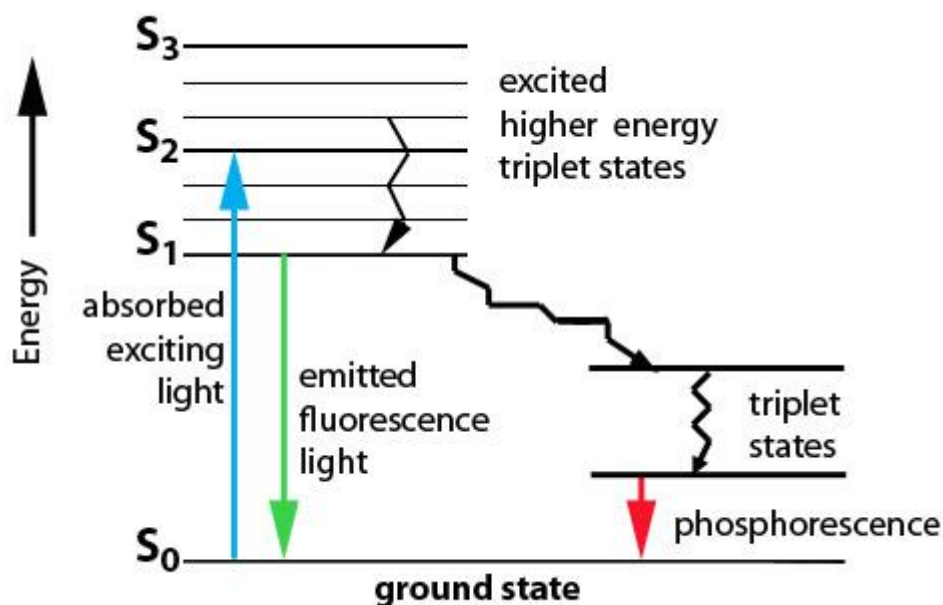
### **3.7 Nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeon**

Jsou tvořeny polymerem označovaným bez další specifikace jako polymer PD. Dodavatel o něm poskytuje informaci, že jde o nový polymer, který je odolnější vůči kyslíku a je fotostabilnější oproti latexovým (polystyrenovým) částicím. PD nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeon využívají novou formu zesíťovaného polymeru k zapouzdření tohoto barviva o vysoké intenzitě fluorescence, čímž umožňují měření s vyšší citlivostí. Tyto fluorescenčně značené nanočástice jsou vhodné ke značení proteinů a k detekci reakcí antigen-protilátka. Uchovávají se při teplotě 2 °C až 8°C (26).

### **3.8 Použité metody měření**

#### **3.8.1 Fluorescenční mikroskop**

Ve většině nově vyvinutých mikroskopických technik se využívá fluorescence. Fluorescenci molekul můžeme schematicky ilustrovat na Jablonského diagramu (obr. 1). Ve fluorescenční mikroskopii se využívá kratších vlnových délek v oblasti ultrafialového (UV) záření, kdy látka v základním stavu, ground state, absorbuje světelné paprsky, absorbed exciting light, a emituje viditelné světlo delších vlnových délek, emitted fluorescence light, které je pak pozorovatelné světelným mikroskopem. Dochází k ozáření atomu, kde za normálních okolností obíhají elektrony kolem jádra ve vrstvách (orbitalech) s určitými energetickými hladinami  $S_1$ ,  $S_2$  a  $S_3$ . Při excitaci elektrony absorbují energii a jsou vybuzeny do vyšší energetické hladiny, kde jsou ale nestabilní a vracejí se zpět do základního stavu. Přesun elektronu z vyšší energetické hladiny do nižší je doprovázen vyzářením fotonu (27) (28).



Obr. 1 – Jablonského diagram (29)

Pro fluorescenční zobrazení je třeba mít k dispozici:

- 1) Fluorescenční barvivo (fluorofor, fluorochrom), látku schopnou po ozáření světlem určité vlnové délky absorbovat část světelné energie a uvolňovat světlo o delší vlnové délce. Struktury obsahující fluorochromy září v obraze fluorescenčního mikroskopu v různých barvách na temném pozadí.
- 2) Světelný zdroj, který musí emitovat dostatečně intenzivní záření v ultrafialové a viditelné oblasti. Nejčastěji se používají vysokotlaké rtuťové výbojky, xenonové výbojky a halogenové žárovky.
- 3) Soustavu filtrů seřazených do speciální „filtrové kostky“, kde excitační filtr propouští pouze světlo, které je potřebné k excitaci fluorochromu, ostatní světlo pohlcuje. Další filtr – dichroické zrcadlo – slouží k oddělení excitačního a fluorescenčního (emitovaného) světla. Umístí-li se do optické dráhy v úhlu 45°, kratší vlnové délky odráží a delší jím prochází. Jeho hlavní předností je velká efektivita oddělení excitačního a fluorescenčního světla. Účinnost odrazu excitačního světla je více než 90 % a účinnost průchodu fluorescenčního světla je



také větší než 90 %. Celková účinnost oddělení je tedy větší než 80 %. Poslední filtr – bariérový – propouští pouze fluorescenční (emitované) světlo, čímž poskytuje černé pozadí k fluorescenčnímu obrazu. Navíc umožňuje z fluorescenčního spektra nechat projít pouze jeho část. Vhodná kombinace dichroického zrcadla, excitačního a emisního filtru pro použitý druh fluorochromu je základem úspěšného pozorování fluorescenčním mikroskopem nebo mikroskopem s epifluorescenčním nástavcem (27).

Standardní součástí fluorescenční mikroskopie je využití software pro obrazovou analýzu, který umožňuje zpracovávat obrazový výstup kvantitativním i kvalitativním způsobem (27).

### **3.8.2 Stanovení velikosti částic metodou DLS.**

Dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering – DLS) je rovněž znám jako fotonová korelační spektroskopie nebo též kvazielastický rozptyl světla. Metoda slouží ke stanovení velikosti částic v nesedimentujících koloidních disperzích. Zetasizer Nano ZS je světově nejrozšířenější přístrojový systém. Používá se pro měření velikosti, elektroforetické pohyblivosti proteinů, zeta potenciálu koloidů a nanočástic, případně měření mobility proteinu a mikroreologie bílkovin a polymerních roztoků (30) (31).

Zetasizer využívá jako budící zdroj světla červený laser o vlnové délce 633 nm. Tímto laserem je osvětlen vzorek. Principem metody je měření fluktuací intenzity světla rozptýleného molekulami/částicemi vzorku v průběhu času. Při rozptylu světla molekulou se rozptýlí jen část dopadajícího světla. Kdyby byla molekula stacionární, množství rozptýleného světla by bylo konstantní, ale jelikož všechny molekuly v roztoku difundují Brownovým pohybem vzhledem k detektoru, existují interference (pozitivní nebo negativní), které způsobují změny intenzity. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Rychlost těchto změn je tudíž přímo závislá na pohybu molekuly. Fluktuace intenzity rozptýleného světla molekul v principu ovlivňují následující

faktory: teplota – čím vyšší je teplota, tím rychleji se molekuly pohybují; viskozita rozpouštědla – čím vyšší je viskozita rozpouštědla, tím pomaleji se molekuly pohybují; velikost molekul – čím větší jsou molekuly, tím pomaleji se pohybují (30) (31) (32).

Před vlastním měřením se musí provést základní nastavení programu přístroje. Nastavuje se druh média, v kterém je rozptýlen měřený vzorek a vhodný materiál nejbližší svými vlastnostmi zkoumanému vzorku (index lomu, absorpce záření). Po určitou dobu probíhá temperace vzorku, aby bylo dosaženo požadované konstantní teploty, za které bude probíhat samotné měření (31).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Suroviny a materiál

Název suroviny	Výrobce (nebo dodavatel)
Prasečí jazyk	Skaličan a. s., Česká Skalice, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 470 marked, karboxylované	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Nano beads based on PD, Chromeon 545 marked	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Nano beads based on polyacrylonitrile, Chromeon 470 marked, karboxylované	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Aqua purificata, Čištěná voda	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Aqua purificata, Ultračistá voda	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Orion application solution pH 7.00 Buffer	Thermo electron Co., Waltham, MA, USA
Orion application solution pH 10.01 Buffer	Thermo electron Co. Waltham, MA, USA
Dinatrii phosphas dodecahydricus	Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové, ČR
Natrii dihydrogenophosphas dihydricus	Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové, ČR
Natrii chloridum	Penta Ing. Petr Švec, Praha, ČR
Carbaethopendecinii bromidum	Slovakofarma a.s., Hlohovec, SR

Všechny suroviny byly podle deklarácí výrobců a dodavatelů kvality lékopisné nebo vyšší. Čištěná voda a voda pro HPLC (filtrace Millipore) pochází z centrální přípravný na FaF UK a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

Z dalších materiálů a pomůcek, kromě běžného laboratorního vybavení, bylo využito kyanoakrylátové lepidlo PowerFix CA střední a silikon Lukosan.

## 4.2 Přístroje

Typ přístroje	Výrobce
Předvážky Kern 440-45N	Kern ande Sohn, Balingen, SNR
Analytické váhy PIONEER TM PA 430	Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
Magn. míchačka, Fisher Scientific 408 N	Fisher Scientific, Pardubice, ČR
Digitální pH-metr GRYF 209L	Elektr. přístroje, Havlíčkův Brod, ČR
Lednička s mrazničkou Frigera D118702	Liebherr, Ochsenhausen, SNR
DLS – Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd, VB
Termostatovaná vodní lázeň Grant JB 5	Grant Co., VB
Vícemístné ponorné míchadlo	Variomag Telesystem, SNR
Fluores. mikroskop, OLYMPUS BX 51	Olympus, Tokyo, Japonsko
Absolute Digimatic Indicator ID-S1012B	Mitutoyo America Co., IL, USA

Sestava pro fluorescenční mikroskop typ OLYMPUS BX 51 se skládá ze světelného zdroje OLYMPUS U-RFL - T, rtuťové lampy model U - LH 100 H GAPO, WIB filtru U-MWIB 3 a digitální kamery OLYMPUS DP 72. V tomto případě dochází k excitaci při vlnové délce 460 - 495 nm.

## 4.3 Zpracování biologického materiálu

Jako modelové membrány pro permeační pokusy byly použity sublingvální membrány z prasečích jazyků, protože jsou morfologicky velmi podobné

sublingvální membráně lidského jazyka. Modelový materiál byl získán z prasete domácího (*Sus scrofa*, v. *domestica*).

Preparace samotné prasečí sublingvální membrány byla provedena v několika následných krocích. Nejprve byl oddělen celý jazyk od ostatních částí ústní dutiny. Poté byla odstraněna většina svaloviny jazyka. Nakonec, pomocí skalpelu a důkladné práce, byla membrána očištěna a zbavena zbytků svaloviny. Proříznuté, protržené nebo jakkoliv jinak viditelně poškozené membrány nebyly v permeačních pokusech použity. Očištěné sublingvální membrány byly pro aktuální použití v pokusech uloženy a uchovávány ve fyziologickém roztoku.

Pro první permeační pokus byly použity sublingvální membrány z prasečích jazyků, které byly dlouhodobě zmrazeny (29. 11. 2012) a uchovávány po celou dobu v mrazničce v polyethylenové folii. Dne 12. 6. 2013 byly tyto membrány rozmrazeny ponořením na cca 5 minut do destilované vody temperované na 37°C a rozřezány na čtverce vhodné velikosti cca 15 minut před sestavením permeačních cel. Pomocí mikrometru Mitutoyo byly orientačně změřeny tloušťky několika nařezaných membrán.

Pro druhý permeační pokus, který byl uskutečněn 19. 6. 2013, byly použity čerstvě vypreparované membrány, které byly rozřezány na části vhodné velikosti jako při prvním experimentu, a také u nich byla změřena tloušťka mikrometrem.

#### **4.4 Složení a příprava pufrů**

**Kalibrace pH – metru.** Před přípravou fosfátových pufrů dle Sørensenů o pH 7,4 a pH 6,6 byla provedena kalibrace pH – metru Gryf 209 L, vybaveného elektrodou THETA '90 (bev), typ HC 113. Ke kalibraci byly použity dva pufrů, jeden o pH 10,0, druhý o pH 7,0.

### Složení fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 7,4

Surovina	Množství (g)
Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	2,1
Dinatrii phosphas dodecahydricus	19,1
Natrii chloratum	4,4
Aqua purificata	ad 1000,0 ml

### Příprava fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 7,4

1. V kádince s 500 ml vody byla rozpuštěna daná množství dihydrogenfosforečnanu sodného a chloridu sodného za použití míchačky. Přičemž chlorid sodný byl přidán k dihydrogenfosforečnanu sodnému.
2. Hydrogenfosforečnan sodný byl rozpuštěn ve 400 ml vody.
3. Do roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného byl postupně doléván roztok hydrogenfosforečnanu, dokud pomocí pH-metru nebylo dosaženo požadovaného pH. Po dosažení dané hodnoty pH byl vzniklý roztok doplněn vodou na 1 000 ml.
4. Pufr byl převeden do odměrné baňky. Odměrná baňka s připraveným pufrům byla uzavřena parafilmem, aby se předešlo vniknutí nečistot do pufru a byla uchovávána v ledničce při teplotě 2°C – 6°C bez přístupu světla.

### Složení fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 6,6

Surovina	Množství (g)
Natrii dihydrogenphosphas dihydricus	6,2
Dinatrii phosphas dodecahydricus	9,5
Natrii chloratum	4,9
Aqua purificata	ad 1000,0 ml

**Příprava** byla provedena stejným způsobem jako fosfátový pufr dle Sörensena o pH 7,4.

Oba pufrы byly zhotoveny také ve **zředěné** verzi a to způsobem: 1 díl pufru námi již připraveného dle rozpisu výše byl smíchán s 9 díly vody (čištěná voda). Pro další použití tak byly nachystány pufrы o pH 7,4 a 6,6, zředěné v poměru 1:9. Jejich uchovávání bylo totožné jako u pufrů neředěných.

**Příprava** fosfátových pufrů se surfaktantem

Při přípravě se využívalo již připravených fosfátových pufrů dle Sörensena o pH 6,6 a pH 7,4. Bylo pouze rozpuštěno 0,1 g Carbaethopendecinii bromidum ve 100 ml fosfátového pufru. Toto rozpuštění surfaktantu bylo provedeno jak ve fosfátovém pufru o pH 6,6, tak v pufru o pH 7,4.

Zároveň byly připraveny také **ředěné fosfátové pufrы se surfaktantem**. Vycházelo se z ředěných variant fosfátových pufrů dle Sörensena o pH 6,6 a pH 7,4. Navážka 0,1 g Carbaethopendecinii bromidum byla rozpuštěna ve 100 ml pufru ředěného 1:9 čištěnou vodou. Z připraveného roztoku bylo odebráno 25 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno ředěným pufrém po značku. Výsledný pufr byl následně zfiltrován přes jednorázový PTFE filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ . Ten samý postup byl proveden s ředěným fosfátovým pufrém o pH 6,6 i s pufrém o pH 7,4. Oba ředěné pufrы se surfaktantem byly skladovány v odměrných baňkách v lednici při teplotě 2°C až 6°C, uzavřeny parafilmem a chráněny před světlem.

#### **4.5 Měření hodnoty pH disperze nanočástic**

Měrná elektroda pH-metru pro stanovení příslušné hodnoty pH nanočástic byla ponořena do celých vzorků disperzí nanočástic. Před každým ponořením do disperzí nanočástic byla měrná elektroda opláchnuta destilovanou vodou a lehce osušena buničinou. Před měřením byla provedena kalibrace pH-metru pomocí pufrů o pH 7,00 a pH 10,01.

Měření hodnoty pH bylo provedeno u šesti vzorků (pracovně označovaných A – F) disperzí nanočástic (Sigma-Aldrich, Praha). Vzorky A a B byly stejné šarže a obsahovaly nanočástice založené na polymeru PD, značené Chromeonem 470. Vzorky C a D se rovněž zakládaly na polymeru PD a byly značené Chromeonem 470, ale byly karboxylované. Šarže u vzorků C a D nebyla totožná, vzorku C bylo velmi malé množství a měření pH se provádělo velmi obtížně. Vzorek E obsahoval karboxylované nanočástice založené na polyakrylonitrilu (PAN), fluorescenčním barvivem byl Chromeon 470. Vzorek F tvořila disperze nanočástic také založených na PD polymeru, ale nanočástice byly značené Chromeonem 545.

#### **4.6 DLS stanovení velikosti nanočástic v disperzi**

Velikost nanočástic v disperzích byla změřena přístrojem Zetasizer Nano ZS metodou laserové difrakce. Dané množství nanočásticové disperze bylo rozptýleno ve stanoveném médiu přímo v kyvetě určené k měření. Jako médium byla zvolena čištěná voda, fosfátový pufr připravený dle Sørensenova o pH 6,6 a rovněž o pH 7,4, jejich ředěné varianty (fosfátové pufrы ředěné 1:9), fosfátové pufrы se surfaktantem a jejich ředěné varianty.

Všechna média byla před použitím přefiltrována přes jednorázový PTFE filtr (velikost pórů - 0,22  $\mu\text{m}$ ). Vzorky byly připravovány pipetováním a opatrným protřepáním v kyvetě těsně před vlastním měřením. Každý vzorek se v přístroji po určité době temperoval na teplotu 25°C.

Jako disperzní prostředí byla v softwaru DTS nastavena voda a jako materiál byl nastaven polystyrénový latex. Měření bylo prováděno u vzorků A – F (**viz oddíl 4.5**).



### Složení vzorků pro DLS:

Vzorek	Disperze nanočástic	Médium ad 1 ml
1.	20 $\mu$ l	Čištěná voda
2.	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr (pH 6,6 a 7,4)
3.	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr ředěný 1:9 (pH 6,6 a 7,4)
4.	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr se surfaktantem (pH 6,6 a 7,4)
5.	20 $\mu$ l	Fosfátový pufr se surfaktantem ředěný (pH 6,6 a 7,4)

#### 4.7 Desintegrace agregátů

Po úvodním zjištění, že shlukování nanočástic probíhá ve fosfátových pufrách o pH 6,6 a 7,4, bylo dále prováděno měření s fosfátovými pufrů ředěnými 1:9 čištěnou vodou. Vyzkoušeno bylo také přidání povrchově aktivního surfaktantu (Carbaethopendecini bromidum) k fosfátovým pufrům ředěným i neředěným se zamýšleným snížením mezifázové energie.

#### 4.8 Permeační pokusy

K permeačním pokusům byly využívány modifikované Franzovy difúzní cely (viz obr. 2). Kompletní sestavu cely tvoří dvě plexiskla s kulatým otvorem ve středu (otvory mají velikost 1 cm<sup>2</sup>) fixované k sobě pomocí malých dřivek, spodní část vhodná k plnění a naplnění akceptorovou fází a část vrchní sloužící k uchycení gumiček pro celkovou celistvost cely a k nanášení donorové fáze.

Vypreparované sublingvální membrány nařezané na čtverce potřebné velikosti



Obr. 2 – Modifikovaná Franzova cela

byly opatrně umístěny mezi plexiskla se středovým otvorem, tak aby zůstaly napnuté a nepoškozené. K uchycení membrán mezi plexiskly bylo použito vteřinové kyanoakrylátové lepidlo PowerFix CA střední (1.–4. cela obou permeačních pokusů) a silikon Lukosan (cela 5.–12. obou permeačních pokusů).

Do spodní části každé Franzovy cely bylo ještě před uzavřením sestavy vloženo magnetické míchadlo. Po kompletním sestavení byly spodní části cel naplněny akceptorovým pufrem

(fosfátový pufr dle Sørensenů o pH 7,4, ředěný 1:9) pomocí injekční stříkačky o objemu 20 ml.

Přebytky pufrů v injekční stříkačce, které již nebylo možné doplnit do spodní části cel, byly přeneseny do kalibrovaných zkumavek, ze kterých bylo možné odečíst přesný objem akceptorového pufru naplněného do spodní části cely.

Takto připravené difúzní cely byly umístěny do předem nachystané vodní lázně vytemperované na  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kde byly ponechány přibližně hodinu pro dosažení ustálené teploty lázně. Po hodinové temperaci cel ve vodní lázni následovalo nanesení 200  $\mu\text{l}$  donorové fáze mikropipetou na membránu přesně do prostoru vymezeného středovým otvorem v plexiskle. Jako donorová fáze byl vybrán fosfátový pufr o pH 6,6 připravený dle Sørensenů, ředěný v poměru 1:9 a pufr citrátový, oba s přidavkem kofeinu (0,25 g kofeinu na 50 ml pufru) jako markeru membránové integrity. V obou pufrech byly rozptýleny nanočástice vzorku A (Nanobeads based on PD, Chromeon 470 marked).

Konkrétní složení donorových pufrů bylo následující:

- 1) 1 600  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru pH 6,6, ředěného 1:9 s 0,5% kofeinu + 400  $\mu\text{l}$  nanočástic PD značených Chromeonem 470 a

2) 800 µl citrátového pufru s 0,5% kofeinu + 200 µl nanočástic PD značených Chromeonem 470.

Nanočástice rozptýlené ve fosfátovém pufru byly pipetovány v množství 200 µl do 1. až do 8. Franzovy cely, nanočástice v citrátovém pufru byly nanášeny do cely 9 – 12 ve stejném množství (200 µl). Po nanesení donorové fáze na povrch membrány uzavřené do Franzovy cely byla úplnost sestavy doplněna o vložení krycího sklíčka na vrchní plexisklo, vzorku tak bylo zabráněno vypařovat se v průběhu permeačního pokusu.

V předem stanovených časových intervalech, tj. po 1, 3, 5, 7, 18, 24 hodinách, od nanesení donorové fáze byly odebírány do vialek vzorky akceptorového pufru a to v množství 1 ml. Odebrané množství pufru bylo zpět doplněno z vytemperovaného zásobního akceptorového pufru. Po uplynutí 24 hodin se už akceptorová fáze nedoplnila puftrem o pH 7,4 a permeační pokus byl ukončen. Vzorky ve vialkách byly uloženy v lednici o teplotě 2 C až 6 C. Cely byly rozebrány a použité sublingvální membrány ihned zkoumány fluorescenčním mikroskopem nebo zataveny do polyethylenové folie, zmrazeny tekutým dusíkem a uloženy v mrazničce pro pozdější mikroskopování.

Pro první permeační pokus byly použity sublingvální membrány z prasečích jazyků, které byly dlouhodobě zmrazeny (29. 11. 2012) a uchovávány po celou dobu v mrazničce v polyethylenové folii. Druhý permeační pokus již proběhl s čerstvě vypreparovanými membránami uloženými ve fyziologickém roztoku. Ke stanovení koncentrace nanočástic v akceptorové fázi byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Data jsou zpracována v **oddíle 5.4.2.**

#### **4.9 Příprava vzorků pro kalibraci**

1. Zásobní roztok kofeinu s fosfátovým puftrem byl připraven smícháním 0,25 g kofeinu s 50 ml fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 7,4 v odměrné baňce. Vznikl tak 0,5 % (tj. 500 mg%) roztok, který byl dále ještě 100x naředěn. Koncentrace v první zkumavce kalibrační řady tak činila 0,005 %

(tj. 5 mg%). Následným ředěním roztoku v první zkumavce byla získána celá kalibrační řada:

Poměr ředění	Zásobní roztok 5 mg% [ml]	Fosfátový pufr [ml]	Koncentrace [mg%]
1	20	0	5
1/2	10	10	2,5
1/3	6,66	13,33	1,66
1/4	5	15	1,25
1/9	2,22	17,77	0,55

2. Zásobní roztok nanočástic ve fosfátovém pufru byl připraven smícháním 50  $\mu$ l 0,5 % (tj. 500 mg%) disperze nanočástic PD Chromeon 470 – marked a 10 ml fosfátového pufru dle Sørensenů o pH 7,4. Vznikl tak 0,0025 % (tj. 2,5 mg%) roztok, ze kterého byla dalším ředěním připravena kalibrační řada:

Podíl zásobního roztoku [%]	Zásobní roztok [ $\mu$ l]	Fosfátový pufr [ $\mu$ l]	Koncentrace [mg%]
20	200	800	0,5
10	100	900	0,25
5	50	950	0,125
2,5	25	975	0,0625
1,25	12,5	987,5	0,0313
0,625	6,25	993,75	0,0156
0,312	3,13	996,87	0,0078
0,156	1,56	998,44	0,0039

#### 4.10 Stanovení nanočástic v kalibračních a permeačních vzorcích

Množství nanočástic v odebraných akceptorových fázích a kalibrační vzorky byly měřeny pomocí systému HPLC. K detekci byl použit UV/VIS detektor ( $\lambda = 272$  nm) pro kalibrační vzorky kofeinu v pufru a fluorescenční detektor ( $\lambda_{\text{ex}} = 470$  nm;  $\lambda_{\text{em}} = 600$  nm) pro vzorky akceptorových fází s nanočásticemi. Jako mobilní fáze byl zvolen metanol s vodou v poměru 1:3, průtoková rychlost činila 0,5 ml/min.

Koncentrace každého odebraného vzorku akceptorové fáze byla stanovena zprůměrováním dvou následných měření. Hodnoty koncentrací byly pak v šabloně pro zpracování výsledků z permeací korigovány na odebraný objem. Výsledkové protokoly této korekce šablonou jsou uvedeny v kapitole **PŘÍLOHY**.

Z hodnot měřených kalibračních vzorků byla pomocí lineární regrese sestavena kalibrační přímka (**viz oddíl 5.3**).

#### 4.11 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenčním mikroskopem byly pozorovány disperze karboxylovaných nanočástic vzorku D (Nanobeads based on PD, Chromeon 470 marked, carboxylated) v médiích, ve kterých dle měření metodou DLS vznikaly aglomeráty, tj. ve fosfátových puffech o pH 6,6 a 7,4. Kapka vzorku byla mikropipetou nanесena na podložní sklíčko, přiklopena krycím sklíčkem a pozorována mikroskopem (**výsledky viz oddíl 5.2.1**).

Fluorescenční mikroskopie byla využita také pro pozorování prasečích sublingválních membrán použitých v permeačních pokusech ze strany donorové i akceptorové. Mikroskopovány byly jak membrány dlouhodobě zmrazené, tak čerstvé, po použití v permeacích. Při mikroskopování byly membrány překryty krycím sklíčkem, v případě potřeby (pozorování vzorků zvětšených 1000x) zakápnuty imerzním olejem. (**výsledky viz oddíl 5.5**)

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Instrumentální a analytické přístroje a metody využití v experimentální části byly již dříve konkrétně ověřeny praktickým používáním na katedře farmaceutické technologie FaF UK. Uspořádání permeačních *in vitro* pokusů splňuje požadavky na rychlé a citlivé stanovení průchodu nanočástic prasečí sublingvální membránou a bylo využito také pro hodnocení záchytu nanočástic fluorimerickou mikroskopií.

Výběrem Sørensenova pufru o pH 7,4 (ředěného 1:9) jako akceptorové fáze mělo být dosaženo simulace mírně alkalického pH systémového oběhu lidského těla. Rovněž donorová fáze v podobě Sørensenova fosfátového pufru o pH 6,6 měla představovat přirozené pH v prostředí dutiny ústní.

Jako surfaktant byl při přípravě použit také Carbaethopendecini bromidum. Tato látka je díky své antimikrobiální aktivitě široce používána jako antiseptikum, laboratorní a průmyslové dezinficiens, ale také jako analytické činidlo v technikách micelární extrakce a separace (33).

Před provedením vlastních permeačních experimentů bylo důležité zjistit maximum informací o používaných nanočásticových materiálech z hlediska jejich velikosti, případně o agregačních vlastnostech v přítomnosti výše zmíněných pufrů. Předmětem zkoumání byly především nanočástice značené fluorescenčním barvivem, jejich charakteristika, chování v samotné disperzi či jejich vlastnosti v jednotlivých médiích, vliv medií na podmínky permeace, použití zmražených nebo nativních sublingválních membrán v experimentech.

### 5.1 Hodnoty pH nanočásticových disperzí

Měření hodnoty pH disperzí nanočástic proběhlo podle postupu a popisu uvedeného v **oddíle 4.5**. Výsledné hodnoty pH shrnuje **tabulka 1**. Z ní vyplývá, že hodnoty pH sledovaných disperzí nanočástic se vzájemně příliš neliší. Naměřená hodnota pH se pohybuje ve velmi úzkém rozmezí, nezávisle na konkrétním typu

vzorku. Výraznou odlišnost hodnoty pH vzorku C lze odůvodnit zkresleným měřením kvůli velmi malému množství disperze, které bylo k dispozici. Měrná elektroda nebyla v disperzi ponořena až po rysku. Z tohoto údaje nebude činěn žádný závěr. Průměrně dosahují disperze nanočástic hodnoty pH 6,7 (po vypuštění hodnoty pro částice C).

**Tabulka 1** – Hodnoty pH nanočásticových disperzí

Vzorek	Popis	Hodnota pH
A	Nanobeads based on PD, Chromeon 470 marked	6,7
B	Nanobeads based on PD, Chromeon 470 marked	6,72
C	Nanobeads based on PD, Chromeon 470 marked, karboxylované	7,67
D	Nanobeads based on PD, Chromeon 470 marked, karboxylované	6,54
E	Nanobeads based on polyakrylonitrile, Chromeon 470 marked, karboxylované	6,66
F	Nanobeads based on PD, Chromeon 545 marked	6,88
Průměr pH (bez vzorku C)		$6,7 \pm 0,1095$

## 5.2 Velikost částic v disperzích měřená metodou DLS

Měření velikosti nanočástic v disperzích bylo prováděno za účelem zjištění agregátového chování nanočástic v daných médiích. Především šlo o vyloučení, resp. podchycení známek shlukování nanočástic do agregátů, které by svojí velikostí případně znemožňovaly či ztěžovaly průnik nanočástic sublingvální membránou. Částečně byla také uvažována prevence aglomerace nebo i elektrostatická desintegrace vzniklých agregátů karboxylovaných nanočástic volbou vhodného média.

Agregace jako proces, při kterém se nanočástice shlukují ve snaze vytvořit energeticky výhodnější systém, je z hlediska dalšího využití částic často velmi nežádoucí proces. Agregací nanočástic se výrazně mění řada jejich vlastností včetně pohyblivosti i vlastnosti soustavy jako celku (34).

Při měření velikosti nanočástic pomocí DLS bylo zjištěno, že disperze karboxylovaných nanočástic (vzorek D) vytváří ve fosfátových pufrách o pH 6,6 i pH 7,4 agregáty. Vzorek dispergovaný v čištěné vodě byl bez sraženin. Stejný nálezný byl učiněn také u vzorku F (Nanobeads based on PD, Chromeon 545 marked).

Pro další práci byl použit vzorek D (agregovaný) a vzorek C (bez agregátů). Jejich vzájemným srovnáním byly sledovány rozlišné účinky použitých médií na tvorbu agregátů. Vzorky byly pozorovány pomocí metody DLS, postup přípravy vzorku pro vlastní měření je popsán v **oddíle 4.6 a 4.7**.

Měření distribuce velikosti částic v disperzích a příprava vzorků proběhly postupem popsaným v **oddíle 4.6**.

**Obrázek 3** zobrazuje výsledky měření fluktuací intenzity světla rozptýleného částicemi vzorku A ve vodě. Graf pochází z programu DTS, kterým byly zpracovány výsledky z DLS, a je zároveň typickou ukázkou údajů získaných měřením metodou DLS.

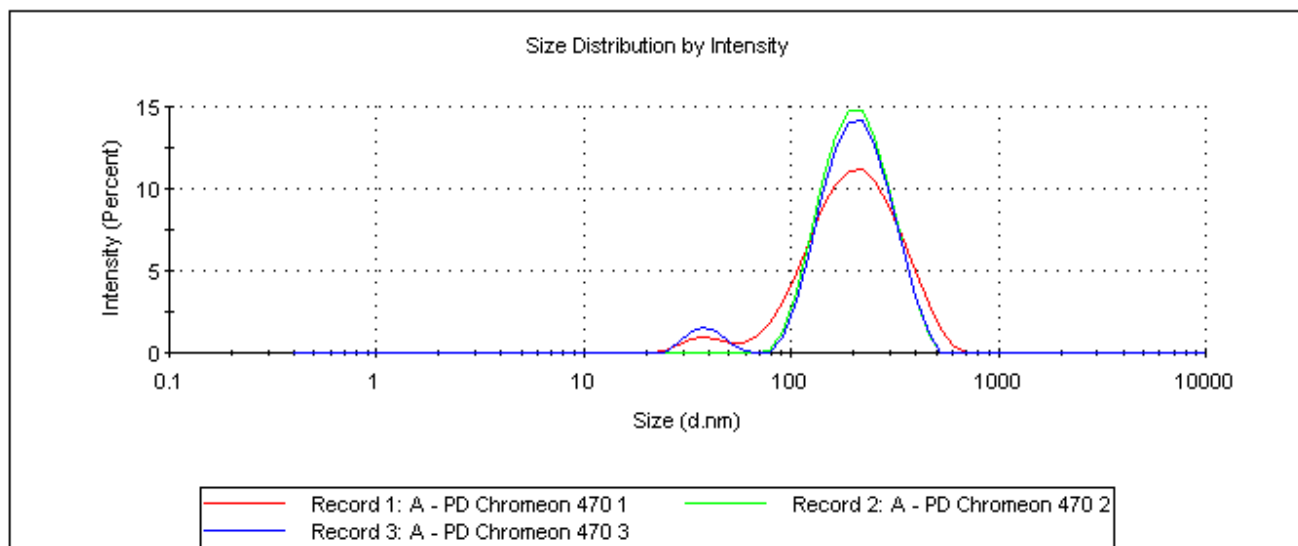
Vzorky A až F rozptýlené v základních médiích (voda a neředěné fosfátové pufrý dle Sørensen) jsou dále přehledněji zpracovány v **tabulkách 2 - 7**. Jak již bylo naznačeno dříve, vzorky D a F vytvářely ve fosfátových pufrách agregáty a naměřené hodnoty velikosti částic v těchto vzorcích tak několikanásobně přesahují průměrné hodnoty velikostí u ostatních vzorků. Příslušné hodnoty vybočující z průměrů jsou v **tabulkách 5 a 7** zvýrazněny tučně. K vlivům způsobujícím agregaci obecně patří ohřívání, zmrazování, intenzivní míchání či přidávání elektrolytů do koloidní soustavy. Co způsobilo agregaci částic v našich vzorcích, není jednoznačné. Do úvahy připadá i stáří disperzí, opakované ohřívání a zchlazování disperzí nebo vysoká koncentrace pufru.



**Sample Name:** A- PD Chromeon 470 1  
**SOP Name:** Chromeon.sop  
**File Name:** HorejsovaSasurovaDP2013.dts  
**Record Number:** 1  
**Material RI:** 1,59  
**Material Absorbtion:** 0,010  
**Dispersant Name:** Water  
**Dispersant RI:** 1,330  
**Viscosity (cP):** 0,8870  
**Measurement Date and Time:** 25. dubna 2013 14:46:11

**Temperature (°C):** 25,0  
**Count Rate (kcps):** 468,8  
**Cell Description:** Disposable sizing cuvette  
**Duration Used (s):** 60  
**Measurement Position (mm):** 4,65  
**Attenuator:** 7

	<b>Size (d.nm):</b>	<b>% Intensity:</b>	<b>St Dev (d.nm):</b>
<b>Z-Average (d.nm):</b> 166,0	<b>Peak 1:</b> 224,3	95,6	104,2
<b>Pdl:</b> 0,237	<b>Peak 2:</b> 40,98	4,4	9,952
<b>Intercept:</b> 0,948	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality :</b> <b>Good</b>			



Obr. 3 - Distribuce velikostí nanočástic v disperzi vzorku A podle intenzity rozptýleného světla, médium - čištěná voda; ukázka údajů získaných z programu DTS

**Tabulka 2** – Velikost částic v disperzi vzorku A, médium – voda a fosfátové pufrы neředěné

Vzorek A	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Čištěná voda	1	166,0	0,237	224,3	41,0	95,6	4,4
	2	168,2	0,220	216,5	0	100,0	0
	3	168,7	0,217	219,5	39,0	94,5	5,5
	Průměr	167,6	0,225	220,1	26,7	96,7	3,3
	SD	1,4	0,011				
Fosfátový pufr pH 6,6	1	165,8	0,232	221,4	43,0	93,2	6,8
	2	169,5	0,232	224,9	37,2	94,9	5,1
	3	165,2	0,231	221,3	40,5	94,0	6,0
	Průměr	166,8	0,232	222,5	40,2	94,0	6,0
	SD	2,3	0,001				
Fosfátový pufr pH 7,4	1	171,2	0,230	234,4	54,8	90,9	9,1
	2	171,5	0,224	225,4	40,5	94,1	5,9
	3	167,5	0,248	230,2	49,6	92,7	7,3
	Průměr	170,1	0,234	230,0	48,3	92,6	7,4
	SD	2,2	0,012				

**Tabulka 3** – Velikost částic v disperzi vzorku B, médium – voda a fosfátové pufrы neředěné

Vzorek B	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d. nm]	Pík 2 [d. nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Čištěná voda	1	167,2	0,222	221,5	42,4	94,3	5,7
	2	164,9	0,223	218,9	42,5	93,6	6,4
	3	166,3	0,219	218,1	40,3	93,7	6,3
	Průměr	166,1	0,221	219,5	41,7	93,9	6,1
	SD	1,2	0,002				
Fosfátový pufr pH 6,6	1	167,4	0,237	226,8	40,6	94,0	6,0
	2	168,7	0,240	229,9	43,6	93,1	6,9
	3	168,7	0,238	224,7	38,1	94,8	5,2
	Průměr	168,3	0,238	227,1	40,8	94,0	6,0
	SD	0,8	0,002				
Fosfátový pufr pH 7,4	1	170,7	0,233	228,4	45,5	93,1	6,9
	2	169,0	0,230	227,8	47,4	93,8	6,2
	3	171,8	0,236	236,9	56,3	91,4	8,6
	Průměr	170,5	0,233	231,0	49,7	92,8	7,2
	SD	1,4	0,003				

**Tabulka 4** – Velikost částic v disperzi vzorku C, médium – voda a fosfátové pufrы neředěné

Vzorek C	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Čištěná voda	1	193,6	0,197	243,7	0,0	100,0	0,0
	2	190,1	0,233	250,0	0,0	100,0	0,0
	3	196,7	0,199	245,6	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	193,5 3,3	0,210 0,020	246,4	0,0	100,0	0,0
Fosfátový pufr pH 6,6	1	197,8	0,229	266,3	54,1	93,6	6,4
	2	202,2	0,211	261,5	51,0	94,0	6,0
	3	201,6	0,203	255,7	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	200,5 2,4	0,214 0,013	261,2	35,0	95,9	4,1
Fosfátový pufr pH 7,4	1	201,7	0,235	272,4	59,8	94,3	5,7
	2	203,2	0,210	263,2	53,0	94,3	5,7
	3	203,1	0,223	273,8	68,3	91,3	8,7
	Průměr SD	202,7 0,8	0,223 0,013	269,8	60,3	93,3	6,7

**Tabulka 5** – Velikost částic v disperzi vzorku D, médium – voda a fosfátové pufrы neředěné

Vzorek D	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Čištěná voda	1	102,1	0,234	105,9	3075,0	91,5	8,5
	2	101,4	0,223	114,8	3939,0	95,6	4,4
	3	103,5	0,212	138,9	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	102,3 1,1	0,223 0,011	119,9	2338,0	95,7	4,3
Fosfátový pufr pH 6,6	1	<b>3027</b>	0,406	1900	204,7	94,1	5,9
	2	<b>2917</b>	0,535	1604	4955	54,6	45,4
	3	<b>2692</b>	0,622	4766	1262	61,6	38,4
	Průměr SD	<b>2878,7</b> 170,8	0,521 0,109	2756,7	2140,6	70,1	29,9
Fosfátový pufr pH 7,4	1	<b>4528</b>	0,608	1349	0,0	100,0	0,0
	2	<b>5094</b>	0,546	1054	0,0	100,0	0,0
	3	<b>4439</b>	0,469	1547	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	<b>4687,0</b> 355,3	0,541 0,070	1316,7	0,0	100,0	0,0

**Tabulka 6** – Velikost částic v disperzi vzorku E, médium – voda a fosfátové pufrы neředěné

Vzorek E	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Čištěná voda	1	102,5	0,206	126,7	0,0	100,0	0,0
	2	103,5	0,201	130,3	0,0	100,0	0,0
	3	103,0	0,222	138,7	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	103,0 0,5	0,210 0,011	131,9	0,0	100,0	0,0
Fosfátový pufr pH 6,6	1	98,5	0,198	125,1	0,0	100,0	0,0
	2	100,0	0,213	129,8	0,0	100,0	0,0
	3	101,0	0,223	129,8	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	99,8 1,3	0,211 0,013	128,2	0,0	100,0	0,0
Fosfátový pufr pH 7,4	1	100,5	0,198	119,9	0,0	100,0	0,0
	2	100,7	0,199	128,0	0,0	100,0	0,0
	3	100,8	0,199	130,2	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	100,7 0,2	0,199 0,001	126,0	0,0	100,0	0,0

**Tabulka 7** – Velikost částic v disperzi vzorku F, médium – voda a fosfátové pufrы neředěné

Vzorek F	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Čištěná voda	1	134,1	0,190	167,6	0,0	100,0	0,0
	2	133,0	0,185	164,7	0,0	100,0	0,0
	3	133,5	0,213	172,7	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	133,5 0,6	0,196 0,015	168,3	0,0	100,0	0,0
Fosfátový pufr pH 6,6	1	<b>2391</b>	0,406	2837	204,9	94,8	5,2
	2	<b>2481</b>	0,492	3894	719,6	83,6	16,4
	3	<b>2307</b>	0,567	1829	0,0	100,0	0,0
	Průměr SD	<b>2393,0</b> 87,0	0,488 0,081	2853,3	308,2	92,8	7,2
Fosfátový pufr pH 7,4	1	<b>3360</b>	0,379	2414	0,0	100,0	0,0
	2	<b>3323</b>	0,527	1695	5219	57,4	35,5
	3	<b>3228</b>	0,353	2397	5560	96,1	3,9
	Průměr SD	<b>3303,7</b> 68,1	0,420 0,094	2168,7	3593,0	84,5	13,1

Zajímavý je fakt, že ačkoliv karboxylovaný vzorek D agregáty vytvářel, u vzorku C, také karboxylovaného, ale jiné šarže a vzorku E, tedy karboxylovaného, na polyakrylonitrilovém základě, agregáty ve fosfátových pufrch tvořeny nebyly.

Pro další sledování účinku použitých médií na tvorbu agregátů byl zvolen vzorek D, který byl srovnáván se vzorkem C. Oba vzorky (D i C) obsahovaly karboxylované nanočástice založené na polymeru PD, značené Chromeonem 470, lišily se však výrobní šarží. Vzorky byly rozptýleny ve fosfátovém pufru o pH 6,6 i 7,4 s přidaným surfaktantem, ve fosfátovém pufru (pH 6,6 i 7,4) zředěném 1:9 a ve zředěném fosfátovém pufru s přidavkem surfaktantu. Příprava a složení pufrů byly popsány v **oddíle 4.4**. Získané hodnoty měření vzorků na DLS jsou shrnuty v následujících **tabulkách 8 – 13**.

**Tabulka 8** - Velikost částic v disperzi vzorku C, médium – fosfátové pufrы neředěné se surfaktantem

Vzorek C	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Fosfátový pufr pH 6,6 se surfaktantem	1	947,8	0,706	566,8	145,0	84,9	15,1
	2	1195	0,766	525,4	122,0	88,8	11,2
	3	967,0	0,859	987,9	195,5	78,9	21,1
	Průměr	1036,6	0,777	693,4	154,2	84,2	15,8
	SD	137,5	0,077				
Fosfátový pufr pH 7,4 se surfaktantem	1	3624	1,000	380,8	0,0	100,0	0,0
	2	2438	1,000	569,3	0,0	100,0	0,0
	3	2446	1,000	484,6	0,0	100,0	0,0
	Průměr	2836	1,000	478,2	0,0	100,0	0,0
	SD	682,4	0,000				

**Tabulka 9** - Velikost částic v disperzi vzorku D, médium – fosfátové pufrы neředěné se surfaktantem

Vzorek D	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Fosfátový pufr pH 6,6 se surfaktantem	1	939,6	0,752	531,5	112,7	80,4	19,6
	2	715,1	0,819	841,9	186,5	63,0	37,0
	3	549,6	0,807	932,8	190,1	55,2	32,8
	Průměr	734,8	0,793	768,7	163,1	71,7	29,8
	SD	195,7	0,036				
Fosfátový pufr pH 7,4 se surfaktantem	1	634,9	0,735	625,5	135,7	72,7	27,3
	2	486,1	0,784	1052	314,8	58,9	30,0
	3	484,0	0,787	808,4	171,4	61,3	27,0
	Průměr	535,0	0,769	828,6	207,3	64,3	28,1
	SD	86,5	0,029				

**Tabulky 8 a 9** uvádějí výsledky měření velikosti částic v disperzích vzorku C a D rozptýlených ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 6,6 a 7,4 se surfaktantem. Porovnáním výsledků měření vzorků ve fosfátových pufrách se surfaktantem a bez něj lze zjistit následující:

- vzorek C ve fosfátových pufrách bez surfaktantu netvořil okem viditelné agregáty, zjištěná průměrná velikost nanočástic ve fosfátovém pufru o pH 6,6 byla 200,5 d.nm, v pufru o pH 7,4 202,7 d.nm
- vzorek C ve fosfátových pufrách se surfaktantem vytvářel v květě lehký zákal, průměrná velikost částic se mnohonásobně zvětšila – 1036,6 d.nm pro pufr o pH 6,6 a 2836 d.nm pro pufr o pH 7,4
- vzorek D ve fosfátových pufrách bez surfaktantu tvořil agregáty detekované metodou DLS, průměrná naměřená velikost částic v pufru o pH 6,6 byla 2878,7 d.nm, v pufru o pH 7,4 4687 d.nm
- vzorku D ve fosfátových pufrách přidání surfaktantu pomohlo ve smyslu zmenšení velikosti částic v disperzi, naměřená velikost částic byla nižší – 734,8 d.nm pro pufr o pH 6,6 a 535 d.nm pro pufr o pH 7,4

K tomu je možné doplnit, že G. Niziri a kol. (35) ve své práci uvádějí, že surfaktanty v roztocích mají tendenci se vázat na polymery. Tento proces začíná u dobře definované koncentrace surfaktantu označované jako kritická agregační koncentrace. Experimentálně bylo vypočítáno, že kritická agregační koncentrace u roztoků surfaktantů je mnohem nižší než kritická micelární koncentrace. Tato významná studie se dále zabývá formováním nanočástic interakcí anionického polyelektrolytu (polyakrylátu sodného) a opačně nabitých surfaktantů s různou délkou řetězce (alkyltrimetylamonium bromid). V systémech obsahujících nabitý polymer a opačně nabitý surfaktant dochází díky silným elektrostatickým silám k fázové separaci. V určitém rozsahu koncentrace surfaktantu pak dochází k precipitaci komplexu surfaktant–polymer.

Molární poměr náboje mezi tenzidem a polymerem ovlivňuje velikost a zeta potenciál vznikajících částic, avšak nemá významný vliv na vnitřní strukturu částic. Jako důležitá se ukázala délka řetězce surfaktantu, která předurčuje průměr částice stejně jako její vnitřní strukturu. Čím delší je uhlovodíkový řetězec surfaktantu, tím je vznikající částice větší a polymer má větší schopnost se formovat do nitkovitých micel agregátů.

Touto studií tak mohou být vysvětleny změny velikosti částic ve vzorcích po dispergaci v ředěných pufrech se surfaktantem, především pak zvětšení průměrné velikosti částic vzorku C.

Uspokojivé výsledky přineslo měření vzorků dispergovaných v ředěných fosfátových pufrech. Jak vyplývá z **tabulek 10 a 11**, průměrné velikosti částic vzorku C i D dosahují hodnot, které jsou více charakteristické pro nanočástice. Ve fosfátových pufrech ředěných 1:9 nevznikaly agregáty, průměrné velikosti částic se zmenšily (v porovnání s výsledky v tabulkách 4 a 5).

**Tabulka 10** - Velikost částic v disperzi vzorku C, médium – fosfátové pufrы ředěné

Vzorek C	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9	1	193,2	0,227	255,3	46,2	96,8	3,2
	2	192,5	0,217	250,7	44,9	96,5	3,5
	3	192,8	0,197	245,7	50,2	95,4	4,6
	Průměr	192,8	0,214	250,6	47,1	96,2	3,8
	SD	0,4	0,015				
Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9	1	197,2	0,198	248,7	0,0	100,0	0,0
	2	193,6	0,193	244,8	0,0	100,0	0,0
	3	194,9	0,210	251,0	47,3	94,7	5,3
	Průměr	195,2	0,200	248,2	15,8	98,2	1,8
	SD	1,8	0,009				

**Tabulka 11** - Velikost částic v disperzi vzorku D, médium – fosfátové pufrы ředěné

Vzorek D	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9	1	100,8	0,222	109,6	3619	94,4	5,6
	2	100,4	0,228	115,7	4601	97,0	3,0
	3	99,4	0,228	110,3	3883	94,6	5,4
	Průměr	100,2	0,226	111,9	4034,3	95,3	4,7
	SD	0,7	0,003				
Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9	1	100,0	0,228	123,2	4272	97,4	2,6
	2	98,5	0,229	112,4	2969	94,4	5,6
	3	98,2	0,231	112,1	3413	94,6	5,6
	Průměr	98,9	0,229	115,9	3551,3	95,5	4,6
	SD	1,0	0,002				



**Tabulka 12** - Velikost částic v disperzi vzorku C, médium – fosfátové pufrы ředěné se surfaktantem

Vzorek C	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9 se surfaktantem	1	903,2	0,731	427,5	96,2	86,5	13,5
	2	659,3	0,693	548,1	144,7	82,3	17,7
	3	702,0	0,738	589,2	129,0	81,2	18,8
	Průměr	754,8	0,721	521,6	123,3	83,3	16,7
	SD	130,3	0,024				
Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9 se surfaktantem	1	650,7	0,650	442,9	117,8	81,7	18,3
	2	612,0	0,517	408,6	85,3	90,9	9,1
	3	474,3	0,688	690,7	215,6	54,4	43,5
	Průměr	579,0	0,618	514,1	139,6	75,7	23,6
	SD	92,7	0,090				

**Tabulka 13** - Velikost částic v disperzi vzorku D, médium – fosfátové pufrы ředěné se surfaktantem

Vzorek D	Měření	Z-Average [d.nm]	PdI	Pík 1 [d.nm]	Pík 2 [d.nm]	Pík 1 [%]	Pík 2 [%]
Fosfátový pufr pH 6,6 ředěný 1:9 se surfaktantem	1	437,8	0,523	640,8	141,0	69,4	29,1
	2	359,8	0,806	618,9	114,6	63,2	22,6
	3	354,3	0,769	773,6	166,1	56,5	32,7
	Průměr	384,0	0,699	677,8	140,6	63,0	28,1
	SD	46,7	0,154				
Fosfátový pufr pH 7,4 ředěný 1:9 se surfaktantem	1	279,7	0,471	159,7	979,0	49,0	48,1
	2	273,1	0,449	744,9	153,2	52,9	44,0
	3	274,6	0,456	405,0	4704,0	92,5	7,5
	Průměr	275,8	0,459	436,5	1945,4	64,8	33,2
	SD	3,5	0,011				

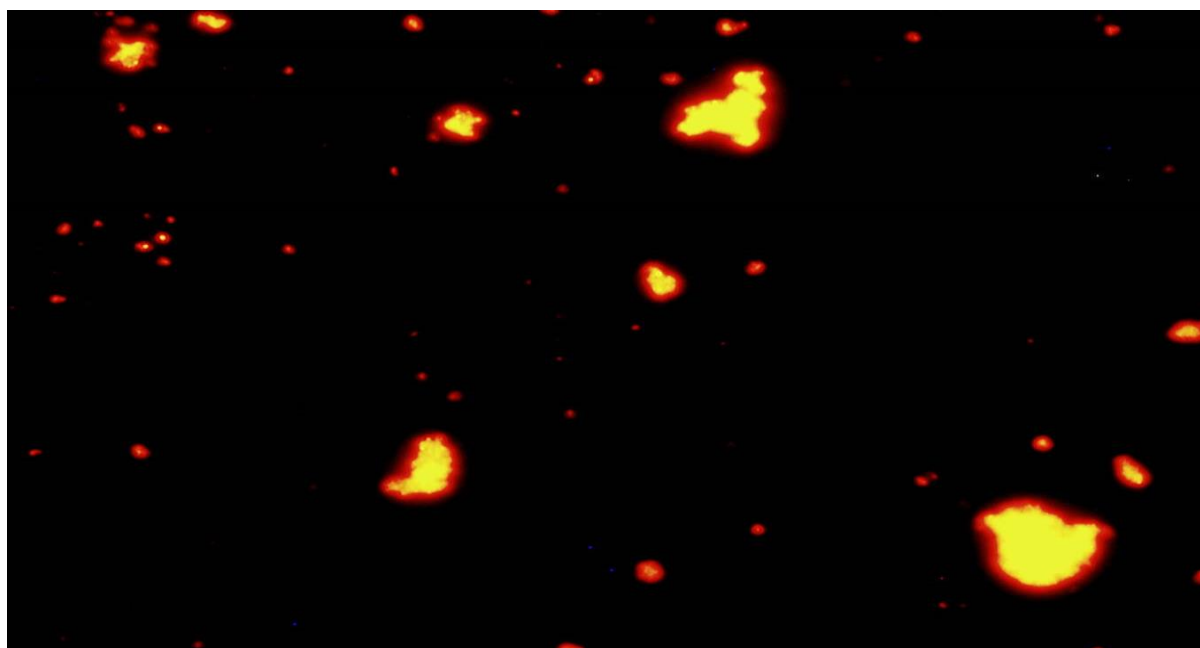
**Tabulky 12 a 13** zobrazují výsledky měření vzorků C a D v ředěných fosfátových pufrých s přidáním surfaktantem. Podle očekávání naměřené hodnoty nejsou natolik uspokojivé jako hodnoty měření vzorků pouze v ředěných pufrých, ani tolik vybočující jako hodnoty u samotných neředěných pufrů se surfaktantem.

Výsledky naměřené pomocí DLS lze prezentovat v následujícím souhrnu:

<b>Vzorek A</b>	+ Čištěná voda - $167,6 \pm 1,4$ nm
	+ pufr o pH 6,6 - $166,8 \pm 2,3$ nm
	+ pufr o pH 7,4 - $170,1 \pm 2,2$ nm
<b>Vzorek B</b>	+ Čištěná voda - $166,1 \pm 1,2$ nm
	+ pufr o pH 6,6 - $168,3 \pm 0,8$ nm
	+ pufr o pH 7,4 - $170,5 \pm 1,4$ nm
<b>Vzorek C</b>	+ Čištěná voda - $193,5 \pm 3,3$ nm
	+ pufr o pH 6,6 - $200,5 \pm 2,4$ nm
	+ pufr o pH 7,4 - $202,7 \pm 0,8$ nm
<b>Vzorek D</b>	+ Čištěná voda - $102,3 \pm 1,1$ nm
	+ pufr o pH 6,6 - $2878,7 \pm 170,8$ nm
	+ pufr o pH 7,4 - $4687,0 \pm 355,3$ nm
<b>Vzorek E</b>	+ Čištěná voda - $103,0 \pm 0,5$ nm
	+ pufr o pH 6,6 - $99,8 \pm 1,3$ nm
	+ pufr o pH 7,4 - $100,7 \pm 0,2$ nm
<b>Vzorek F</b>	+ Čištěná voda - $133,5 \pm 0,6$ nm
	+ pufr o pH 6,6 - $2393,0 \pm 87,0$ nm
	+ pufr o pH 7,4 - $3303,7 \pm 68,1$ nm

### 5.2.1 Pozorování nanočásticových agregátů fluorescenčním mikroskopem

Mikroskopické preparáty byly připraveny postupem popsaným v **oddíle 4.11**, a to ihned po změření distribuce velikostí částic přístrojem DLS. Následně byly sledovány fluorescenčním mikroskopem a zachyceny fotograficky. Pozorovány byly aglomeráty tvořené při dispergaci vzorku D v neředěných fosfátových pufrách. Velikost nalezených shluků částic se pohybovala přibližně v rozmezí od 0,6  $\mu\text{m}$  do 18,5  $\mu\text{m}$ . Tato skutečnost byla zjištěna přirovnáním velikosti agregátu k měřítku fotografie, což umožňoval používaný program AnalySIS Auto. Příklady nalezených precipitátů jsou dokumentovány na následujících **obrázcích 4 – 7**

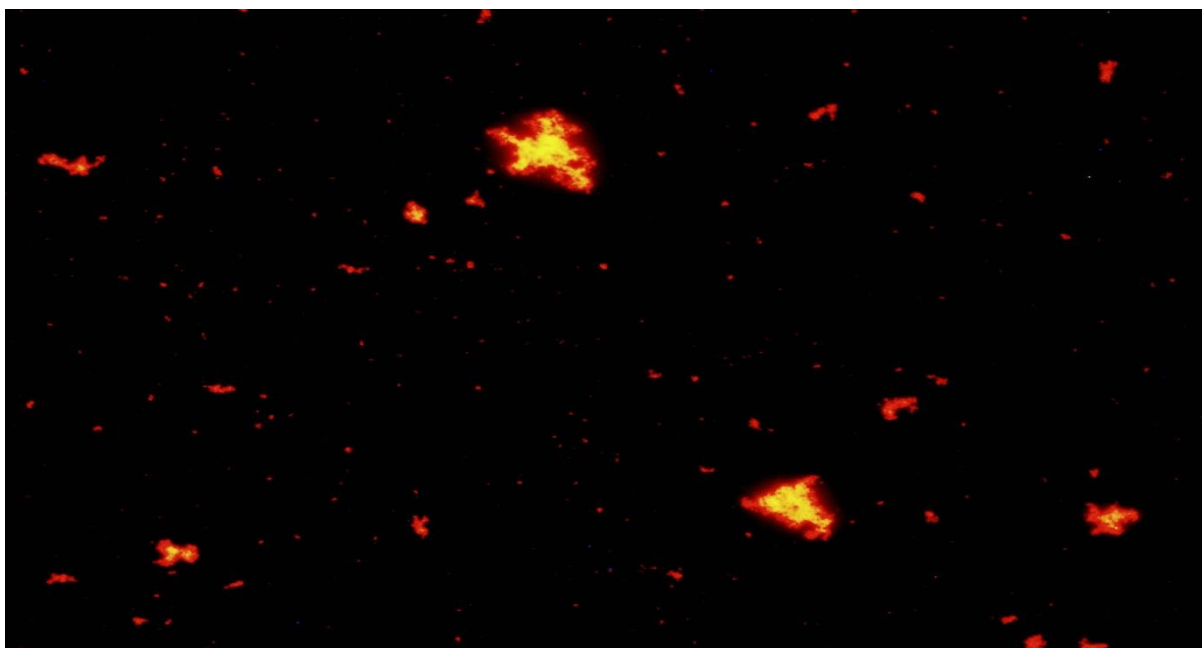


**Obr. 4** - Karboxylované nanočástice založené na PD polymeru značené Chromeonem 470 dispergované ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 6,6; nastavení mikroskopu: filtr WIB, ISO 400, zvětšení 100x, 2000 ms

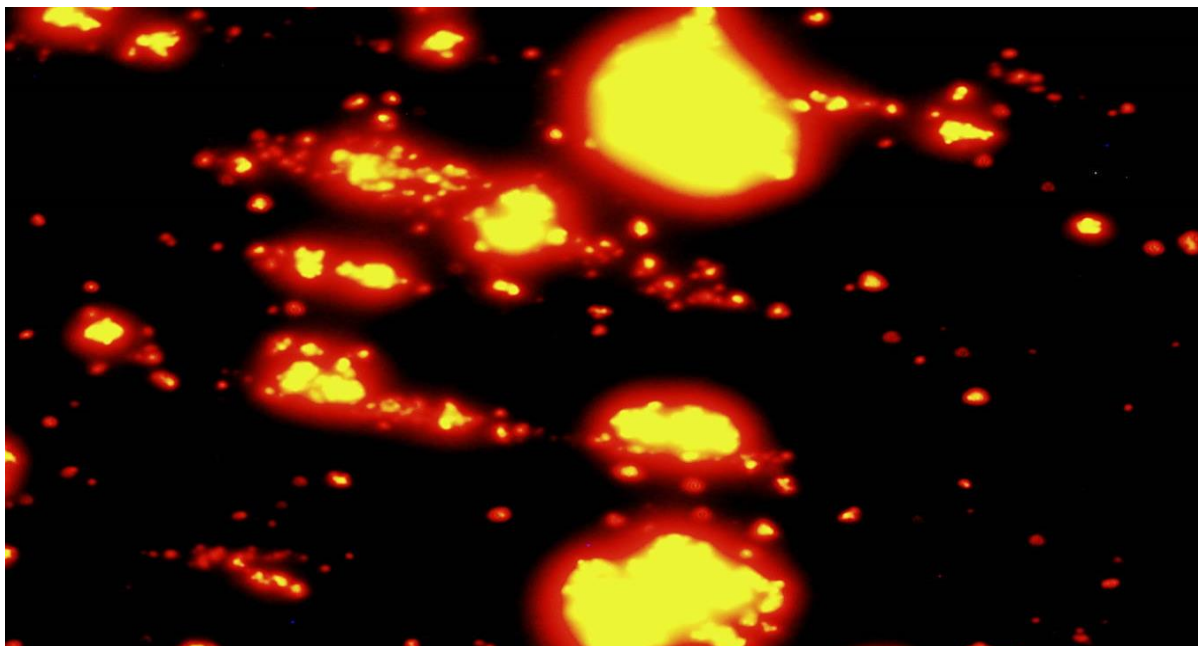
Agregáty zdokumentované na **Obrázku 5** byly jedny z největších námi nalezených. Jejich velikost činila přibližně 18,5  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 5** - Karboxylované nanočástice založené na PD polymeru (značené Chromeonem 470) dispergované ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 6,6; nastavení mikroskopu: filtr WIB, ISO 400, zvětšení 100x, 2000 ms



**Obr. 6** - Karboxylované nanočástice založené na PD polymeru (značené Chromeonem 470) dispergované ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 7,4; nastavení mikroskopu: filtr WIB, ISO 400, zvětšení 100x, 1000 ms



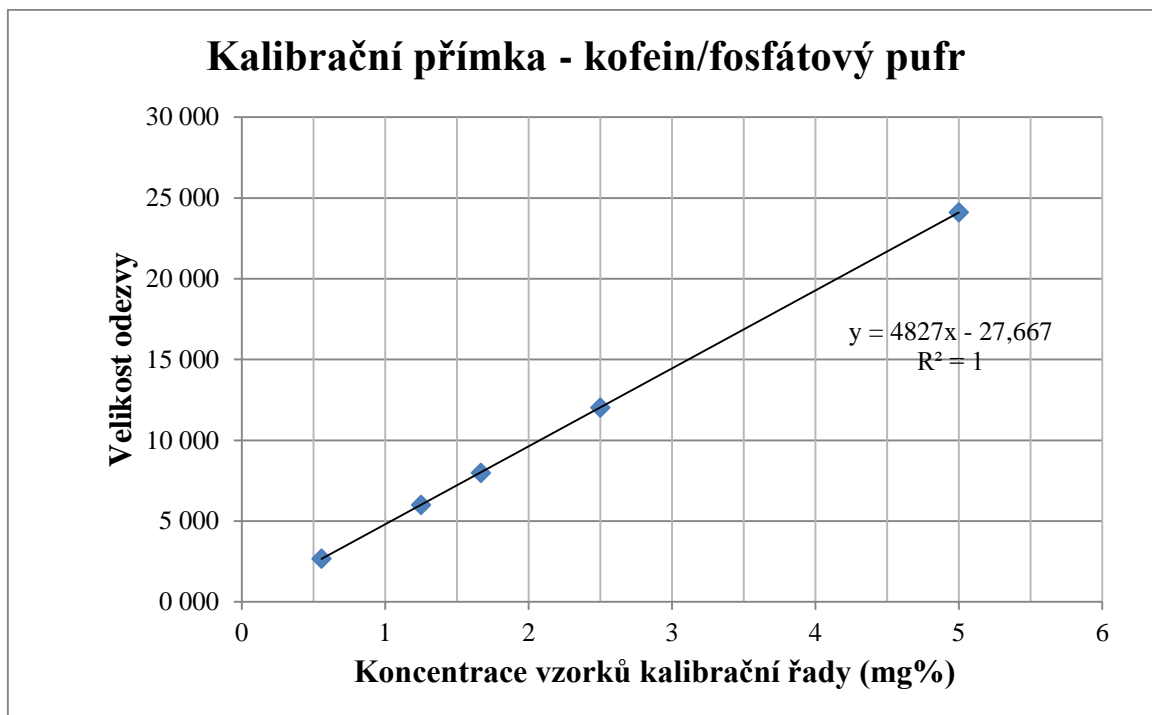
**Obr. 7** - Karboxylované nanočástice založené na PD polymeru (značené Chromeonem 470) dispergované ve fosfátovém pufru dle Sørensenova o pH 7,4; nastavení mikroskopu: filtr WIB, ISO 400, zvětšení 100x, 2000 ms

Na **Obrázku 6** a především pak na **Obrázku 7** lze zaregistrovat větší tloušťku vrstvy agregovaných nanočástic. Nanočástice se nacházely ve více hladinách, proostřováním obrazu vystupovaly jiné úrovně fluoreskujících částic.

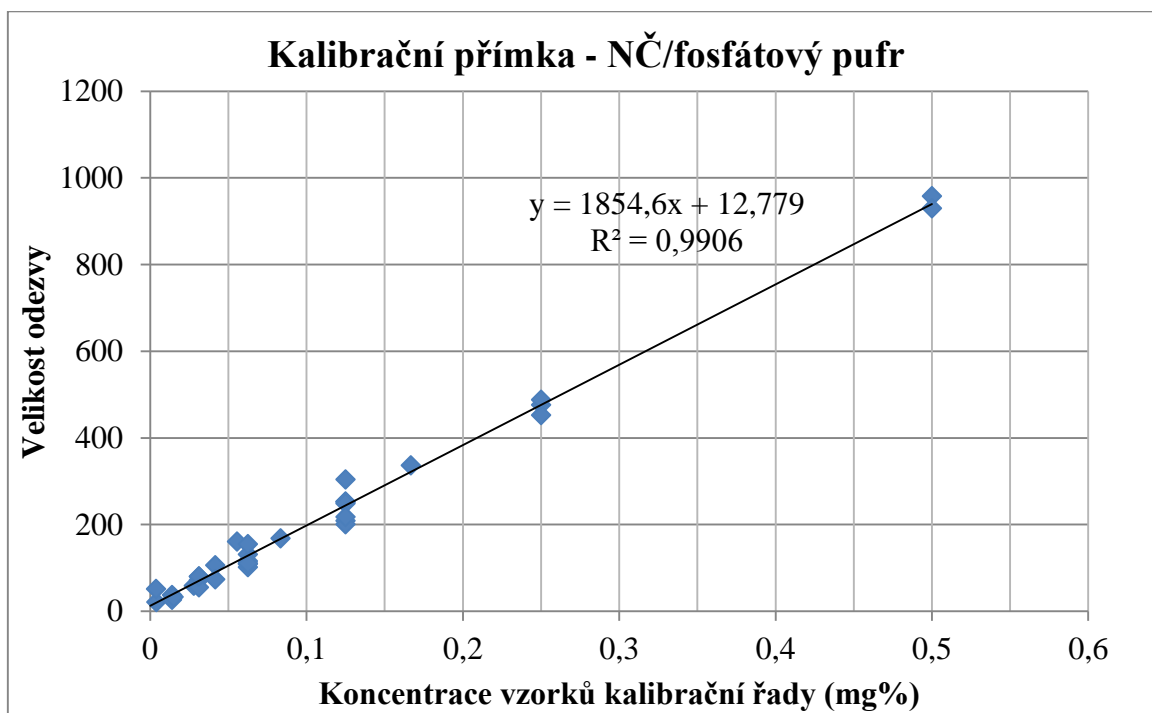
### 5.3 Kalibrační přímky

Kalibrační přímky byly sestrojeny pomocí lineární regrese z hodnot naměřených HPLC systémem.

Příprava vzorků kalibrační řady je popsána v **oddíle 4.9**. Příslušné kalibrační přímky včetně vyčíslení rovnic a údaje statistického koeficientu determinace  $R^2$  pro kofein a nanočástice ve fosfátovém pufru jsou zobrazeny v **Grafu 1 a 2**. Z těchto údajů je zřejmé, že metodika v popsaném provedení splňuje požadavky na věrohodné stanovení obsahu sledovaných látek v roztoku či disperzi.



Graf 1: Kalibrační přímka pro kofein



Graf 2: Kalibrační přímka pro nanočástice

## **5.4 Zhodnocení permeačních pokusů**

Rozdílem mezi pufrům fosfátovým a citrátovým v průniku, podmínkách a vlastnostech se zabývala ve své diplomové práci Lenka Horejšová. Náplní mé diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv na průnik nanočástic mají dvě techniky zpracování sublingválních membrán a dvě techniky fixace sublingvální membrány v modifikované Franzově difúzní cele.

Za tímto účelem byl v permeačních pokusech sledován průnik nanočástic a kofeinu do akceptorové fáze, kterou tvořil fosfátový pufr ředěný 1:9 o pH 7,4. Z toho důvodu byly vytvořeny dvě různé kalibrační přímky – jedna pro kofein ve fosfátovém pufru a druhá pro nanočástice ve fosfátovém pufru.

### **5.4.1 Tloušťky membrán**

Jak již bylo popsáno, permeační pokusy proběhly ve dvou fázích. První permeační pokus (P1) byl proveden s dlouhodobě zmrazenými membránami, rozmraženými těsně před použitím v permeacích. Mikrometrem byly změřeny tloušťky membrán u deseti náhodných vzorků, výsledek byl zprůměrnován. Tloušťky rozmražených membrán dosahovaly v průměru 0,51 mm. Druhý permeační pokus (P2) byl uskutečněn s membránami vypreparovanými z čerstvých prasečích jazyků těsně před permeačním pokusem. Také u nich byla mikrometrem ověřena tloušťka. Hodnoty tloušťky nativních membrán dosahovaly v průměru 0,49 mm. Průměrná tloušťka membrány rozmražené a nativní se příliš neliší.

Lze tedy konstatovat, že ani dlouhodobé zmrazení membrány tak nemá na tloušťku membrány měřitelný vliv.

## 5.4.2 Srovnání metod fixace membrány – lepidlo vs silikon

Výsledky byly vyhodnoceny na základě údajů  $Q_t$  (exp) získaných analýzou vzorků HPLC a následnou korekcí v šabloně pro zpracování výsledků permeací.

Hodnoty  $Q_t$  (exp) [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ] představují množství permeantu prošlého přes  $1\text{ cm}^2$  sublingvální membrány do akceptorové fáze. Tyto hodnoty byly pro lepší názornost následně převedeny na hodnoty poměrové veličiny **R** [%]. Hodnota **R** udává poměr hodnoty  $Q_t$  (exp) v jednotlivých časech odběru k maximálnímu naměřenému množství proniklých částic.

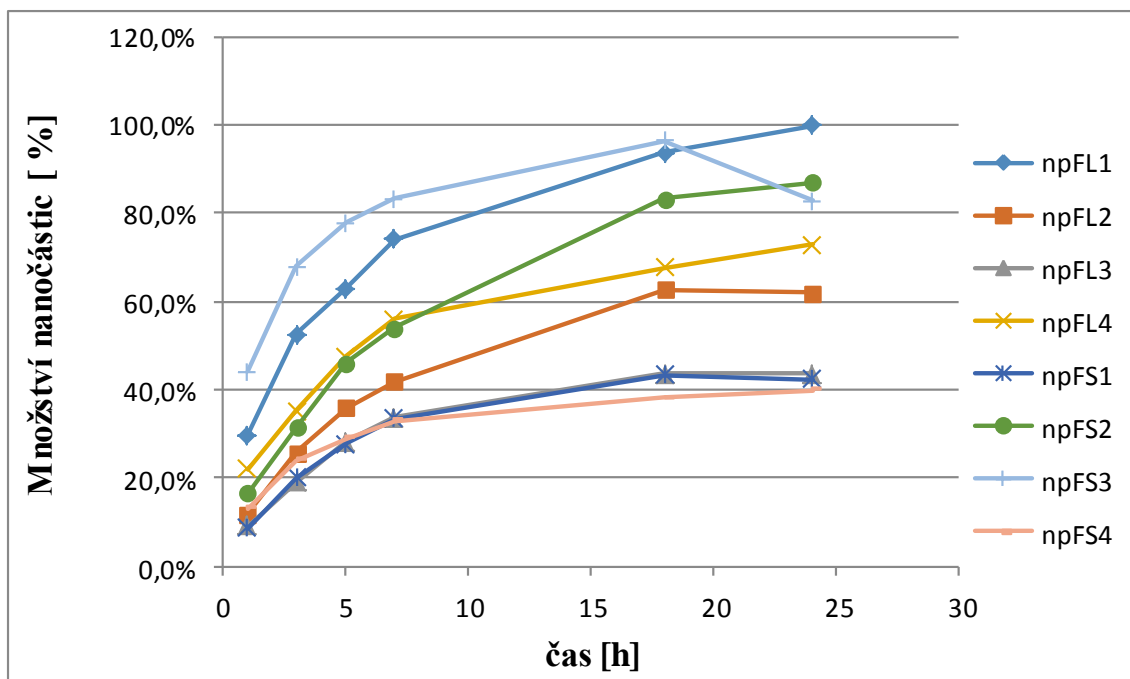
V **tabulce 14** jsou uvedeny hodnoty **R** v jednotlivých časech odběru permeace P1, což názorně zobrazuje **Graf 3**. **Tabulka 15** a **Graf 5** uvádí totéž pro permeaci P2. V P1 i P2 jsou membrány v difúzních celách č. 1 – 4 fixované lepidlem, v celách č. 5 – 8 fixuje membrány silikon.

### 5.4.2.1 Permeační pokus P1

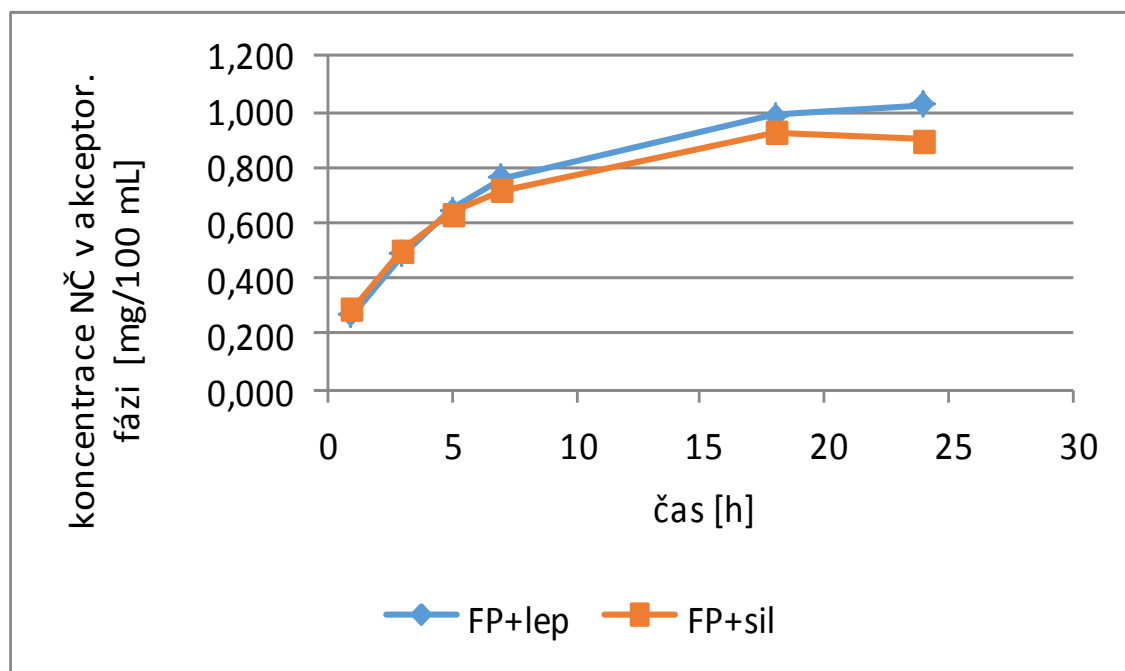
**Tabulka 14** - Tabulka hodnot R (%) pro permeaci P1; cely 1 – 4 - lepidlo, cely 5 – 8 - silikon

Cely	Čas odběru akceptorové fáze (hod)					
	1	3	5	7	18	24
1	29,8	52,5	62,9	74,2	93,7	100,0
2	18,7	41,2	57,2	66,6	100,0	98,9
3	21,1	43,5	64,6	77,4	100,0	100,0
4	30,1	48,2	65,3	76,8	92,7	100,0
5	19,9	46,3	63,8	77,2	100,0	97,8
6	19,1	36,2	52,8	62,0	95,5	100,0
7	45,8	70,4	80,7	86,5	100,0	85,9
8	33,0	60,1	72,9	82,7	95,6	100,0





**Graf 3** - Časové průběhy permeovaných množství [%] nanočástic v pokusu P1



**Graf 4** - Časové průběhy koncentrací [mg/100 ml] permeovaných nanočástic v pokusu P1

V zobrazení výsledků na **Grafu 3** je vyneseno normalizované procentuální množství nanočástic v akceptorové fázi v jednotlivých časech odběru. Křivky npFL1 – 4 představují množství prošlých NČ v celách 1 – 4 s membránou fixovanou kyanoakrylátovým lepidlem, křivky npFS 1 – 4 představují cely 5 až 8 s membránou upevněnou v permeační cele silikonovou pastou.

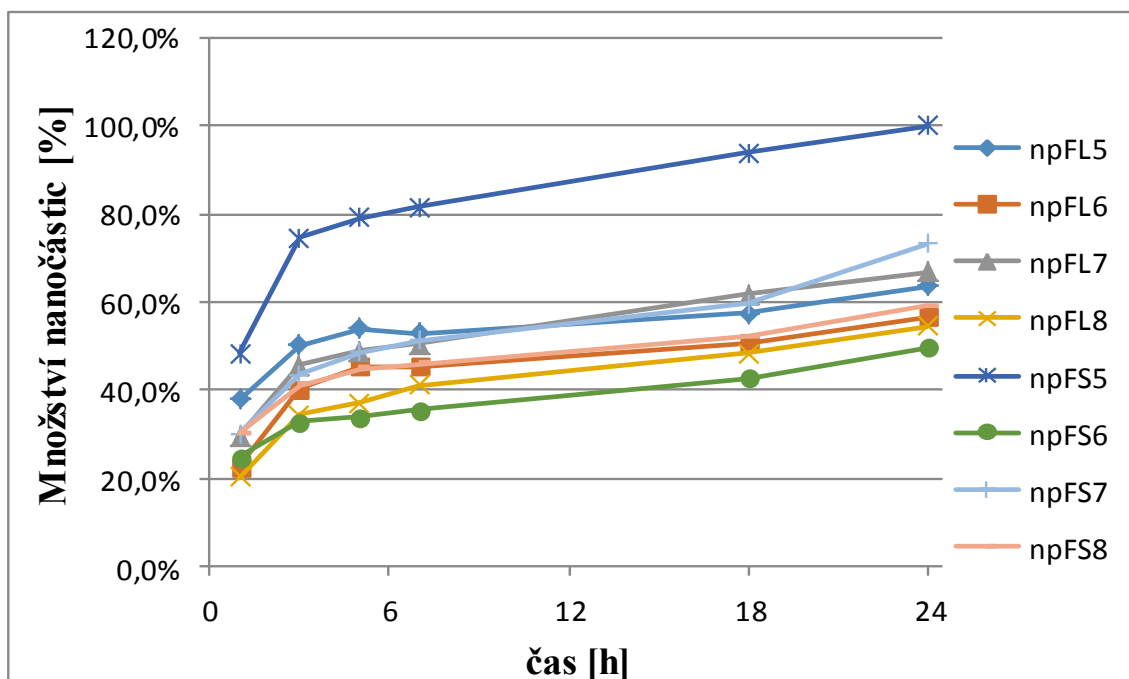
Souhrnné srovnání průchodu nanočástic membránami v celách s lepidlem a se silikonem v průběhu permeačního pokusu P1, jak je prezentováno na **Grafu 4**. Vychází z průměrných hodnot koncentrací nanočástic prošlých do akceptorové fáze v jednotlivých hodinách odběru. Křivka FP + lep představuje průměrné hodnoty koncentrací NČ v akceptorové fázi z cel s lepidlem, křivka FP + sil analogicky udává totéž pro cely se silikonem.

Se zaměřením na zadání práce lze z obou typů právě uvedených srovnání permeací nanočástic konstatovat především to, že přes sublingvální membránu skutečně procházejí. Toto potvrzení již dříve získaných výsledků je významné proto, že vylučuje vliv případného průniku nanočástic arteficiální cestou kolem fixované sublingvální membrány v permeační cele.

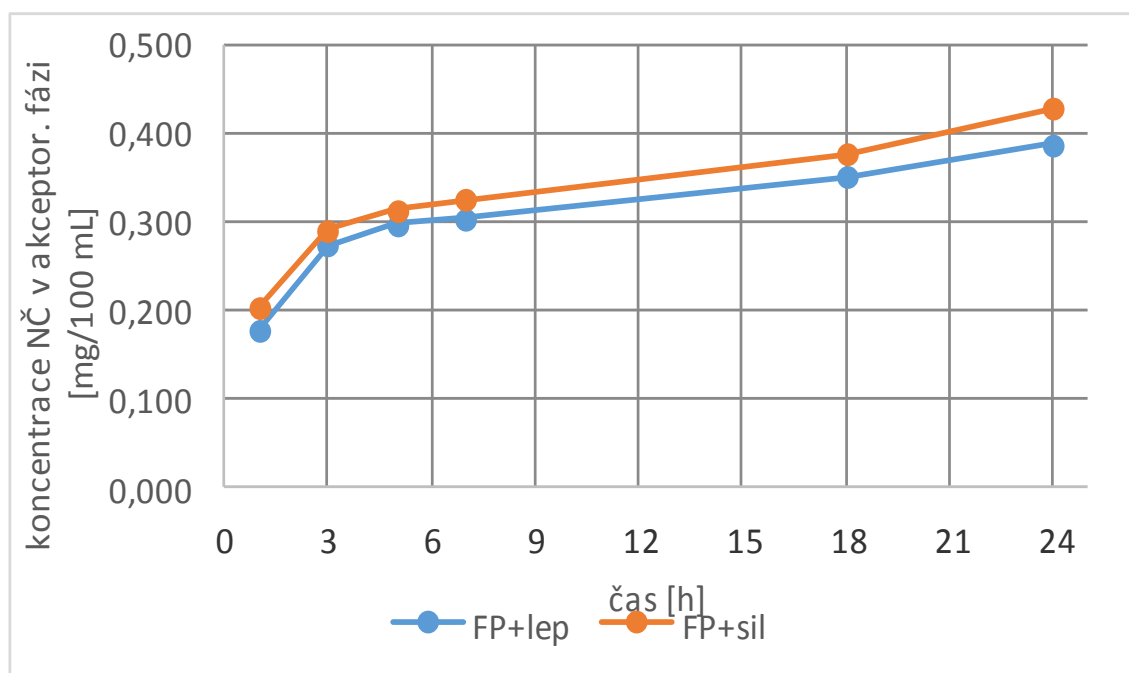
#### 5.4.2.2 Permeační pokus P 2

**Tab. 15** - Tabulka hodnot R (%) pro permeaci P2; cely 1 až 4 - lepidlo, cely 5 až 8 - silikon

Cely	Čas odběru akceptorové fáze (hod)					
	1	3	5	7	18	24
1	59,5	79,0	84,9	83,3	90,5	100,0
2	39,7	70,8	79,9	79,8	89,3	100,0
3	44,3	68,4	73,0	75,4	92,1	100,0
4	37,2	63,0	68,2	75,6	88,8	100,0
5	48,4	74,6	79,2	81,7	93,8	100,0
6	49,5	65,7	67,9	71,2	85,8	100,0
7	41,1	59,3	66,2	69,8	81,2	100,0
8	50,9	69,5	76,0	77,9	88,6	100,0



**Graf 5** - Časové průběhy normalizovaných množství [%] nanočástic v pokusu P2

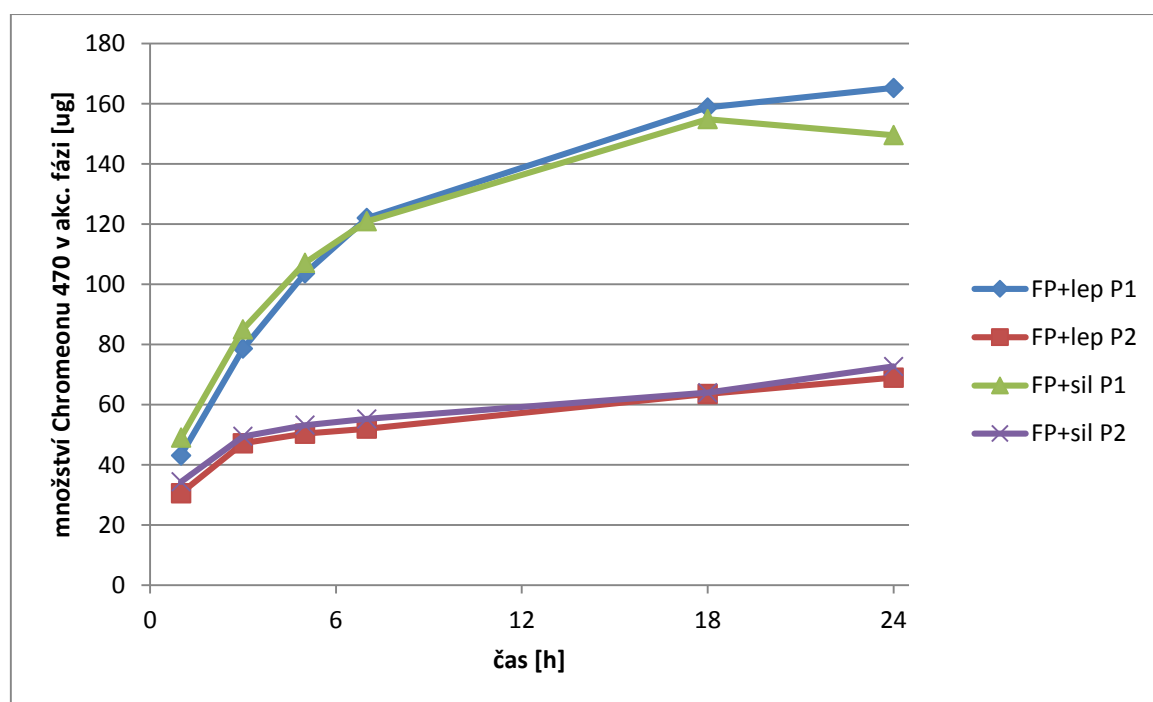


**Graf 6**- Časové průběhy koncentrací [mg/100 ml] permeovaných nanočástic v pokusu P2

V **Grafu 5** je zobrazeno normalizované procentuální množství nanočástic v akceptorové fázi v jednotlivých časech odběru; křivky npFL5 – 8 představují množství prošlých nanočástic v celách 1 – 4 s fixací lepidlem, křivky npFS 5 – 8 představují cely 5 až 8 při fixaci silikonem.

V **Grafu 6** představuje křivka označená FP+lep průměrné hodnoty koncentrací nanočástic v akceptorové fázi z cel s lepidlem, křivka FP + sil analogicky udává totéž pro cely se silikonem.

**Graf 7** je konečným srovnáním vlivu obou metod fixace na množství nanočástic prošlých přes sublingvální membránu do akceptorové fáze. Z grafu je patrné, že metoda fixace nemá markantní vliv na průnik nanočástic přes membránu při *in vitro* pokusech.

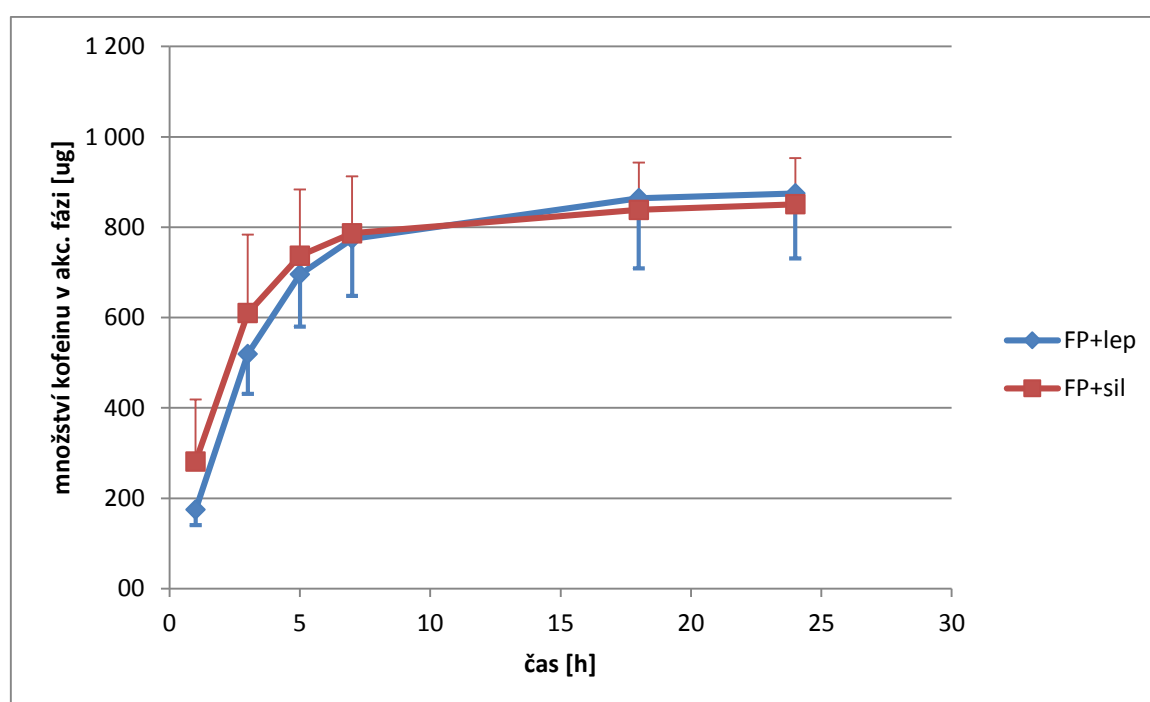


**Graf 7** - Vliv metody fixace membrány v difúzní cele a rozdíl mezi zmraženou a nativní sublingvální membránou při průnik nanočástic

Z hodnot koncentrací nanočástic prošlých do akceptorové fáze uvedených v **Grafech 4, 6 a 7** vyplývá, že nanočástice lépe pronikají zmrazenou membránou než nativní, čerstvě vypreparovanou. Tento fakt byl po provedených pokusech

uveden také v dřívějších diplomových pracích Martiny Spurné a Pavlíny Dvořákové.

Pro úplnost hodnocení je uveden **Graf 8** zobrazující průchod kofeinu (markeru membránové integrity) do akceptorové fáze. Graf je sestaven ze zprůměrovaných hodnot  $Q_t$  (exp) získaných analýzou akceptorové fáze z jednotlivých cel v průběhu permeace P1 i P2. Také průnik kofeinu membránou a jeho množství v akceptorové fázi významně neovlivňuje metoda fixace membrány v cele.



**Graf 8** Vliv fixace membrány na permeaci kofeinu sublingvální membránou

### 5.5 Pozorování sublingválních membrán po permeacích fluorescenčním mikroskopem

Cílem závěrečného pozorování preparátů fluorescenčním mikroskopem bylo vizuálně ověřit zda nanočástice prochází neporušenou membránou, jak jsou v preparátu situovány (zda u kraje 1 cm<sup>2</sup> výseče cely či uprostřed), a jestli lze najít rozdíl v průniku částic preparáty různě fixovanými ve Franzových difúzních

celách (silikon, vteřinové lepidlo). Kvůli časové náročnosti tohoto sledování byly prohlédnuty pouze náhodně vybrané reprezentativní vzorky, které zastupovaly různé kombinace použitých membrán a metod fixace, s kterými bylo pracováno v permeačních experimentech. Byly pozorovány jak zmrazené, tak nativní membrány fixované silikonem i vteřinovým lepidlem a to ze své donorové i akceptorové strany.

Preparáty sublingválních membrán pro mikroskopii byly v zásadě připraveny postupem popsáním v **oddíle 4.11**.



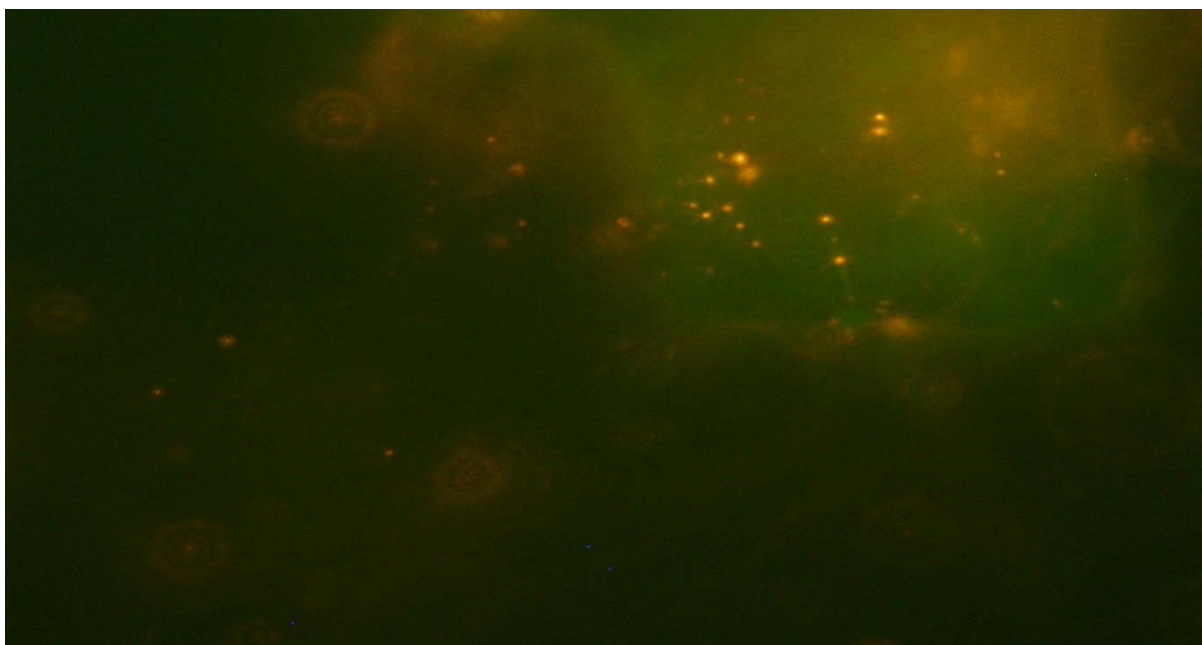
**Obr. 8** - Zmrazená sublingvální membrána fixovaná lepidlem, donorová strana, okraj; nastavení mikroskopu – WIB, ISO 400, zvětšení 100x, 2000 ms, zapnutý zdroj VIS

Najít nanočástice ve velkém počtu na donorové straně bylo poměrně snadné u zmrazené i nativní membrány, jsou prezentovány na **Obr. 8, 10, 12, 14**. Částice se zachytávaly v různých úrovních membrány podle toho, jak byla membrána povrchově strukturovaná. Proostřováním obrazu se daly pozorovat fluoreskující nanočástice zanořené v různých hloubkách, proto jsou některá místa na **Obr. 8, 10**

**i 12** zaostřená lépe než jiná. Na pozorování samotného povrchu membrány je třeba zvolit např. menší zvětšení.



**Obr. 9** - Zmrazená membrána fixovaná lepidlem, akceptorová strana, okraj; nastavení mikroskopu – WIB, ISO 400, zvětšení 100x, 2000 ms, zdroj VIS



**Obr. 10** - Zmrazená membrána fixovaná silikonem, donorová strana, uprostřed; nastavení mikroskopu – WIB, ISO 800, zvětšení 100x, 2000 ms

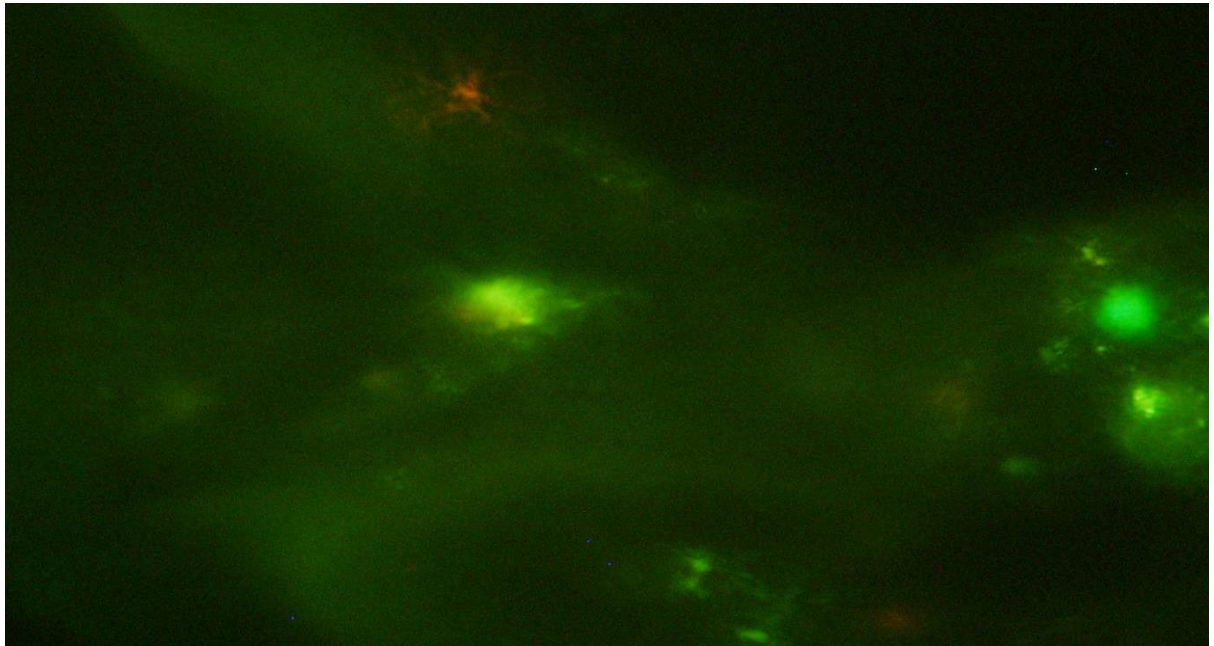


**Obr. 11** - Zmrazená membrána fixovaná silikonem, akceptorová strana, uprostřed;  
nastavení mikroskopu – WIB, ISO 800, zvětšení 100x, 2000 ms

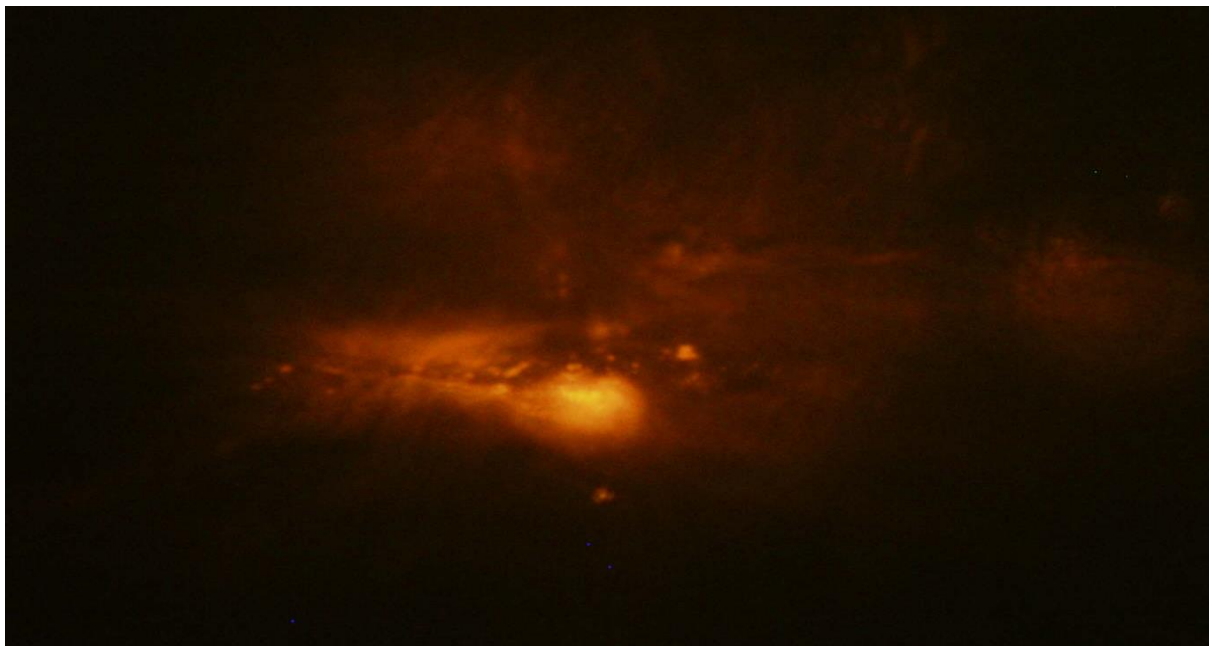


**Obr. 12** - Nativní membrána fixovaná lepidlem, donorová strana, uprostřed;  
nastavení mikroskopu – WIB, ISO 800, zvětšení 100x, 2000 ms, zdroj VIS





**Obr. 13** - Nativní membrána fixovaná lepidlem, akceptorová strana, okraj;  
nastavení mikroskopu – WIB, ISO 1600, zvětšení 100x, 1500 ms, zdroj VIS



**Obr. 14** - Nativní membrána fixovaná silikonem, donorová strana, okraj;  
nastavení mikroskopu – WIB, ISO 800, zvětšení 100x, 1500 ms



**Obr. 15** - Nativní membrána fixovaná silikonem, akceptorová strana, okraj; nastavení mikroskopu – WIB, ISO 1600, zvětšení 100x, 1500 ms

Nanočástice byly pozorovány také na akceptorové straně zmrazené i nativní membrány (**Obr. 9, 11, 13, 15**), přestože jejich hledání bylo významně ztíženo. Částice se totiž vyskytovaly spíše jednotlivě jako samostatné fluoreskující tečky než ve větších koncentracích, jak tomu bylo u donorové strany membrány. Přesto byly nalezeny prošlé částice u všech typů membrán a fixací, a to ve středu i na kraji preparátu. Z vizuálního hodnocení lze říct, že membrány nebyly proděravělé, snad jen **Obr. 13** ukazuje ztenčený povrch membrány ve více místech či větší membránové póry (světle zelená místa).

## 6 ZÁVĚRY

1. Průměrné **pH** disperzí nanočástic A, B, D, E, F mělo hodnotu  **$6,7 \pm 0,1095$** . Hodnoty pH hodnocených disperzí nezávisí na typu obsažených nanočástic.
2. Disperze karboxylovaných nanočástic PD, Chromeon 470 marked, karboxylované (vzorek D) vytváří ve fosfátových pufrách o pH 6,6 i pH 7,4 aglomeráty. Vzorek dispergovaný v čištěné vodě byl bez aglomerátů nanočástic. Stejný nález byl také u vzorku F (Nanobeads based on PD, Chromeon 545 marked).
3. Aglomeráty vytvořené v disperzích nanočástic rozptýlených ve fosfátových pufrách lze desintegrovat zředěním pufrů čištěnou vodou v poměru 1:9.
4. Zmrazení membrány nemá vliv na její tloušťku. Průměrné tloušťky membrány zmrazené (0,51 mm) a nativní (0,49 mm) se prakticky nelišily.
5. Nanočástice typu PD značené Chromeonem 470 jsou schopné průniku přes prasečí sublingvální membránu.
6. Potvrzení průniku je významné tím, že vylučuje vliv průniku nanočástic arteficiální cestou.
7. Metoda fixace membrány ve Franzově difúzní cele nemá statisticky významný vliv na množství proniklých nanočástic.
8. Lépe pronikají nanočástice přes dlouhodobě zmrazenou sublingvální membránu než přes nativní membránu čerstvě vypreparovanou.
9. Použité nanočástice bylo možné pozorovat fluorescenčním mikroskopem na membráně z donorové i akceptorové strany.
10. Doporučení: provést měření s větším počtem vzorků ve více sériích, aby množství dat pro statistické zpracování bylo dostačující. Zaměřit se na možnosti ovlivnění permeace nanočástic membránou, např. vhodnou úpravou donorové fáze.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>C<sub>k</sub> [mg/100ml]</b>	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
<b>C<sub>k</sub> [mg/100ml]</b>	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
<b>DLS</b>	dynamický rozptyl světla
<b>ISO</b>	citlivost – fluorescenční mikroskop
<b>J [μg.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>]</b>	flux nanočástic
<b>M<sub>r</sub> [g/mol]</b>	molekulová hmotnost
<b>n</b>	počet naměřených bodů
<b>NČ</b>	nanočástice
<b>P1</b>	první blok měření
<b>P2</b>	druhý blok měření
<b>PdI</b>	index polydisperzity
<b>pH</b>	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
<b>PTFE</b>	polytetrafluorethylen
<b>q</b>	absolutní člen
<b>Q<sub>t</sub> [μg/cm<sup>2</sup>]</b>	množství permeantu prošlého přes 1 cm <sup>2</sup> sublingvální membrány
<b>R [%]</b>	poměr množství permeantu prošlého membránou v určitém čase k maximálnímu prošlému množství permeantu
<b>r</b>	korelační koeficient
<b>SD</b>	směrodatná odchylka
<b>t [h]</b>	čas
<b>UV/VIS</b>	ultrafialové/viditelné světlo
<b>V<sub>o</sub>[ml]</b>	celkové množství akceptorové fáze
<b>ΔV<sub>dop</sub> [ml]</b>	množství doplňované akceptorové fáze
<b>WIB</b>	filtr – fluorescenční mikroskop

## 8 LITERATURA

1. Klusoň, Petr a kol. Vítejte v "nanosvětě". *Chemické listy*. 2007, 101, stránky 262-272.
2. Prnka, Tasilo a Šperlink, Karel. *Bionanotechnologie, nanobiotechnologie, nanomedicína*. Ostrava : Repronis, 2006. ISBN 80-7329-134-7.
3. Rabišková, Miloslava. Nanočástice pro lékové formy. *Remedia*. 2007, 5, stránky 495–501.
4. Trojan, Stanislav a kol. *Lékařská fyziologie*. Praha : Grada, 2003. ISBN 80-2470-512-5.
5. Čihák, Radomír. *Anatomie 2*. Praha : Grada, 2013. ISBN 80-247-4788-0.
6. Petrovický, Pavel a kol. *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi - II. svazek - Orgány a cévy*. Martin (SR) : Osveta, 2001. ISBN 80-8063-047-X.
7. Macháčková, Marie. [www.agronavigator.cz](http://www.agronavigator.cz). [Online] [Citace: 5. 1. 2013.] <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=3700&ids=148>.
8. Moreira, Veronika. [zdrave.cz](http://zdrava-vyziva.zdrave.cz/chut-jeji-vnimani-a-vyznam/). [Online] [Citace: 5. 1. 2014.] <http://zdrava-vyziva.zdrave.cz/chut-jeji-vnimani-a-vyznam/>.
9. Silbernagl, Stefan a Despopoulos, Agamemnon. *Atlas fyziologie člověka*. Praha : Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
10. Narang, Neha a Sharma, Jyoti. Sublingual mucosa as a route for systemic drug delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011, 3.
11. Singh, Manisha a kol. An overview on fast disintegrating sublingual tablets. *International Journal of Drug Delivery*. 2012, 4.
12. Patel, Nibha a Pancholi, SS. Sublingual Route for Systemic Drug Delivery. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical sciences*. 2012, 3.
13. [www.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org/wiki/Sublingual_administration). [Online] [Citace: 14. 1. 2014.] [http://en.wikipedia.org/wiki/Sublingual\\_administration](http://en.wikipedia.org/wiki/Sublingual_administration).
14. [www.nano-concept.cz](http://www.nano-concept.cz/co-je-to-nanotechnologie/). [Online] [Citace: 16. 1. 2014.] <http://www.nano-concept.cz/co-je-to-nanotechnologie/>.

15. nanotechnologie.vsb.cz. [Online] [Citace: 16. 1. 2014.]  
<http://nanotechnologie.vsb.cz/>.
16. Kubínek, Roman a Stránská, Vendula. Úvod do problematiky nanotechnologií. [Online] [Citace: 16. 1. 2014.]  
<http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/nanotechnologie.pdf>.
17. Krajská hygienická stanice Moravskoslezského kraje. [Online] [Citace: 17. 1. 2014.] [http://www.khsova.cz/01\\_aktuality/nanotechnologie.php?datum=2009-03-18](http://www.khsova.cz/01_aktuality/nanotechnologie.php?datum=2009-03-18).
18. www.nono4you.cz. [Online] [Citace: 17. 1. 2014.]  
<http://www.nano4you.cz/page/nanotechnologie/2>.
19. Hájková, Zdeňka. www.studiumchemie.cz. [Online] [Citace: 17. 1. 2014.]  
[http://www.studiumchemie.cz/materialy/Zdenka\\_Hajkova/nanotechnologie.pdf](http://www.studiumchemie.cz/materialy/Zdenka_Hajkova/nanotechnologie.pdf).
20. Řezanka, Pavel. ksich.natur.cuni.cz. [Online] [Citace: 18. 1. 2014.]  
<http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1>.
21. Pucek, Robert. Příprava a aplikace nanočástic vybraných kovů či jejich oxidů v spektroskopických, katalytických a environmentálních aplikacích. *Habilitační práce*. Olomouc : autor neznámý, 2013.
22. Bartovská, Lidmila a Šišková, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha : VŠCHT, 2010. ISBN 80-7080-745-3.
23. Mandal, Ananya. www.news-medical.net. [Online] [Citace: 20. 1. 2014.]  
<http://www.news-medical.net/health/Nanoparticles-What-are-Nanoparticles.aspx>.
24. Topinka, Jan. Nanočástice: Technologický zázrak, nebo hrozba pro lidské zdraví? Česká Pozice, Praha : MAFRA a.s., 26. 2. 2013.
25. www.pharmainfo.net. [Online] [Citace: 20. 1. 2014.]  
<http://www.pharmainfo.net/nanoparticles>.
26. www.sigmaaldrich.com. [Online] [Citace: 21. 1. 2014.]  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/43187?lang=en&region=CZ>.
27. Veselá, Mária. www.chempoint.cz. [Online] [Citace: 28. 1. 2014.]  
<http://www.chempoint.cz/fluorescencni-mikroskopie>.
28. www.wikiskripta.cz. [Online] [Citace: 28. 1. 2014.]  
[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD\\_mikroskop](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskop)

29. www.gauravtiwari.org. [Online] [Citace: 28. 1. 2014.]  
<http://gauravtiwari.org/wp-content/uploads/2014/01/jablonski-diagram.jpg>.
30. Kalina, Michal. www.chempoint.cz. [Online] [Citace: 28. 1. 2014.]  
<http://www.chempoint.cz/vyuziti-dynamickeho-rozptylu-svetla-k-mereni-viskozity>.
31. www.malvern.com. [Online] [Citace: 28. 1. 2014.]  
<http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/>.
32. Šenkeříková, Jana. Charakterizace emulzí fotonovou korelační spektroskopií. *Diplomová práce*. Zlín : UTB, 2010.
33. Kopecký, František a kol. Inclusion complexation of carbethopendecinium bromide with some  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrines studied by potentiometry with membrane electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2004, 69.
34. Pucek, Robert a Kiliánová, Martina. *Cvičení ze základů nanomateriálové chemie*. Olomouc : UPOL, 2012.
35. Nizri, G. a kol. Nanostructures formed by self-assembly of negatively charged polymer and cationic surfactants. *Langmuir*. 2009, 25.

# 9 PŘÍLOHY

## Protokol P1-1

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,9$

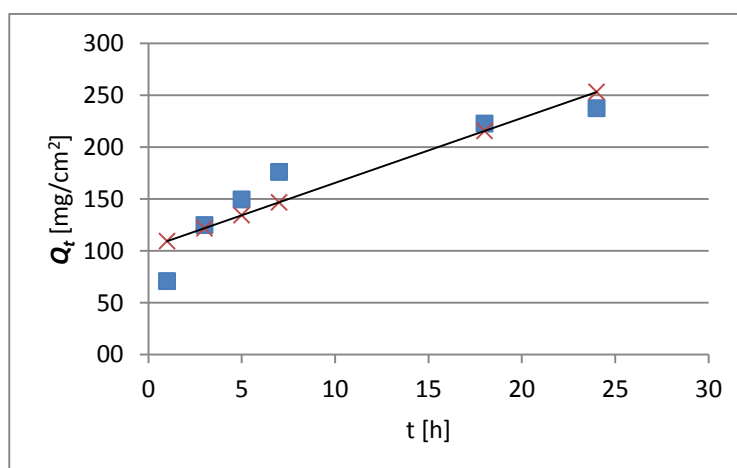
Jazyk

Fixace: lepidlo

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,444	1	0,444	70,7	70,7
3	0,756	1	0,784	124,7	124,7
5	0,864	1	0,939	149,3	149,3
7	0,978	1	1,107	176,1	176,1
18	1,208	1	1,399	222,4	222,4
24	1,226	0	1,493	237,4	237,4

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	70,7	109,2
3	124,7	121,7
5	149,3	134,3
7	176,1	146,8
18	222,4	215,5
24	237,4	253,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 6,251225
Abs. člen	q = 102,9953
Korelační koef.	r = 0,922971





## Protoko P1-2

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,7$

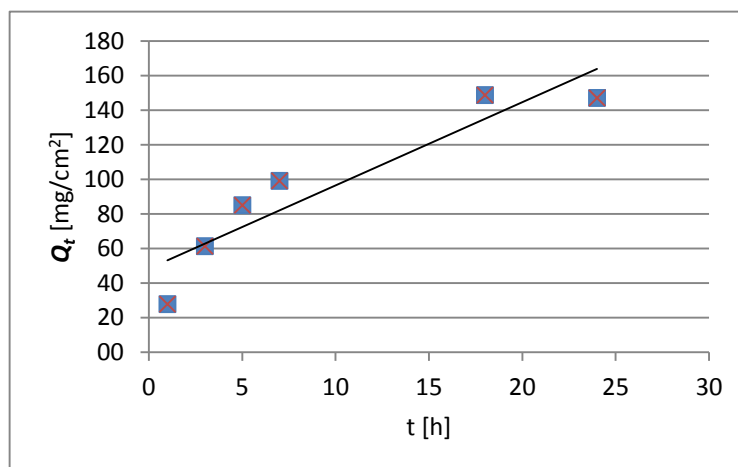
Jazyk

Fixace: lepidl

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,157	1	0,157	27,8	27,8
3	0,337	1	0,346	61,3	61,3
5	0,453	1	0,481	85,1	85,1
7	0,506	1	0,560	99,1	99,1
18	0,758	1	0,841	148,8	148,8
24	0,706	0	0,831	147,2	147,2

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$
1	27,8	27,8
3	61,3	61,3
5	85,1	85,1
7	99,1	99,1
18	148,8	148,8
24	147,2	147,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 4,81403
Abs. člen	q = 48,3444
Korelační	r = 0,92869



### Protoko P1-3

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,4$

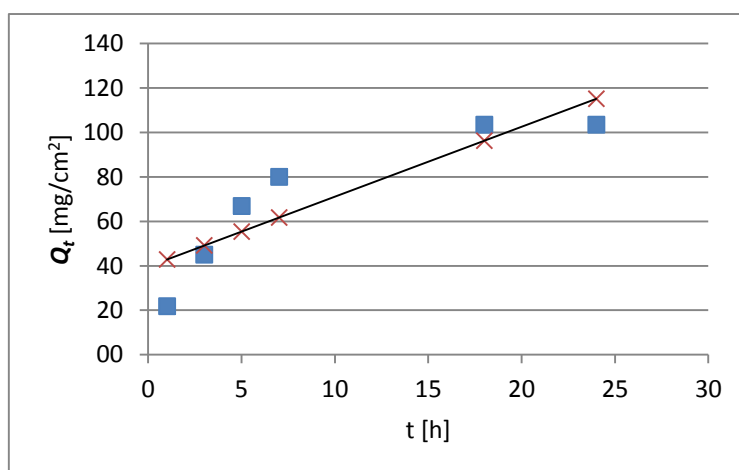
Jazyk

Fixace: lepidl

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,142	1	0,142	21,8	21,8
3	0,283	1	0,292	45,0	45,0
5	0,406	1	0,434	66,8	66,8
7	0,466	1	0,520	80,0	80,0
18	0,587	1	0,671	103,4	103,
24	0,549	0	0,671	103,4	103,

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$
1	21,8	42,9
3	45,0	49,1
5	66,8	55,4
7	80,0	61,7
18	103,4	96,2
24	103,4	115,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 3,13983
Abs. člen	q = 39,7191
Korelační	r = 0,88843



## Protokol P1-4

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/10]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/10]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o/1cm^2$

$V_o = 15,6$

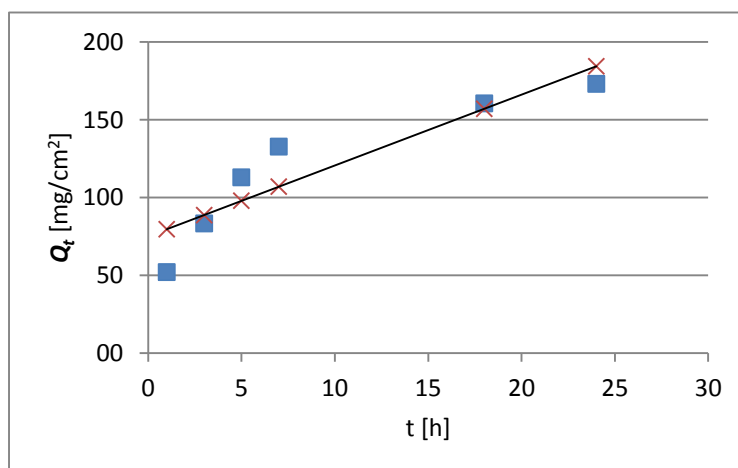
Jazyk

Fixace: lepidlo

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,334	1	0,334	52,2	52,2
3	0,513	1	0,535	83,4	83,4
5	0,671	1	0,725	113,1	113,1
7	0,755	1	0,852	132,9	132,9
18	0,883	1	1,029	160,5	160,5
24	0,907	0	1,110	173,1	173,1

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	52,2	79,7
3	83,4	88,8
5	113,1	98,0
7	132,9	107,1
18	160,5	157,2
24	173,1	184,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 4,554626
Abs. člen	q = 75,17825
Korelační koef.	r = 0,909836



## Protoko P1-5

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,9$

Jazyk

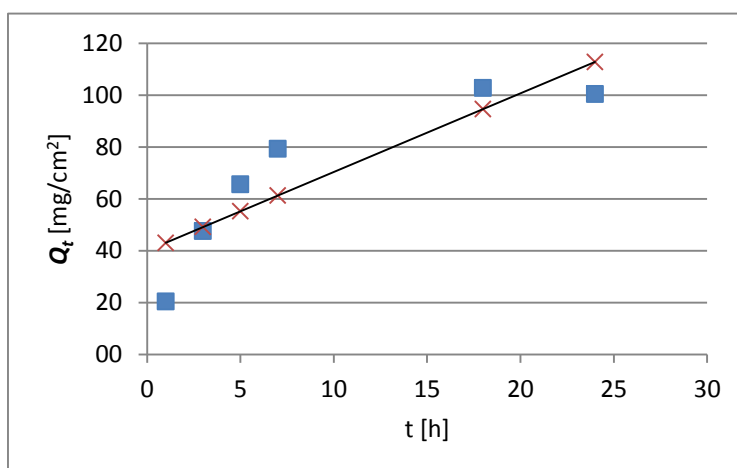
Fixace: siliko

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,114	1	0,114	20,5	20,5
3	0,259	1	0,266	47,6	47,6
5	0,346	1	0,366	65,6	65,6
7	0,403	1	0,443	79,3	79,3
18	0,511	1	0,574	102,7	102,
24	0,470	0	0,561	100,5	100,

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$
1	20,5	43,1
3	47,6	49,2
5	65,6	55,2
7	79,3	61,3
18	102,7	94,6
24	100,5	112,8

### Parametry regrese

Počet bodů n = 6  
 Flux J = 3,03214  
 Abs. člen q = 40,0563  
 Korelační r = 0,87713



## Protoko P1-6

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,4$

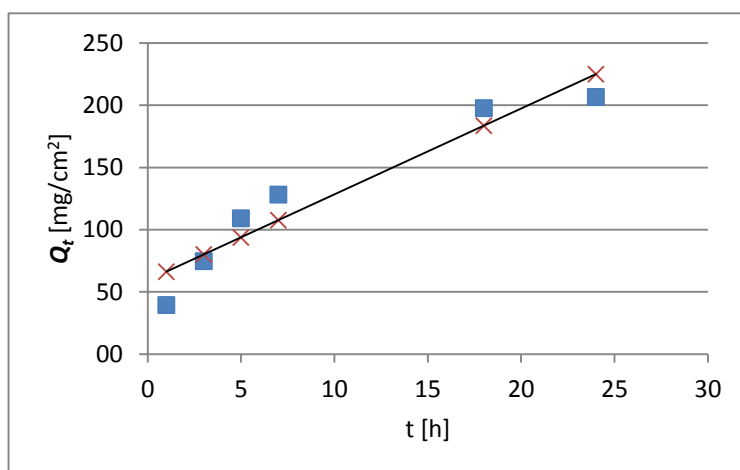
Jazyk

Fixace: siliko

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,257	1	0,257	39,5	39,5
3	0,470	1	0,486	74,9	74,9
5	0,663	1	0,710	109,3	109,
7	0,743	1	0,833	128,3	128,
18	1,145	1	1,283	197,7	197,
24	1,131	0	1,343	206,9	206,

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$
1	39,5	66,4
3	74,9	80,1
5	109,3	93,9
7	128,3	107,7
18	197,7	183,5
24	206,9	224,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 6,89318
Abs. člen	q = 59,4642
Korelační	r = 0,95513



## Protokol P1-7

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o/1cm^2$

$V_o = 17,8$

Jazyk

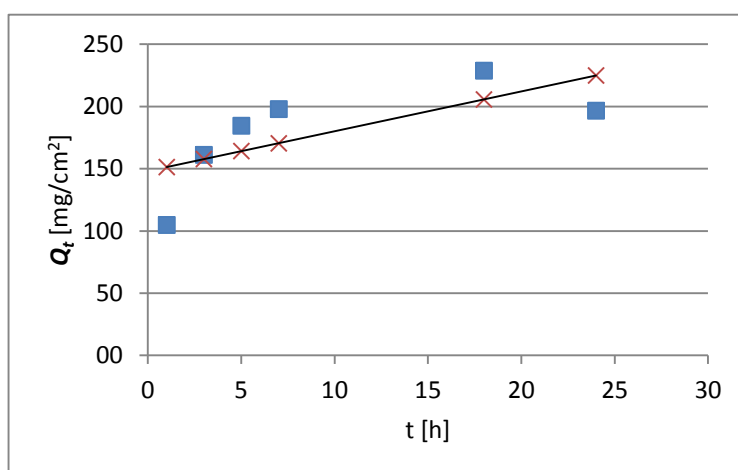
Fixace: silikon

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,589	1	0,589	104,9	104,9
3	0,872	1	0,905	161,0	161,0
5	0,955	1	1,037	184,6	184,6
7	0,977	1	1,113	198,0	198,0
18	1,095	1	1,286	228,9	228,9
24	0,853	0	1,105	196,7	196,7

$t$	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	104,9	151,3
3	161,0	157,7
5	184,6	164,1
7	198,0	170,5
18	228,9	205,7
24	196,7	224,9

### Parametry regrese

Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 3,19797$
Abs. člen	$q = 148,1098$
Korelační koef.	$r = 0,693301$



## Protokol P1-8

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

$V_o = 16,1$

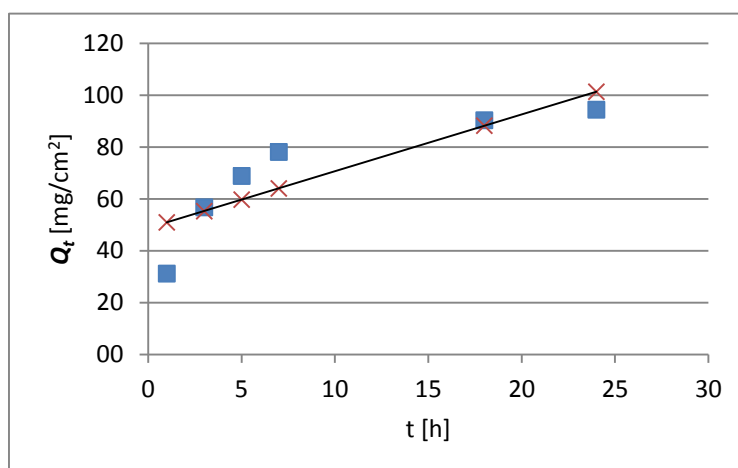
Jazyk

Fixace: silikon

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,194	1	0,194	31,2	31,2
3	0,340	1	0,352	56,7	56,7
5	0,395	1	0,428	68,9	68,9
7	0,427	1	0,485	78,1	78,1
18	0,477	1	0,561	90,3	90,3
24	0,473	0	0,587	94,4	94,4

$t$	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	31,2	50,9
3	56,7	55,3
5	68,9	59,7
7	78,1	64,1
18	90,3	88,2
24	94,4	101,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 2,192771$
Abs. člen	$q = 48,74075$
Korelační koef.	$r = 0,85851$



## Protokol P2-1

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,9$

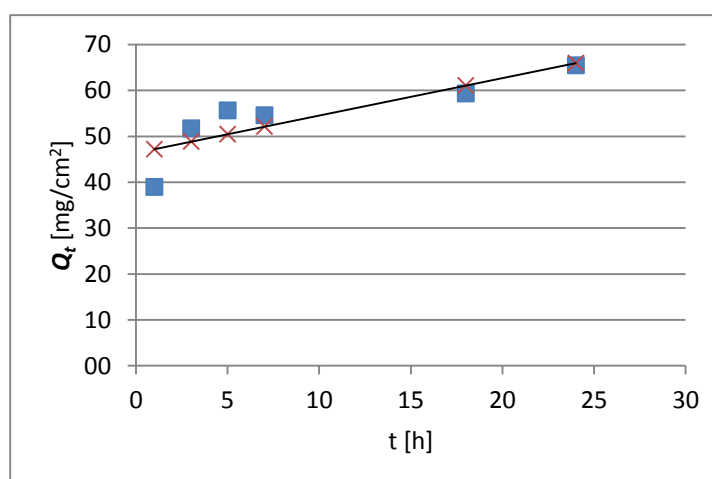
Jazyk

Fixace lepidlo

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,245	1	0,245	38,9	38,9
3	0,310	1	0,326	51,8	51,8
5	0,315	1	0,350	55,6	55,6
7	0,288	1	0,343	54,6	54,6
18	0,300	1	0,373	59,3	59,3
24	0,320	0	0,412	65,5	65,5

$t$	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	38,9	47,2
3	51,8	48,8
5	55,6	50,5
7	54,6	52,1
18	59,3	61,1
24	65,5	66,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 0,815615$
Abs. člen	$q = 46,4026$
Korelační koef.	$r = 0,84483$





## Protokol P2-2

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o/1cm^2$

$V_o = 17,7$

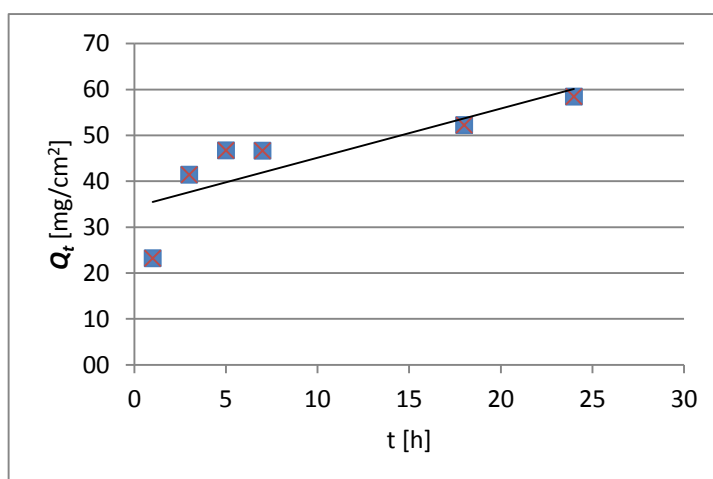
Jazyk

Fixace lepidlo

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,131	1	0,131	23,2	23,2
3	0,226	1	0,234	41,4	41,4
5	0,244	1	0,264	46,7	46,7
7	0,230	1	0,264	46,7	46,7
18	0,248	1	0,295	52,2	52,2
24	0,269	0	0,330	58,5	58,5

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	23,2	23,2
3	41,4	41,4
5	46,7	46,7
7	46,7	46,7
18	52,2	52,2
24	58,5	58,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 1,07109
Abs. člen	q = 34,41653
Korelační koef.	r = 0,817408



## Protokol P2-3

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,4$

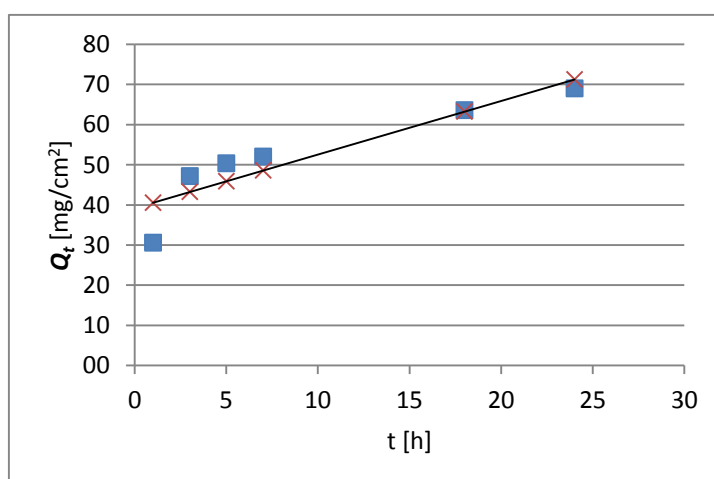
Jazyk

Fixace lepidlo

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,199	1	0,199	30,6	30,6
3	0,294	1	0,306	47,2	47,2
5	0,295	1	0,327	50,4	50,4
7	0,286	1	0,338	52,0	52,0
18	0,343	1	0,413	63,6	63,6
24	0,356	0	0,448	69,0	69,0

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	30,6	40,5
3	47,2	43,2
5	50,4	45,9
7	52,0	48,6
18	63,6	63,2
24	69,0	71,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 1,335057
Abs. člen	q = 39,20445
Korelační koef.	r = 0,912096



## Protokol P2-4

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,6$

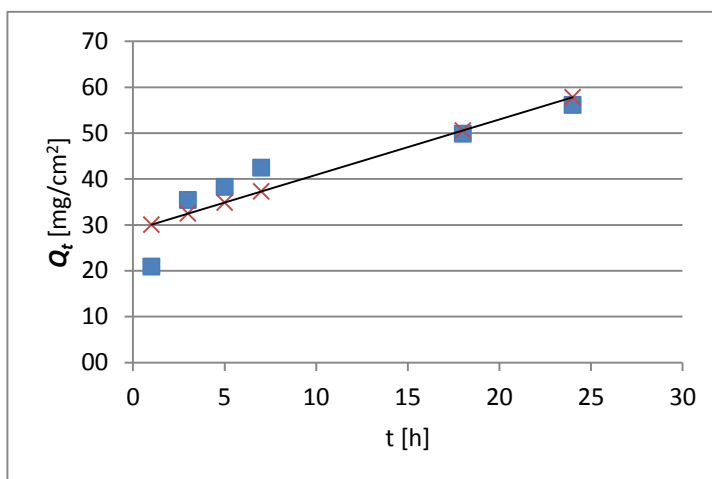
Jazyk

Fixace lepidlo

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,134	1	0,134	20,9	20,9
3	0,218	1	0,227	35,4	35,4
5	0,223	1	0,245	38,3	38,3
7	0,235	1	0,272	42,4	42,4
18	0,268	1	0,320	49,9	49,9
24	0,291	0	0,360	56,2	56,2

$t$	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	20,9	30,0
3	35,4	32,5
5	38,3	34,9
7	42,4	37,3
18	49,9	50,6
24	56,2	57,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 1,208535$
Abs. člen	$q = 28,82896$
Korelační koef.	$r = 0,907079$



## Protokol P2-5

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,9$

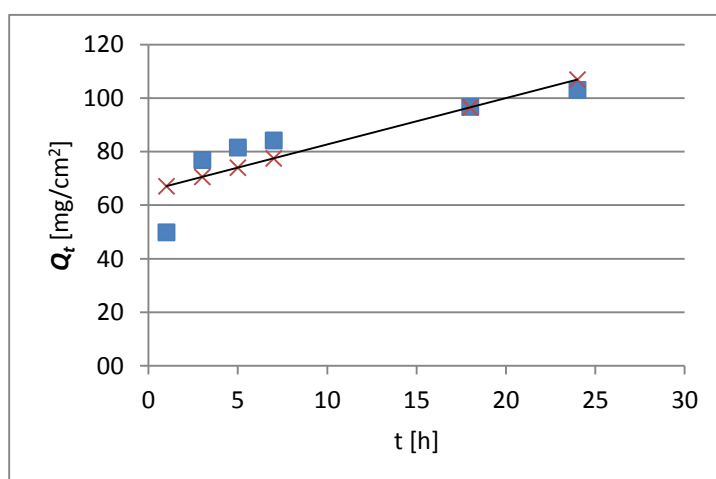
Jazyk

Fixace silikon

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,279	1	0,279	49,9	49,9
3	0,414	1	0,430	76,9	76,9
5	0,417	1	0,456	81,6	81,6
7	0,409	1	0,471	84,2	84,2
18	0,455	1	0,540	96,7	96,7
24	0,466	0	0,576	103,1	103,1

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	49,9	67,1
3	76,9	70,5
5	81,6	74,0
7	84,2	77,5
18	96,7	96,5
24	103,1	106,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 1,732544
Abs. člen	q = 65,33652
Korelační koef.	r = 0,858449



## Protokol P2-6

$V_o$	[ml]
t	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,4$

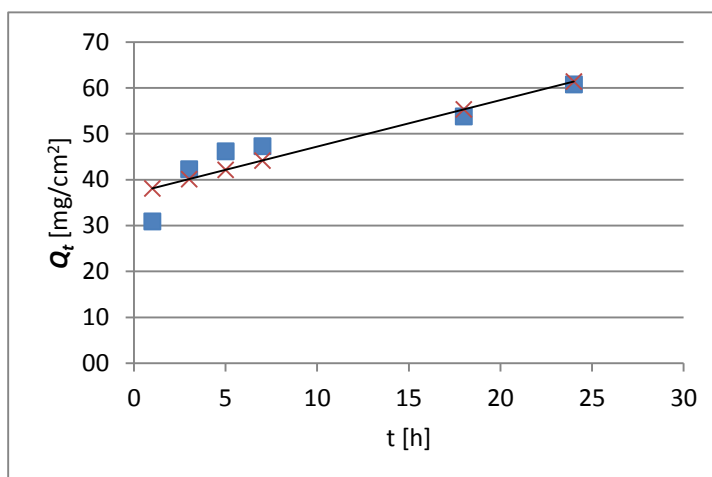
Jazyk

Fixace silikon

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,165	1	0,165	25,4	25,4
3	0,208	1	0,219	33,7	33,7
5	0,202	1	0,226	34,9	34,9
7	0,200	1	0,237	36,6	36,6
18	0,236	1	0,286	44,0	44,0
24	0,268	0	0,333	51,3	51,3

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	25,4	29,5
3	33,7	31,4
5	34,9	33,3
7	36,6	35,1
18	44,0	45,5
24	51,3	51,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,939094
Abs. člen	q = 28,57515
Korelační koef.	r = 0,963331



## Protokol P2-7

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,8$

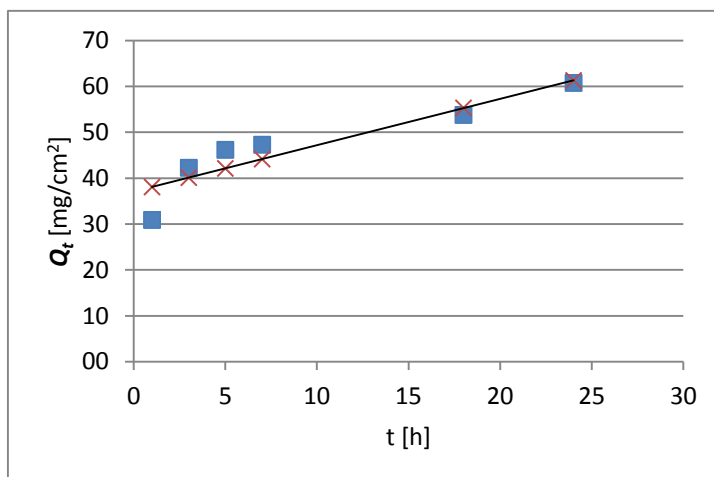
Jazyk

Fixace silikon

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,175	1	0,175	31,1	31,1
3	0,242	1	0,252	44,9	44,9
5	0,258	1	0,281	50,1	50,1
7	0,259	1	0,297	52,8	52,8
18	0,293	1	0,345	61,4	61,4
24	0,356	0	0,425	75,6	75,6

$t$	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	31,1	39,3
3	44,9	42,4
5	50,1	45,5
7	52,8	48,5
18	61,4	65,5
24	75,6	74,7

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 1,541607$
Abs. člen	$q = 37,74335$
Korelační koef.	$r = 0,940859$



## Protokol P2-8

$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[mg] ve $V_o$
$Q_t$	[mg] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,1$

Jazyk

Fixace silikon

$t$	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,192	1	0,192	30,9	30,9
3	0,251	1	0,262	42,3	42,3
5	0,259	1	0,287	46,2	46,2
7	0,250	1	0,294	47,3	47,3
18	0,275	1	0,334	53,8	53,8
24	0,301	0	0,377	60,8	60,8

$t$	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	30,9	38,1
3	42,3	40,1
5	46,2	42,2
7	47,3	44,2
18	53,8	55,3
24	60,8	61,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 1,01061$
Abs. člen	$q = 37,10555$
Korelační koef.	$r = 0,913993$

