UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Vliv přídavku viskozifiantů na vlastnosti nanoemulzí II

The effect of addition of thickening agents on nanoemulsion properties II

Rigorózní práce

Autor: Mgr. Alžběta Dorota Dostálová

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

Brno Červen 2015

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

. . . . . .

Podpis autora

Děkuji Doc. Pavlu Doležalovi a Mgr. Pavlu Berkovi za hodnotné rady a věnovaný čas při vypracování této práce.

Dále děkuji Vladimírovi a Vladimíře nejen za podporu.

ABSTRAKT

V nanoemulzích, které jsou mléčně zakalené, se rozměry vnitřní diskontinuální fáze pohybují nejčastěji v rozmezí hodnot mezi 200 nm a 300 nm. Na rozdíl od mikroemulzí, které jsou transparentní a termodynamicky stabilní, podléhají nanoemulze řadě stejných destabilizačních procesů jako makroemulze, včetně Ostwaldova zrání. Přidání viskozifiantu ovlivňuje stabilitu systému, přičemž obecně platí, že zvýšením viskozity vnější spojité fáze se celý emulzní systém fyzikálně stabilizuje.

Je-li zvýšení viskozity nanoemulze dáno přítomností polymerního viskozifiantu, může při překročení určité koncentrace polymerního viskozifiantu dojít naopak k destabilizaci. Tohoto efektu bylo v práci využito k rozhodnutí o výběru vhodné olejové fáze nanoemulzí.

Jako viskozifianty byly zvoleny dva deriváty celulózy, konkrétně hypromelóza (HPMC) a hydroxyethylcelulóza (HEC), které byly k předem připraveným nanoemulzím přidány v koncentracích 0,083; 0,167; 0,333 a 0,667 ‰. Vzniklé soustavy byly po zpracování proměřeny metodou DLS, ke zjištění velikosti dispergovaných částic olejové fáze a viskozitně, metodou kapilární viskozimetrie.

Jako metoda zrychlených stabilitních testů byla zvolena zkouška tepelným namáháním. Vzorky byly vystaveny 5 cyklům změn teploty z 8 °C na 40 °C.

Velikost částic byla v průběhu teplotního namáhání nanoemulzí měřena opakovaně a pohybovala se v rozmezí hodnot 180 ± 50 nm u vzorků s nižšími koncentracemi viskozifiantu (do 0,33 ‰).

U vyšší koncentrace (0,667 ‰) přidaného viskozifiantu bylo možné zaznamenat zvýšenou polydisperzitu systému (rozmezí velikosti částic vzrostlo na interval od 75 nm do 280 nm) a docházelo k destabilizaci celého systému již v průběhu měření.

Zkouška tepelným namáháním nikterak neovlivnila viskozitu nanoemulzního systému.

Z makroskopického pohledu, i z pohledu hodnocení změn velikosti částic, byly jako nestabilnější nanoemulze vyhodnoceny vzorky číslo 25 a 27. Jejich olejovou fázi lze proto doporučit jako perspektivnější pro praktické využití.

Klíčová slova: nanoemulze, viskozifiant, DLS, stabilita emulze, stabilitní test.

ABSTRACT

Non-transparent nanoemulsions are determined by particle size of discontinuous phases in range of 200 – 300nm. Contrary to microemulsions that are transparent and thermodynamically stable, nanoemulsions are affected by number of common destabilizing processes as macroemulsions including Ostwald ripening. Adding of thickening agents to the nanoemulsions shall affect stability of the system. Generally, as the viscosity of continuous phase increases, so does the physical stability of the emulsion system.

However, the system may be destabilized if the viscosity of nanoemulsions is increased due to the effect of addition of polymer thickening agent and if certain concentration of polymer thickening agent is exceeded. This phenomenon is utilized in the thesis in order to select appropriate oil phase of nanoemulsions.

Two cellulose derivatives hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and hydroxyethylcellulose (HEC) were selected as thickening agents which were added to nanoemulsions at the different concentrations assessed as follows: 0.083; 0.167; 0.333 and 0.667 ‰. Samples were then examined using the DLS (Dynamic Light Scattering) method in order to measure size of dispersed particles of oil phase and by the capillary viscosimetry.

In order to test stability of the samples the thermal stress test was used (temperature rise from 8 °C to 40 °C in 5 cycles).The particle size was measured repeatedly during the thermal stress test. For samples with lower concentration of the thickening agent (up to 0.33 ‰), the particle size range was 180 nm ± 50 nm.

Higher concentration of the thickening agent (0.667 ‰) subsequent to higher polydispersity of the system (the particle size range increased to 75 nm – 280 nm) and the system became unstable yet during the measurement.

There was no appreciable influence of the thermal stress test on the viscosity of nano-emulsion system.

The samples of the nanoemulsion No. 25 and No. 27 were evaluated to be the most stable ones, from both perspectives, a macroscopic and change in particle size point of view. Therefore, the oil phase of the nanoemulsion samples No. 25 and No. 27 is suggested as the most prospective for practical use.

Keywords: nanoemulsion, thickening agent, DLS, stability of emulsion, stability tests

OBSAH

1 ÚVOD 8

2 ZADÁNÍ PRÁCE 9

3 TEORETICKÁ ČÁST 10

3.1 Disperzní systémy 10

3.2 Emulze 11

3.2.1 Typy emulzí 12

3.3 Mikromulze 12

3.3.1 Vznik mikroemulzí 13

3.3.2 Využití mikroemulzí 14

3.4 Nanoemulze 14

3.4.1 Příprava nanoemulzí 14

3.4.2 Využití nanoemulzí ve farmacii 16

3.5 Emulgátory 17

3.5.1 Tenzidy jako emulgátory 17

3.5.2 Teplota inverze fází 19

3.6 Viskozifianty 20

3.6.1 Třídění viskozifiantů 20

3.6.2 Biopolymery 21

3.7 Reologické vlastnosti emulzí 25

3.7.1 Viskozita a metody měření viskozity 26

3.8 Stabilita a kompatibilita 30

3.8.1 Stabilitní zkoušky 31

3.8.2 Stabilita emulzí 32

3.8.3 Hodnocení stability emulzí 35

3.9 Analýza velikosti částic laserovou difrakcí (DLS) 36

3.9.1 Brownův pohyb 37

3.9.2 Teorie rozptylu světla 38

3.9.3 Přístrojové vybavení 38

3.9.4 Princip 39
3.9.5 Výhody nových měřících systémů 42
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 44
4.1 Suroviny a materiál 44
4.2 Přístroje a pomůcky 44
4.3 Složení výchozích nanoemulzí 45
4.5 Měření velikosti částic 47
4.6 Stanovení viskozity 48
4.7 Zkouška tepelným namáháním 48
5 VÝSLEDKY 49
5.1 Velikost částic nanoemulzí 49
5.1.1 Protokoly z DLS měření 49
Protokol 1 50
Protokol 2 51
5.1.2 Souhrnné výsledky měření velikosti částic 52
5.2 Hodnocení viskozity emulzí 57
5.3 Vizuální hodnocení emulzí ze zkoušek tepelným namáháním 59
6 DISKUSE 66
7 ZÁVĚRY 72
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 73
9 POUŽITÁ LITERATURA 74

1 ÚVOD

Farmaceutická technologie dlouhodobě zaměřuje svoji pozornost na vývoj a postupné zavádění takových lékových forem do terapeutické praxe, které by umožnuily cílenou distribuci a uvolňování léčiv.. Z farmakoterapeutického pohledu je přitom významným důvodem zavedení takové inovace především redukce vedlejších nežádoucích účinků léčiv, a to jak lokálních, tak i systémových. Dále se zvyšuje účinnost terapie a je možné řídit uvolňování a intenzitu účinku léčiv.

Pro transport obtížně vstřebatelných léčiv do místa terapeutického působení se používají mikročásticové a nanočásticové soustavy. Subcelulární velikost takových struktur aplikačních soustav umožňuje transport léčiv do orgánů, tkání a buněk těla, které zůstávají samotným léčivým látkám nedostupné. Používají se k cílenému uvolňování a působení léčiva při perorálním, parenterálním i lokálním podání.

Mikroemulze, které jsou transparentní, vznikají spontánně a vykazují dobrou stabilitu. Obsahují vysoký podíl tenzidu, nejčastěji okolo 20 %. Ten bývá často jedním z důvodů alergických reakcí a limitujícím faktorem pro parenterální podání. Na rozdíl od toho nanoemulze, pro které je charakteristická velikost kapiček vnitřní fáze do 500 nm, neobsahují vysoké podíly tenzidu. Mohou být mléčně zakalené a dochází u nich ke stejným projevům nestability jako u makroemulzí, tedy ke krémovatění, Ostwaldovu zrání emulze, flokulaci.

Při tvorbě nanoemulzí je potřebné brát v úvahu nejen vlastnosti povrchově aktivní látky, resp. jejích směsí, ale také kvalitu a kvantitu olejové fáze. Jednou z možností, jak ovlivnit stabilitu nanoemulzí, je zvýšení viskozity kontinuální fáze přidáním viskozifiantu. V takovém případě je ovšem třeba počítat i s dalšími účinky viskozifiantu na emulzní systém.

V této práci jsou hodnoceny stabilitně disperzní charakteristiky a makroskopické chování modelových nanoemulzí s kvalitativně rozdílnou kompozitní olejovou fází ve dvou aplikačně požadovaných kvantitativních poměrech. Testované nanoemulze jsou uvažovány jako nosiče perorálně aplikovaných léčiv.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

Prvotním zadáním této práce bylo hodnocení dvou formulačně významných fyzikálních charakteristik hydrofilních nanoemulzí s obsahem dvou kvalitativně odlišných směsí olejů kvantitativně představujících 20 %, resp. 30 % vnitřní fáze. Dalším úkolem bylo hodnotit stabilitu zadaných nanoemulzí samotných a dále po dodatečném odstupňovaném přídavku dvou polaritně různých polymerních viskozifiantů. K tomuto účelu byly jako viskozifianty vybrány dva zásadně rozdílné deriváty celulózy, konkrétně hydroxyethylcelulóza a hypromelóza.

Pro získání dostatečně informativních stabilitních údajů byly vzorky nanoemulzí vystaveny teplotnímu namáhání, průběžně hodnoceny makroskopicky a přitom byla sledována případná změna jejich viskozity a změny velikosti částic dispergované fáze.

Cílem práce z praktického hlediska bylo nalézt odpověď směřující k výběru vhodné olejové fáze pro fyzikálně stabilní nanoemulzi s případným nalezením stabilizačně vhodného koncentračního rozmezí některého ze dvou derivátů celulosy zadaných jako viskozifianty. Druhým krokem bylo využít koncentračně odstupňovaného přídavku derivátů celulosy k nalezení stabilitně nejrobustnější testované nanoemulzní soustavy.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Disperzní systémy

Disperze jsou látkové systémy, které obsahují alespoň dvě fáze nebo dvě složky, z nichž jedna je rozptýlena ve druhé v podobě částic. Spojitá, souvislá či kontinuální fáze disperzního systému bývá označována jako *dispergující fáze* (prostředí, médium). V ní rozptýlené částice jsou *dispergovanou složkou* (dispersum) nebo *dispergovanou fází* v případě větších částeček.[1]

Podle skupenství spojité fáze se disperzní systémy dělí na *plynné*, *kapalné* a nebo *tuhé*. Podle velikosti dispergovaných částic lze disperze členit na *analytické, koloidní a hrubě disperzní*.

U *analytických disperzí* mají rozptýlené částice vnitřní fáze průměr přibližně do 1 nm anebo počet atomů do 10^3. Jedná se o disperze nízkomolekulárních látek, nikoliv makromolekul.

Jako *koloidní systémy* jsou uváděny disperze s velikostí částic v průměru od 1 nm po 5 00nm, případně až po 1000 nm. Rozptýlené částice jsou zde zastoupeny shluky menších molekul a iontů (asociační koloidy), makromolekulami různých polymerů (molekulové koloidy), nebo částečkami jiné fáze (fázové koloidy).

Nad uvedenou hranici velikosti částeček pro koloidní systémy se soustavy označují jako *hrubé disperze*. Hrubé disperze s kapalnou dispergující fází jsou makroemulze – dispergovaná je fáze kapalná, suspenze – dispergovaná je fáze tuhá, u pěny je dispergovaná fáze plynná. Hrubé disperze plynu jsou aerodisperze, dýmy, mlhy a jejich kombinace – smog.

Podle uniformity velikosti částic lze rozlišovat *monodisperzní systémy* s relativně jednotnou velikostí částic. Ty jsou většinou stabilnější. V *polydisperzním* systému mají rozptýlené částice různou velikost a nižší stabilitu.

Problémem koloidních systémů je jejich termodynamická a mechanická nestabilita. Termodynamická nestálost se projevuje sklonem ke zmenšení velikosti plochy fázového rozhraní. To vede ke shlukování malých částic na větší – koagulaci. Fyzikálně mechanická nestálost se projevuje sedimentací. [2,3]

3.2 Emulze

Podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) jsou emulze definovány jako systémy, ve kterých jsou tekuté kapky a/nebo tekuté krystaly rozptýleny v kapalině.[4]

Emulze tvoří jednu z podtříd disperzních systémů. Jedná se o nestabilní, hrubě disperzní systém. Skládají se ze dvou vzájemně nemísitelných, nebo omezeně mísitelných, heterogenních kapalin. Jedná se tedy o soustavu vnější, spojité či kontinuální fáze, ve které je rozptýlena fáze vnitřní, diskontinuální.

Farmaceutické emulze obvykle tvoří jedna fáze vodná a druhá fáze olejová. Podle vnější a vnitřní fáze se emulze rozlišují na jednotlivé podtypy. Rozlišují se emulze typu *olej ve vodě, o/v*, kde jsou kapky oleje rozptýleny ve vnější spojité vodné fázi. Dále pak jsou to emulze typu *voda v oleji, v/o,* kde jsou v oleji rozptýleny kapky vodné fáze. Za vodnou fázi se přitom rozumí voda, dále vodný roztok, ale i směs vody s převahou jiné hydrofilní kapaliny, např. glycerolu. Olejovou fází se rozumí libovolná kapalná nebo polotuhá lipofilní látka, která je nemísitelná s vodou, jako např. parafínový olej, rostlinné oleje, živočišné tuky apod.

Emulze mohou být kapalné, ale i polotuhé soustavy. To závisí především na konzistenci vnější fáze. Emulze typu *o/v* se zdají být na pokožce alespoň zpočátku nemastné. Mísí se s vodou a vnější kontinuální fázi lze barvit barvivy, která jsou rozpustná ve vodě. Jejich elektrická vodivost odpovídá vodným roztokům. Emulze typu *v/o* zanechávají na pokožce mastný film a jsou jen velmi málo vodivé.

Emulze jsou většinou neprůhledné, mléčně bíle zkalené. A to i přes to, že se skládají z průhledných kapalných fází. Zákal vzniká v důsledku odrazu světla na kapkách vnitřní fáze. K odrazu světla dochází proto, že vlnová délka viditelného světla je menší, než je rozměr kapek vnitřní fáze. Obě fáze se liší indexem lomu. Zákal odlišuje běžné emulze od mikroemulzí, jejichž koloidní částice mají menší rozměr, než je vlnová délka viditelného světla.

Kromě jednoduchých emulzí lze také připravit emulze složené, dvojité, *v/o/v* se zdvojenou vodnou fází nebo *o/v/o* se zdvojenou olejovou fází.

Vzájemné spojení dvou nemísitelných fází je obtížné. Znamená to zvětšení energie o mezipovrchovou energii, jejíž mírou je mezipovrchové napětí obou kapalin. Takto připravené emulze jsou velmi nestabilní a rychle zanikají. Tím se energeticky náročná plocha dvou vzájemně nemísitelných kapalin opět sníží. Vznik emulze lze však

ulehčit přidáním třetí složky. Touto složkou je povrchově aktivní látka, emulgátor. Základní funkcí tzv. pravého emulgátoru je v tomto případě snížení mezipovrchového napětí kapalin. Emulgátor a další pomocné látky emulzní systém stabilizují.[2,5]

3.2.1 Typy emulzí

Pro emulze, jako disperzní systémy, existuje několik dělení. Nejběžnější je rozdělení emulzí podle velikosti částic vnitřní fáze.

Makroemulze se ještě dále dělí na emulze typu voda v oleji (*v/o*) a olej ve vodě (o/v). Velikost částic vnitřní fáze se pohybuje v rozmezí 0,1 μm – 5 μm, s nejčastějším průměrem 1 μm –2 μm. Jedná se o mléčně zakalený systém.

Velikost částic diskontinuální fáze v **mikroemulzních** systémech se pohybuje v rozmezí 5 nm – 50 nm, někdy se udává až 500 nm. Jedná se o termodynamicky stabilní, téměř čirou homogenní kapalinu.

Nanoemulze obsahují částice o velikosti od několika nanometrů až po 200 nm.[5] Velikost částic pro nanoemulze není jednotně definovaná. Některé zdroje uvádějí i širší rozpětí hodnot od 20 nm až 500 nm.[6] Jsou mléčně zbarvené, neprůhledné, ale v porovnání s makroemulzí jsou termodynamicky stabilnější.

Násobné emulze, také emulze v emulzi, se skládají z částic, které jsou větší než makroemulzní. Existují různé varianty těchto emulzí (*v/o/v, o/v/o, v/o/o, v/o/o/o*). Stejně jako makroemulze a nanoemulze se používají pro přípravu mikročástic a nanočástic.

U **smíšené emulze** je vodná fáze nahrazená fází olejovou, tedy typ *o/o*, ve které je účinná látka nerozpustná. [7,8]

3.3 Mikromulze

Mikroemulze (ME) se stejně jako makroemulze skládají ze tří základních složek, ze dvou vzájemně nemísitelných kapalin a povrchově aktivních látek (tenzidu případně kotenzidu). Podle potřeby se přidávají další komponenty.

Obsah tenzidu v ME je zpravidla několikanásobně vyšší než u makroemulzí, okolo 20 % hmotnosti soustavy. ME vytvářejí zejména iontové tenzidy. Někdy je zapotřebí dodat kotenzid – lipofilnější neiontový tenzid. ME lze také definovat jako micely s velkým obsahem solubilizátu a představují určitý přechod mezi emulzemi a micelárními koloidy.

Na rozdíl od makroemulzí a nanoemulzí vznikají ME samovolně, díky vysoké koncentraci tenzidu, surfaktantu. Pro vznik ME není potřeba dodat mechanickou energii. Vykazují nízké mezifázové napětí. ME jsou termodynamicky stabilní, nedochází u nich k separaci fází, tedy ke krémovatění, flokulaci, koalescenci a dalším projevům nestability. Pokud ovšem dojde k velké změně poměru účastnících se složek, může být narušen rovnovážný stav a to může vést k následnému zakalení.

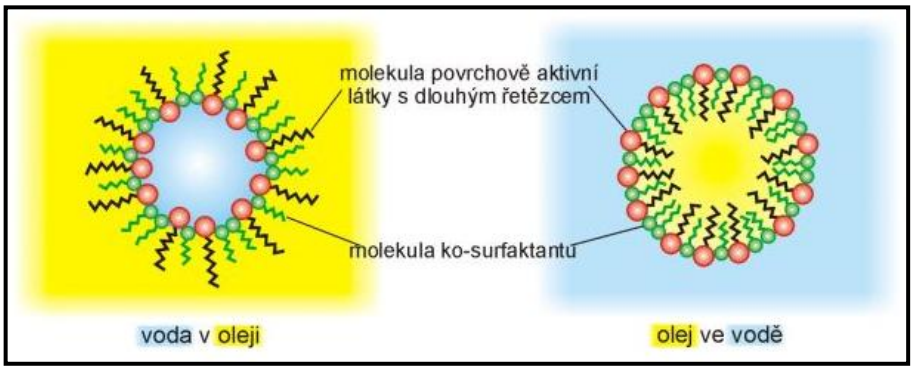
ME jsou nízkoviskózní, téměř čiré, transparentní, homogenní kapaliny a vykazují Tyndallův efekt[1].

Olejovou složkou ME bývají nejčastěji kapalné parafínové uhlovodíky. Rozlišují se převážně vodné ME typu *o/v*, emulze s vyrovnaným poměrem oleje a vody a ME typu *v/o* s menším podílem vody na celkové hmotnosti.

3.3.1 Vznik mikroemulzí

ME se připravují nejčastěji dvěma způsoby. Buď z klasických makroemulzí anebo z roztoků tenzidů, jejichž koncentrace se blíží kritické micelární koncentraci. Kritická micelární koncentrace je taková koncentrace tenzidu, při které dochází v systému k jeho samovolné agregaci do větších útvarů – micel.

Vznik ME se obvykle neobejde bez přidání kotenzidu, látky povrchově aktivní. Kotenzid sám o sobě není schopný vytvářet micely, protože jeho lipofilní řetězec je příliš krátký. Vstupuje do micelárních struktur a ještě dále snižuje mezipovrchové napětí (viz **Obrázek 1:** Schematické znázornění kapky mikroemulze Nejčastěji se používají alkoholy s kratší či střední délkou řetězce (např.: hexanol, dodekanol), nebo tuk z ovčí vlny.[2,9]



[1] **Tyndallův efekt** - rozptyl světla procházejícího kapalinou nebo plynem obsahujícím jemně rozptýlené, zejména koloidní částice. Svazek paprsků, procházející systémem, se v důsledku rozptylu světla na částicích stává při bočním pozorování viditelným. V homogenním prostředí tento jev nenastává.

Obrázek 1: Schematické znázornění kapky mikroemulze[10]

3.3.2 Využití mikroemulzí

ME se používají jako rozpouštědla a extrakční činidla, jejichž hydrofilně-lipofilní profil lze plynule měnit v širokém rozmezí. Nejčastěji se používají k solubilizaci ve vodě nerozpustných léčiv a k následnému cílenému transferu, což lze využít i u parenterálií. Nesmí se ovšem opomenout na vysoký podíl olejové fáze a vysoké procento tenzidu a kotenzidu.

Dále se s výhodou mikroemulze používají jako membránové přenašeče v přípravcích s řízeným uvolňováním. Mohou také sloužit jako ochranné nosiče proteinových složek, nativních enzymů a monoklonálních protilátek.[2]

3.4 Nanoemulze

Nanoemulze (NE) tvoří jednu z podskupin multifázových koloidních disperzí. Nejčastěji jsou definovány emulze typu *o/v*, ačkoliv jsou známé i reverzní NE typu *v/o*. Průměrná velikost částic vnitřní fáze se pohybuje v rozmezí 50 nm až 1 000 nm. Definice NE není doposud jednotná, a proto se liší i uváděná velikost vnitřní fáze, nejčastěji průměrná velikost částic koliduje v rozmezí od 1nm po 100 nmaž 500 nm. [6]

Často jsou pod pojmem NE v literatuře popisovány mikroemulze, tedy termodynamicky stabilní, transparentní, rovnovážné systémy. NE jsou ovšem systémy nerovnovážné, s obdobnou tendencí projevů nestability jako u makroemulzí. Stejně tak vznik není spontánní, ale je nutné použít speciální metody ke zmenšení kapiček vnitřní fáze na hodnoty nanoemulze.[5, 11, 12]

3.4.1 Příprava nanoemulzí

Pro vytvoření stabilní NE je nutné kontrolovat množství vstupních faktorů. Mezi ně patří správná volba nemísitelných fází, řízené přidávání jednotlivých složek a použití střihových metod tak, aby došlo ke vzniku NE.

Existuje několik dalších požadavků. Dispergovaná fáze musí být zcela nerozpustná v kontinuální fázi. Tím je omezeno Ostwaldovo zrání emulze. Potlačení zrání může být dosaženo i jinými prostředky, ale volba vhodné fáze je nejvýhodnější.

Druhým požadavkem je správná volba surfaktantu. Najčastěji se používají alkany s krátkým řetězcem a alkoholy.

Třetím požadavkem je, aby kontinuální fáze obsahovala přebytek emulgátoru. Emulgátory se shlukují do povrchově aktivních micel v kontinuální fázi a při tvorbě NE se jednotlivě využívají ke stabilizaci mezifáze.

Posledním podstatným požadavkem pro vznik NE je dodání mechanické energie, nejčastěji střihové,. Mezi postupy s použitím střihových metod patří ultrazvuková homogenizace, mikrofluidizace a vysokotlaká emulgace.

Jednou z používaných metod přípravy NE je **ultrazvuková emulgace - homogenizace.** Tato střihová metoda vyžaduje již připravenou makroemulzi. Frekvencí 20 kHz či vyšší a vysokým výkonem dochází k rozdělení kapiček vnitřní fáze na kapičky velikosti odpovídající NE. Vyzařované ultrazvukové pole není homogenní, proto je nutné zajistit recirkulaci emulzního systému. Tento typ přípravy se používá častěji v laboratorních podmínkách.

Vysokotlaká homogenizace se používá k přípravě NE o extrémně malé velikosti částic, řádově jednotek nanometrů. Předem připravená makroemulze je pod vysokým tlakem protlačována pístem přes přepážku s otvory dané velikosti. U některých modelů nanoemulze po protlačení přes štěrbiny v přepážce ještě naráží na tvrdý povrch umístěný kolmo ke směru toku. Tím účinnost dále roste. Vznikající nanoemulze má nízký stupeň polydisperzity – velikost kapek vnitřní fáze je značně stejnorodá. Jedná se o vysoce účinnou metodu. Výtěžnost souvisí se zvoleným poloměrem vznikajících nanočástic. Nevýhodou je zvýšení teploty emulze během výrobního procesu (nutná přítomnost chladícího bloku) a vysoká energetická náročnost.

Mikrofluidizace taktéž slouží k přípravě nanoemulze s nízkým stupněm polydisperzity. Premixovaná emulze je pod vysokým tlakem opakovaně protlačována přes systém mikrokanálků. Na závěr jsou ze vzniklé NE ještě odfiltrovány zbylé větší částice.

V praxi je nejčastěji používanou metodou vysokotlaká homogenizace a mikrofluidizace. Obě metody mohou být využity jak v laboratorním, tak v průmyslovém měřítku.

Metodou **fázové inverze** lze získat nanoemulze s nižší homogenitou vnitřní fáze. Emulze jednoho typu je invertována na typ opačný změnou teploty a/nebo změnou koncentrace emulgátoru. Při inverzi fází zůstává mezipovrchový film zachován. Tato metoda je využívána laboratorně a řadí se ke kondenzačním postupům.[5, 13]

3.4.2 Využití nanoemulzí ve farmacii

Studiu nanoemulzí se velmi intenzivně věnuje celé odvětví farmaceutické technologie. Prakticky všechny práce zabývající se NE hovoří o velkém potenciálu a přínosu těchto aplikačních forem. NE jsou používány pro orální, topické i parenterální lékové formy. Používají se hned z několika důvodů:

- rozpouštění ve vodě špatně rozpustných léčiv (diazepam, vitamín A a E, propofol, dexamethason palmitát, aj.)
- stabilizace složek, které snadno podléhají hydrolýze (lomustin, fysostigmin salicylát)
- prevence vazby léčiva na infúzní set (diazepam)
- redukce dráždění, bolesti anebo toxicity při intravenózním podání (amfotericin, diazepam, propofol)
- možnost prodlouženého uvolování léčiva (barbituráty, dexamethason palmitát, fysostigmin salicylát)
- možnost cíleného podání (cytotoxické látky)[14]

Po perorálním i intravenózním podání se zvyšuje biodostupnost, a to i přes hematoencefalickou bariéru. Nedochází k buněčnému efluxu, po aplikaci jsou nanočástice emulze fagocytovány makrofágy a jsou distribuovány ve vysokých koncentracích do jater, ledvin a sleziny. Tím, že je léčivo uzavřeno v kapičce NE, není v přímém kontaktu s vnitřním prostředím a léčivo je uvolňováno do cílové oblasti postupně. Podané léčivo ve formě NE by mělo mít vhodné rozměry, aby mohlo volně cirkulovat v krevním oběhu bez zachycení v plicních kapilárách a s nízkým rizikem obstrukce v krevním řečišti. Eliminace léčiva z organismu je také pomalejší. Těchto vlastností se využívá při léčbě onemocnění s rychlým vznikem rezistence.[15]

Asi nejvíce studovaným použitím NE je cílená distribuce léčiv. Tu lze ovlivnit aktivně, navázáním vhodného ligandu na mezifázi NE. Pomocí ligandu se pak kapičky s léčivem váží na cílový orgán. Při pasivní variantě se distribuce ovlivňuje velikostí částic vnitřní fáze.

Pro použití v humánní medicíně musí být všechny složky nosiče nebo systému biokompatibilní a biodegradovatelné tak, aby se po doručení léčivé látky vyloučily bez vyvolání nežádoucích toxických účinků, zánětu, alergie nebo hematologických

problémů. Pro intravenózní podání se používají NE, které jsou stabilizované sójovými nebo vaječnými fosfolipidy.[16, 17]

V transdermální aplikaci a kosmetologii se NE používají k aplikaci lipofilních látek. Vezikuly NE pronikají snadno do pokožky a tím zvyšují obsah léčivé látky v lipofilní části pokožky. Výhodou je nepřítomnost dráždivých pomocných látek a rozpouštědel, které mohou způsobovat alergickou reakci. [18]

3.5 Emulgátory

Emulgátor je pomocnou látkou, která usnadňuje vznik emulze, snižuje povrchové napětí a stabilizuje emulzi. Přestože jsou emulgátory v emulzním systému v minoritním zastoupení, právě ony určují, jaký vznikne typ emulze, nebo zda dojde při změně podmínek k inverzi fází, změně typu emulze. Emulgátory také výrazně ovlivňují konzistenci a další vlastnosti emulze.

Nejčastěji používaným typem emulgátoru jsou tenzidy. Další skupinu tvoří emulgátory nepravé, nerozpustné a komplexní.

Nerozpustné emulgátory jsou anorganické i organické látky. Jde o jemně práškované amfifilní látky, které jsou částečně smáčené jak olejovou, tak vodnou fází. Hromadí se na fázovém rozhraní. Takto vzniklá vrstva mechanicky brání koalescenci. Koloidní oxid křemičitý (Silica coloidallis anhydrica; Aerosil) či bentonit se takto používají pro emulze typu *o/v* a oxid hlinitý, práškované uhlí nebo oxid hořečnatý pro typ emulze *v/o*.

Nepravé emulgátory, viskozifianty, tvoří disperze s vysokou viskozitou kontinuální fáze, která brání pohybu dispergované fáze a tím i koalescenci. Nejčastěji se používají různé typy polymerů kyseliny polyakrylové, xantanová guma, agar, pektin. Dále se k pozitivnímu ovlivnění vnitřní struktury emulze využívají povrchově aktivní viskozifianty.

Komplexní emulgátory jsou směsi emulgátorů *o/v* a *v/o* o daném složení. Vytvářejí emulgátorové filmy, vytvářejí gelové struktury a systémy tekutých krystalů. K součástem komplexních emulgátorů patří například kyselina stearová a stearan sodný, estery sorbitanu s vyššími mastnými alkoholy, polysorbáty, případně cholesterol a laurylsulfát sodný.[1,2]

3.5.1 Tenzidy jako emulgátory

Tenzidy přispívají ke vzniku emulze různými mechanismy. Snižují mezipovrchové napětí mezi jednotlivými fázemi systému. Tím usnadňují emulgování v důsledku snížení potřebné energie. Vytváří adsorpční vrstvy na mezifázi. Tím řídí rozdělení fází, typ emulze a stabilita systému. Zvyšují viskozitu vnější fáze, někdy až do vytvoření gelu, čímž se potlačují tendenci kapek ke koalescenci.

Molekuly tenzidu mají obvykle asymetrickou strukturu s bipolárním charakterem. Lipofilní část molekuly odpuzuje vodu, je nepolární. V přítomnosti vody se tyto části snaží zaujmout takovou prostorovou orientaci, která umožňuje maximum lipofilních kontaktů pomocí nevazebných interakcí.

Hydrofilní, polární části molekuly mají afinitu k vodě a ve vodné fázi jsou méně či více hydratovány. Vytváří se kolem nich solvatační obal z molekul vody díky vodíkovým můstkům. Čím polárnější je molekula, tím je vyšší míra hydratace.

Podle schopnosti tenzidů ve vodě disociovat se rozlišují tenzidy neionogenní – **neiontové** a iontogenní – **iontové**, ty se dále dělí na anionaktivní, kationaktivní a amfolytické.

Anionaktivní tenzidy ve vodném prostředí disociují na povrchově aktivní, negativně nabitý aniont a na kationt. Kationt je většinou menší. Příkladem jsou alkalická mýdla, mýdla alkalických zemin a těžkých zemin, soli žlučových kyselin, alkylétersulfonáty, alkansulfonáty aj.

V *kationaktivním* tenzidu má povrchově aktivní část kladný náboj a malý aniont. Jako kationtové tenzidy se používají lecitiny – fosfatidylcholin, kefaliny a amfolytická mýdla.

Amfoterní tenzidy obsahují obě funkční skupiny. Náboj závisí na koncentraci vodíkových můstků ve vodném prostředí, tedy na pH. Při vyšším pH se chovají jako aniontové tenzidy a naopak při nízkých hodnotách pH jako kationtové. V blízkosti neutrálních hodnot pH se chovají jako amfiony, náboj je vyrovnaný.

Neiontové tenzidy nejsou ve vodném prostředí disociovány. Použití v této skupině nachází steroly, zejména cholesterol, vyšší alifatické alkoholy, estery anhydridu sorbitolu s vyššími mastnými kyselinami (např. Spany), estery makrogolu a sorbitanu, tedy polysorbáty (např. Tweeny), vosky (bílý vosk, vosk z ovčí vlny, alkoholy vosku z ovčí vlny) a povrchově aktivní makromolekuly, jako je polyvinylalkohol, methylcelulosa, methylhydroxyethylcelulosa, methylhydroxypropylcelulosa a další.

Při překročení tzv. kritické micelární koncentrace molekuly tenzidu spontánně agregují do větších útvarů, micel. Jsou to agregáty o velikosti typické pro koloidní stav.[2]

Výběr vhodného emulgátoru pro emulze požadovaných vlastností usnadňuje číselně vyjádřená hodnota hydrofilně-lipofilní rovnováhy HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) daného tenzidu podle Griffina. HLB je číselné vyjádření poměru mezi mírou manifestace hydrofilních a lipofilních vlastností jednotlivých částí molekuly tenzidu udávané v rozmezí hodnot od 0 do 20.

Při hodnotách do 9 převládá charakter lipofilní. Rozmezí hodnot od 9 do 11 jsou hodnoty střední a u hodnot vyšších než 11 jsou vlastnosti tenzidu převážně hydrofilní. Směsi tenzidů se optimalizují na požadovanou hodnotu HLB. Ta se vypočítá ze známých žádoucích hodnot HLB pro jednotlivé olejové fáze. Ačkoliv udávané hodnoty HLB ne vždy odpovídají skutečnosti, přesto je tato hodnota velmi dobrou orientační pomůckou pro volbu vhodného emulgátoru. [19]

Faktory, které ovlivňují žádoucí hodnotu HLB emulze jsou: polarita molekul látek tvořících olejovou fázi emulze, váhový poměr emulgátoru a lipofilní fáze, objemový poměr olejové a vodné fáze, složení vodné fáze, složení olejové fáze, emulgační metody, emulgační zařízení a emulgační teplota.

3.5.2 Teplota inverze fází

Mnohé emulze stabilizované neionogenními, povrchově aktivními látkami jsou připravovány procesem inverze při kritické teplotě. Tato teplota může být určena pomocí emulzní vodivosti. Do emulze se přidává malé množství elektrolytu. Získaná vodivost je vyjádřena jako teplotní funkce. Vodivost emulze vzrůstá až do dosažení kritické teploty a poté dochází k rychlému snížení vodivosti.

Tato teplota je ovlivněna množstvím HLB povrchově aktivních látek. Velikost kapek závisí na teplotě a množství HLB emulgátoru. Kapičky jsou méně stabilní vůči koalescenci v blízkosti kritické teploty. Stabilita narůstá, jestliže dojde k rychlému ochlazení emulzního systému. Relativně stabilní emulze se připravují za teplot vyšších o 20 °C až 65 °C než je teplota skladování.

Emulze, které jsou připraveny v hodnotách teplot těsně pod kritickou teplotou, tvoří menší kapičky. Tyto kapičky jsou sice citlivé vůči projevům destabilizace, ale

pokud dojde k rychlému ochlazení, stabilita se zvyšuje. Tohoto postupu se využívá k přípravě nanoemulze.

Celková stabilita emulze je relativně necitlivá ke změnám hodnot HLB a ke kritické teplotě emulzifikantu, ale je velmi citlivá ke změnám celkové kritické teploty systému. Z tohoto důvodu musí být brána emulze jako celek, se všemi ostatními složkami.

S ohledem na výše uvedené korelace mezi teplotou a HLB a případné závislosti kinetiky kapek lze tyto souvislosti hypoteticky použít ke stanovení stability emulze. Pro hodnocení dlouhodobé stability je ovšem třeba používat je obezřetně. Kritická teplota může být použita jako vodítko pro přípravu stabilních emulzí. Stanovení celkové a dlouhodobé stability by mělo být hodnoceno jinými metodami.[19]

3.6 Viskozifianty

Farmaceutické emulze jsou většinou stabilizovány syntetickými povrchově aktivními látkami. Jejich použití však přímo nebo nepřímo zvyšuje toxicitu a může změnit distribuci nebo zcela eliminovat efekt podávaného léčiva. Většina povrchově aktivních látek vyvolává dráždivé kožní reakce a může způsobit toxické symptomy u zvířat a lidí. Například možná vazba povrchově anionaktivních látek na proteiny, enzymy a fosfolipidové membrány může mít za následek biochemické změny, jakou je modifikace struktury proteinů a enzymů a dysfunkce fosfolipidové membrány.

Záměna syntetické povrchově aktivní látky za mnohem lépe snášenou molekulu tedy přináší ve stabilizaci NE zásadní průlom. Farmaceutická odvětví v tomto směru pokulhávají za potravinářským průmyslem. Používání přírodních polymerů, jako jsou proteiny a polysacharidy, jako emulgátorů a/nebo stabilizačních činidel pro formulování vysoce stabilních emulzí, je v potravinářském průmyslu zcela běžnou praxí.[20]

Viskozifianty jsou látky, které zvyšují viskozitu disperzního prostředí tekutých disperzí nebo roztoků. Jsou jednou ze součástí emulzí, které jsou používány k úpravě vlastností a stability systému. Výsledkem zvýšení viskozity vnější fáze je zvýšená odolnost emulze vůči projevům nestability, jako je například sedimentace či krémovatění. [21, 22]

3.6.1 Třídění viskozifiantů

Viskozifianty používané pro kinetickou stabilizaci emulze je možné rozdělit do čtyř kategorií.

V první kategorii jsou zařazeny viskozifiantu, které jsou složeny z iontů. Ty mají schopnost adsorbovat se na povrchu kapky bez ovlivnění mezifázového napětí a usnadňují proces emulgace. Některé mohou za vhodných podmínek přispět ke vzniku slabé elektrostatické bariéry mezi blízkými kapičkami a tím přispět ke stabilizaci emulze.

Druhá třída se skládá z malých koloidních pevných částic oxidu křemičitého nebo koloidního kaolinu, které se adsorbují a tvoří fyzikální bariéru mezi kapičkami. Tím dochází k vzájemnému odpuzování kapiček a prevenci srůstání. Tento typ se používá ke zvýšení viskozity, stability emulzí typu *v/o*.

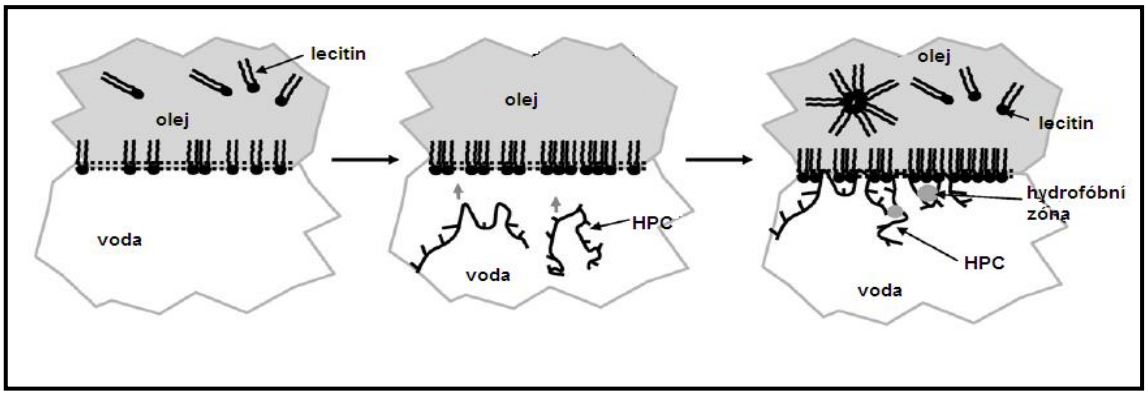
Třetí třída je tvořena z klasických monomerních povrchově aktivních látek, jako je například dodecylsulfát sodný. Snižují povrchové napětí a zvyšují stabilitu emulze, ale mohou být dráždivé a potenciálně toxické vůči životnímu prostředí.

Čtvrtá třída obsahuje polymerní povrchově aktivní látky. Kromě obecných, povrchové napětí snižujících vlastnosti, polymery vyvolávají sterické nebo elektrostatické interakce, změny viskozity nebo pružnosti rozhraní, nebo změnu celkové viskozity systému a tím zlepšují stabilitu emulze.[20]

3.6.2 Biopolymery

Proteiny a polysacharidy patřící do této skupiny zabraňují flokulaci a srůstání kombinovaným mechanismem. Biopolymerní gely a neadsorpční zahušťujcí polysacharidy snižují pohyb a srážky kapiček vnitřní fáze v emulzích zvýšením viskozity kontinuální fáze.

Mechanismus stabilizace emulze pomocí polymerního viskozifiantu je poměrně složitý. Předpokládá se hned několik možných vysvětlení a jejich vzájemná kombinace. Především dochází k ovlivnění viskozity spojité vnější fáze. Dalším mechanismem stabilizace je adsorpce na mezipovrchovém rozhraní voda/olej, tím se vytváří sterická nebo elektrosterická bariéra. Také se předpokládá interakce s ostatními složkami systému (**Obrázek 2**: Tyto přídatné účinky viskozifiantů mohou vést naopak k destabilizaci celého systému. [22, 23]



Obrázek 2: Vliv polymeru na mezifázové rozhraní [24]

Zvýšení stability emulze je tedy závislé na koncentraci viskozifiantu. Při vyšších koncentracích viskozifiantů může polymer soutěžit s emulgátorem o místo na mezipovrchovém rozhraní fází. Kolem kapiček vnitřní fáze se tvoří koróna z hydrofobních řetězců polymeru, které se mohou vzájemně odpuzovat Výsledkem je snížení elasticity mezifáze.[24]

Biopolymery, jako jsou proteiny a polysacharidy, jsou dobrými příklady přírodních stabilizátorů emulzí. V současné době jsou využívány více v potravinářském průmyslu, ale pomalu se přesouvají i na pole farmaceutické. Ve farmaceutické oblasti jsou již tyto přírodní polymery používány pro jiné účely, jako je tvorba kapsle (želatina), pojivo v tabletách (arabská guma, chitosan, hypromelosa), suspenzní činidlo (arabská guma), mukoadhezivní přípravky (chitosan), atd.

Většina polysacharidů přispívá ke stabilizaci emulzí vytvořením rozšířené sítě v kontinuální fázi, která se tím stává vysoce viskózní. Může dokonce tvořit gel.

Jen malé množství derivátů polysacharidů má povrchové vlastnosti, které umožňují jejich adsorpce na rozhraní olej-voda. Kombinace vlastností proteinů a polysacharidů za vhodných podmínek (koncentrace, poměr protein-polysacharid, pH, iontová síla, teplota) mohou být vhodnou strategií pro zlepšení stability emulze. Proteiny a polysacharidy tvoří komplexy prostřednictvím kovalentní vazby, nebo elektrostatickými interakcemi. Díky tomu může vzniknout vícevrstevná membrána kolem olejových kapiček tvořená opačně nabitými částmi biopolymeru. Tyto vrstvy poskytují jak elektrostatickou tak sterickou stabilizaci, tím zlepšují tepelnou stabilitu a odolnost vůči vnějším vlivům.

Stabilizace nebo destabilizace emulze pomocí biopolymeru závisí na různých parametrech, jakými jsou strukturální rysy polymeru, koncentrace polymeru, pH,

iontová síla, proces emulgace atd. Při formulování biopolymerem stabilizované emulze je tedy nutné, aby byl proces emulgace monitorován.

Příklady biopolymerů uvedené níže jsou především ty, které se již ve farmaceutických aplikacích používají, ale v jiných, než k formulaci emulze. Jejich použití ve farmaceutických emulzích by proto měly být snadno přenositelné.

Mnohé **bílkoviny** jsou schopny adsorbovat se na rozhraní fází a snížit tím povrchové napětí. Malé, syntetické, povrchově aktivní látky o stejné koncentraci jsou ve snižování mezifázového napětí obecně účinnější než proteiny. Nicméně proteiny dají vzniknout termodynamicky a kineticky stabilnější emulzi.

Ve své primární struktuře bílkoviny obsahují hydrofilní a hydrofobní zbytky náhodně rozesety po celé své délce. V terciární složené konformaci se vyskytují některé z těchto zbytků jako oddělené části. Na rozhraní olej-voda případně na rozhraní vzduch-voda probíhá adsorpce ve třech hlavních fázích. Difúzí do blízkosti rozhraní, skutečné adsorpce a reorganizaci adsorbovaného proteinu. Během adsorpce je vložen pouze zlomek z proteinových částí do lipofilní fáze, a většina z proteinové struktury zůstává orientována do vodné části. Proteiny potom prodělávají konformační změny, aby se maximalizoval počet příznivých interakcí a minimalizoval počet těch nepříznivých. Mezimolekulární interakce mezi adsorbovanými molekulami proteinu může vést k tvorbě vysoce viskoelastického filmu, který zabraňuje shlukování. Zbývající části proteinu ve vodné fázi napomáhají sterické stabilizaci proti flokulaci.

Všechny proteiny mají různá množství hydrofobních skupin a mají různé pružnosti. V důsledku toho vznikají různé mezifázové vlastnosti.

Obvyklá koncentrace proteinu používaná pro stabilizaci emulzí tvoří 1 % až 3 % celkové hmotnosti. V tomto rozmezí koncentrací není rychlost adsorpce proteinu limitujícím faktorem pro tvorbu emulze. Účinnost proteinů při stabilizaci emulze může být zlepšena prostřednictvím fyzikální, enzymatické a genetické obměny. Například částečnou denaturací nebo rozkladem proteinů mohou být získány modifikace, které umožňují většímu počtu hydrofobních skupin vejít do kontaktu s plynnou nebo olejovou fází.

Z bílkovinných struktur biopolymerů lze jako viskozifiant použít želatinu, kasein, mléčnou či syrovátkovou bílkovinu anebo proteiny získané z hrachu.

Polysacharidy jsou známé pro svoji schopnost vázat vodu a zahušťovací, resp. viskozitu upravující, vlastnosti. Je to dáno jejich hydrofilním charakterem a vysokou molekulovou hmotnostní. Nejběžnější polysacharidy nemají příliš vysokou tendenci k adsorpci na rozhraní kapalin. Z pohledu stabilizace emulze mohou být rozděleny do dvou kategorií.

Neadsorbující polysacharidy nemají žádnou nebo mají jen omezenou povrchovou aktivitu a zvyšují stabilitu emulze za pomoci tvorby gelu nebo změnou viskozity vodné kontinuální fázi. Do této skupiny viskozifiantu se řadí xantánová guma, algináty, karageny, hyaluronan či chitosan.

Jiné polysacharidy, jako je například arabská guma, chemicky modifikovaný škrob nebo deriváty celulózy, přirozeně se vyskytující hydrokoloidy galaktomananu (guarová guma, guma z pískavice), acetylované pektiny z cukrové řepy, jsou vedeny ve skupině *adsorbujících polysacharidů*.

Tento typ viskozifiantu stabilizuje emulzi adsorpcí na povrchu kapky oleje a zabrání tak flokulaci a srůstání pomocí elektrostatických anebo sterických odpudivých sil. U galaktomananů je to dáno především přítomností bílkovinné frakce v jejich struktuře. Zdá se také, že protein spojený s pektinem hraje důležitou roli při stabilizaci emulze.

Naopak, pro deriváty celulózy je povrchová aktivita důsledkem kombinace hydrofobních a hydrofilních skupin podél struktury celulózy. Rozmístění polárních skupin umožňuje adsorpci na fázovém rozhraní a snížení povrchového napětí.

Hypromelóza - HPMC, také pod názvem Hydroxypropylmethylcelulosa, Methocel, je součástí zajímavé skupiny povrchově aktivních derivátů celulózy, které mají silnou tendenci se hromadit na rozhraní olej-voda a způsobovat tak snížení povrchového napětí. Jedná se o neiontový celulózový ether (částečně O-methylovaný a O-(2 hydroxypropylovaný). HPMC nachází uplatnění v různých farmaceutických aplikacích, používá se pro řízené uvolňování léčiv, ovlivnění textury a reologických vlastností disperzí, emulgaci, atd.

Stabilizační vlastnosti derivátů celulózy mohou být vysvětleny jejich strukturou. Vzhledem k jejich hydrofobním skupinám, které jsou bohaté na methoxylovou skupinu a hydrofilním skupinám bohatých na hydroxypropylové skupiny, se mohou adsorbovat na rozhraní kapaliny a snižovat mezifázové napětí. HPMC vykazují se změnou poměru methoxylových a hydroxypropylových skupin různé povrchové aktivity. Předpokládá

se, že stejně jako u proteinů dochází následně ke změně molekulární konformace polymeru.

Zpočátku jsou makromolekuly stočené a po adsorpci se řetězec polymeru začne odvíjet. HPMC se v koncentraci od 0,45 % do % používá do očních kapek a umělých slz. Dále je používána jako pojivo tablet nebo matrice pro tablety s prodlouženým uvolňováním. Kromě toho je HPMC alternativou želatiny ve výrobě tvrdých kapslí.

Seskupení **protein-polysacharid** kombinuje výhody bílkovin (rychlejší adsorpce ve srovnání s polysacharidy) a polysacharidů (sterické odpuzování nebo zlepšení viskozity). Vzniku povrchově aktivních komplexů protein-polysacharid může být dosaženo buď kovalentní vazbou, vznikají tzv. *kovalentní komplexy*, nebo elektrostatickými interakcemi za vzniku *nekovalentního komplexu*. K tomuto kroku je důležitý správný výběr polymeru a fyzikálně-chemických podmínek tak, aby protein a polysacharid nesly opačný náboj.[20]

3.7 Reologické vlastnosti emulzí

Reologie se zabývá studiem toku v hmotě a pozoruje změny v látkách, které vznikají při působení vnějších sil. Reologické vlastnosti jsou vlastnosti vycházející z proudění viskózních tekutin. Jsou popisem deformace hmoty a pohybu kapalin z hlediska časového faktoru jevů. Podle mechanického chování těles dělí tato vědní disciplína tělesa na elastické, viskózní a viskoelastické.

Elastické chování vykazuji struktury, které se působením vnější síly deformují. Viskózní systémy se pod vlivem vnější síly chovají jako kapaliny, dochází k toku soustavy. Viskoelastické soustavy se z části chovají jako kapaliny (reagují tokem) a z části jako elastické těleso (deformace).

Znalost základních reologických veličin, viskozity, meze toku a modulů pružnosti napomáhá studovat a kontrolovat účinnost, kvalitu a fyzikální stabilitu emulzí.

Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice, které zpravidla vyjadřují vztah mezi deformačním smykovým (tečným, vazkým) napětím τ a deformací kapaliny. Jejich grafickou podobou jsou tokové křivky – reogramy.

Z reologického pohledu lze rozdělit kapalné systémy na newtonské a nenewtonské kapaliny. V případě *newtonských* kapalin se jedná o ideálně viskózní materiál, kde platí Newtonův zákon. Jedná se zpravidla o nízkomolekulární látky.

Vedle newtonských kapalin existují i kapaliny reologicky složitější, které se Newtonovým zákonem neřídí. Označují se proto jako *nenewtonské* kapaliny a jsou to např. roztoky a taveniny polymerů, suspenze, různé pasty apod. [25, 26]

3.7.1 Viskozita a metody měření viskozity

Viskozita – vazkost, vnitřní tření, η – je fyzikální veličina definovaná jako odpor projevující se na styčné ploše dvou vrstev tekutiny, pohybujících se různou rychlostí, tečným napětím, jímž se snaží rychlejší vrstva urychlovat vrstvu pomalejší a ta naopak zpomalovat vrstvu rychlejší. Je-li rozdíl rychlostí Δv a vzdálenost vrstev Δy, je tečné napětí τ úměrné gradientu rychlosti, tj.:

$$\tau = \eta \, \Delta v / \Delta y$$

Konstanta úměrnosti η je tzv. dynamická viskozita. Její jednotkou v soustavě SI je pascalsekunda (Pa.s), což je dynamická viskozita tekutiny, v níž při gradientu rychlosti 1/s vzniká tečné napětí 1 Pa. Dynamická viskozita (φ) je látkovou charakteristikou, jejíž hodnota závisí na teplotě a tlaku. U plynů s teplotou roste, u kapalin naopak klesá. Převratná hodnota dynamické viskozity $\varphi = 1/\eta$ se nazývá fluidita (tekutost).

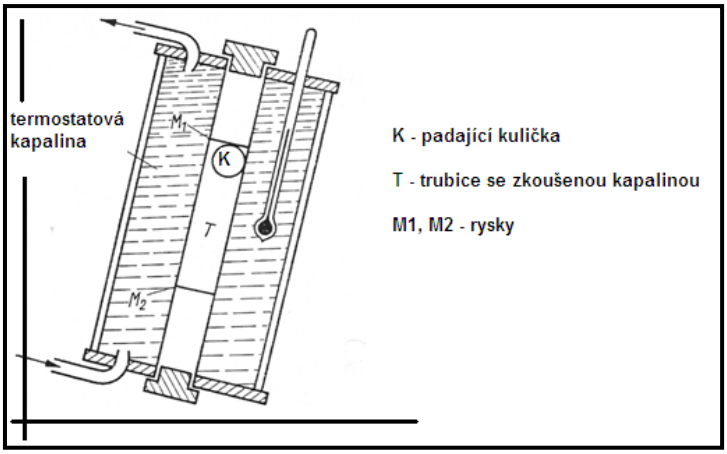
Podíl dynamické viskozity η a hustoty tekutiny ρ je tzv. kinematická viskozita ν

$$\nu \, (=\rho \, \eta)$$

Její jednotkou v soustavě SI je metr čtverečný za sekundu (m^2s^{-1}). Častěji se udává v milimetrech čtverečných za sekundu (mm^2s^{-1}). Viskozita je z obecného hlediska odpor proti toku či změně tvaru jakékoli látky, jde o důsledek molekulární koheze či z ní plynoucí struktury látky.[1]

K měření viskozity se běžně používají průtokové, pádové a rotační viskozimetry. Kapilární viskozimetr lze používat pro stanovení viskozity newtonských kapalin a rotační viskozimetr pro stanovení viskozity newtonských i nenewtonských kapalin. Pouze rotační typ viskozimetru a speciální kapilární viskozimetry umožňují dostatečně charakterizovat tokovou křivku nenewtonských kapalin. Podmínkou správného měření je vždy laminarita proudění v celém rozsahu měření a dobře definovaná geometrie toku.

Měření **pádovými viskozimetry** je založeno na měření rychlosti pádu známého tělíska (obvykle koule) v kapalině, jejíž viskozita je určována. Nejjednodušším tělískovým viskozimetrem je viskozimetr Stokesův. Jiným přístrojem této skupiny je technický viskozimetr Höpplerův – viz.: **Obrázek 3**. V tomto přístroji padá kulička skleněnou trubicí odkloněnou od vertikály o 10^{o} s průměrem jen málo větším než je průměr padající koule. U obou viskozimetrů je měření viskozity převedeno na měření doby pádu kuličky. Výměna kuliček umožňuje kvalitativní zjištění, závisí-li viskozita na gradientu rychlosti či nikoliv, tj. zda se zkoumaná kapalina chová newtonsky nebo nikoliv.



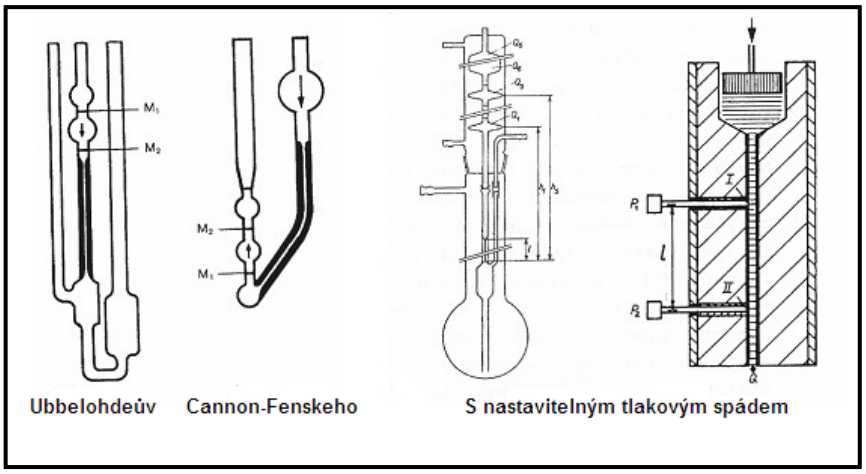
Obrázek 3: Höpplerův kuličkový viskozimetr[27]

Pro měření velmi viskózních kapalin byly vyvinuty reoviskozimetry s tlačnou kuličkou, v nichž je kulička protlačována vzorkem umístěným v nádobě válcovitého tvaru při definovaném zatížení, které lze měnit. To umožňuje zjišťovat i tokové charakteristiky nenewtonských kapalin.

Průtokové viskozimetry jsou založeny na Poisseuilově rovnici pro laminární výtok kapaliny z kolmé trubice kruhového průřezu.

$$\eta = \pi . r . h . \rho . g . t/8V$$

kde je r poloměr trubice, l – délka trubice, h – výška sloupce kapaliny, ρ - hustota kapaliny, g – tíhové zrychlení, t – doba toku a V – objem vyteklé kapaliny. Nejznámějšími typy jsou viskozimetr *Englerův, Ostwaldův, Kohlův* a *Ubbelohdeův,* znázorněné na **Obrázek 4.**



Obrázek 4: Typy viskozimetrů[27]

Potřebný tlakový spád se vytváří různou výškou sloupce měrné kapaliny, tlakem interního plynu nebo zátěžovým pístem. Měří se buď objemový průtok (běžnější, méně náročný způsob) nebo tlakový spád (vyžaduje spolehlivé objemové dávkování se stabilním výkonem). Přesnost měření závisí především na výběru správné kapiláry s dobře definovanými parametry a na měření tlakového rozdílu.

Český lékopis 2009 definuje podmínky pro měření pomocí kapilárního viskozimetru takto: Stanovení viskozity pomocí vhodného kapilárního viskozimetru se provádí při teplotě (20 ± 0,1)°C, není-li předepsáno jinak. Čas potřebný k tomu, aby hladina kapaliny klesla od jedné značky ke druhé, se měří stopkami s přesností na 0,2 sekundy. Měření je platné, pokud se dvě po sobě jdoucí měření neliší o více než 1 %. Pro výpočet se bere průměr nejméně ze tří měření doby průtoku zkoušené kapaliny mezi danými body.

Kinematická viskozita η ($mm^2.s^{-1}$) se vypočítá podle vzorce:

$$\eta = kt$$

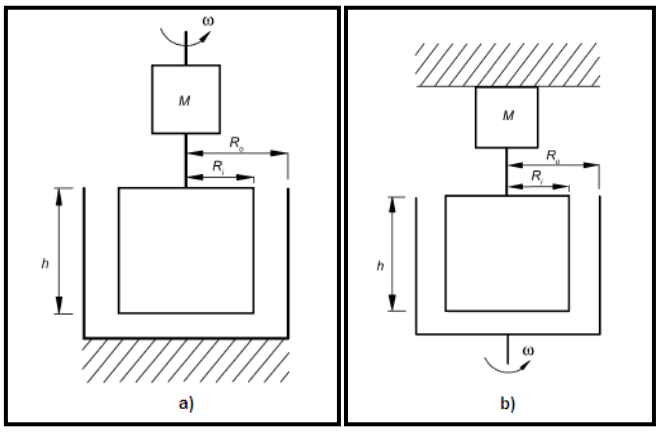
v němž značí k – konstantu viskozimetru vyjádřenou v milimetrech čtverečných na druhou a sekundu na méně první (mm^2s^{-1}) a t – dobu průtoku zkoušené kapaliny viskozimetrem v sekundách.

Principem měření viskozity pomocí **rotačního viskozimetru** je měření síly působící na rotor (torzní síla), který se otáčí při konstantní úhlové rychlosti (rychlost otáčení) v měřené kapalině. Rotační viskozimetry se používají pro měření newtonských (smykově nezávislé viskozity) i nenewtonských kapalin (smykově závislé viskozity nebo zdánlivé viskozity).

Rotační viskozimetry je možné dělit na dvě skupiny, absolutní a relativní. U absolutních viskozimetrů je proudění v měřící geometrii dobře definováno. Výsledky měření v absolutních hodnotách mohou být srovnány s jakýmikoliv jinými absolutními hodnotami. Za absolutní viskozimetr je považován viskozimetr kužel-deska, případně soustředný válcový viskozimetr.

Ve viskozimetru se kapalina umístí do prostoru mezi kužel a plochý disk, který svírá přesně vymezený úhel. Měření se může provádět otáčením kužele nebo plochého disku.

V *soustředných válcových viskozimetrech* se viskozita měří tak, že se kapalina umístí mezi vnitřní a vnější válec. Měření se může provádět buď otáčením vnitřního válce (viskozimetr typu Searle, viz **Obrázek 5: a)** nebo otáčením vnějšího válce (viskozimetr typu Couette viz Obrázek 5: **b).**



Obrázek 5: Soustředné válcové viskozimetry[28]

M je torzní síla v newtonmetrech, která působí na povrch válce, ω – úhlová rychlost v radiánech za sekundu, *h* – výška ponoření vnitřního válce do kapalného prostředí v metrech a R_1 a R_0 – poloměr vnitřního a vnějšího válce v metrech.

Naopak u **relativního viskozimetru** není proudění v měřící geometrii definováno, výsledky jsou relativní. Jako relativní viskozimetr se používá *vřetenový viskozimetr*. V tomto typu viskozimetru se viskozita stanoví otáčením vřetene ponořeného do kapaliny. Relativní hodnoty viskozity, nebo zdánlivé viskozity, je možné získat za použití přepočítávacích faktorů odečtením ze stupnice při dané rychlosti otáčení.

U relativních viskozimetrů není smykový poměr ve všech částech vzorku stejný, proto nemůže být definován. Stanovená hodnota má relativní charakter a lze ji

srovnávat pouze s hodnotami, které byly získány za přesně stejných experimentálních podmínek.

Používají se různé měřící systémy pro dané rozsahy viskozity, stejně jako několik rychlostí otáčení. Český lékopis 2009 doporučuje k měření viskozity přednostně kapilární a rotační viskozimetr. Použití ostatních typů viskozimetru je možné pouze za předpokladu, že jejich přesnost není menší než přesnost viskozimetrů doporučených.[28,29]

3.8 Stabilita a kompatibilita

Stabilita léčiva je schopnost zachovat si po určitou dobu a za stanovených podmínek uchovávání dané jakostní znaky. Jakostí se rozumí vhodnost k zamýšlenému použití, či vyhovění stanoveným specifikám. Mírou stability je doba použitelnosti. [2]

Změny rovnovážného stavu – změny stability v soustavách léčiv se označují jako farmaceutické inkompatibility. Tímto procesem se posunuje chemická nebo fázová rovnováha dané soustavy ze stavu optimální aktivity do oblasti, ve které se stává již méně hodnotná nebo i bezcenná, případně až nebezpečná. [30]

Kompatibilita je termín, který ve farmacii vyjadřuje vzájemnou snášenlivost jednotlivých složek léčivého přípravku. Sledování kompatibility je krátkodobá zkouška (řádově hodiny až dny). Naproti tomu zkoušky stabilitní probíhají po měsíce až roky. Stabilita a kompatibilita se tedy liší v rychlosti probíhajících změn v přípravku.

Existuje několik systémů třídění inkompatibilit do různých systémů. Nejčastěji se inkompatibility třídí z pohledu charakteru změn v soustavě, tj. z hlediska změn stavových – inkompatibilita fyzikální a z pohledu změn látkových – inkompatibilita chemická. Dále bývá rozlišována inkompatibilita zjevná - tedy snadno rozpoznatelná smysly a inkompatibilita skrytá, kterou je možné rozeznat pouze analytickými metodami chemickými a fyzikálně-chemickými.

Fyzikální inkompatibilita (FI). K tomuto typu inkompatibility dochází smísením látek, u nichž se vlivem vzájemného působení změní některá fyzikální vlastnost tak, že přípravek nesplňuje požadovaná jakostní kritéria. Projevem může být nemísitelnost, nerozpustnost, případně změny bodu tání, skupenství a konzistence.

U roztoků se FI nejčastěji projevuje změnou čirosti nebo vznikem zákalu. Záleží na rozpustnosti rozpouštěné látky a na zvoleném rozpouštědle. V původně čirých koloidních disperzích typu hydrogelu může vyšší přídavek alkoholu vyvolat koagulaci polymeru.

U směsí tuhých substancí může docházet ke změnám konzistence, má-li například směs velmi nízkou eutektickou teplotu. V tomto případě dochází k hrudkovatění, zvlhnutí prachu nebo k úplnému ztekucení.

V heterogenních soustavách je důsledkem FI narušení disperzního systému. Dochází k příliš rychlému až nevratnému oddělování fází. Dalším typem FI v heterogenní soustavě se může stát silná adsorpce léčivé látky, ale i důležitých pomocných látek na další složky. Např. nežádoucí absorpce na primární obal z plastu.

Dalším subtypem fyzikální inkompatibility je působení zevních podmínek na soustavu. Podmínkou pro vznik může být nevhodný obalový materiál, okolní atmosféra, světlo nebo teplo.

Chemická inkompatibilita. Jedná se o látkové změny při přípravě a uchovávání léčiv. Příčinou jsou chemické reakce různých typů obvykle s rychlým ustavením chemické rovnováhy. Takové jsou především acidobazické reakce, dále například polymerace či zmýdelnění. Projevem může být například vznik zákalu či sraženiny. Často však je vznik chemické inkompatibility rozpoznatelný pouze pomocí analytických metod.

Odstranění inkompatibilit není jednoduchou záležitostí a nelze ji obecně zformulovat. Pokud je známá podstata inkompatibility, lze použít některý ze zavedených postupů. Inkompatibilitě je možné se vyhnout například změnou technologického postupu, úpravou pH roztoku, změnou koncentrace pomocných látek, změnou nebo přidáním pomocné látky za látku nevyvolávající inkompatibilitu, případně přípravou jiné lékové formy.[30]

3.8.1 Stabilitní zkoušky

Stabilitní testy ve farmacii se používají ke stanovení podmínek skladování a uchovávání léčivých přípravků. Sledování stability je podstatné pro zajištění kvalitního, bezpečného a účinného přípravku po celou dobu jeho dané použitelnosti. Zkoušky sledují v určitém časovém rozmezí vybrané fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické aspekty jakosti léčivého přípravku, který je vystavený působení určitých vnějších vlivů.

Požadované zkoušení a stanovení stability popisují národní normy, mezinárodní předpisy a lékopisy.

Stabilitní testy se dělí podle podmínek zátěže na testy stresové, zrychlené a testy dlouhodobé. Takzvané změnové stabilitní testy se zakládají při změně vnitřního obalu

nebo technologii výroby. Pro pravidelné sledování stability vyráběných léčivých přípravků se zakládají tzv. následné stabilitní testy.

Při zrychlených stabilitních zkouškách je urychlen chemický rozklad a fyzikální změny léčivého přípravku pomocí stresových podmínek. Testy probíhají při teplotě nejméně o 15°C vyšší, než je běžná skladovací teplota. Obvykle při 40°C ± 2°C. Relativní vlhkost se používá také vyšší, než je běžná, tedy 75% ± 5%. Minimální délka trvání zrychlených zkoušek při podání žádosti o registraci léčivého přípravku je 6 měsíců.

Protože je zrychlený stabilitní test velmi náročný na přístrojovou techniku, lze místo něj použít test přechodný. Při tomto testování se přípravek uchovává při teplotě 60°C ± 2°C a relativní vlhkosti 65% ± 5%. Doba zkoušení ale musí být prodloužena o minimálně 6 měsíců, tedy na jeden rok.

Dlouhodobé stabilitní zkoušky se mají uskutečňovat za klimatických podmínek, které jsou předepsány jako podmínky k uchovávání přípravku. Podle světové zdravotnické organizace jsou jednotlivé země zařazeny do různých klimatických pásem podle průměrných teplot a vlhkostí, která jsou na daném území dosahovány. Česká republika spadá do prvního klimatického pásma, testuje se tedy při 10°C - 25°C a relativní vlhkosti 60% ± 5%. Vzorky se při stabilitní zkoušce uchovávají na horní hranici tohoto rozmezí, což je 25°C. Doba zkoušení má odpovídat době použitelnosti přípravku. Termíny hodnocení vzorků jsou v měsících 0, 3, 6, 12, 24 a dále v ročních intervalech.

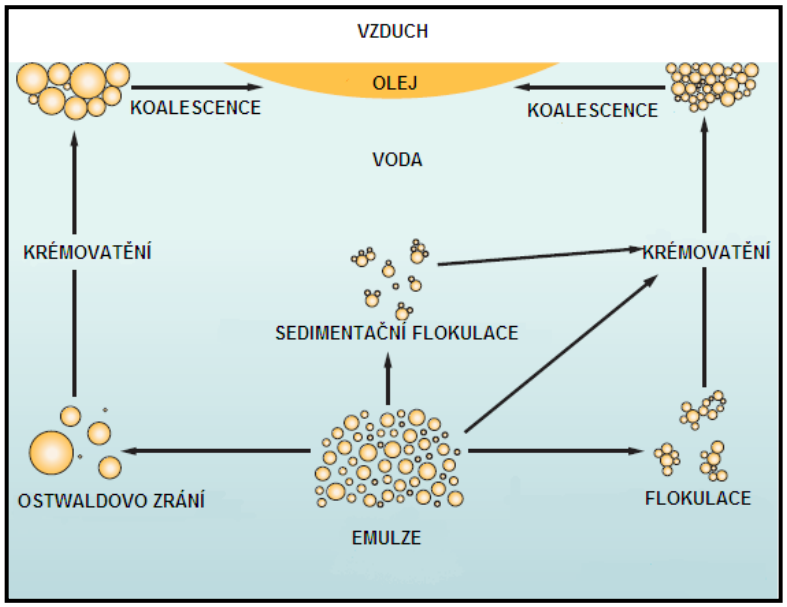
Léčivé přípravky, které je nutné uchovávat v chladu, se dlouhodobě hodnotí při 5°C ± 3°C. Při uchovávání v mrazu je daná teplota -20°C ± 5°C.

Výše popsané zkoušky jsou požadovány k registračním účelům a lze je použít u přípravků, které nevyžadují speciální podmínky skladování. K testování se používají klimatizované skříně a místnosti, které zaručují požadovanou teplotu a vlhkost vzduchu.[2, 31]

3.8.2 Stabilita emulzí

Emulze jsou termodynamicky nestabilní systémy. Jejich stabilita je dána složkou, které se váže na mezifázové rozhraní. Termín stabilita emulzí bývá také definován jako odolnost vůči fyzikálním změnám.

Procesy, které vedou nejčastěji k destabilizaci emulzního systému, jsou krémovatění, koalescence a flokulace. K dalším typů destabilizace patří sedimentace, Ostwaldovo zrání, či inverze fází. Jednotlivé procesy destabilizace emulze jsou navzájem propojeny a nelze je od sebe jednoduše oddělit. Vlastnosti a chování emulze nelze teoreticky odlišit ani předvídat, zjišťují se převážně empiricky.



Obrázek 6: Schéma destabilizačních dějů v emulzi.[32]

Procesy destabilizace je možné rozdělit na pochody reverzibilní a ireverzibilní. Při **krémovatění** (u emulzí o/v) dochází k odvrstvení fází v gravitačním poli podle jejich hustoty. Vnitřní fáze zůstává zachována v podobě těsněji uspořádaných aglomerátů u hladiny. Jelikož zůstává mezipovrchový film tenzidů zachován, lze krémovatění odstranit protřepáním emulze. Je-li ovšem mezipovrchová vrstva narušena, dochází přes krémovatění až k nevratnému procesu koalescence. Procesu krémovatění lze zabránit správně zvoleným typem emulgátoru. Další variantou, jak zvýšit odolnost emulze vůči krémovatění, je snížení mezipovrchového napětí obou fází. Z tohoto důvodu se zvyšuje viskozita vodné fáze přidáním viskozifiantu, případně se mění velikost kapek olejové fáze.

Během **flokulace** dochází ke shlukování – agregaci jednotlivých kapek vnitřní fáze a tím k tvorbě klastrů. K flokulaci dochází v okamžiku nedostatečného působení Van der Waalsových sil. Ty nedokáží udržet částice v dostatečné vzdálenosti tak, aby nedošlo k jejich spojení. Stejně jako krémovatění je i flokulace procesem vratným, ale stejně tak může přecházet v nevratnou koalescenci.

Koalescence emulze je nevratné splývání a pozvolné zvětšování malých kapek vnitřní fáze. Tím se postupně zmenšuje plocha nestálého rozhraní fází mezi fází dispergovanou a dispergující. Následuje úplné rozvrstvení soustavy podle hustot fází. Proces koalescence je zcela nevratný a je považován za nejdůležitější děj vedoucí k destabilizaci systému.

Koalescence může být rozdělena do dvou hlavních kategorií podle mechanismu vzniku. V prvním případě je koalescence následkem sedimentace a dále agregace. Také označována jako koalescence v krému. V sedimentační teorii se předpokládá, že jsou všechny cesty částic vertikálně lineární. Druhou možností je agregace způsobená Brownovým pohybem. Zde se předpokládá zcela náhodný pohyb částic. Částice menší se pohybují rychleji, tím narůstá počet možných srážek jednotlivých částic, jejich spojení a zvětšování. Oba procesy probíhají v systému současně a poměr jednotlivý procesů lze odhadnout jen teoreticky.

Příčinou koalescence je malá emulgační schopnost, nedostatečný obsah emulgátoru nebo jeho chemická změna po přidání inkompatibilní složky. Vůči koalescenci jsou odolnější monodisperzní systémy, systémy o relativně stejné velikosti částic vnitřní fáze.[32]

Ostwaldovo zrání (OZ) emulzí, též disproporcionace, je spojování a následné splývání menších částic vnitřní fáze za vzniku větších důsledkem rozdílného tlaku uvnitř kapiček. Tento tlak vyplývá z rozdílu v poloměru zakřivení kapek a je větší pro menší kapičky. Daný tlakový rozdíl tvoří hnací sílu pro difúzi. Rychlost difúze závisí na rozpustnosti dispergované fáze ve fázi kontinuální. Materiál, který tvoří mezifázové rozhraní u menší, zanikající kapičky, se redistribuuje ve prospěch větší kapičky. Tím dochází k nárůstu velikosti částic vnitřní fáze a snižuje se napětí mezifázového rozhraní. Mezipovrchový film zůstává zachován, ale emulzi již nelze vrátit do původního stavu roztřepáním, jako je tomu v případě flokulace. Předejít OZ lze přidáním vhodného emulgátoru o správné koncentraci.[13, 33]

Inverze fází, tedy přechod jednoho typu emulze ve druhý, se nejčastěji vyskytuje u emulzí, které mají nízké mezifázové rozhraní. Změna může být způsobena fyzikálními vlivy nebo nevhodnou kombinací emulgátoru (inkompatibilita) s další složkou emulze. Další možností je změna teploty (teplota inverze). Této vlastnosti emulzí se využívá při přípravě i výrobě.[2]

3.8.3 Hodnocení stability emulzí

Celková stabilita emulze je důsledkem fyzikální stability (bez separace fází), stability chemické (žádné chemické reakce) a mikrobiologické stability (bez rozvoje patogenních zárodků).

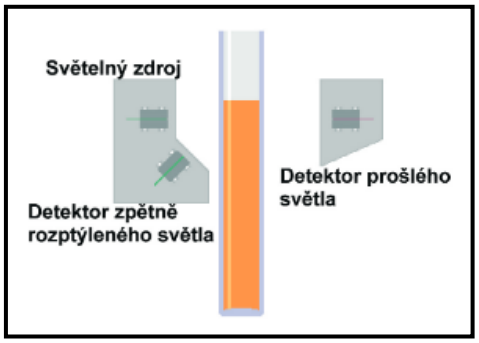
Existuje několik přístupů k hodnocení stability emulze. Fyzikální stabilita může být hodnocena pomocí různých metod. Metodou zrychleného stárnutí anebo použitím centrifugace.

Metoda **zrychleného stárnutí** emulze napodobuje teplotní podmínky, ke kterým by mohlo dojít během přepravy a skladování emulze. Princip spočívá ve vyhodnocování vzorků uložených při různých teplotách (0°C až 40°C) a za různá časová období (od 24 hodin do 15 dnů). Tento postup může zahrnovat i opakované střídání studených a teplých cyklů.

Druhý způsob, jak teoreticky určit stabilitu emulze, je **centrifugace**. Tento proces urychluje sedimentaci nebo procesy krémovatění v relativně krátkém časovém rozmezí (desítky minut).[20]

Další, relativně nový přístup k hodnocení stability emulze, je pomocí přístroje **Turbiscan**®. Srdcem přístroje Turbiscan je měřicí hlava, která se pohybuje nahoru a dolů podél skleněné válcové kyvety s plochým dnem, **Obrázek 7**. Pulzní hlava sestává ze zdroje infračerveného světla (λ=850nm) a dvou synchronních detektorů, které snímají celou délku kyvety s obsahem testované emulze.

Detektor prošlého světla pod úhlem 180°, resp. 0° zachycuje světlo, které projde vzorkem, zatímco detektor zpětně rozptýleného světla (45°, případně 135°) zachycuje světlo, které je vzorkem rozptýleno zpět. Měřicí hlava skenuje celou výšku vzorku a zachycuje prošlé i zpětně rozptýlené světlo. Přístroj provádí skeny v předem naprogramovaných časovaných intervalech a naměřené profily prokládá v jednom grafu, tím detekuje případné nestability.



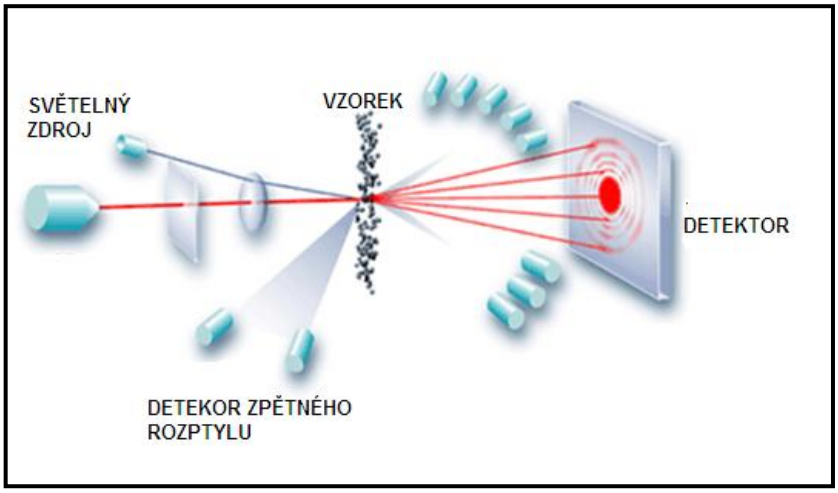
Obrázek 7: Schéma přístroje Turbiscan®[34]

Pomocí Turbiscanu® lze získat hodnoty difúzní odrazivosti a propustnosti vzorku v závislosti na čase. To umožňuje detekci destabilizačních procesů i v počáteční, pro oko neviditelné fázi.

Některé typy přístrojů jsou vybaveny termostatem. Lze tedy modelovat různé teplotní skladovací podmínky a změny emulze v čase.[20,34]

3.9 Analýza velikosti částic laserovou difrakcí (DLS)

Laserová difrakce je stále častěji preferovanou metodou pro stanovení velikosti částic ve farmaceutickém průmyslu. Jedná se o hromadný způsob měření, který generuje výsledky pro celý vzorek. Princip spočívá v průchodu monochromatického laserového paprsku měřící celou. Zde dochází k difrakci paprsku na jednotlivých částicích měřeného vzorku. Vzniklý difrakční obrazec nese informace o velikosti a distribuci částic. Informace z obrazce jsou pomocí Fourierovy transformace převedeny na distribuční křivku. [35]



Obrázek 8: Hardware analyzátoru [36]

Starší přístroje pro laserovou difrakci využívaly pouze difrakci v malých úhlech. Postupem času byla metoda rozšířena i o difrakci laserového světla v širším úhlovém rozsahu a aplikaci Mieho teorie. Ta doplnila již dříve používanou Frauenhofovu aproximaci a anomální difrakci.

Metoda vychází z předpokladu, že částice jsou kulovité. Pro nesférické (nekulovité) částice se stanoví rozdělení, které odpovídá kulovitým částicím. Výsledky, které jsou naměřeny touto metodou, se proto mohou odlišovat od výsledků, které jsou získány metodami založenými na jiných fyzikálních principech (například sedimentace či prosévání). [19]

Cílem všech metod měření velikosti částic je zajistit jednotné číslo, které by přesně vypovídalo o velikosti dané částice. Většina metod tedy předpokládá, že je měřený materiál kulovitý a pro úplný popis není třeba znát všechny parametry částice, jako je např. délka, šířka či výška. Výsledná velikost je stanovena jako průměr "ekvivalentní koule", která by poskytla přibližně stejné výsledky, jako měřená částice. Proto je metoda laserové difrakce světla (DLS z anglického Dynamic Light Scattering) s výhodou používána právě pro měření a distribuci velikosti částic emulzí. [36]

Protože vzorek není v přímém kontaktu s měřící optikou, řadí se DLS k neinvazivním měřícím metodám. [37]

3.9.1 Brownův pohyb

Brownův pohyb je náhodný, neuspořádaný pohyb mikroskopických částic v kapalném nebo plynném médiu. Částice v roztoku se vlivem tepelného pohybu neustále srážejí. Směr a síla těchto srážek jsou náhodné, a tím je i okamžitá poloha částice náhodná.

DLS měří míru Brownova pohybu ve vzorku a vztahuje ji k velikosti částic. Čím větší je částice, tím pomalejší vykazuje změnu z místa. Naopak malé částice jsou po jednotlivých srážkách mnohem rychlejší a rychleji mění své místo ve vzorku.

Míra Brownova pohybu je závislá nejen na velikosti částic, ale také na viskozitě a teplotě. Proto je pro měření zapotřebí temperovat vzorek na konstantní, předem známou, teplotu a znát viskozitu vzorku při dané teplotě.

Rychlost Brownova pohybu je definovaná vlastnost známá jako translační difúzní koeficient (obvykle symbol *D*).

Velikost částic je vypočítána ze Stokes - Einsteinovy rovnice s pomocí translačního difuzního koeficientu:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Kde je: *d(H)* – velikost částice, *D* – translační difuzní koeficient, *k* – Boltzmannova konstanta, *T* – absolutní teplota a η – viskozita.

Hodnota, která je měřena pomocí DLS, vypovídá o tom, jak částice difunduje do rozpouštědla. Naměřená hodnota odpovídá translačnímu difúznímu koeficientu koule o

adekvátní velikosti. Translační difúzní koeficient není závislý pouze na velikosti částice, ale také na povrchu daných částic, jejich koncentraci a typu.[37]

3.9.2 Teorie rozptylu světla

Rozptyl světla na částicích je téměř izotropní na částicích, jejichž vlnová délka je podstatně menší než vlnová délka použitého laseru. Nejčastěji je-li průměr (d) méně než d=λ/10 nebo kolem 60nm pro He-Ne laser. **Rayleighova aproximace** říká, že $I \approx d^6$ a dále také to, že $I \approx 1/\lambda^4$, kde I je intenzita světla rozptýleného, d je průměr částic, λ je vlnová délka laseru a d^6 je údaj, který říká, že 50nm částice rozptýlí milionkrát více světla jako 5nm částice. Proto je zde nebezpečí, že světlo z větších částic bude pohlcovat rozptýlené světlo z menších částic. Tento faktor také znamená, že je těžké pomocí DLS změřit směs 1000nm a 10nm částic, protože příspěvek k celkovému rozptylu malými částicemi bude extrémně malý.

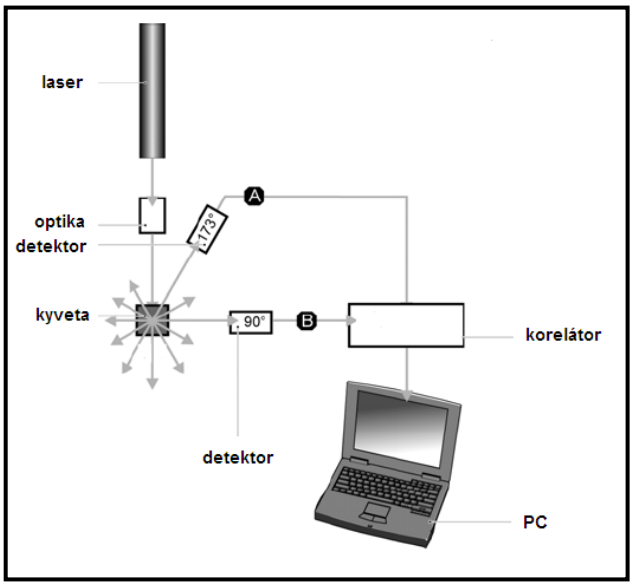
Při rozptylu na větších částicích, jejichž rozměr se blíží vlnové délce dopadajícího světla, je analýza rozptylu na jedné částici komplikovaná. Dochází k interferenci světla rozptýleného od různých částí stejné částice. S tímto faktem pracuje **Mieho teorie**, která se používá v softwaru DLS pro konverzi rozložení intenzity odraženého světla na objem.

Mieho teorie je založena na předpokladu kulovitého tvaru částic. To znamená, že vypočtená velikost není absolutní velikostí částice, ale odpovídá velikosti teoretické koule o stejném objemu jako analyzovaná částice. Použití Mieho teorie vyžaduje znalost relativního indexu lomu měřených částic vzhledem k měrnému. V případě, že velikost částic zhruba odpovídá vlnové délce dopadajícího světla, lze pozorovat maxima a minima v obrazci. Mieho teorie pouze správně vysvětluje tyto mezní hodnoty napříč všemi vlnovými délkami, úhly a rozměry.[37]

3.9.3 Přístrojové vybavení

Přístroj pro laserovou difrakci se skládá ze zdroje monochromatického světla – laseru. Nejčastěji se používá laser helium-neonový s konstantní vlnovou délkou 633nm. Další součástí je optika, která upravuje intenzitu prostupujícího laserového paprsku. Dále se v přístroji nachází zóna (nebo cela) pro měření vzorku – kyveta, Fourierova čočka a detektor, který slouží k zachycení difrakčního obrazce. V závislosti na modelu přístroje se využívá umístění detektoru buď po úhlem 90° a nebo pod úhlem 173°. Difrakční

obrazec je předáván do korelátoru. Nedílnou součástí je také softwarové vybavení, které shromažďuje údaje z korelátoru a prezentuje výsledky.[22, 37]



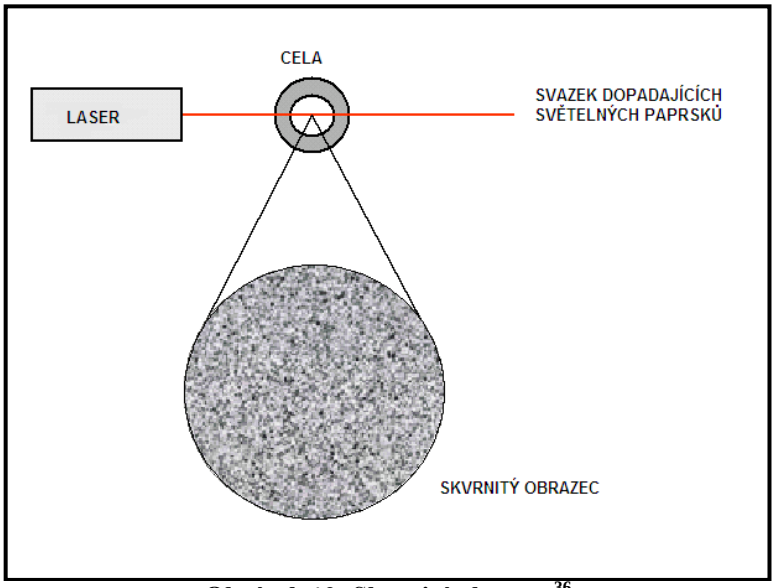
Obrázek 9: Uspořádání měřícího systému, kde cesta A je pro detekci v úhlu 173° a cesta B pro detekci pod úhlem 90°[36]

3.9.4 Princip

Paprsek monochromatického světla, obvykle laserového, prochází reprezentativním vzorkem umístěným v kyvetě. Vzorek o odpovídající koncentraci je dispergovaný ve vhodné kapalině (nejčastěji voda) nebo v plynu. Přítomné částice způsobují ohyb (difrakci) světla laserového paprsku. Úhel difrakce je nepřímo úměrný velikosti částic. Čím menší je detekovaná částice, tím větší je ohybový úhel. Závislost je logaritmická. Současně klesá intenzita záření, která je také závislá na objemu částice.

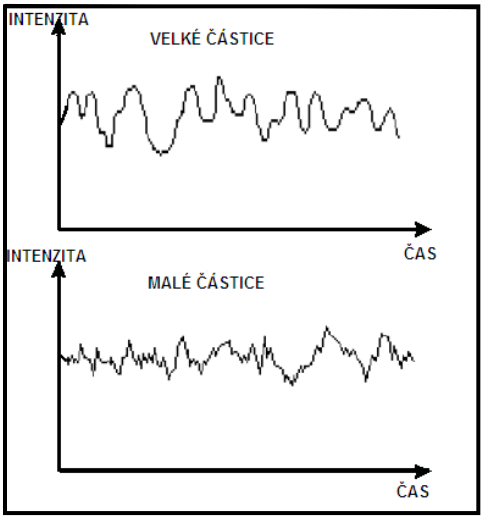
Velké částice tedy způsobují ohyb laserového paprsku pod malým úhlem a paprsek dopadající na detektor má velkou intenzitu, zatímco malé částice způsobují difrakci laserového paprsku pod velkým úhlem, ale paprsek dopadající na detektor má nízkou intenzitu.

Tímto mechanizmem vznikají na detektoru skvrnité obrazce, **Obrázek 10**. Světlá místa vznikají na obrazci při dopadu odražených paprsků o stejné nebo násobné fázi. Dochází ke skládání vln – interferenci. Dopadají-li na detektor odražené paprsky o různé fázi, vznikají na obrazci místa tmavá. DLS je někdy označována jako foton korelační spektrometrie, protože se velikost částic vyhodnocuje na základě korelační analýzy počtu fotonů dopadajících na detektor. Měří se změna šířky čáry Rayleighova rozptýleného záření v důsledku Brownova tepelného pohybu částic.



Obrázek 10: Skvrnitý obrazec [36]

Rychlost, jakou se mění skvrnité obrazce, je závislá na velikosti částic. Malé částice způsobují rychlejší změnu intenzity rozptýleného světla, které dopadá na detektor.



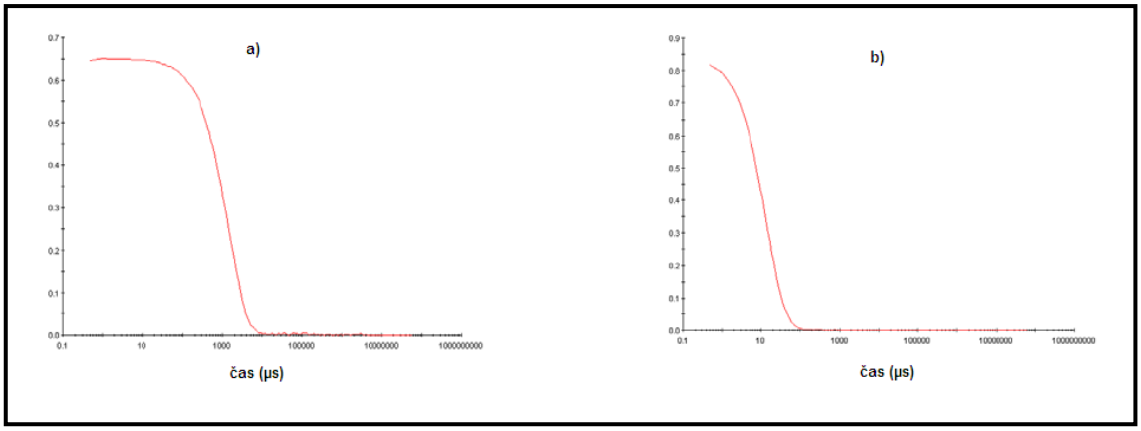
Obrázek 11: Typické kolísání intenzity pro velké i malé částice [36]

Nejefektivnějším způsobem, jak změřit kolísání intenzity založeného na Brownově pohybu, je použít digitální autokorelátor.

Korelátor je ve své podstatě signálový komparátor. Srovnává stupeň podobnosti mezi jednotlivými signály. Nebo srovnává tentýž signál sám se sebou v různých časových rozmezích. Intenzity signálů v krátkém časovém úseku jsou si velmi podobné, o chvíli později se podoba snižuje, až s časem dosáhne korelace na nulu. K tomuto jevu

dochází díky Brownovu pohybu. Časová měřítka pro DLS jsou však velmi malá. Aby korelace dosáhla nulu u typického vzorku, je potřeba jedna až deset milisekund. Kroky pro postupné měření korelace se pohybují v řádech nano- nebo mikrosekund. Z tohoto důvodu se využívá srovnání jednoho signálu v čase.

Výstupem z korelátoru je graf, který ukazuje rychlost změny skvrnitého obrazce. V případě, že jsou částice velké, se signál bude měnit pozvolna, korelace bude přetrvávat po dlouhou dobu. Křivka grafu bude méně strmá (viz. **Obrázek 12**, graf **a).** Čím menší jsou částice, tím rychlejší je pohyb. Z toho plyne rychlejší změna obrazce a tím je i výsledná křivka strmější (viz. Obrázek 12, graf **b).**



Obrázek 12: Ukázka korelogramů. Na ose y je odezva korelátoru. Na grafu a) je znázorněna pomalá odezva korelátoru a na grafu b) odezva rychlá – typická pro malé částice [36]

Velikost částic je získána z korelačních funkcí pomocí různých algoritmů. Existují dva způsoby, které mohou být použity. Prvním z nich je proložení korelačních funkcí jednoduchou exponenciálou pro získání průměrné velikosti částic (Z-average) a odhad šířky distribuce velikosti částic – index polydisperzity (PdI). Druhou možností je použít více exponenciálních funkcí za účelem získání hodnot distribuce velikosti částic.

Získaná šířka distribuce velikosti částic tedy odpovídá relativní intenzitě světla rozptýleného částicemi, tedy distribuce intenzity. V případě, že tvoří distribuce intenzity jeden poměrně hladký pík, pak není zapotřebí používat Mieho teorii. V případě, kdy pík není dostatečně ostrý, nebo je píků více, pak lze pomocí Mieho teorie převést vstupní parametry distribuce intenzity na objem distribuce. Tím se získá realističtější pohled na vzorek.

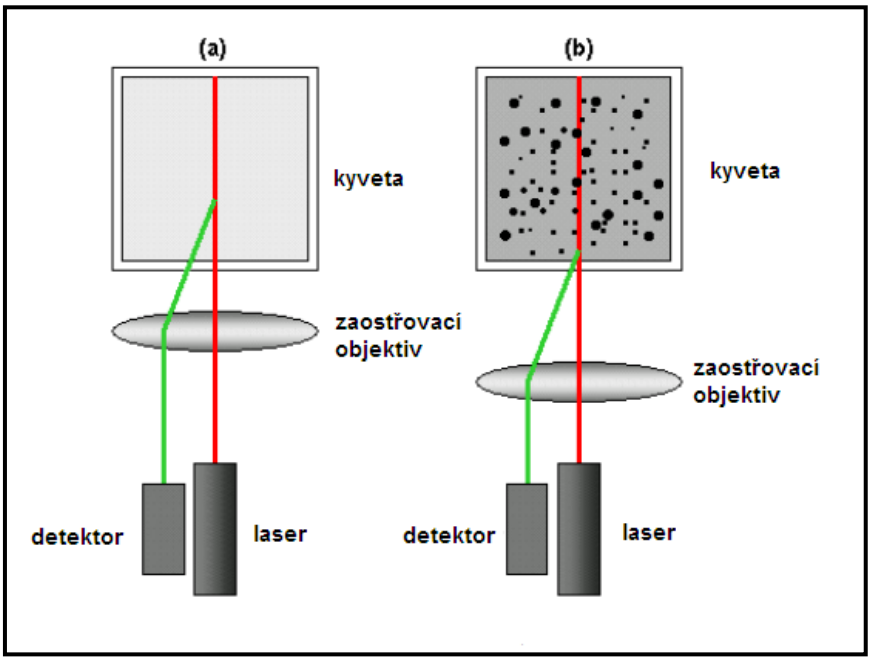
Aby mohl detektor úspěšně měřit, musí být intenzita dopadajícího světla v určitém předem daném rozsahu. Pokud by na detektor dopadalo příliš mnoho rozptýleného světla, detektor by byl nasycen. K odstranění tohoto problému se do systému zabudovává atenuátor, tlumič. U vzorků s vysokým podílem malých částic

nebo vzorků s malou koncentrací umožní tento tlumič průnik většího množství laserového záření. U vzorků, které rozptylují více světla, jako jsou velké částice nebo vzorky o vyšší koncentraci, musí být intenzita rozptýleného světla snížena. Vhodnou pozici tlumiče vyhodnocuje přístroj sám. Rozsah je100 až 0,0003%. [20, 37]

3.9.5 Výhody nových měřících systémů

Nespornou výhodou při použití detekce pod úhlem 173°, jinak známé též jako detekce zpětného rozptylu je fakt, že měřící optika není v přímém kontaktu s měřeným vzorkem. Vzorek není nutné nijak upravovat, či dodatečně ředit a nedochází ke znehodnocení vzorku. Díky detekci zpětným rozptylem je možné měřit širší rozsah velikostí a koncentrací oproti méně citlivému uspořádání pod úhlem 90°.

Další výhodou je, že laserový paprsek nemusí cestovat přes celý vzorek. Software si umí automaticky nastavit nejvhodnější pozici pro měření pomocí zaostřovací techniky. Tím, že laser vykoná jen kratší cestu, těsně za stěnu kyvety, je možné měřit i vzorky o vyšší koncentraci, nebo větší velikosti částic. Snižuje se nepřesnost měření v důsledku rozptylu světla o další částice vzorku. Naopak u vzorků zředěných, či u malých částic je vhodnější provádět měření dále od stěny kyvety, aby se maximalizovalo množství rozptylu.



Obrázek 13: Schéma znázorňující polohu při měření pro (a) zředěné vzorky a pro (b)vzorky s vyšší koncentrací či velikostí částic. [37]

Novější způsob měření také redukuje nepřesnost měření z důvodu obsahu různých kontaminantů jako je například prach.[2, 37]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny a materiál

SUROVINY	VÝROBCE (či DODAVATEL)
Emulze č.: 250708	Biomedica, s.r.o., Praha, ČR
Emulze č.: 260708	Biomedica, s.r.o., Praha, ČR
Emulze č.: 270708	Biomedica, s.r.o., Praha, ČR
Emulze č.: 280708	Biomedica, s.r.o., Praha, ČR
HEC - Natrosol HHX, 1300000 g/mol	Aqualon, Rijswijk, Nizozemsko
HPMC - Metolose 90SH, 700000 g/mol	Syntapharm, Mühlheim, Německo
Voda na injekci	Ardeapharma, a.s., Ševětín, ČR

Výše uvedené používané komerčně dostupné suroviny odpovídaly deklarované jakosti podle příslušných norem výrobců, resp. dodavatelů. Složení jednotlivých emulzí je uvedeno v odst. 4.3.

Metolose je hypromelosa (HPMC) a Natrosol je hydroxyethylcelulosa (HEC).

4.2 Přístroje a pomůcky

PŘÍSTROJE	VÝROBCE
Analytické váhy CP 225 D	Sartorius, Göttingen, Německo
Fotoaparát Canon Powershot A540	Canon, Malajsie
Jednorázové kyvety	Brand, Wertheim, Německo
Kapilární viskozimetr	Sklárny Kavalier, Držkov, ČR
Kombinovaná lednice s mrazničkou	Liebherr, Ochsenhausen, Německo
Laminární box Hela Flow 30	Helago, Hradec Králové, ČR
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha, ČR
Předvážky Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen, Německo
Předvážky Kern 440-53-N	Kern & Sohn, Balingen, Německo
Biolologický termostat BT 50L	Laboratorní přístroje, Praha, ČR
Zetasizer nano ZS	Malvern, Worcestershire, V. Británie

4.3 Složení výchozích nanoemulzí

Číslo šarže	Koncentrace	Emulgátor	Olej
250708	20%	SL	sójový
			lněný
			olivový
			z řas
			hadincový
260708	20%	SL	lněný
			olivový
			z řas
			hadincový
270708	30%	SL	sójový
			lněný
			olivový
			z řas
			hadincový
280708	30%	SL	lněný
			olivový
			z řas
			hadincový

Poznámky: SL – sójový lecithin (1,7 %), všechny emulze obsahovaly antioxidanty, jejichž složení je součástí neveřejných firemních podkladů, stejně jako dílčí zastoupení jednotlivých olejů.

4.4 Složení a příprava nanoemulzních vzorků

Pro vlastní měření vlivu přídavku viskozifiantů na vlastnosti NE byly připraveny emulzní vzorky z výše uvedených emulzí a polymerů.

Jednotlivé vzorky byly pro účely této práce označeny podle následujícího kódu:

XX - YZ,

kde **XX** je shodné s prvními čísly z označení použité emulze, **Y** je označení pro viskozifiant a **Z** značí výslednou koncentraci viskozifiantu. Jednotlivé vzorky se lišily použitou emulzí a koncentrací přidaného viskozifiantu. Jednalo se o koncentrace: 0,00; 0,083; 0,167; 0,333 a 0,667‰.

Tabulka 1: Význam hodnoty Y a Z

Y	Viskozifiant
0	HPMC
1	HEC

Z	Koncentrace viskozifiantu (‰)
1	0,000
2	0,083
3	0,167
4	0,333
5	0,667

Tabulka 2: Příklad označení a složení emulzních vzorků

Vzorek	Emulze	Viskozifiant 1% HPMC	Voda	Koncentrace viskozifiantu
25-01, 26-01, 27-01, 28-01	20,0	0,000	10,00	0,000 ‰
25-02, 26-02, 27-02, 28-02	20,0	0,250	9,75	0,083 ‰
25-03, 26-03, 27-03, 28-03	20,0	0,500	9,50	0,167 ‰
25-04, 26-04, 27-04, 28-04	20,0	1,000	9,00	0,333 ‰
25-05, 26-05, 27-05, 28-05	20,0	2,000	8,00	0,667 ‰

Příprava nanoemulzních vzorků

A. Viskozifianty

1. Příprava 1% roztoku viskozifiantu.

B. Emulzní vzorky

1. Přidání příslušného množství roztoku viskozifiantu k emulzi.
2. Doplnění vodou na injekce do hmotnosti 30,0 g.
3. Důkladné promíchání vzorků na magnetické míchačce při pokojové teplotě po dobu 10 minut s vizuální kontrolou

Příprava 1% roztoku viskozifiantu

Složení:	viskozifiant	0,50
	voda na injekci	ad 50,0

1. Dispergace příslušného množství HPMC v horké vodě a HEC ve vodě studené.
2. Zahřátí HEC a následné chlazení roztoků na laboratorní teplotu za stálého míchání na magnetické míchačce.
3. Doplnění roztoků do konečné hmotnosti 50,0 g.

Poznámka: Příprava jednotlivých vzorků a veškerá manipulace s NE vzorky probíhala v aseptickém prostředí laminárního boxu.

4.5 Měření velikosti částic

Velikost částic ve vzorcích byla měřena metodou laserové difrakce. Celkový objem emulze byl důkladně promíchán a do kyvety byl přenesen vzorek o objemu 1 mililitru. Pro účely měření byly použity jednorázové polystyrenové kyvety. Měření probíhalo za definovaných podmínek, jejichž hodnoty byly zadány do software přístroje. Jako disperzní prostředí byla zvolena voda o dané viskozitě 0,8872 mm^2s^{-1} a indexu lomu 1,330. Teplota vzorku byla přístrojem temperována na 25°C po dobu tří minut. Nejvhodnější hloubka proměřování vzorku byla systémem určena automaticky, a to pro každý vzorek zvlášť. Stanovení probíhalo pro každý vzorek ve třech po sobě jdoucích měřeních.

Velikost dispergovaných částic tedy byla stanovena třikrát: poprvé ihned po přípravě vzorků, poté po druhém cyklu tepelného namáhání a naposledy po ukončení testů tepelného namáhání.

Získané hodnoty byly dodatečně přepočítány opravou viskozity předdefinované na viskozitu, která byla naměřena pro jednotlivé koncentrace přidaných polymerů.

4.6 Stanovení viskozity

Viskozita byla měřena pomocí kapilárního viskozimetru. Vzorky byly vytemperovány na teplotu 20°C. Pro každý vzorek byla vypočítána průměrná kinematická viskozita z minimálně tří po sobě jdoucích měření, přičemž naměřené hodnoty se nesměly lišit o více jak 1 %.

Viskozita vzorků byla stanovena celkem třikrát. Poprvé ihned po přípravě vzorků o dané koncentraci viskozifiantu, podruhé po druhém cyklu zkoušky tepelným namáháním a naposledy po skončení tepelného namáhání.

4.7 Zkouška tepelným namáháním

Pro zjištění stability připravených NE byly vzorky podrobeny tepelnému namáhání. Pro účely této práce byl zvolen cyklus střídání teplot 40°C a 8°C každých 72 hodin. Jeden cyklus tedy trval 144 hodin. Testování probíhalo v pěti po sobě jdoucích cyklech.

Vzorky byly střídavě vkládány do termostatu, kde byla udržována teplota 40 °C. Po 72 hodinách byly vzorky z termostatu vyjmuty a na 72 hodin vloženy do chladničky s teplotou 8°C. Po každém vyjmutí z chladničky byly NE vyfotografovány a makroskopicky hodnoceny.

U všech vzorků byl hodnocen vznik zkrémovatělé vrstvy v poměru k celkovému objemu vzorku a jejich roztřepatelnost.

5 VÝSLEDKY

5.1 Velikost částic nanoemulzí

5.1.1 Protokoly z DLS měření

Na následujících dvou stranách je uvedena ukázka protokolů získaných při proměřování vzorků emulzí na Zetasizeru Nano ZS. První je z měření získaného při dosazení předdefinované, tedy předem přibližně odhadnuté hodnotě viskozity, druhý je získán úpravou získaných výsledků na skutečně naměřenou viskozitu vzorků. V grafu jsou barevně odlišena tři opakovaná měření pro jeden vzorek, ze kterých je následně vypočtena průměrná hodnota velikosti částic. Ta je dále v této práci použita pro účely hodnocení vlastností zkoumaných vzorků emulzí v této práci.

Size Distribution Report by Intensity

v2.0

Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: 26 - 02b 3

SOP Name: fat emulsion 25 AK.sop

General Notes: Fat Emulsions Biomedica s viskozifiantem
+ 0,0625% HPMC

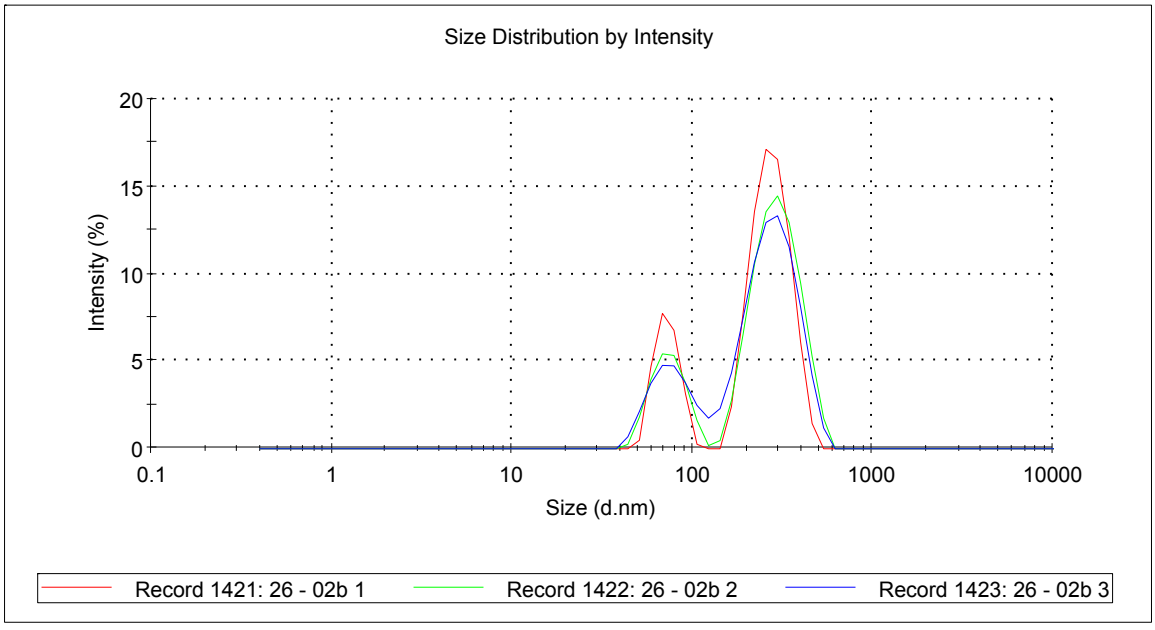
File Name:	abu.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	1423	**Dispersant RI:**	1,330
Material RI:	1,48	**Viscosity (cP):**	1,8721
Material Absorbtion:	0,30	**Measurement Date and Time:**	25. května 2009 12:52:15

System

Temperature (°C):	25,0	**Duration Used (s):**	60
Count Rate (kcps):	450,4	**Measurement Position (mm):**	0,85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm):	177,4	**Peak 1:**	282,3	76,4	89,02
PdI:	0,401	**Peak 2:**	77,95	23,6	20,65
Intercept:	0,791	**Peak 3:**	0,000	0,0	0,000
Result quality	Good				



Size Distribution Report by Intensity

v2.0

Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: 26 - 02b 3

SOP Name: fat emulsion 25 AK.sop

General Notes: Fat Emulsions Biomedica s viskozifiantem
+ 0,0625% HPMC

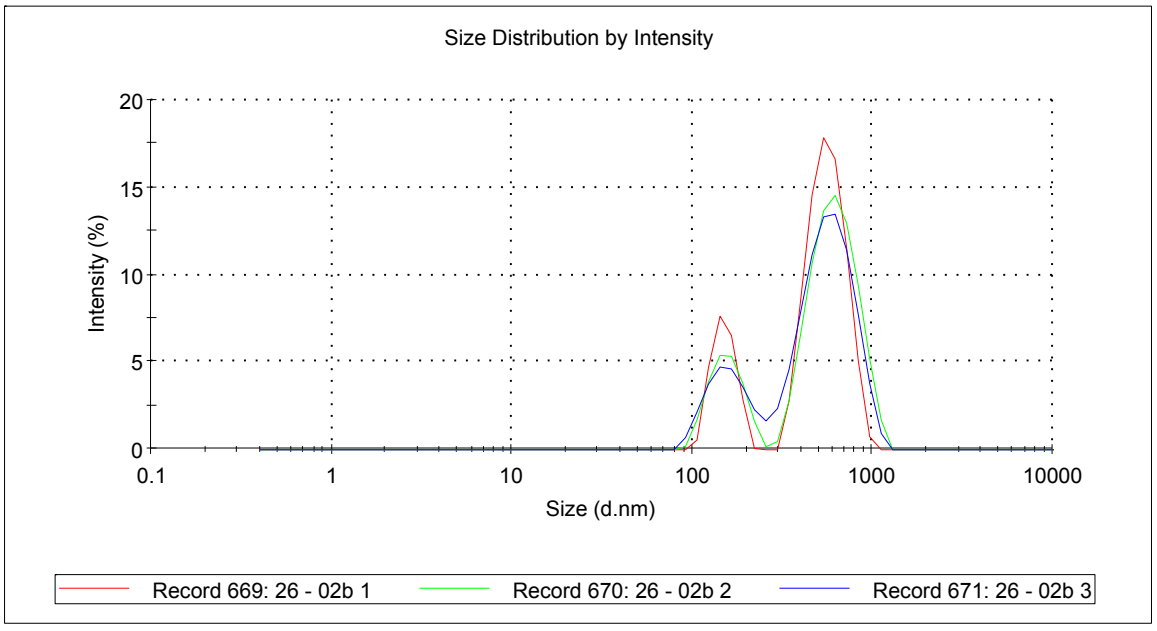
File Name:	abu.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	671	**Dispersant RI:**	1,330
Material RI:	1,48	**Viscosity (cP):**	0,8872
Material Absorbtion:	0,30	**Measurement Date and Time:**	25. května 2009 12:52:15

System

Temperature (°C):	25,0	**Duration Used (s):**	60
Count Rate (kcps):	450,4	**Measurement Position (mm):**	0,85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm):	374,3	**Peak 1:**	580,6	76,9	180,9
PdI:	0,401	**Peak 2:**	161,2	23,1	42,77
Intercept:	0,791	**Peak 3:**	0,000	0,0	0,000
Result quality	Good				



5.1.2 Souhrnné výsledky měření velikosti částic

Naměřené hodnoty velikosti částic jsou uspořádány do **Tabulka 3** aTabulka 4. Vzorky měřené po druhém cyklu tepelného namáhání mají označení **(I)** a vzorky měřené po skončení testování jsou označeny **(II)**.

Tabulka 3: Velikost částic [nm] **a směrodatné odchylky (σ) s HPMC jako viskozifiantem**

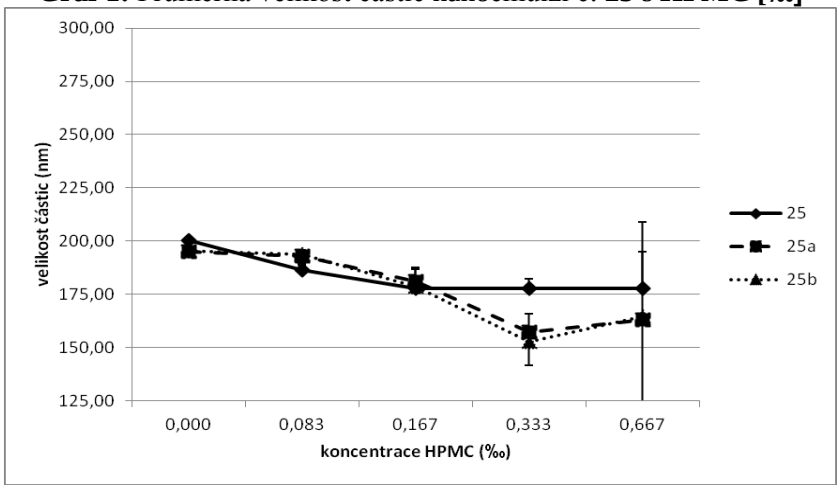
Číslo Vzorku	HPMC (%)	velikost částic	σ	velikost částic (I)	σ (I)	velikost částic (II)	σ (II)
25-01	0,0000	200,2	± 1,3	194,9	± 5,3	195,4	± 2,9
25-02	0,0083	186,2	± 2,8	193,1	± 2,7	193,5	± 3,9
25-03	0,0166	177,5	± 9,2	181,2	± 6,3	178,5	± 2,7
25-04	0,0333	147,8	± 4,9	157,3	± 8,3	152,7	± *11,1*
25-05	0,0666	134,1	± *31,2*	163,1	± *31,8*	164,4	± *43,1*
26-01	0,0000	219,2	± *31,9*	198,6	± 5,1	194,3	± 2,8
26-02	0,0083	184,5	± 1,3	190,7	± 1,6	182,7	± 4,6
26-03	0,0166	176,6	± 6,0	180,8	± 9,6	170,7	± 2,8
26-04	0,0333	151,8	± 10,3	156,0	± 8,8	154,1	± 6,7
26-05	0,0666	132,7	± *14,5*	153,1	± *25,2*	150,9	± *20,3*
27-01	0,0000	209,8	± 2,8	206,7	± 7,3	201,6	± 4,2
27-02	0,0083	195,0	± 1,8	186,8	± 2,5	186,5	± 4,3
27-03	0,0166	185,3	± 2,0	176,9	± 3,5	173,0	± 3,1
27-04	0,0333	176,1	± 2,3	175,9	± 9,6	172,7	± 3,5
27-05	0,0666	167,4	± 6,4	**227,8**	± 8,2	**210,0**	± *17,0*
28-01	0,0000	183,4	± 6,2	176,1	± 1,4	174,1	± 0,8
28-02	0,0083	174,9	± 3,6	172,1	± 7,6	164,2	± 2,7
28-03	0,0166	151,2	± 8,1	151,5	± 9,0	181,8	± 8,3
28-04	0,0333	151,5	± *22,7*	155,9	± *17,7*	181,8	± 9,6
28-05	0,0666	**214,4**	± *10,6*	**221,8**	± *16,5*	**288,7**	± *10,9*

Tabulka 4: Velikost částic a směrodatné odchylky (σ) s HEC jako viskozifiantem

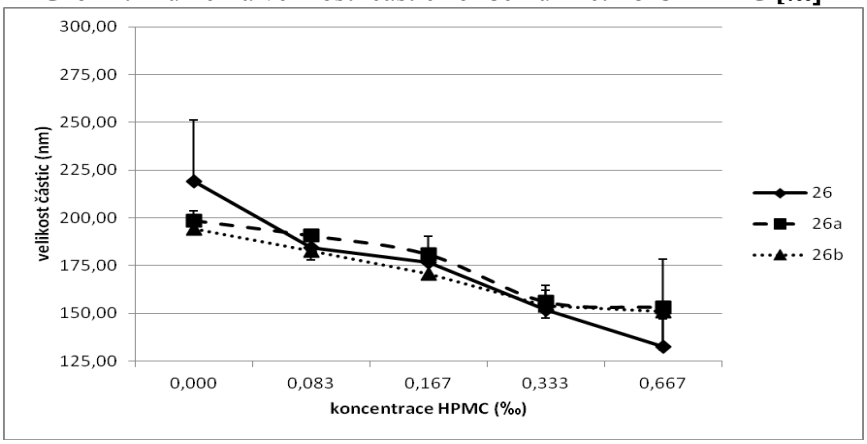
Číslo Vzorku	HEC (%)	velikost částic(nm)	σ	velikost částic (I)	σ (I)	velikost částic (II)	σ (II)
25-11	0,0000	200,2	± 1,3	194,9	± 5,3	195,4	± 2,9
25-12	0,0000	182,6	± 3,7	167,6	± 2,1	178,1	± 2,8
25-13	0,0083	173,1	± 4,3	160,0	± 6,3	159,6	± 4,2
25-14	0,0166	143,6	*± 16,2*	138,9	± 10,0	134,6	± 3,7
25-15	0,0333	138,0	*± 13,2*	132,2	*± 10,7*	134,2	*± 15,9*
26-11	0,0000	219,2	± 31,9	198,6	± 5,1	194,3	± 2,8
26-12	0,0000	178,9	± 5,9	168,1	± 4,9	172,2	± 1,6
26-13	0,0083	166,2	± 1,4	162,7	± 0,8	161,7	± 2,3
26-14	0,0166	136,2	± 0,6	139,7	± 6,4	137,9	± 7,3
26-15	0,0333	73,6	± 8,6	136,3	*± 26,3*	136,6	*± 27,7*
27-11	0,0000	209,8	± 2,8	206,7	± 7,3	201,6	± 4,2
27-12	0,0083	187,4	± 5,2	156,4	± 3,5	177,7	± 7,1
27-13	0,0166	150,9	*± 15,6*	140,0	± 4,9	164,0	± 6,6
27-14	0,0333	146,9	*± 28,3*	176,9	*± 36,3*	169,0	± 1,3
27-15	0,0666	**190,2**	*± 17,7*	**192,7**	± 2,4	**196,8**	*± 23,2*
28-11	0,0000	183,4	± 6,2	176,1	± 1,4	174,1	± 0,8
28-12	0,0083	162,1	± 2,2	178,7	± 3,4	172,3	± 2,3
28-13	0,0166	153,0	*± 11,7*	161,2	± 5,3	166,3	± 5,2
28-14	0,0333	134,3	± 5,1	141,6	± 5,6	156,0	*± 20,8*
28-15	0,0666	**208,1**	*± 16,8*	**239,9**	*± 19,3*	**222,6**	± 10,0

Následovně jsou v každém grafu srovnány jednotlivé vzorky měřené ihned po přípravě, po druhém cyklu tepelného namáhání (označení **a**) a po skončení zkoušek pomocí teplotních změn (označení **b**).

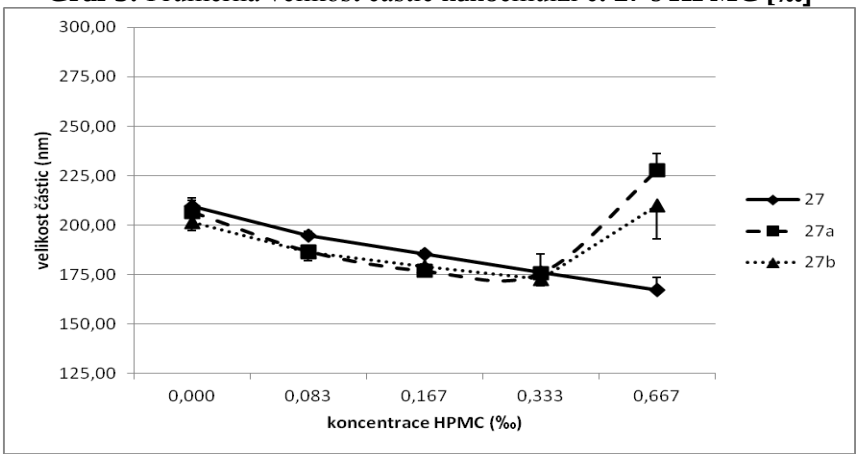
Graf 1: Průměrná velikost částic nanoemulzí č. **25** s **HPMC [‰]**



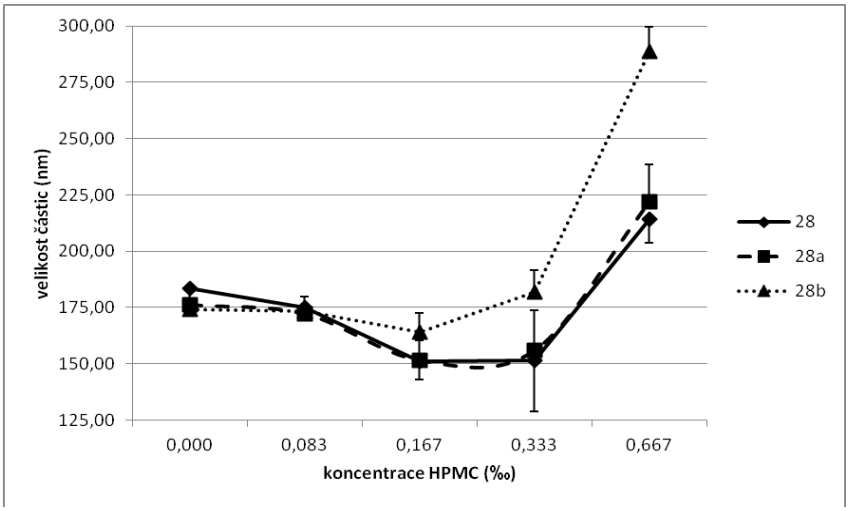
Graf 2: Průměrná velikosti částic nanoemulzí č. **26** s **HPMC [‰]**



Graf 3: Průměrná velikost částic nanoemulzí č**. 27** s **HPMC [‰]**

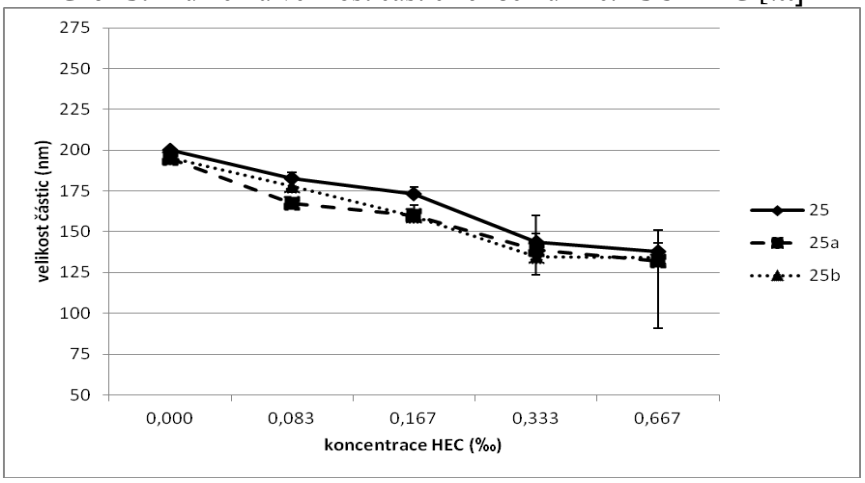


Graf 4: Průměrná velikost částic nanoemulzí č. **28** s **HPMC** [‰]

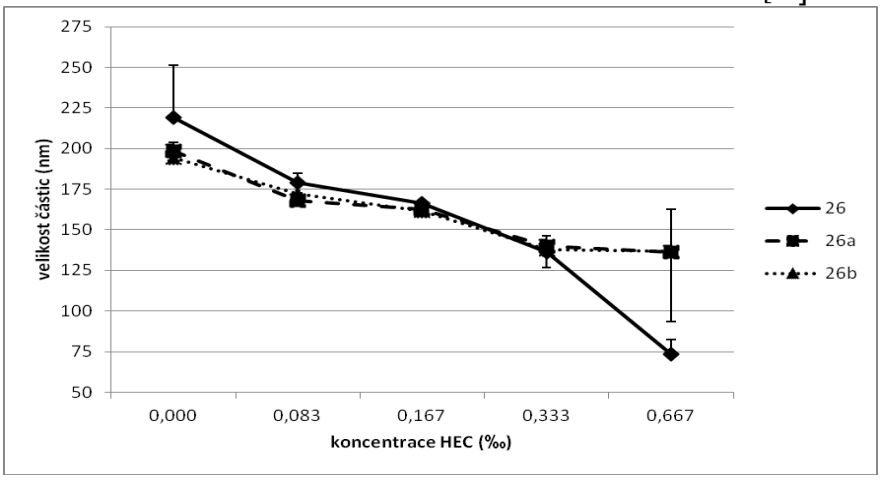


Poznámka: Při měření vzorku **28-05** docházelo k separaci fází již během měření.

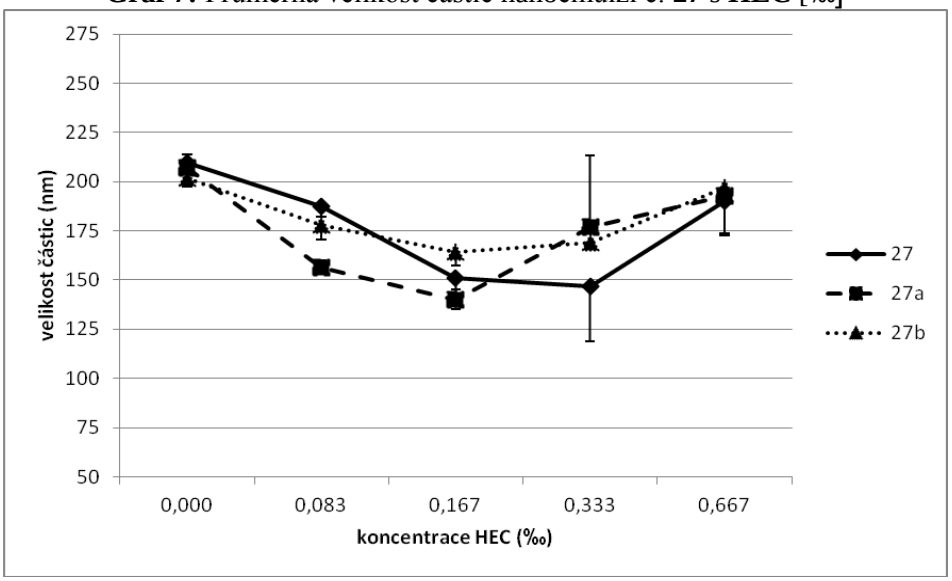
Graf 5: Průměrná velikost částic nanoemulzí č. **25** s **HEC** [‰]



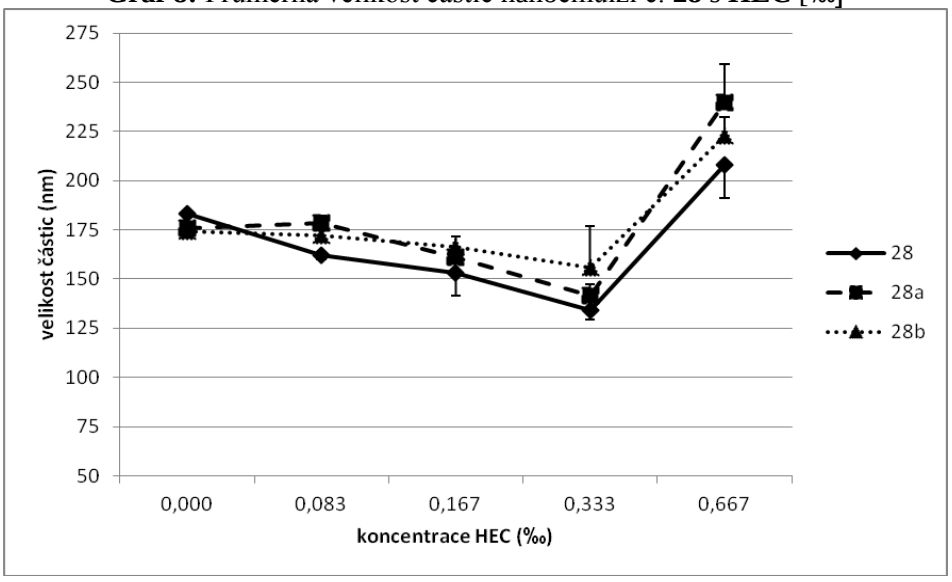
Graf 6: Průměrná velikost částic nanoemulzí č. **26** s **HEC** [‰]



Graf 7: Průměrná velikost částic nanoemulzí č. **27** s **HEC** [‰]



Graf 8: Průměrná velikost částic nanoemulzí č. **28** s **HEC** [‰]



Poznámka: Při měření vzorku 28-15 docházelo k separaci fází již během měření.

5.2 Hodnocení viskozity emulzí

Poprvé byla viskozita měřena po přípravě NE vzorků, podruhé po druhém teplotním cyklu **(I)** a naposled po ukončení teplotního namáhání **(II)**. Průměr naměřených hodnot pro měření v různých fázích teplotních cyklů ukazují **Tabulka 5** až **Tabulka 8**

Tabulka 5: Viskozita [mm^2s^{-1}] emulzních vzorků s HPMC jako viskozifiantem

HPMC	0,000 ‰	0,083 ‰	0,167 ‰	0,333 ‰	0,667 ‰
25	1,6430	1,8245	2,1189	2,4592	3,4211
25(I)	1,6703	1,7811	2,0161	2,4292	3,4512
25(II)	1,6632	1,8144	2,0341	2,4202	3,4512
26	1,6267	1,8721	2,0993	2,4908	3,5388
26(I)	1,6267	1,8103	2,0393	2,4308	3,5388
26(II)	1,6697	1,8721	2,0902	2,5418	3,5388
27	1,6874	1,8663	2,1593	2,3864	5,9120
27(I)	1,7338	1,9232	2,2907	2,3392	4,2404
27(II)	1,7307	1,8663	2,1940	2,2882	4,0003
28	2,1357	2,3688	2,8510	3,4188	5,4618
28(I)	2,2225	2,4818	2,8690	3,3199	5,4018
28(II)	2,1357	2,3588	2,7099	3,0890	4,7926

Tabulka 6: Průměrná viskozita vzorků s HPMC jako viskozifiantem (mm^2s^{-1})

HPMC	0,000 ‰	0,083 ‰	0,167 ‰	0,333 ‰	0,667 ‰
25	1,6588	1,8067	2,0630	2,4362	3,4412
26	1,6404	1,8515	2,0793	2,4878	3,5388
27	1,7173	1,8853	2,2147	2,3379	4,7176
28	2,1646	2,4031	2,8100	3,2759	5,2187

Tabulka 7: Dílčí hodnoty viskozity [mm^2s^{-1}] vzorků s HEC jako viskozifiantem

HPMC	0,000 ‰	0,083 ‰	0,167 ‰	0,333 ‰	0,667 ‰
25	1,6430	1,9062	2,1370	2,7309	2,8209
25(I)	1,6703	2,0389	2,2702	2,8810	2,8510
25(II)	1,6632	1,9561	2,2702	2,7909	2,8510
26	1,6267	1,9502	2,1470	2,6991	5,8820
26(I)	1,6267	2,0603	2,2417	2,8191	4,3725
26(II)	1,6697	1,9615	2,2117	2,7471	4,0013
27	1,6874	3,1578	3,4189	4,5015	6,0880
27(I)	1,7338	3,2801	3,5988	4,2104	6,0280
27(II)	1,7307	3,0610	3,3199	4,0514	5,6981
28	2,1357	2,4394	2,8371	3,6012	5,7161
28(I)	2,2225	2,3092	2,5402	3,0811	4,4895
28(II)	2,1357	2,3318	2,4698	2,9410	4,1896

Tabulka 8: Průměrná viskozita vzorků s HEC jako viskozifiantem (mm^2s^{-1})

HEC	0,000 ‰	0,083 ‰	0,167 ‰	0,333 ‰	0,667 ‰
25	1,6588	1,9671	2,2258	2,8009	2,8410
26	1,6404	1,9907	2,2001	2,7551	4,7519
27	1,7173	3,1663	3,4459	4,2544	5,9364
28	2,1646	2,3601	2,6157	3,2078	4,7984

5.3 Vizuální hodnocení emulzí ze zkoušek tepelným namáháním

Na prezentovaných snímcích jsou seřazeny fotografie, které byly průběžně pořizovány během testování. Vialky s obsahem testovaných emulzí jsou řazeny zleva doprava podle stoupající koncentrace přidaného viskozifiantu.

První série fotografií ukazuje vývoj vizuálních změn u emulze **číslo 25** s **HEC** jako viskozifiantem. První snímek je pořízen před testováním, každý další po skončení jednoho cyklu testování.

Obrázek 14: Vzorky s HEC před testováním

Obrázek 15: Vzorky s HEC po 1. cyklu testování

Obrázek 16: Vzorky s HEC po 2. cyklu testování

Obrázek 17: Vzorky s HEC po 3. cyklu testování

Obrázek 18: Vzorky s HEC po 4. cyklu testování

Obrázek 19: Vzorky s HEC po 5. cyklu testování

V **druhé sérii** fotografií je chronologicky znázorněna emulze číslo **28** s **HPMC** jako viskozifiantem.

Obrázek 20: Vzorky s HPMC před testováním

Obrázek 21: Vzorky s HPMC po 1. cyklu testování

Obrázek 22: Vzorky s HPMC po 2. Cyklu testování

Obrázek 23: Vzorky s HPMC po 3. cyklu testování

Obrázek 24: Vzorky s HPMC po 4. cyklu testování

Obrázek 25: Vzorky s HPMC po 5. cyklu testování

6 DISKUSE

6.1 Velikost částic

Základní konstatování, které vyplynulo z měření velikosti částic všech hodnocených vzorků je, že ve všech případech nebyly překročeny průměrné hodnoty vymezující nanodisperzní oblast, většinou se pohybovaly v rozmezí 150 nm až 200 nm, s nejodlehlejší výjimkou u nanoemulze 28 s nejvyšším přídavkem viskozifiantu HPMC po prvním zátěžovém teplotním cyklu.

Při podrobnějším pohledu na naměřené průměrné hodnoty velikosti částic a hodnoty **σ** jejich směrodatných odchylek v souhrnných **Tabulka 4** aTabulka 5 je zřejmé, že se průměrné hodnoty ze třech opakování pro jednu nanoemulzní soustavu navzájem významně neliší. Je pozoruhodné, že intervaly kolem dílčích průměrných hodnot velikosti vytýčené již pouhým jednonásobkem hodnoty **σ** umožňují takové konstatování ve všech případech. Znamená to, že všechny hodnocené soustavy vykazují překvapivě malou polydisperzitu.

Pro případnou další interpretaci bylo ovšem zajímavější podchytit takové případy z měření velikosti dispergovaných nanočástic, které přece jenom vykazovaly alespoň poněkud nápadně vyšší hodnoty variability. Jako pracovní kritérium pro takové hodnocení kolísavosti naměřených hodnot byl zadán relativní interval ± 10 %. Hodnoty variability **σ,** které byly vyšší než 10 %, jsou v **Tabulka 4** aTabulka 5vyznačeny kurzívou.

Na základě uplatnění tohoto pracovního kritéria se jako soustava s nejmenším kolísáním naměřených velikostí dispergovaných částic jevila nanoemulze **27**, u které se ani nejvyšší přídavek HPMC neprojevil nápadnějším zvýšením variability velikosti částic.

Nejzajímavějším poznatkem patrným z údajů v **Tabulka 4** je skutečnost, že až na výjimku, konkrétně při nejvyšší koncentraci HPMC u vzorku **28,** a částečně **27,** klesala naměřená velikost částic pravidelně s narůstající koncentrací viskozifiantu. Jestli a jak se tento fakt projeví na podobě makroskopicky odečítaných údajů ze sledování v zátěžovém testování nanoemulzí však nebylo zřejmé.

Zmíněná souvislost je patrnější z **Graf 1** až**Graf 8.** V **Graf 1** až**Graf 8** je vynesena naměřená průměrná velikost částic jednotlivých vzorků. Stanovení velikosti částic bylo

pro každý vzorek provedeno třikrát během jednoho měření. Jelikož se od sebe hodnoty jednoho měření nelišily o více jak ± 5%, jsou v grafech vyneseny hodnoty průměrné.

V daném kontextu je důležitá poznámka ke **Graf 5**, že při měření vzorku **28-05** docházelo během měření k separaci fází.

Překvapivě silně analogicky vycházely také údaje naměřené pro nanoemulzní soustavy s odstupňovaným přídavkem HEC. I v tomto případě jsou vyznačeny významnější hodnoty variability kurzívou. A také se opět ukázalo, že při měření vzorku **28-15** docházelo k separaci fází již během měření

6.2 Hodnocení viskozity

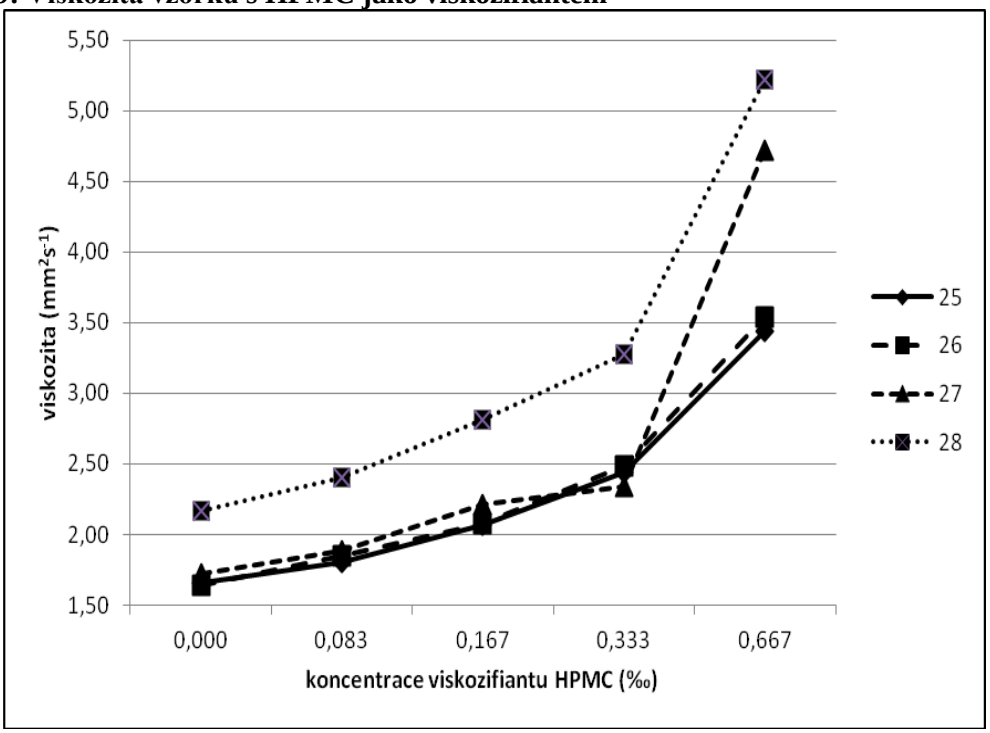
Viskozita hodnocených vzorků naměřená v různých fázích tepelného namáhání se u jednotlivých vzorků téměř nelišila. Až na vzorky s nejvyšší koncentrací přidaného viskozifiantu se naměřené rozdíly pohybovaly v rozmezí ± 0,100 mm^2s^{-1}. Pro účely stanovení stability systému jsou to hodnoty zanedbatelné.

Problematické bylo stanovení pro vzorky číslo **27** a **28**, tedy vzorky s 30% obsahem olejové fáze, s viskozifiantem v koncentraci nejvyšší, tedy 0,667‰, u kterých již během měření docházelo k separaci fází. Vyšší diference naměřených viskozitních hodnot byla u vzorků s nejvyšší koncentrací přidaného polymeru způsobena destabilizací systému – rozvrstvování fází podle hustoty.

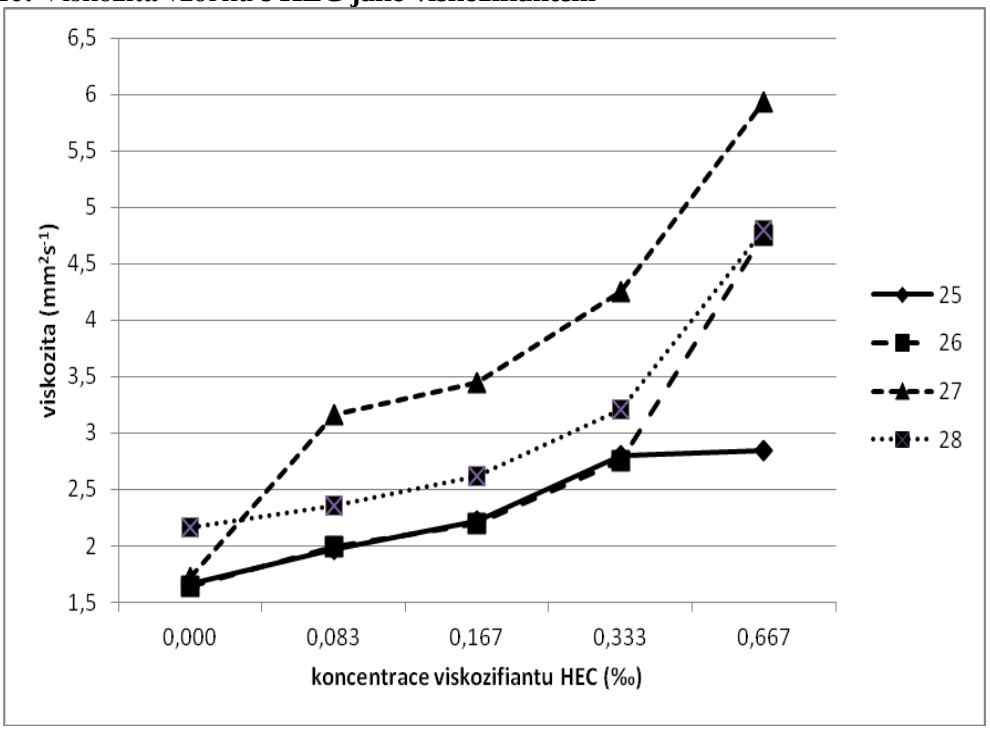
Samotný fakt, že s narůstající koncentrací přidávaných polymerů HPMC a HEC vzrůstá v daném koncentračním rozmezí viskozita nanoemulzí, nemá žádný podstatný význam. Měření viskozity bylo prováděno především proto, aby bylo možné počítat s relevantními hodnotami viskozity při DLS měření velikosti částic.

V **Graf 9** a **Graf** 10 jsou vyneseny průměrné hodnoty viskozity za všechna tři měření během tepelného namáhání.

Graf 9: Viskozita vzorků s HPMC jako viskozifiantem



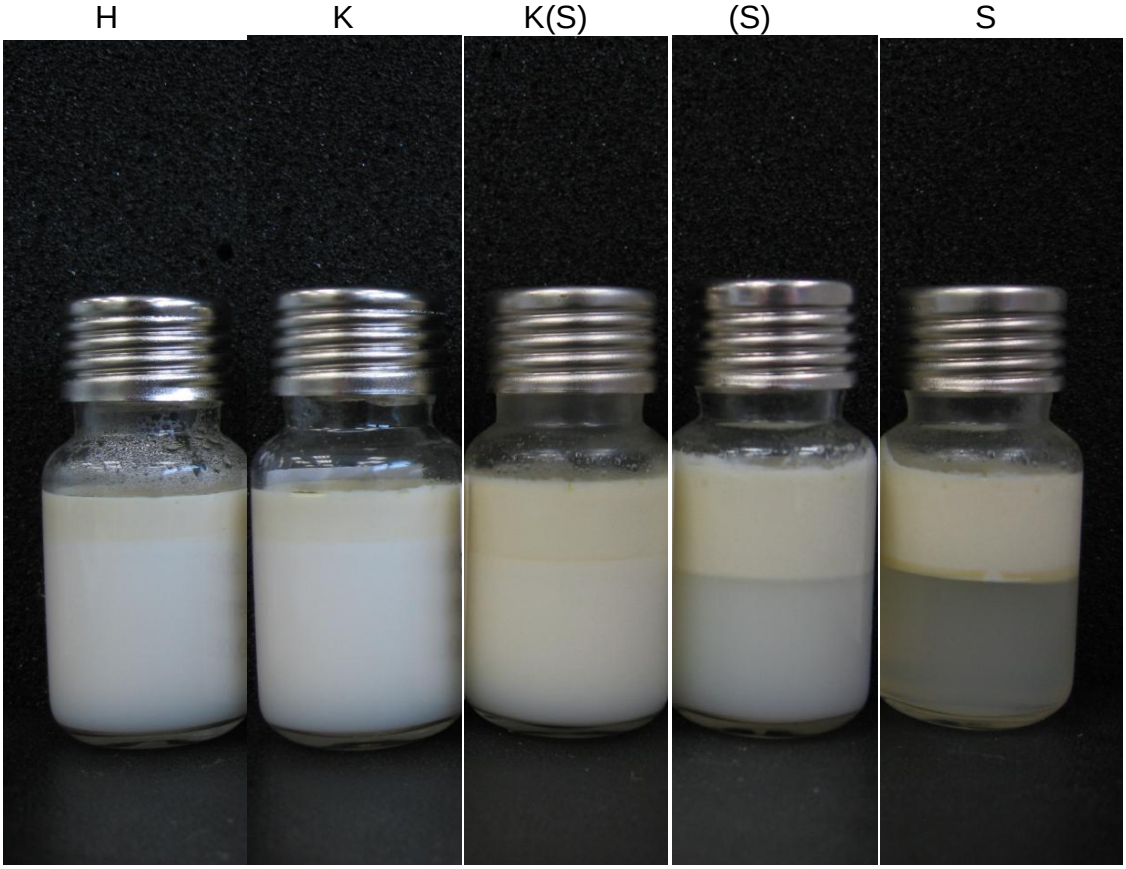
Graf 10: Viskozita vzorků s HEC jako viskozifiantem



6.3 Makroskopické hodnocení nanoemulzí

Toto hodnocení bylo pro konečné hodnocení vlivu přídavku obou viskozifiantů k zadaným nanoemulzním (NE) vzorkům chápáno jako zásadní. Při makroskopickém hodnocení NE bylo rozlišováno pět různých variant, jak je vyznačeno na **Obrázek 26**.

Vzorky jsou považovány za homogenní a označeny písmenem H, tvoří-li zkrémovatělá vrstva vzorku u hladiny ≤ 15 % celkového objemu (resp. výšky vzorku ve vialce) a lze ji snadno roztřepat. U vzorků s označením K zabírá zkrémovatělá část vzorku asi 15 % až 30 % objemu. Označení K(S) nesou vzorky, u kterých zkrémovatělá vrstva tvoří 30 % až 40 % a dochází ke krémovatění emulze. Pod symbolem (S) jsou vedeny vzorky, u kterých došlo k neúplné koalescenci, tedy Ostwaldovu zrání, OZ emulze - je tedy možné pozorovat začínající separaci fází v důsledku OZ. U vzorků s označením S došlo k úplnému OZ za vzniku precipitátu a ve vzorku jsou zřetelně patrné dvě oddělené fáze, kde je vodná fáze téměř čirá. Vzorek nelze roztřepat.



Obrázek 26: Ukázka vzorků s rozlišovanými variantami H, K, K(S), (S) a S.

Vzorky byly makroskopicky hodnoceny ihned po přípravě, po každém cyklu testování a po skončení testů. Jelikož se jednotlivá hodnocení výrazně nelišila, jsou uvedeny pouze dvě souhrnné tabulky. V **Tabulka 9** jsou uvedeny hodnoty získané ihned po

přípravě a v **Tabulka 10** jsou pro srovnání uvedeny hodnoty naměřené po skončení testování.

Tabulka 9: Makroskopické hodnocení emulzí I. (vysvětlivky viz str. 69)

viskozifiant	č. emulze	koncentrace viskozifiantu [‰]				
		0,00	0,083	0,16	0,33	0,66
HPMC	**25** (20%)	H	H	H	K	K
	26 (20%)	H	H	H	K	K
	27 (30%)	H	H	H	K	K(S)
	28 (30%)	H	K	K	K	(S)
HEC	**25** (20%)	H	H	K	K	K
	26 (20%)	H	H	H	K	K
	27 (30%)	H	K	K	K(S)	(S)
	28 (30%)	H	H	K	K(S)	(S)

Tabulka 10: Makroskopické hodnocení emulzí II. (vysvětlivky str. 69)

viskozifiant	č. emulze	koncentrace viskozifiantu [‰]				
		0,00 ‰	0,083 ‰	0,16 ‰	0,33 ‰	0,66 ‰
HPMC	**25** (20%)	H	H	H	K	K
	26 (20%)	K	K	K	K	K
	27 (30%)	H	H	K	K	K(S)
	28 (30%)	K	K	K	K(S)	S
HEC	**25** (20%)	H	K	K	K	K
	26 (20%)	H	H	H	K	K
	27 (30%)	H	K	K	K(S)	(S)
	28 (30%)	K	K	K	K(S)	(S)

Cyklus změny teploty vzorků ze 40°C na 8°C byl opakován celkem pětkrát. Většina nanoemulzí se jevila jako dostatečně stabilní, pouze s pozvolnou vizuálně pozorovatelnou změnou. K nejvíce patrným změnám došlo u emulze číslo **28**. U této emulze byl přídavek viskozifiantu v nejvyšší koncentraci příčinou úplné separace vodné a olejové fáze v průběhu zkoušek. K rozvrstvení došlo u obou přidávaných viskozifiantů.

U některých vzorků bylo možné pozorovat vystoupení drobných kapiček oleje ve zkrémovatělé vrstvě. Kapičky byly snadno roztřepatelné.

Při podrobnějším pohledu se z makroskopického hlediska ukázalo, že přidání jak HPMC tak i zcela odlišného HEC jako viskozifiantů vede již v koncentraci 0,33 ‰

(a vyšší) u všech hodnocených nanoemulzí ke koalescenci až separaci fází, tedy k projevům snížené stability.

Odolnější jsou z tohoto hlediska nanoemulze s 20% obsahem vnitřní olejové fáze, tedy vzorky **25** a **26.**

Zajímavé je, že tento výsledek lze odečíst nejen po teplotním zatěžování ve 4 cyklech zahřívání, ale také ihned po vpravení příslušného polymeru do soustavy. Jinak výsledek jako takový, tedy ve srovnání 20 % vnitřní fáze oproti 30 %, není sám o sobě překvapující. Větší množství vnitřní fáze má za dodržení stejné úrovně ostatních podmínek včetně velikosti částic a obsahu emulgátorů v nanoemulzní soustavě větší velikost mezipovrchu a obecně i větší tendenci ke koalescenci.

Z praktického hlediska je důležitější vzájemné porovnání dvojic s kvalitativně odlišným složením olejové fáze, tedy vždy vzorku **25** oproti **26** a zvlášť vzorku **27** oproti **28**.

Pro případného výrobce je důležité, má-li svůj vývoj z hlediska stability finálního nanoemulzního přípravku orientovat směrem k jednomu ze dvou různých složení olejové fáze. V tomto smyslu je důležitější odečet hodnocení v **Tabulka 10,** tedy po zatěžovacích zkouškách. Z tohoto hlediska se jako vhodnější jeví olejová fáze složení **25**, resp. **27**, která i při vyšším podílu olejové fáze v nanoemulzi, konkrétně na úrovni 30 %, poskytovala nejstabilnější soustavy.

Z celkového pohledu se jako nejstabilnější jevila emulze číslo **25**, dále emulze **26**, **27** a jako nejméně stabilní emulze pod číslem **28.**

7 ZÁVĚRY

1. Přidání viskozifiantů HPMC i HEC v koncentraci vyšší než 0,33 ‰ vede k destabilizaci celého systému nanoemulze.

2. Naměřená velikost částic byla nejméně variabilní u vzorků nanoemulze číslo 25 s HEC jako viskozifiantem.

3. Viskozita nanoemulzních vzorků vystavených tepelnému namáhání nebyla významně ovlivněna.

4. Koncentrace 0,667 ‰ obou testovaných viskozifiantů umožnila rozlišit mezi dvěma olejovými fázemi soustavu **25** a **27** jako stabilnější, tudíž příslušnou olejovou fázi jako vhodnější.

5. Zkoušky tepelným namáháním naopak ukázaly, že nejméně stabilní je nanoemulze **28**, ve které ve spojení s nejvyšší koncentrací viskozifiantu došlo k makroskopicky pozorovatelnému úplnému rozvrstvení fází podle hustoty.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DLS	měření velikosti částic laserovou difrakcí
FI	fyzikální inkompatibilita
HEC	hydroxyethylcelulosa
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha (Hydrophilic-Lypophilic Balance)
HPMC	hypromelosa (hydroxypropylmethylcelulosa)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
ME	mikroemulze
NE	nanoemulze
o/v	emulze typu olej ve vodě
OZ	Ostwaldovo zrání
PdI	polydisperzita
SL	sójový lecithin
v/o	emulze typu voda v oleji
σ	směrodatná odchylka
σ (ut)	směrodatná odchylka vzorků měřených po homogenizaci

9 POUŽITÁ LITERATURA

[**1**] VOKURKA, Martin, et al.: *Velký lékařský slovník*. Praha: Maxdorf, 2008. 1143 s. ISBN 978-80-7345-166-0.

[**2**] KOMÁREK, Pavel; RABIŠKOVÁ, Miloslava. *Technologie léků: Biogalenika*. Praha: Galén, 2006. 399 s. ISBN 80-7262-423-7.

[3] MANDÁK, M. a kolektiv: *Liekové formy*. *Učebnica pre farmaceutické fakulty.* Martin: Osveta, 1985, 392s. Vydání 1.

[**4**] SMITH, Duane H.; LIM, Kyung-Hee. Phase and emulsion morphology diagrams of nonionic amphiphile/oil/water systems and their interrelationships. *Pure & Appl. Chem.*, [online]. 1993, Vol. 65, No. 5, s. 977-982.

[5**]** MASON, T., G.; WILKING, J., N.; MELESON, K.; CHANG, B., C.; GRAVES, M., S.: Nanoemulsions: formativ, structure and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter* [online]. 2006. Vol. 18, Issue 41. DOI:10.1088/0953-8984/18/41/R01

[6] USÓN, N.; GARCIA, M., J.; SOLANS, C.: Formation of water-in-oil (W/O) nano-emulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low-energyemulsification method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2004. Vol. 250, Issues 1–3. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2004.03.039

[7] THARWAT, F. T.: *Emulsion formation, stability and rheology*., [online]. 2014, [cit. 2014-08-20]. Dostupné z www: <http://www.wiley-vch.de/books/sample/3527319913_c01.pdf>

[8] VYSLOUŽIL, J.; DVOŘÁČKOVÁ, K.; KEJDUŠOVÁ, M.; RABIŠKOVÁ, M.; *Příprava mikročástic metodou odpařování rozpouštědla*., [online]. 2013, [cit.

2014-08-15]. Dostupné z www: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_01_16-23.pdf>

[9] *Microemulsions.* [online]. [cit. 2014-07-02] Dostupné z www: <http://www.chm.bris.ac.uk/eastoe/Surf_Chem/3%20Microemulsions.pdf>

[10] Vydavatelstvi.vscht.cz:knihy/uid_es-001/hesla [online]. 2005 [cit. 2014-07-01]. Mikroemulze. Dostupné z www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mikroemulze.html>

[**11**] www.pharmainfo.net [online]. 2008 [cit. 2014-08-19]. Nanoemulsions. Dostupné z WWW: <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/nanoemulsions-0>

[12] J. M. GUTIÉRREZ, C. GONZÁLEZ, A. MAESTRO, I. SOLÈ, C. M. PEY and J. NOLLA: Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2008, Vol. 13, n. 4, S. 245-251. DOI:10.1016/j.cocis.2008.01.005.

[13] TADROS, Tharwat; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J., C. Solans: Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2004, Vol. 108-109. DOI: 10.1016/j.cis.2003.10.023

[14] FLORENCE, A.,T.; GREGORIADIS, G.: *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*. Amsterdam: Harwood Academish Publishers, 1998. 352 s., ISBN 90-5702-349-1.

[15] LI, Di-Cai, et al.: Application of targeted drug delivery system in Chinese medicine. *Journal of Controlled Release* [online]. 2009, Vol. 138, Issue 2. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.05.008

[16] RABIŠKOVÁ, M.: Využití nanočásticových systémů v medicíně. *Remedia* [online] 2008, Číslo 18 1/2008.

[17] VYAS, Tushar K.; SHAHIWALA, Aliasgar; AMIJI, Mansoor M.: Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2008, Volume 347, Issues 1-2. DOI:10.1016/j.ijpharm.2007.06.016

[18] SHAKEEL F., BABOOTA S., AHUJA A., ALI J., AQIL M., SHAFIQ S.: Nanoemulsions as Vehicles for Transdermal Delivery of Aceclofenac. AAPS *PharmSciTech*. [online] 2007; 8(4). DOI: 10.1208/pt0804104

[19] TADROS, TH. F.: *Emulsion Formation and Stability*. Weinheim, Viley-VCH, 2O13, 272 s., ISBN 978-3-527-31991-6.

[**20**] BOUYER, E.; MEKHOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J., L.; AGNELY, F.: Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, Volume 436, Issues 1-2. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.052

[**21**] GOOCH, Jan W: *Encyclopedic Dictionary of Polymers*, New York: Springer, 2007, 977 s, ISBN: 03-873-102-15

[**22**] SOBISCH, T.; LERCHE, D.: Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation. *Colloids and Surfaces A.: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2008, Vol. 331, Issues 1-2. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2008.05.040

[23] RAMPURNA, P., G.; BHOGI, B., S.: Effect of methylcellulose on stability of oil-in-water emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1996, Volume 140, Issue 1. DOI: 10.1016/0378-5173(96)04591-7

[**24**] MEZDOUR, Samir, et al.: Oil/water surface rheological properties of hydroxypropyl cellulose (HPC) alone and mixed with lecithin: Contribution to

emulsion stability. *Colloids and Surfaces A*: Physicochemical and Engineering Aspects [online]. 2008, Volume 331, Issues 1-2. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2008.07.023

[**25**] DERKACH, S., R.: *Rheology of emulsions*. Advances in Colloid and Interface Science, Volume 151, Issues 1–2, 2009

[26] WEIN, O.: *Úvod do Reologie*. Brno: Malé centrum. 1996, s. 84

[27] RENNER, V.: *Technická měření*, [online]. [cit. 2014-08-11]. Dostupné z www: <http://xyz12345.wz.cz/tmr/zkousky_provoz_mat.html>

[**28**] Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7

[29] *4. Nenewtonské kapaliny*. [online]. [cit. 2014-07-29]. Dostupné z www: <http://www.kme.zcu.cz/granty/biofrvs/pdf/4-01FRVS-03.pdf>

[**30**] MELICHAR, M.; CHALABALA M.; MALÝ, J.; ŠANDA, M.: *Farmaceutické inkompatibility*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1961. 264 s

[31] VETCHÝ, D.: *Stabilitní testy ve farmacii.* [online] 2006. [cit. 2014-01-08]. Dostupné z: www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-200606-0009.php>

[**32**] *Emulsion stability and testing*. Technical brief, [online] 2011, Vol. 2, [cit. 2014-08-10].
Dostupné z www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2011_2.pdf>

[**33**] TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1995, Volume 99, 2-3, DOI: 10.1016/0927-7757(95)03161-6

[34] Stabilita farmaceutických výrobků. CHEMagazín Číslo 2 Ročník XIX 2009, [cit. 2014-07-04].
Dostupné z: www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/chxix_2_cl12.pdf>

[**35**] ŠIMEK, M.; GRÜNDWALDOVÁ, V.; KRATOCHVÍL, B.: Současné metody měření velikosti částic farmaceutických látek a jejich omezení. [cit. 2014-07-24]. Dostupné: www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_01_50-55.pdf

[**36**] *www.malvern.com: Laser diffraction* [online]. 2010 [cit. 2014-08-04]. What is Particle Size?. Dostupné z WWW: <http://www.malvern.com/LabEng/technology/laser_diffraction/what_is_particle_size.htm>

[37] Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Worcestershire, UK, Malvern, 2007 [cit. 2014-08-13]. Dostupné z WWW: <http://www.malvern.com/>