

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

**Katedra farmaceutické technologie**

**Studium disperzity nanoemulzních nosičů léčiv**

**Rigorózní práce**

**Mgr. Hana Hájková**

**Konzultant: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.**

**Hradec Králové, duben 2009**

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové, dne 30.4.2009

podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za odborné vedení při zpracování rigorózní práce.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>4</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>6</b>
2.1 Nanočásticové soustavy .....	6
2.1.1 Nanočástice .....	6
2.1.2 Nanoemulze .....	7
2.1.3 Perorální podání léčiv .....	9
2.1.4 Topické podání léčiv .....	12
2.2 Zeta potenciál a velikost částic .....	13
2.2.1 Princip měření zeta potenciálu .....	14
2.2.1.1 Teorie zeta potenciálu .....	14
2.2.1.2 Elektroforéza .....	15
2.2.1.3 Měření elektroforetické pohyblivosti .....	16
2.2.2 Principy měření velikosti částic .....	17
2.2.2.1 Metoda dynamického rozptylu světla (dynamic light scattering, DLS) .....	17
2.2.3 Stabilita disperzních soustav .....	18
2.2.3.1 DLVO teorie .....	18
2.2.3.2 Výpočet interakční energie podle DLVO .....	19
2.3 Viskozimetrie .....	21
2.3.1 Měření viskozity .....	21
2.3.2 Stanovení kinematické a dynamické viskozity .....	22
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>23</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>24</b>
4.1 Použité přístroje a chemikálie .....	24
4.1.1 Přístroje .....	24
4.1.2 Chemikálie .....	24
4.2 Příprava testovacích médií .....	24
4.3 Měření viskozity .....	25
<b>5. VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY</b> .....	<b>27</b>
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>50</b>
6.1 Obecné poznámky .....	50
6.2 Disperzita částic .....	50
6.3 Stabilita částic .....	52
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>53</b>
<b>8. SOUHRN</b> .....	<b>54</b>
<b>9. SUMMERY</b> .....	<b>55</b>
<b>10. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY</b> .....	<b>56</b>
<b>11. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>57</b>
<b>12. PŘÍLOHY</b> .....	<b>59</b>

## 1. ÚVOD

Nanoemulze, které obsahují dispergované částice kapaliny v nanometrových velikostech, představují soustavy s enormní plochou dispergované fáze, což je je činí vhodnými pro různé účely aplikace. Nanoemulze jsou široce využívány v řadě oborů. Nejmarkantnější rozmach jejich výzkumu a aplikací můžeme pozorovat ve farmacii a kosmetickém průmyslu.

Při podávání léčiv spočívá hlavní výhoda nanodisperzních systémů v možnosti snížit nespecifickou toxicitu léčiva, dále pak ve zvýšení jeho biologické dostupnosti, zvýšení stability a také modifikaci účinku (prodloužená doba působení, lokalizace účinku). Extrémně malá velikost částic v rozmezí 20 nm až 200 nm umožňuje také zlepšit tkáňovou toleranci, absorpci a transport léčiva a minimalizovat obranné reakce těla. To také následně souvisí se zvýšenou compliance pacienta.

I při podání léčiva v nanodisperzním léčivém přípravku se mohou vyskytnout problémy. Mezi ty nejčastější patří vychytávání částic retikuloendoteliálním systémem při parenterálním podání. Nanoemulze jsou využívány především jako nosiče lipofilních léčiv, která včetně pomocných látek musejí být před uvedením na trh prohlášena za bezpečné (GRAS, generally recognized as safe).

Téma rigorózní práce, metodika řešení a předpokládané cíle obecně vyplynuly ze stále se zvětšujícího zájmu o nanosvět a jeho využití v reálném životě. Na katedře farmaceutické technologie jsou nanodisperzní soustavy formulovány a hodnoceny v rámci výzkumného projektu MŠMT ČR. Některé práce, k nimž patří také tato rigorózní, mají přímý aplikační kontext a jsou řešeny ve spolupráci s průmyslovými podniky, v tomto případě konkrétně s RNDr. Janem Mikyskou, CSc. a firmou Biomedica Praha.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nanočásticové soustavy

#### 2.1.1 Nanočástice

Koloidní lipidické částicové systémy jsou vhodné pro topickou, perorální, nasální, ale třeba i pro parenterální aplikaci. Vzhledem k Brownovu pohybu nesedimentují. Nevýhodou může být to, že někdy působí jako antigeny a mají rychlou clearance po i.v. aplikaci (činností retikuloendoteliálního systému, RES).

#### Základní složky

- nosič (polymer, lipid, anorganická látka, kompozit)
- aktivní látka (léčivá látka)

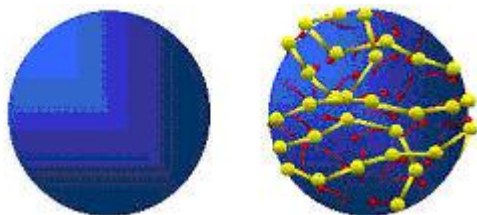
#### Význam částicových systémů

- stabilizace léčivých látek (při skladování, po aplikaci)
- lepší biologická dostupnost

#### Využití v technologii léků

- zabránění inkompatibilitám
- stabilizace
- maskování chutí a vůní
- umožnění manipulace
- modifikace liberace
- cílená distribuce aktivních látek

**Obr.1:** Schéma nanočástice <sup>1</sup>



### 2.1.2 Nanoemulze

Nanoemulze (v mnoha dřívějších publikacích nazývány též mikroemulze) jsou transparentní, termodynamicky stálé, opticky izotropní disperze dvou vzájemně nemísitelných kapalin a povrchově aktivní látky, s velikostí částic ležícím obvykle v rozmezí mezi 20 nm až 200 nm. Na rozdíl od emulze je vesměs nutná přítomnost tenzidu či kotenzidu.

Nanoemulze mají velmi nízké mezipovrchové napětí a velkou mezifázovou plochu (především u nanoemulzí typu o/v). Jejich termodynamická stabilita nabízí výhody oproti nestabilním disperzím. Například v tom, že mohou být připraveny za dodání velmi malého množství energie (což u emulzí a suspenzí není možné) a také mají lepší stabilitu, delší životnost.<sup>2</sup>

Kapénky vnitřní fáze jsou tak malé, že fyzikální vlastnosti dispergovaného oleje/vody nejsou rozlišitelné od vlastností odpovídající mezifáze. Někdy se pro nanoemulze užívá též termín „roztoky zbotnalých micel“.

#### Nejčastější typy mikroemulzí

- **v/o** (voda v oleji)
- **o/v** (olej ve vodě)

#### Komponenty u nanoemulzí

- kapalná hydrofilní fáze (voda)
- kapalná hydrofobní fáze (triacylglyceroly, tekutý parafín, alifatické uhlovodíky, pevné vosky s vyšším hydroxylovým číslem)
- tenzidy (anionické – mýdla vyšších mastných kyselin, kationické – quaty, amfolytické – lecitin, neionogenní – estery sorbitanu)
- kotenzidy (alifatické alkoholy – butanol, oktanol)

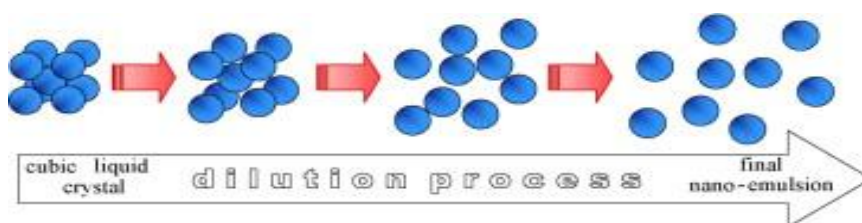
#### Nejčastější nanoemulzní lékové formy

- kožní
- perorální
- parenterální

### Farmaceutické využití

- solubilizace nerozpustného léčiva ve vodě
- tvorba tekutých membránových přenašečů
- stabilizace léčivých látek
- biodostupnost

**Obr. 2:** Proces vzniku nanoemulze z emulze<sup>8</sup>

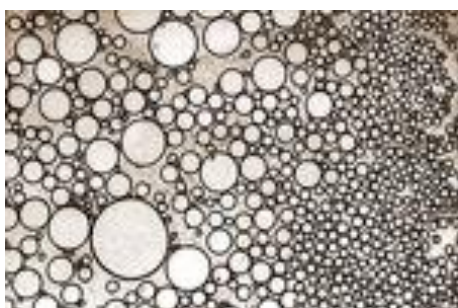


**Tab. 1:** Hlavní rozdíly emulze vs mikroemulze (nanoemulze)

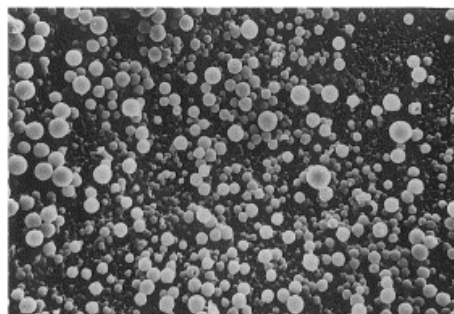
EMULZE	MIKROEMULZE (NANOEMULZE)
1 $\mu\text{m}$ až 10 $\mu\text{m}$	< 1 $\mu\text{m}$ (20 nm – 200 nm)
vysoké mezifázové napětí	nízké mezifázové napětí
nutnost dodání mechanické práce	schopnost spontánního vzniku
fyzikální nestabilita	fyzikální stabilita

**Obr. 3:** a) emulze<sup>3</sup> b) mikroemulze (nanoemulze)<sup>4</sup>

a)



b)





### 2.1.3 Perorální podání léčiv

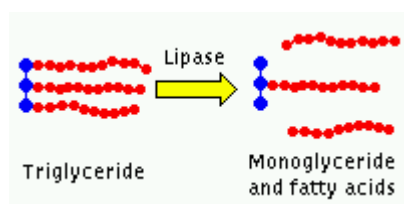
Polymerní nanočástice jsou studovány jako nosiče léčiv více než 20 let. Rozdílné metody a široká škála aktivních substancí a modelů léčiv je studována v oblasti intravenózního, topického, perorálního či očního podání.<sup>5</sup> Nanoemulze jsou široce užívány ve farmacii i v kosmetice a hrají také důležitou roli jako vzor pro syntézu polymerních disperzí a tuhých nanočástic pro jejich dobře nastavitelnou velikost, termodynamickou stabilitu, solubilizační schopnosti, prodloužené době působení atd.<sup>6</sup> Systémy obsahující částice v nanometrových velikostech představují enormní plochu, která je činí vhodnými pro různé farmaceutické aplikace.

Hlavní výhoda perorálního podání nanosystémů spočívá ve snížení toxicity léčiva a zvyšování jeho biologické dostupnosti a stability (především hormony, peptidy a proteiny) v gastrointestinálním traktu.<sup>5</sup>

Extrémně malá velikost částic u nanoemulzí garantuje zlepšenou tkáňovou toleranci, absorpci, transport a minimální obranné reakce těla. Nanoemulze jsou využívány především jako nosiče lipofilních léčiv.<sup>4</sup>

Enzymatické štěpení lipidů je podmínkou pro jejich normální absorpci. Pro optimální působení enzymů je nezbytná mechanická emulgace tuků (především vlivem motility distální části žaludku), protože kapičky tuků v emulzi (1  $\mu\text{m}$  až 2  $\mu\text{m}$ ) nabízejí lipázám velkou povrchovou plochu ke štěpení. Na trávení tuků se tedy podílejí lipázy, fosfolipáza A<sub>2</sub> a nespecifická karboxyesteráza.<sup>7</sup>

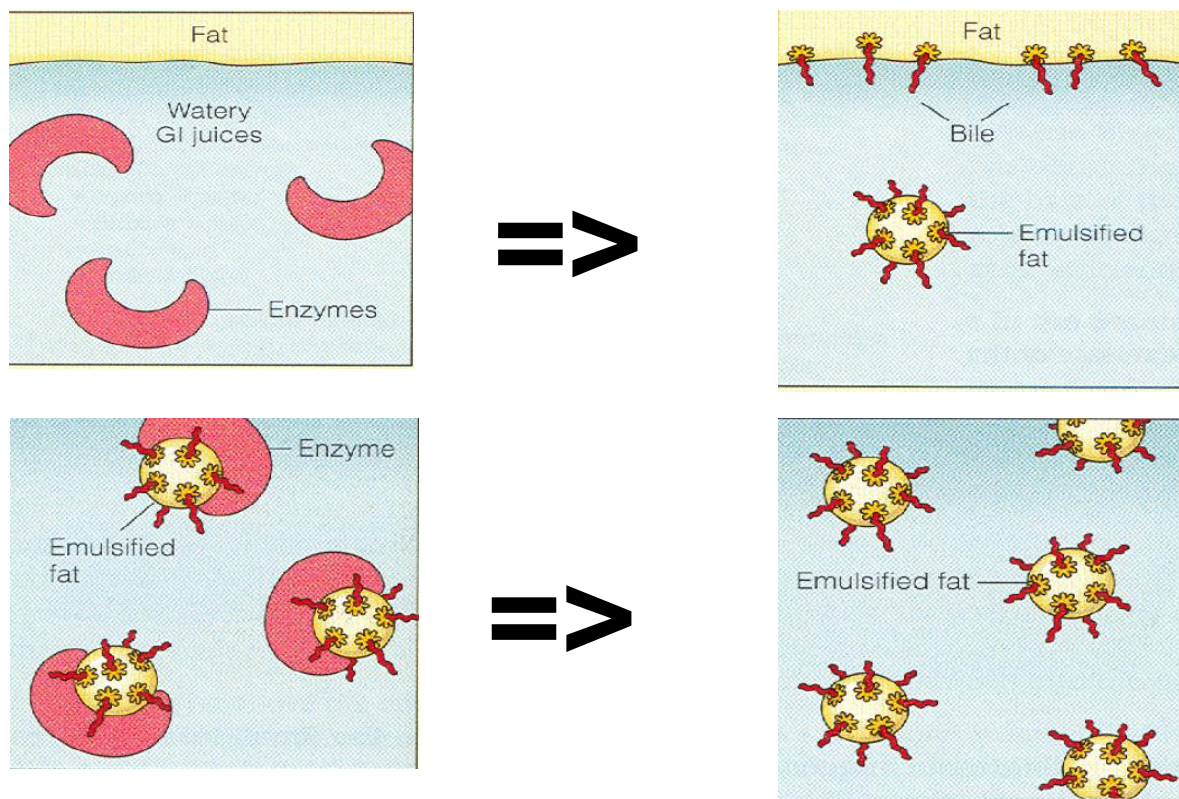
**Obr. 4:** Rozklad triglyceridů pomocí lipázy na monoglyceridy a mastné kyseliny<sup>8</sup>



V tenkém střevě se za spolupůsobení solí žlučových kyselin spontánně tvoří z monoglyceridů, mastných kyselin s dlouhým řetězcem a jiných lipidů micely. Micely díky své velikosti, pouze 20 nm až 50 nm, dovolují ještě těsnější kontakt lipofilních

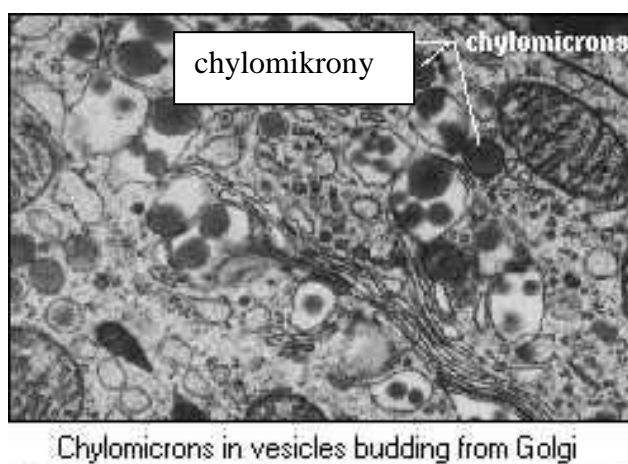
štěpných produktů se stěvní stěnou, a jsou proto nezbytnou podmínkou pro normální vstřebávání tuků.<sup>7</sup>

**Obr. 5:** Emulgace tuků<sup>9</sup>



Transportní formou triglyceridů ze střeva do periferie jsou pak chylomikrony.<sup>7</sup>

**Obr. 6:** Mikroskopický obraz chylomikronů<sup>8</sup>



Jedním z hlavních cílů nanoterapie je směřovat molekuly léčiva přímo k poškozeným tkáním. Pokud jsou přesně definovány parametry, částice podané v parenterální formě mohou být přesně zacíleny do požadovaného místa, kde má dojít k uvolnění léčiva. Nicméně i v této formě podání léčiv se vyskytují problémy, které znepokojují nanotechnology. Jsou jimi nízká fyzikálně-chemická stabilita a rychlé vychytávání částic v retikuloendoteliálním systému (játra, slezina, kostní dřeň). V parenterální formě se podávají také subkutáně pro depotní účinek.<sup>4</sup>

Parenterální podání nanosoustav s léčivy představuje značně specifickou problematiku, kterou se vzhledem k jejímu rozsahu by v rámci svého rozsahu vydala na samostatnou rigorózní práci, a proto se jí nebudu v mé práci blíže zabývat.

Perorální lékové formy s řízeným uvolňováním tedy zůstávají jako atraktivní a široce rozšířená metoda terapeutického podání látek do systémové cirkulace, a to včetně léčiv obsahujících proteiny. Přitom je v principu bezbolestná, není riziková z hlediska infekce jako parenterálním podání, a umožňuje zvýšenou compliance pacienta.

Při neinvazivním podání léčiva ve formě proteinů existují dva hlavní problémy - špatná biologická dostupnost a značná presystémová eliminace. Jde především o vliv dvou hlavních příčin - malého průniku způsobeného jejich velkým rozměrem, a hydrofilitou proteinů, a také rozsáhlou degradací v prostředí gastrointestinálního traktu.

Biochemické bariéry, složené z exo- a endopeptidáz, způsobují rozložení proteinů na aminokyseliny, a proto je absorpce proteinů při perorálním podání velmi obtížná. Také fyzikální bariéry představují pro proteiny značnou překážku.<sup>10</sup> Aby docházelo k zlepšenému intraduodenálnímu vstřebávání ve vodě rozpustných peptidů, byly připraveny nanoemulze.

V různých studiích jsou hydrofilní léčiva emulgována do vodné fáze – jedná se o nanoemulze typu v/o nebo mikroemulze o/v. Tyto studie demonstrovaly zvýšenou biologickou dostupnost hydrofilních makromolekul po perorálním podání, ale pouze jen do určité míry. Např. biologická dostupnost insulinu po perorálním podání ve formě nanoemulze v/o je 0,2%. Je zde ještě řada dalších nevýhod, které jsou spojeny s těmito systémy, pokud jsou proteiny emulgovány ve vodné fázi. U mikroemulzí a nanoemulzí o/v se proteiny ve vodném prostředí mohou lehce rozložit poté, co je

mikro/nanoemulze zředěna gastrointestinální tekutinou. Pro mikro/nanoemulze v/o může potom in vivo dojít k inverzi fází.

Proto byla nutná příprava nanoemulzí typu o/v, kde byly proteiny soustředěny ve fázi olejové. Je dobře známo, že rozpustnost hydrofilních proteinů v lipidech je téměř nulová, což představovalo bariéru v zavádění proteinů do olejové fáze. Aby byl tento problém překonán, musela být použita speciální disperzní technika. Protein byl prvně dispergován na molekulové úrovni s amfifilním excipientem, jakým jsou fosfolipidy, a poté došlo k rozpuštění v olejové fázi. Vysvětlení tohoto postupu spočívá v tom, že došlo k vytvoření micelární amfifilní struktury, a proto mohl být protein rozpuštěn i v oleji.<sup>11</sup> Pro zjištění bezpečnosti, nedráždivosti a minimální toxicity, jsou používány takové nanoemulzní soustavy, které jsou prohlášeny za bezpečné (GRAS).<sup>12</sup>

#### *2.1.4 Topické podání léčiv*

Při topické aplikaci dochází k velmi úzkému kontaktu nanoemulzí s povrchem pokožky. Částičky o malé velikosti zajišťují užší kontakt se stratum corneum. Na rozdíl od nanosfér a nanokapsulí neproniká u nanoemulzí léčivo do stratum corneum ale až do dermis, i když nakonec jeho průnik není tak hluboký jako např. u nanokapsulí.<sup>13</sup> Toto vše značí závislost nejen na typu nanonosiče ale také na typu polymeru, který hraje důležitou roli v rámci kinetiky uvolňování léčiva.<sup>14</sup> (Nanoemulze připravená bez polymeru se rovněž nazývá submikrometrická emulze.<sup>5</sup>). Kromě toho je ale transport ovlivňován ještě dalšími faktory.

Např. nanoemulze v/o byla testována pro její snadnější transport vlasovou pokožkou. Rozsah a rychlost transportu léčivé látky (zde inulinu), která byla zabudována do nanoemulze v/o, byl značně závislý na hydrofilně-lipofilní bilanci surfaktantu. Nanoemulze, u kterých byla užita směs s nižším hydrofilně-lipofilní bilanci, měly rychlejší a větší rozsah transportu. Dále se také zjistilo, že transport zprostředkovaný nanoemulzemi je závislý na molekulové velikosti hydrofilní přísady a povaze vodné fáze.<sup>12</sup>

Při lokální léčbě kožních zranění nebyl dosud splněn požadavek vysoké absorpce léčiva. Nedávný výzkum ovšem prokázal, že velmi dobré a zacílené vstřebávání může být uskutečněno právě pomocí nanoemulzí.

Kromě toho lokální léčba kožních defektů pomocí nanoemulzí redukuje vedlejší nežádoucí účinky, které se vyskytují při celkovém podávání léčiv. Zvyšuje se biologická dostupnost ale také compliance pacientů, která hraje v léčebném procesu stěžejní roli. Přesto i lokální podávání léčiv vede k řadě vedlejších účinků, jako jsou atrofie kůže či lokální podráždění, kterým se v budoucnu nejspíše nevyhneme, a to ani pomocí „zázračných“ nanoemulzí.<sup>15</sup>

## 2.2 Zeta potenciál a velikost částic

Zetasizer Nanosizer je přístroj (**obr. 7**), který umožňuje měřit tři nejdůležitější parametry částic a molekul v kapalném prostředí. Jedná se o velikost částic, zeta potenciál a molekulovou hmotnost.<sup>16</sup>

**Obr. 7:** Malvern zetasizer Nano series s kyvetami pro měření zeta potenciálu



Parametry měření

- **velikost částic** – měření částic 0,6 nm až 6  $\mu\text{m}$
- **zeta potenciál** – měření zeta potenciálu ve vodných i nevodných disperzích
- **molekulová hmotnost** – speciální dioda a tenká detekční optika poskytuje dostatečnou citlivost a stabilitu k měření absolutní molekulové hmotnosti

### *2.2.1 Princip měření zeta potenciálu*

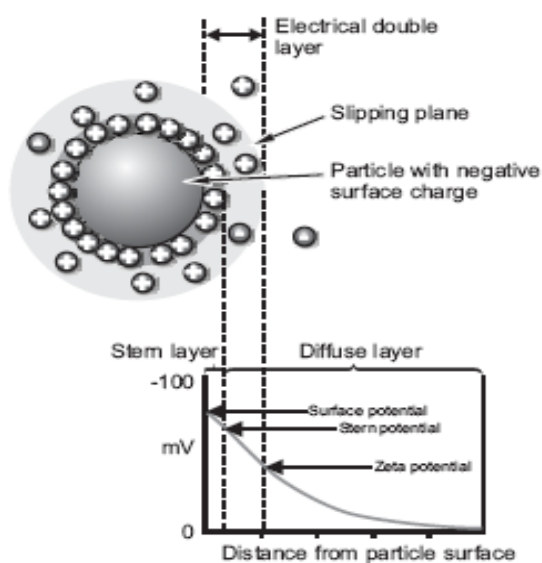
Pro pochopení zeta potenciálu je v první řadě nutné vysvětlit zeta potenciálovou teorii a dále fyzikální děje probíhající při měření.

#### 2.2.1.1 Teorie zeta potenciálu

Zeta potenciál hraje velmi důležitou roli v rámci předpovědi chování částic materiálu. Souvisí s nábojem na povrchu částic, a tak ovlivňuje široký rozsah vlastností koloidních částic, jako např. jejich stabilitu, která zde pro nás představuje stěžejní parametr.<sup>17</sup>

Nabitá síť na povrchu částic způsobuje určité rozložení iontů v okolním meziprostoru, zvyšuje koncentraci opačně nabitých iontů. Nazývá se elektrická dvojrstva a existuje okolo každé částice. Tekutá vrstva okolo částic existuje ve dvou částech, vnitřní vrstva, nazývaná Sternova vrstva, kde jsou ionty mezi sebou pevně vázány, a vnější (difúzní) vrstva, kde jsou ionty připojeny méně pevně. (**Obr. 8**)<sup>18</sup> V difúzní vrstvě je pomyslná hranice iontů a rozpouštědla, která odděluje stálé médium a pohybující se částice. Když se částice pohybuje, ionty pod hranicí se pohybují spolu s ní a nad hranicí se nepohybují. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smykového rozhraní **surface of hydrodynamic shear**, potenciál nacházející se mezi pohybující se částicí a okolím se nazývá zeta potenciál - elektromobilitní potenciál, a měří se zde.<sup>17</sup>

**Obr. 8:** Zeta potenciál



### 2.2.1.2 Elektroforéza

Zetasizer měří zeta potenciál pomocí elektroforetické pohyblivosti a poté k výpočtu používá Henryho rovnici.

Pokud v elektrolytu použijeme elektrické pole, jsou nabitě částice suspendované v elektrolytu přitahovány směrem k elektrodám opačného náboje. Naopak viskózní síly brzdí pohyb částic k elektrodám. Jestliže je dosaženo rovnováhy mezi těmito dvěma opačnými silami, tak se částice pohybují se stálou rychlostí.<sup>19</sup>

Rychlost částic závisí na následujících faktorech:

- intenzita elektrického pole nebo rozložení napětí
- dielektrická konstanta
- viskozita media
- zeta potenciál

Rychlost částic v elektrickém poli je obvykle popisována jako elektroforetická pohyblivost. Na základě těchto informací můžeme zeta potenciál částic aplikovat do Henryho rovnice:<sup>19</sup>

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(Ka)}{3 \eta}$$

(rov. 1)

ve které je

**Z** .....zeta potenciál

**U<sub>E</sub>** ..... elektroforetická pohyblivost

**ε<sub>1</sub>** ..... dielektrická konstanta

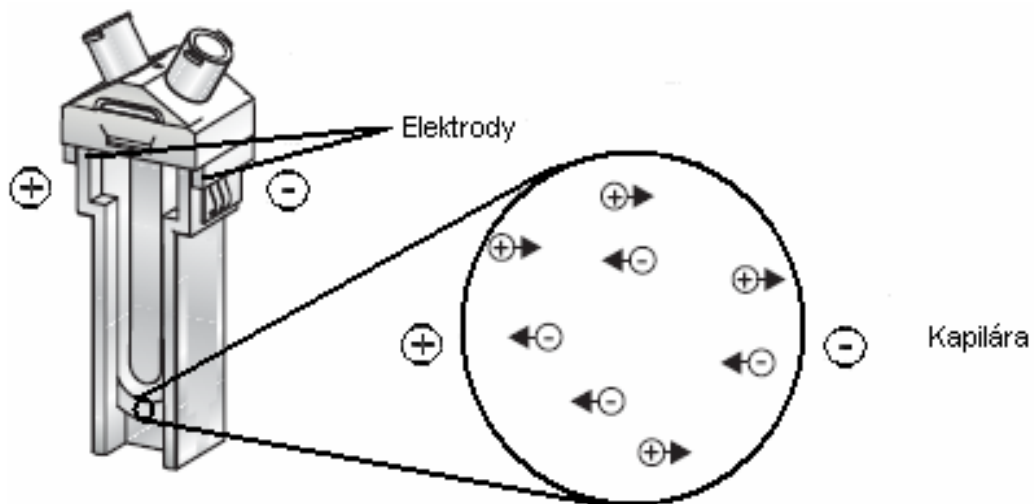
**η<sub>1</sub>** ..... viskozita

**f(Ka)** ..... Henryho funkce

### 2.2.1.3 Měření elektroforetické pohyblivosti

Základ klasické mikroeletroforézy je kyveta s elektrodami na opačných stranách kapiláry. (**Obr. 9**)<sup>18</sup> Částice se pohybují směrem k elektrodám opačného náboje, jejich rychlost je měřena a vyjádřena v jednotce silového pole jako jejich pohyblivost.

**Obr. 9:** Kyveta s elektrodami



Metoda používaná v měření rychlosti v zetasizeru Malvern je laserový Dopplerův rychloměr.<sup>18</sup>



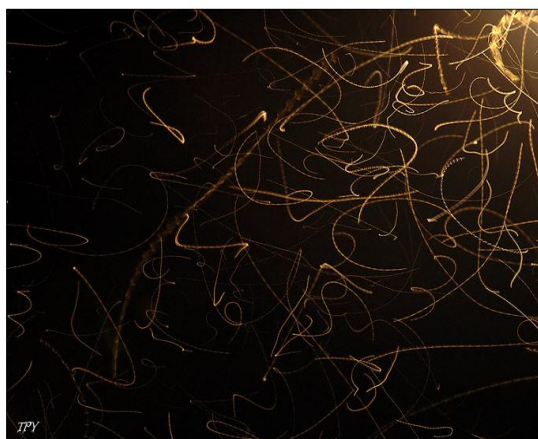
## 2.2.2 Principy měření velikosti částic

### 2.2.2.1 Metoda dynamického rozptylu světla (dynamic light scattering, DLS)

Částice emulgované v kapalině nejsou nikdy stacionární. Pohybují se Brownovým pohybem, který je vyjádřením pohybu částic v důsledku náhodných srážek s molekulami kapaliny. Při dynamickém rozptylu světla dochází k proměňování Brownova pohybu, jehož rychlost závisí na velikosti částic.

Princip je takový, že laserový paprsek prochází disperzí částic a záření je rozptýleno všemi směry. Detektor analyzuje na nej dopadající záření. Kolísající intenzita rozptýleného záření se zobrazuje po dopadu na stínítko detektoru jako soustava černobílých skvrn. Bílé skvrny jsou záznamem dopadajícího rozptýleného záření ve stejné fázi a černé skvrny jsou způsobeny vzájemným vykompenzováním fází. (Obr. 4)<sup>20</sup> Detektor zaznamenává rychlost pohybu skvrn na stínítku v čase a pomocí korelační funkce a Stokes-Einsteinovy rovnice se přepočítává rychlost pohybu částic na jejich velikost.

**Obr. 10:** Fotografie zobrazující Brownův pohyb<sup>21</sup>



Hlavní vlastnost Brownova pohybu pro DLS je to, že se malé částice pohybují rychleji a velké částice naopak pomaleji. Vztah mezi velikostí částic a rychlostí Brownova pohybu je definován jako Stokes-Einsteinův zákon. Tak jako jsou částice konstantně v pohybu, jeví se skvrna také jako pohybující. Zetasizer nano systém měří poměr intenzity kolísání a počítá velikost částic.<sup>19</sup>

Stokes-Einsteinův zákon:

$$r = kT / 6 \pi \eta D \quad (\text{rov. 2})$$

v němž

$\eta$  ... viskozita

$k$  ... Boltzmanova konstanta

$T$  ... teplota

$D$  ... difúzní koeficient

### 2.2.3 Stabilita disperzních soustav

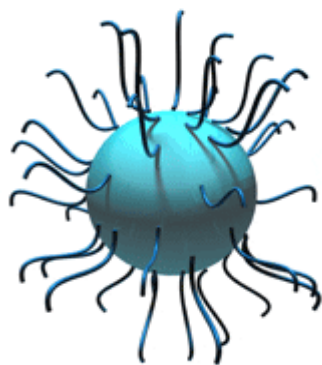
#### 2.2.3.1 DLVO teorie

Základní využití koloidně-elektrolytického fenoménu tedy spočívá v pochopení stability a flokulačních efektů. Nejjednodušší model zabývající se těmito efekty se nazývá DLVO teorie (Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek).<sup>17</sup> Základní myšlenka vyplývá z předpokladu, že pro zachování stability je nutná mírná převaha odpudivých elektrických sil nad silami přitažlivými. U nanodisperzí by měla nastat rovnováha mezi přitažlivými Van der Walsovými silami a odpudivými elektrickými silami, a to vzhledem k Brownovu pohybu. K zachování stability disperze slouží dva základní mechanismy.

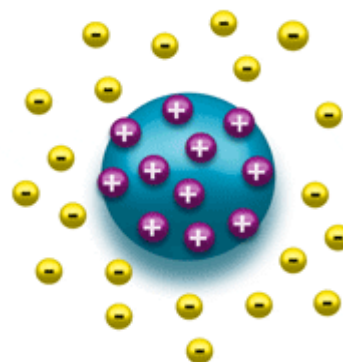
První se nazývá **stérický**, který vyžaduje např. přidání polymeru do systému, který se naadsorbuje na povrch částice a zabraňuje těsnějšímu kontaktu mezi částicemi. Druhý mechanismus se nazývá **elektrostatický**, který vzniká vlivem rozložení náboje v systému. (**Obr. 11**)<sup>22</sup>

Pokud tedy zeta potenciál klesne pod určitou mez, začne docházet ke shlukování vlivem přitažlivých sil (v tomto rozmezí je soustava nejméně stabilní - +30 - -30 mV). Naopak vysoký zeta potenciál vytváří stabilní systém. Bod, při kterém jsou přitažlivé a odpudivé síly v rovnováze se nazývá kritická flokulační koncentrace (CFC). U nanodisperzí ovšem nastává situace zcela opačná. Maximální stabilita leží v rozmezí +30 - -30 mV. Vysvětlení spočívá v neostré hranici mezi fázemi.

**Obr. 11:** Typy stabilizace koloidů <sup>22</sup>



stérická stabilizace

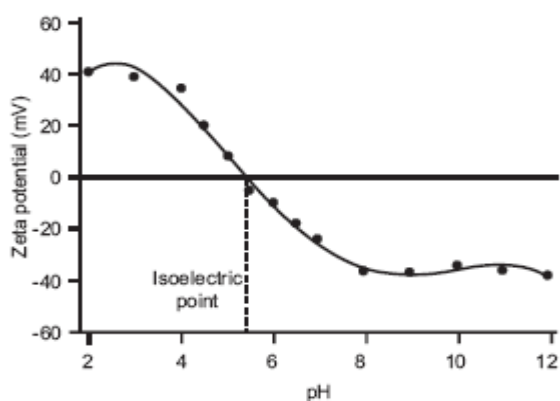


elektrostatická stabilizace

Velice důležitý faktor u hodnot zeta potenciálu je pH. Když si představíme částici v suspenzi s negativním zeta potenciálem, do které přidáme alkálii, částice mají tendenci získat větší negativní náboj. Když přidáme do této suspenze kyselinu, negativní náboj bude neutralizován. Žádné další přidání kyseliny nezapříčiní vzestup pozitivního náboje. Proto zeta potenciál bude pozitivní v nízkém pH a nižší nebo negativní ve vysokém pH.

Hodnota, ve které zeta potenciál je roven nule se nazývá *isoelektrický bod*. V tomto bodě je koloidní systém nejméně stabilní. (**Obr.12**) <sup>18</sup>

**Obr. 12:** Isoelektrický bod



### 2.2.3.2 Výpočet interakční energie podle DLVO

Odpudivá síla mezi kulovitými koloidními částicemi závisí na druhé mocnině potenciálu Sternovy vrstvy a na poměru tloušťky mezery k efektivní tloušťce

dvojvrstvy,  $h/\ell$ . Čím je tento poměr menší, tím více se elektrické dvojvrstvy překrývají a tím silnější je repulzní účinek. Výsledná interakční energie je pak dána součtem odpuzivých elektrostatických sil s přitažlivými silami van der Waalsovými.<sup>23</sup>

$$U = U_{el} + U_{vdW} \quad (\text{rov. 3})$$

$$u = \underbrace{2 \frac{\varepsilon V_S^2}{\ell} \cdot \exp\left(-\frac{h}{\ell}\right)}_{u^{\text{odpuz}} \text{ (elstat.)}} - \underbrace{\frac{A \cdot R}{12 \pi h}}_{u^{\text{přit}} \text{ (vdW)}} \quad (\text{rov. 4})$$

kde

**u** ... výsledná interakční energie

**u<sub>el</sub>** ... odpuzivé elektrostatické síly

**u<sub>vdW</sub>** ... přitažlivé síly van der Waalsovy

**h** ... vzdálenost povrchů přibližujících se částic

**V<sub>S</sub>** ... potenciál Sternovy vrstvy

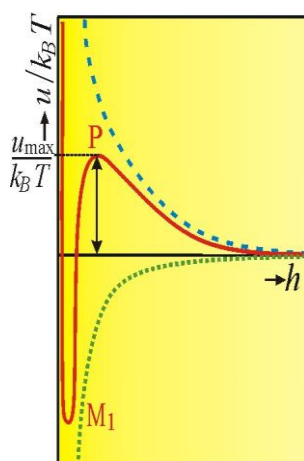
**R** ... poloměr částic

**A** ... Hamakerova konstanta (její hodnota je dána chemickou povahou disperzního prostředí a disperzních částic)

**ε<sub>2</sub>** ... permitivita prostředí

**ℓ** ... efektivní tloušťka elektrické dvojvrstvy<sup>24</sup>

**Obr.13:** Závislost interakční energie na vzdálenosti částic při malých iontových silách (koncentracích elektrolytu v disperzním prostředí) pro dvě kulovité koloidní částice



**a) velmi malá  $h$**  - hluboké minimum  $M_1$ , převládá účinek přitažlivých sil  $\sim A \Rightarrow$  stabilní stav - zkoagulované částice

**b) střední hodnoty  $h$**  - primární maximum  $P$ , výška závisí na tloušťce elektrické dvojvrstvy (tj. hlavně na koncentraci elektrolytu v disperzním prostředí).

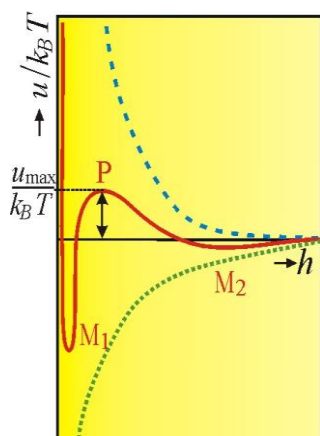
**P** ... energetická bariéra, které dvě částice musí překonat, aby se dostaly do nejstabilnější konfigurace

U koloidních systémů pochází energie potřebná k překonání energetické bariéry z Brownova pohybu částic ( $\frac{3}{2} k_B T$ ).

$h > k_B T$  - agregace téměř neprobíhá a systém může setrvat po prakticky neomezenou dobu v dispergovaném stavu. Takový systém je označován jako *koloidně stabilní*. Z termodynamického hlediska je však v metastabilním stavu, protože není v nejhlubším možném energetickém minimu.

**c) relativně velké  $h$**  - sekundární minimum  $M_2$  - mělké minimum- slabě vázané agregáty (vločky), odolávají Brownovu pohybu, ale rozpadají se při působení vnějších hydrodynamických sil (např. při intenzivním míchání).

**Obr. 14:** Závislost interakční energie na vzdálenosti částic při větších iontových silách



- ✓ *plná čára* - celková interakční energie,
- ✓ *tečkovaná čára* - přitažlivá energie
- ✓ *čárkovaná křivka* - odpudivé energie <sup>23</sup>

## 2.3 Viskozimetrie

Reologické chování látek lze popsat pomocí dvou parametrů - meze toku a viskozity. Viskozita představuje vnitřní tření, které brání pohybu kapaliny. Viskozita se vyjadřuje jako poměr tečného napětí (vzniklého působící vnější silou v rovině plochy) ke gradientu rychlosti deformace, **D**. <sup>25</sup>

### 2.3.1 Měření viskozity

K měření viskozity se běžně používají průtokové, pádové a rotační viskozimetry. <sup>26</sup>

Průtokové viskozimetry jsou založeny na měření tlakové ztráty v kapiláře při laminárním proudění kapaliny kapilárou. Kapilární viskozimetr pracuje na principu Hagen-Poiseuillova zákona, podle kterého platí

$$\eta = \frac{\pi r^4 g}{8 l Q_v} \Delta p \quad (\text{rov. 5})$$

ve kterém

- $\eta$  ... dynamická viskozita
- $r$  ... poloměr kapiláry
- $l$  ... délka kapiláry
- $Q_v$  ... objemový průtok
- $\Delta p$  ... tlakový rozdíl

Za předpokladu konstantního průtoku pak pro kapiláru daných rozměrů platí <sup>27</sup>

$$\eta = k \Delta p \quad (\text{rov. 6})$$

### 2.3.2 Stanovení kinematické a dynamické viskozity

Podstatou zkoušky je stanovení doby průtoku stálého objemu kapaliny kapilárou kalibrovaného viskozimetru Ubbelohdeho viskozimetru při určité hydrostatické výšce kapaliny a při přísně kontrolované a přesně měřené teplotě. Kinematická viskozita se určí ze součinu změřené doby průtoku a konstanty užitého viskozimetru. Za konstantu se dosazuje hodnota vyznačená na viskozimetru výrobcem. <sup>28</sup> Dynamická viskozita se poté vypočte jako součin viskozity kinematické a hustoty dané soustavy.

### 3. CÍL PRÁCE

Cíl rigorózní práce je možno vyjádřit v následujících bodech:

1. změřit velikost částic u jednotlivých typů emulzí na Malvern zetasizeru ZS při teplotě 25°C po 2, 3, 4, 7, 8, 11 a 18 dnech od data přípravy
2. změřit velikost částic u jednotlivých typů emulzí na Malvern zetasizeru ZS při teplotě 37°C (temperace cca 18 hodin)
3. změřit zeta potenciál u jednotlivých typů emulzí na Malvern zetasizeru ZS při teplotě 25°C a 37°C (temperace cca 18 hodin)
4. změřit zeta potenciál u jednotlivých typů emulzí na Malvern zetasizeru ZS při teplotě 25°C s pufrů o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2
5. změřit zeta potenciál u kontrolních vzorků (emulze+voda) na Malvern zetasizeru ZS při teplotě 25°C
6. změřit přesnou viskozitu jednotlivých typů emulzí pomocí vhodného kapilárního viskozimetru při teplotě 25°C
7. výsledky dosažené v rámci experimentálního schématu vyhodnotit z hlediska měnící se disperzity a stability emulzí a vyvodit z nich zobecněné závěry

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité přístroje a chemikálie

#### 4.1.1 Přístroje

Analytické digitální váhy, SARTORIUS 2004 MP (max. 166 g, d = 0,01 mg)

Digitální váhy, KERN 440 – 45 N (max. 1000 g, d = 0,1 g)

pH metr GRYF 209 L

Viskozimetr Ubbelohde (Kavalier, Sázava)

Míchadlo (Fisher Scientific)

Lednice (Frigera NS 600.3 VV)

Stopky laboratorní

Termostat GRANT JB Series - Maneko

Horkovzdušná sušárna HS 61 A

Malvern zetasizer Nano series (Malvern Instruments, UK)

PC s programem Dispersion Technology Software 5.10 (Malvern Instruments, UK)

#### 4.1.2 Chemikálie

Čištěná voda - Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové

Ethanolum 96 % (V/V) – Dr. Kulich Pharma Hradec Králové

Acidum citricum monohydricum - Dr. Kulich Pharma Hradec Králové

Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus - Dr. Kulich Pharma Hradec Králové

Nanoemulze – Biomedica Praha

### 4.2 Příprava testovacích médií

Testované nanoemulze, které byly předem připraveny v podniku Biomedica, se nalily do kyvet a ve stanovených časových intervalech (po 2, 3, 4, 7, 8, 11 a 18 dnech od data přípravy) se změřila požadovaná velikost částic při 25°C. 8. den po přípravě nanoemulzí se též způsobem proměřila ještě velikost částic při 37°C (temperance 18 hodin). V následujících dnech proběhlo změření zeta potenciálu při



teplotě 25°C, 37°C (temperance 18 hodin) a při 25°C za přidání pufrů o třech různých velikostech pH – 3,5, 6,5 a 7,2.

- a) pH 3,5** - fosfátcitrátový pufr byl připraven smísením 0,1537g kyseliny citronové ( $c=15,37$  g/l), 0,2499 g hydrogenfosforečnanu sodného počítaného jako dodekahydrát ( $c=24,99$  g/l) a destilované vody, jelikož byl použit 0,1M roztok o objemu 100 ml.
- b) pH 6,5** - fosfátcitrátový pufr byl připraven smísením 0,0317g kyseliny citronové ( $c=3,17$  g/l), 0,2898 g hydrogenfosforečnanu sodného počítaného jako dodekahydrát ( $c=28,98$  g/l) a destilované vody, jelikož byl použit 0,1M roztok o objemu 100 ml.
- c) pH 7,2** - fosfátcitrátový pufr byl připraven smísením 0,0128g kyseliny citronové ( $c=1,28$  g/l), 0,2958 g hydrogenfosforečnanu sodného počítaného jako dodekahydrát ( $c=29,58$  g/l) a destilované vody, jelikož byl použit 0,1M roztok o objemu 100 ml.

Po důkladném rozpuštění byla hodnota pH zkontrolována digitálním pH metrem a eventuální odchylky byly upraveny malým množstvím kyseliny citrónové nebo hydrogenfosforečnanu sodného na požadovanou hodnotu. Následovalo zředění 1:100. Poté bylo odebráno 0,5 ml pufru (3,5; 6,5; 7,2) a 5 ml emulze (07; 08; 11; 12; 21; 22; 25; 26; 27; 28) a po promísení bylo toto množství vpraveno do kyvety sloužící k měření zeta potenciálu. Navíc ještě byly připraveny kontrolní vzorky, které obsahovaly 0,5 ml vody a 5 ml emulze.

#### 4.3 Měření viskozity

Ze sady viskozimetrů byl vybrán takový, u něhož doba průtoku kapaliny měřeným úsekem trvala cca 120 sekund. Termostat byl předem vytemperován na 25°C. Před měřením byl viskozimetr vypláchnut ethanolem a vysušen v horkovzdušné sušárně. Poté následovalo plnění trubice 1 viskozimetru vzorkem tak, aby hladina nanoemulze byla těsně nad spodní ryskou. Viskozimetr byl ponořen do termostatu a ponechán cca 10 minut, aby došlo k vytemperování na 25°C. Poté

byla na konec trubice 2 nasazena hadička, trubice 3 byla ucpána prstem a vzorek, bez vzduchových bublin, byl nasán nad horní rysku trubice 2. Pak byly otvory trubic 2 a 3 uvolněny, měřená kapalina se nechala volně stékat a laboratorními stopkami byla měřena doba průtoku menisku nanoemulze mezi horní a spodní ryskou trubice 2. (obr. č. 16) Toto měření se u každé nanoemulze opakovalo 3x. Pokud byl rozptyl naměřených hodnot větší než 5 %, pokračovalo se v dalším měření, dokud nebyla dosažena požadovaná přesnost.

**Obr. 16:** Průtokový viskozimetr /27/

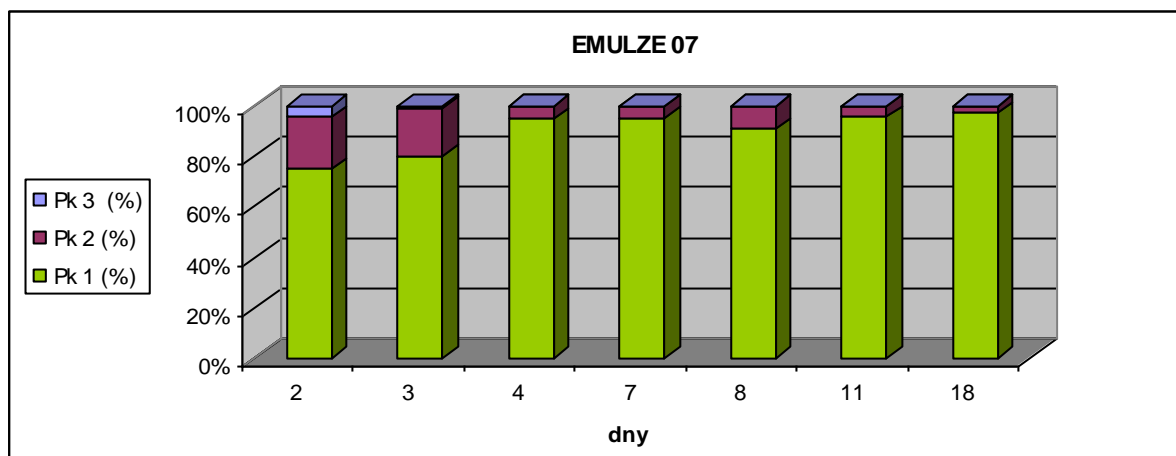


## 5. VÝSLEDKY – TABULKY A GRAFY

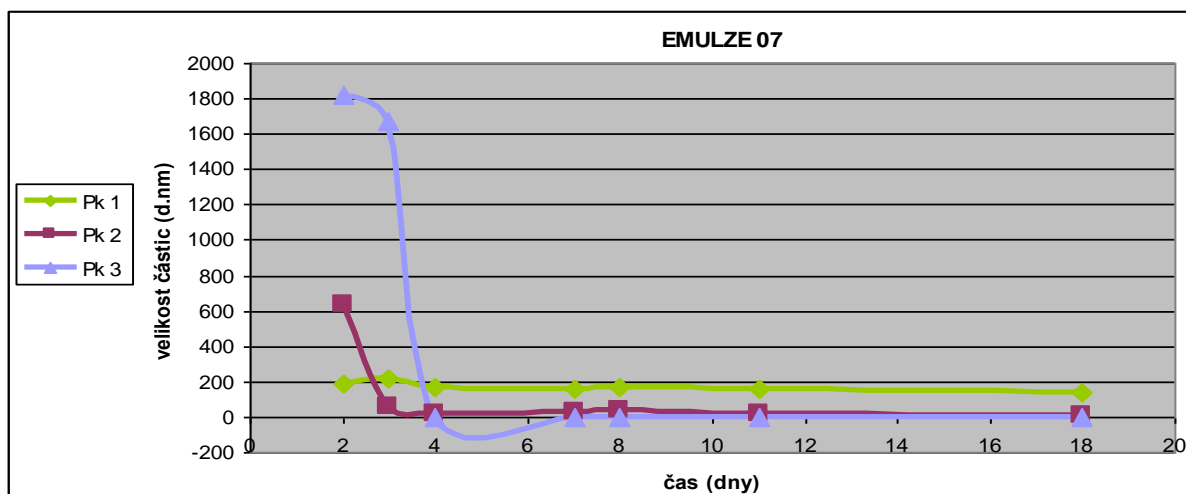
Tabulka 1: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 07

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	189	641	1824	75	20	4
3	215	63	1676	80	19	1
4	168	20	0	95	5	0
7	161	25	0	95	5	0
8	170,7	41	0	91	9	0
11	160	17	0	96	4	0
18	134	11	0	97	3	0

Graf 1: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 07



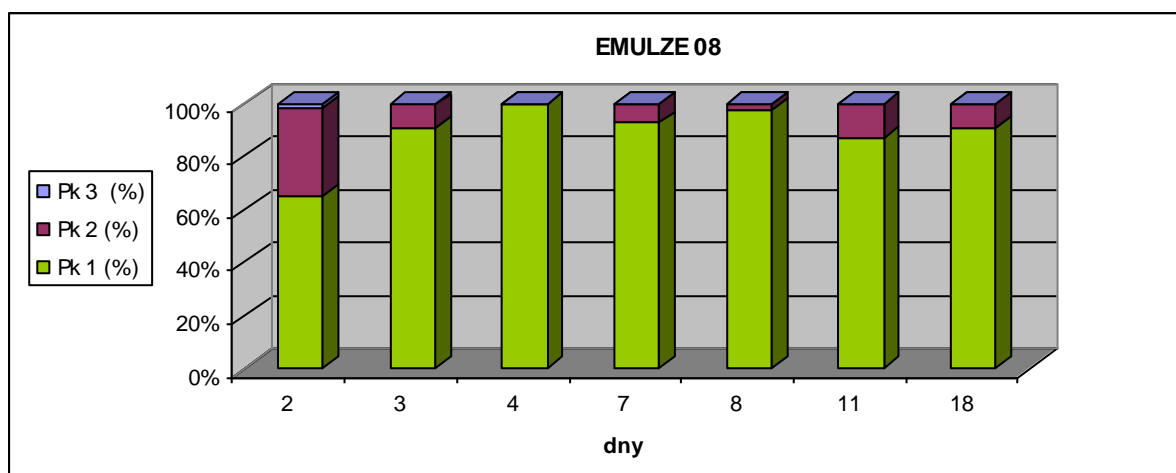
Graf 2: Časový průběh změn velikosti částic emulze 07



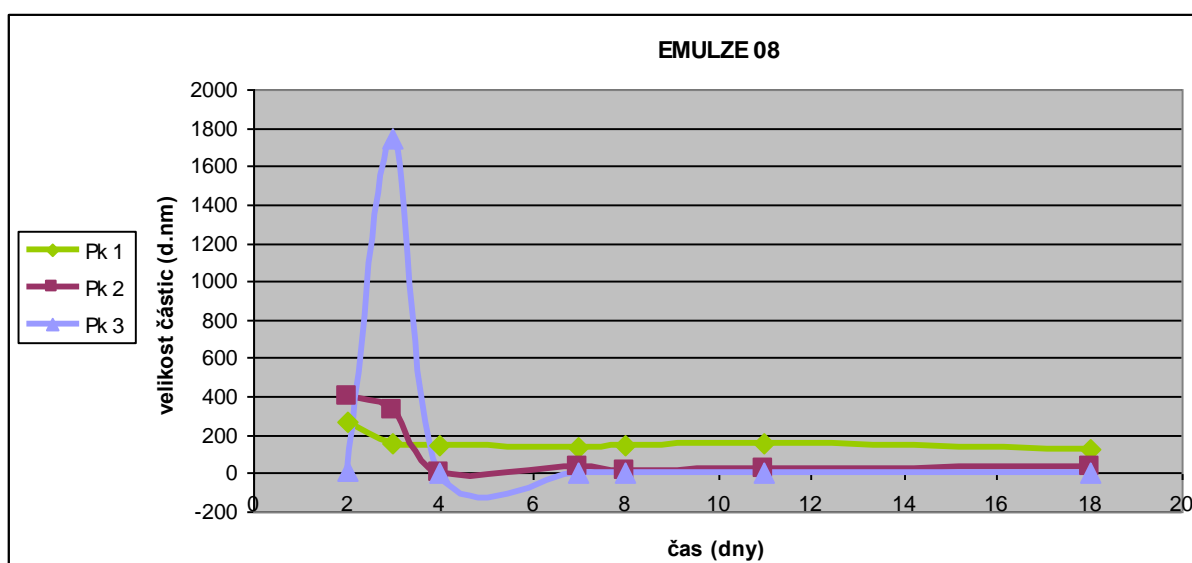
Tabulka 2: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 08

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	267	398	12	65	33	2
3	155	332	1746	91	9	1
4	148	0	0	100	0	0
7	141	32	0	93	7	0
8	146	10	0	97	3	0
11	154	26	0	87	13	0
18	126	37	0	91	10	0

Graf 3: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 08



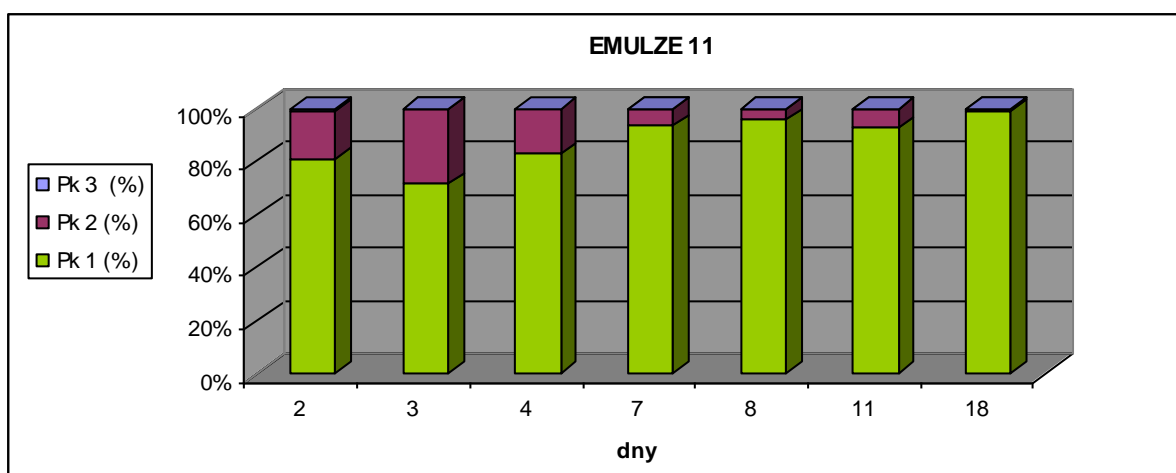
Graf 4: Časový průběh změn velikosti částic emulze 08



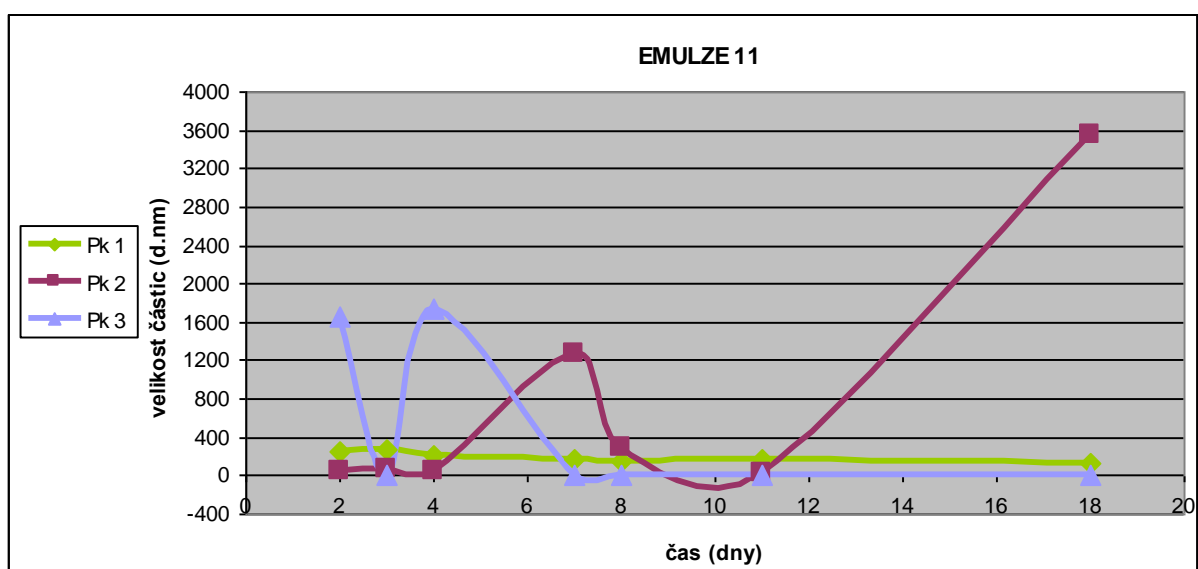
Tabulka 3: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 11

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	255	56	1663	81	18	1
3	268	72	0	72	29	0
4	201	51	1746	83	17	0
7	160	1263	0	93	7	0
8	146	295	0	96	4	0
11	166	29	0	93	7	0
18	127	3548	0	99	1	0

Graf 5: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 11



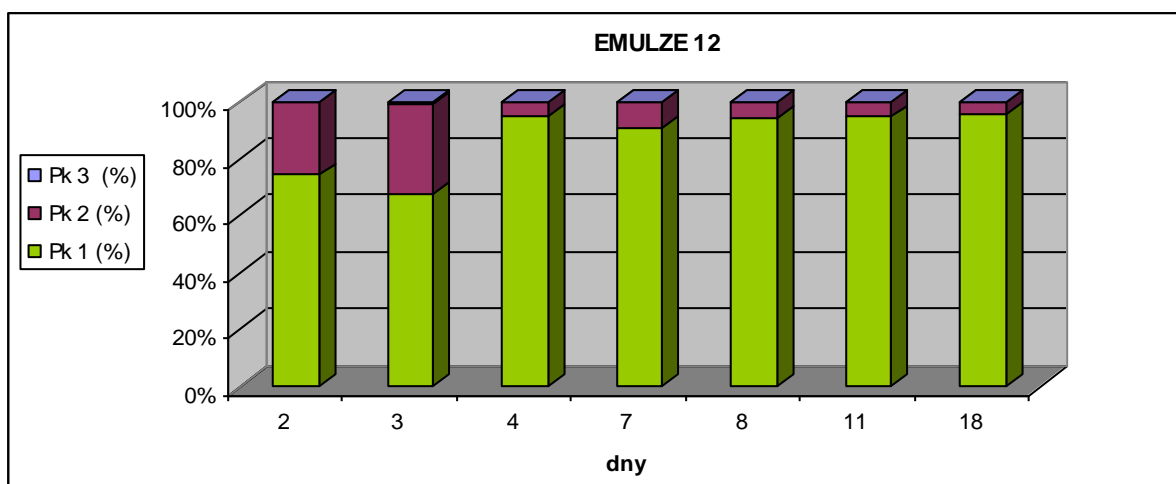
Graf 6: Časový průběh změn velikosti částic emulze 11



Tabulka 4: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 12

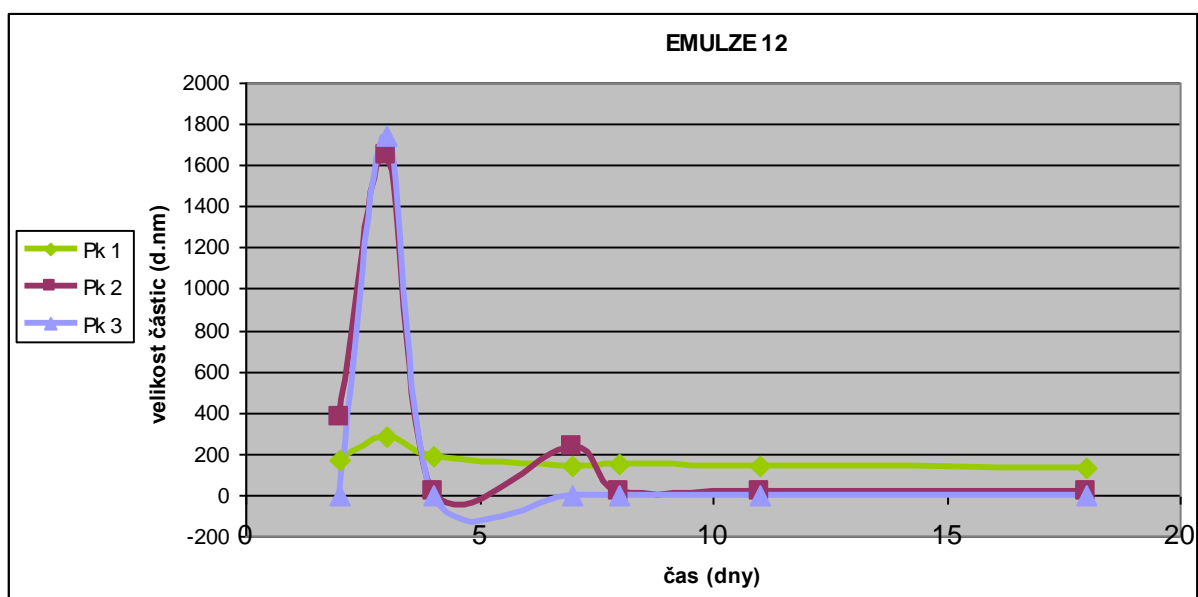
Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	172	378	0	74	26	0
3	287	1653	1746	67	32	1
4	189	19	0	95	5	0
7	137	237	0	91	9	0
8	149	22	0	94	6	0
11	140	22	0	95	5	0
18	127	22	0	96	4	0

Graf 7: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 12



§

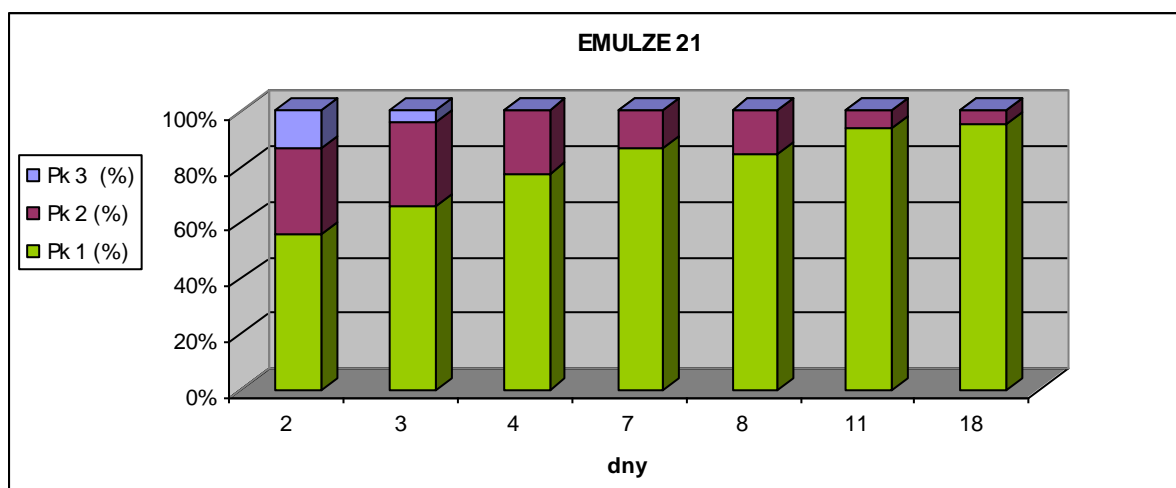
Graf 8: Časový průběh změn velikosti částic emulze 12



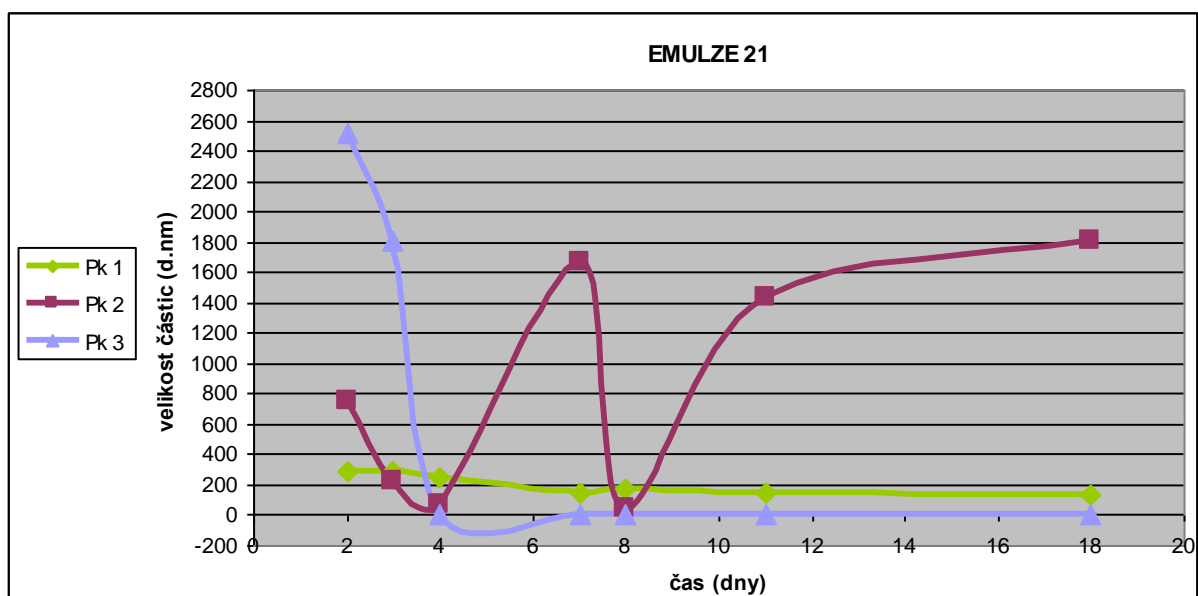
Tabulka 5: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 21

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	288	747	2517	56	30	13
3	289	219	1806	66	31	4
4	257	66	0	77	23	0
7	143	1672	0	87	13	0
8	174	41	0	85	15	0
11	147	1439	0	94	6	0
18	132	1808	0	95	5	0

Graf 9: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 21



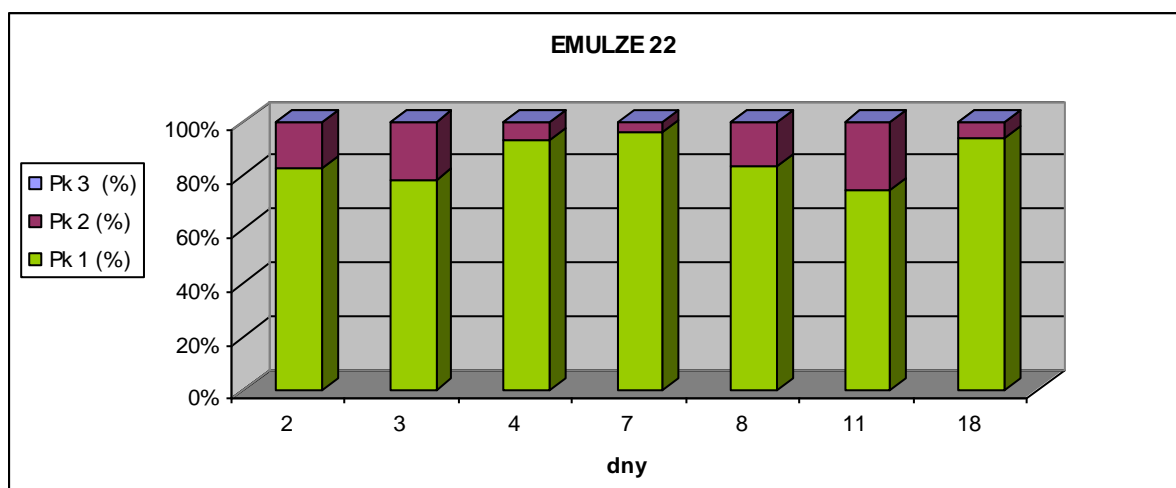
Graf 10: Časový průběh změn velikosti částic emulze 21



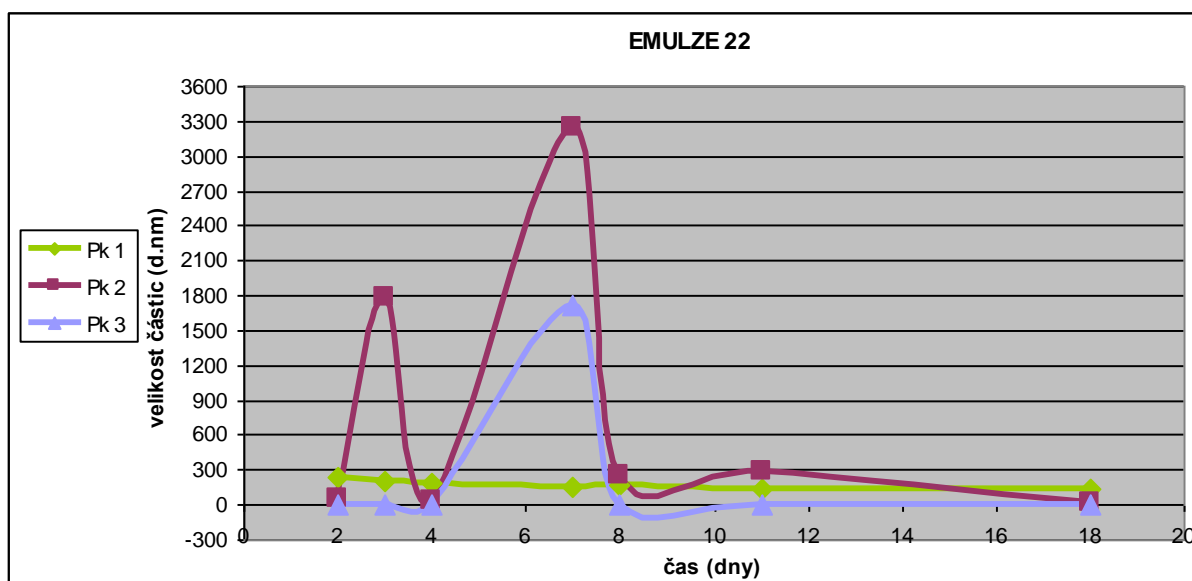
Tabulka 6: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 22

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	235	56	0	83	17	0
3	200	1790	0	78	22	0
4	181	28	0	93	7	0
7	155	3252	1714	96	3	0
8	168	256	0	84	16	0
11	143	293	0	75	25	0
18	139	21	0	94	6	0

Graf 11: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 22



Graf 12: Časový průběh změn velikosti částic emulze 22

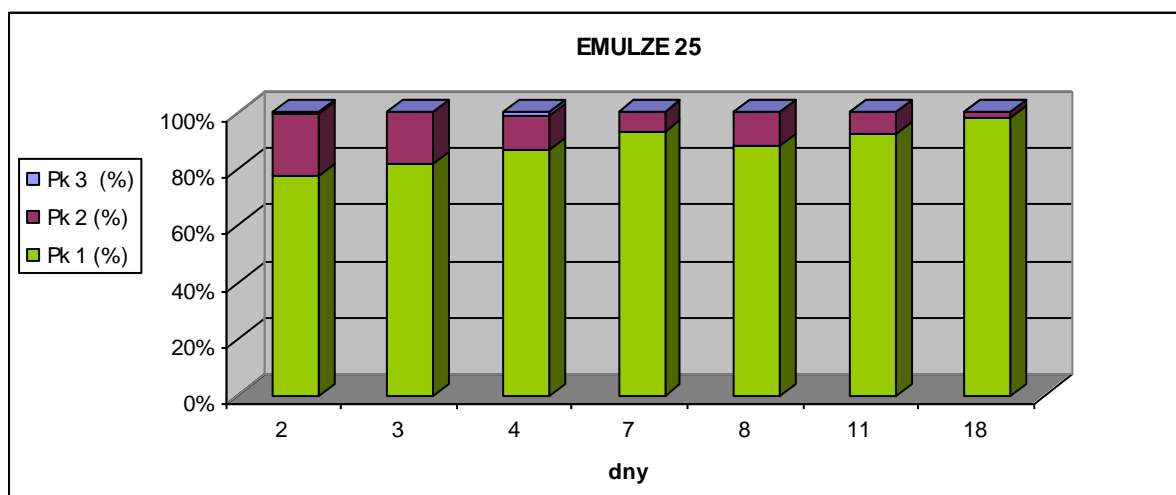




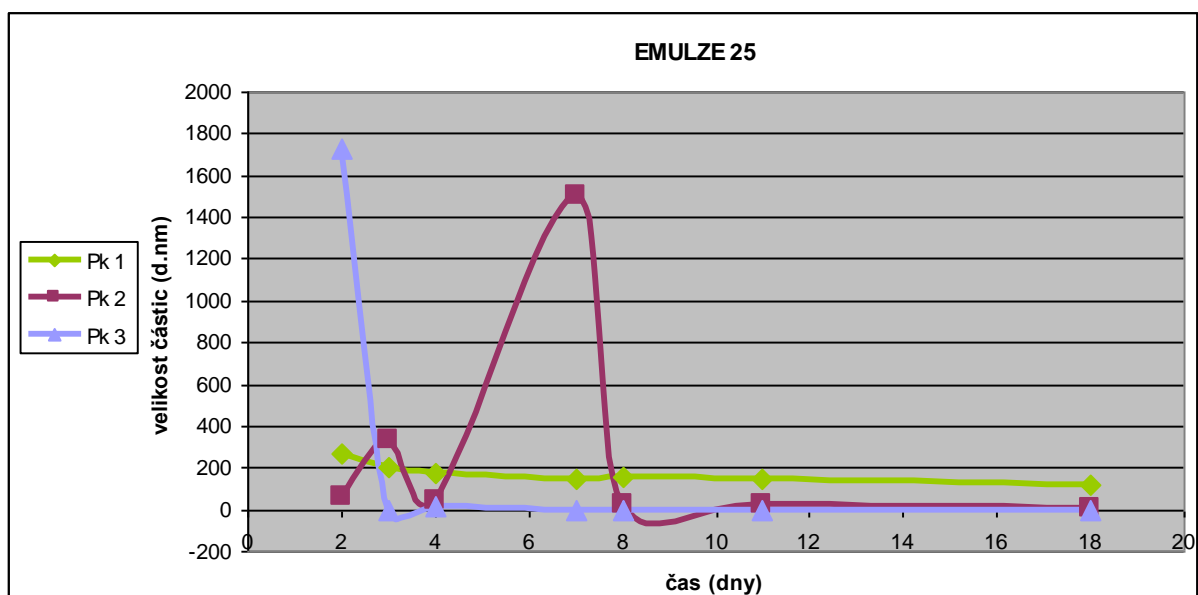
Tabulka 7: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 25

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	269	64	1727	78	22	1
3	202	331	0	82	18	0
4	173	41	12	87	12	1
7	147	1501	0	94	6	0
8	160	27	0	89	11	0
11	147	25	0	93	7	0
18	122	8	0	98	2	0

Graf 13: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 25



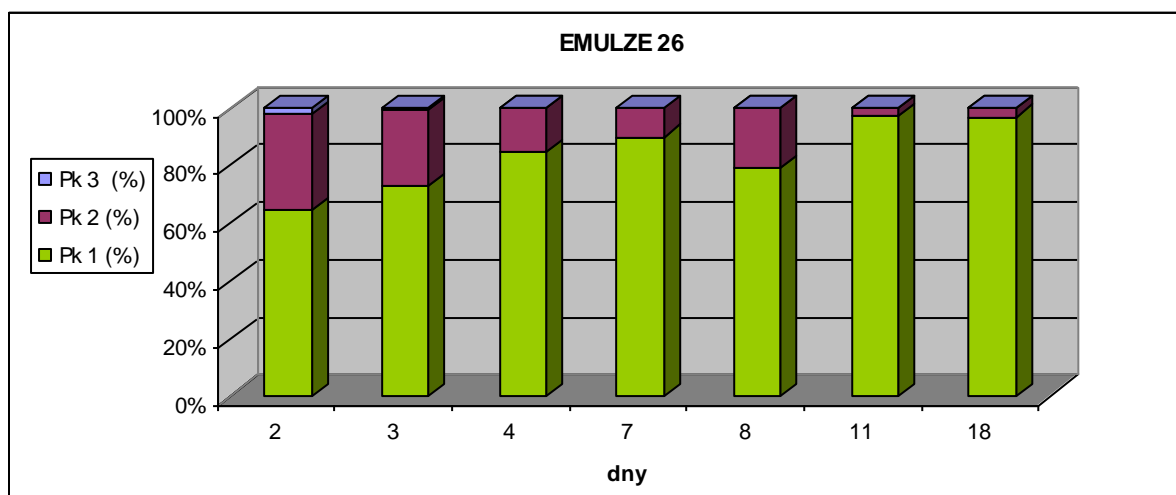
Graf 14: Časový průběh změn velikosti částic emulze 25



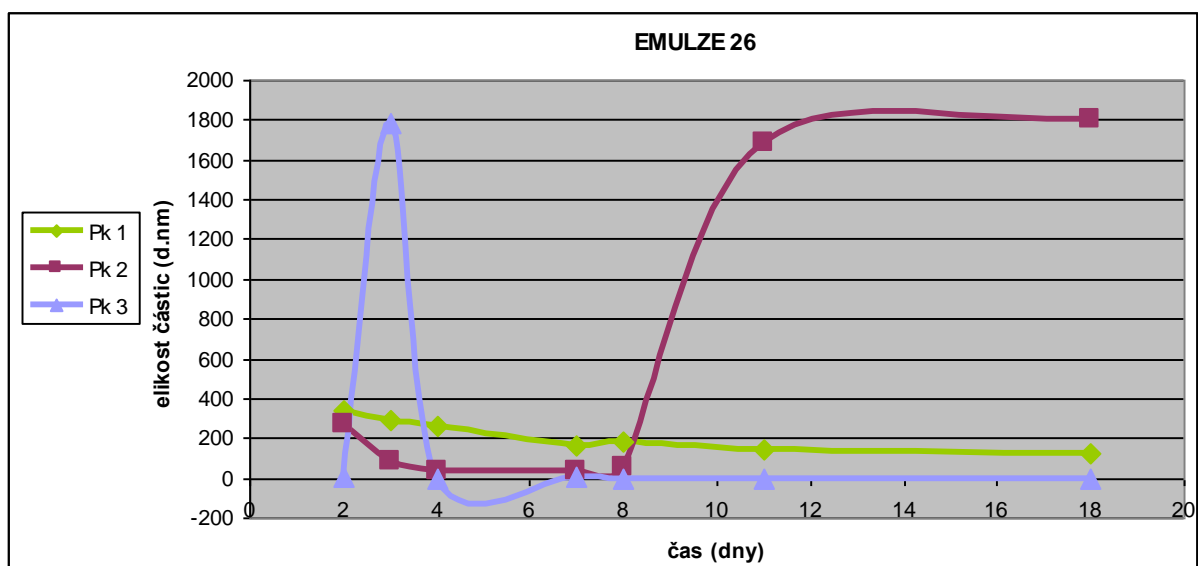
Tabulka 8: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 26

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	344	270	9	65	33	2
3	289	81	1784	73	27	0
4	259	34	0	85	15	0
7	160	36	6	90	10	0
8	181	55	0	79	21	0
11	143	1688	0	97	3	0
18	127	1799	0	97	3	0

Graf 15: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 26



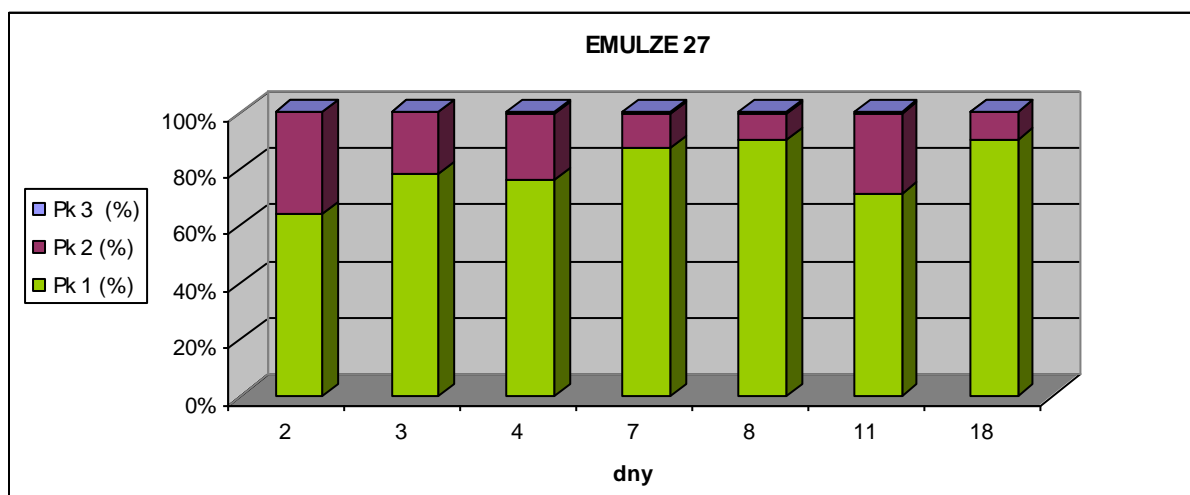
Graf 16: Časový průběh změn velikosti částic emulze 26



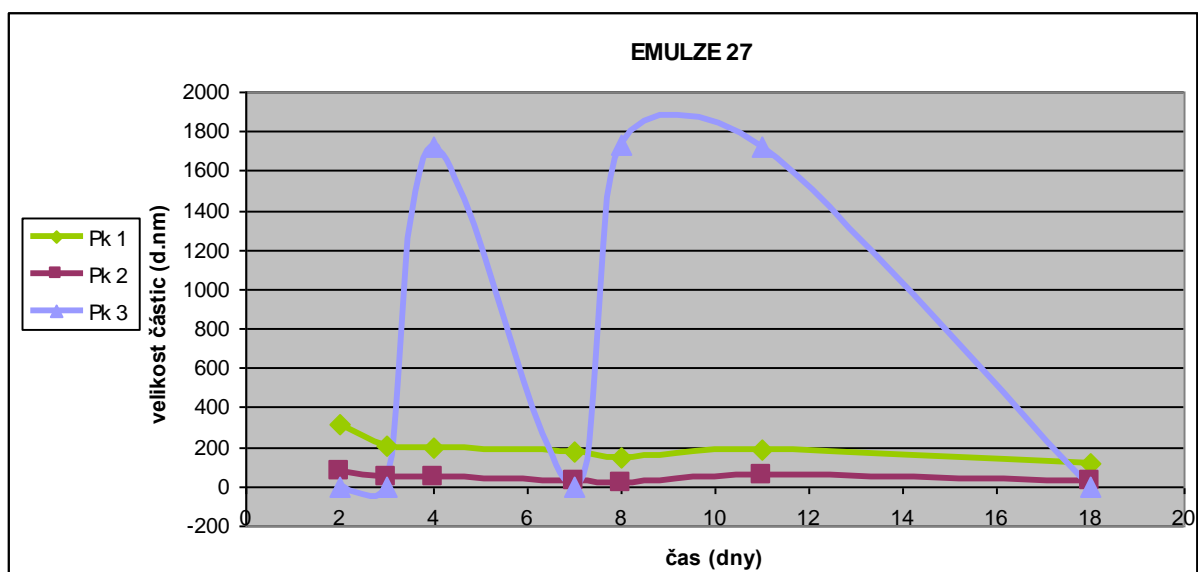
Tabulka 9: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 27

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	314	76	0	64	36	0
3	206	48	0	7	22	0
4	195	52	1725	76	23	1
7	177	30	3	87	12	0
8	146	20	1729	90	9	1
11	184	57	1726	71	29	0
18	116	25	0	90	10	0

Graf 17: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 27



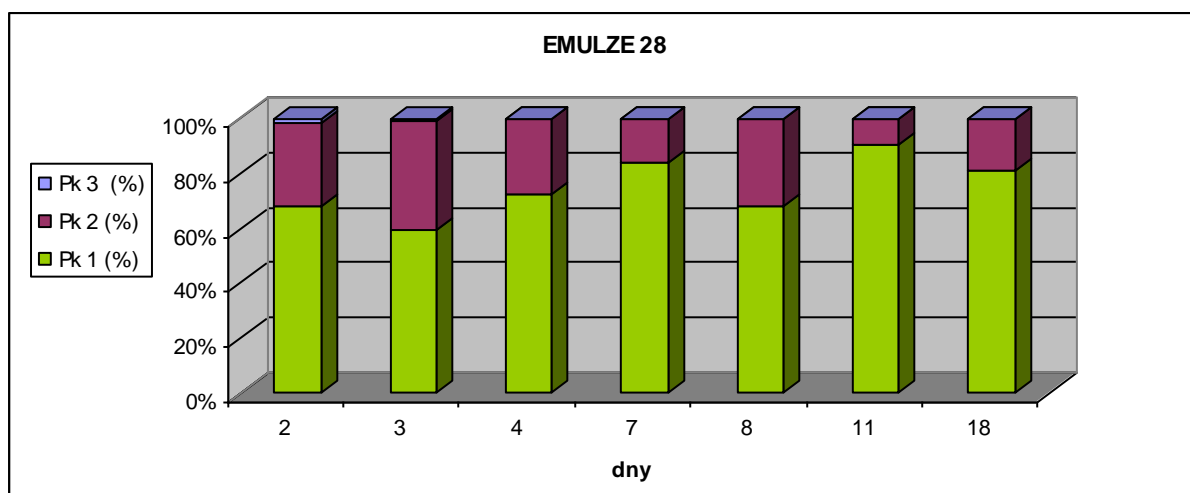
Graf 18: Časový průběh změn velikosti částic emulze 27



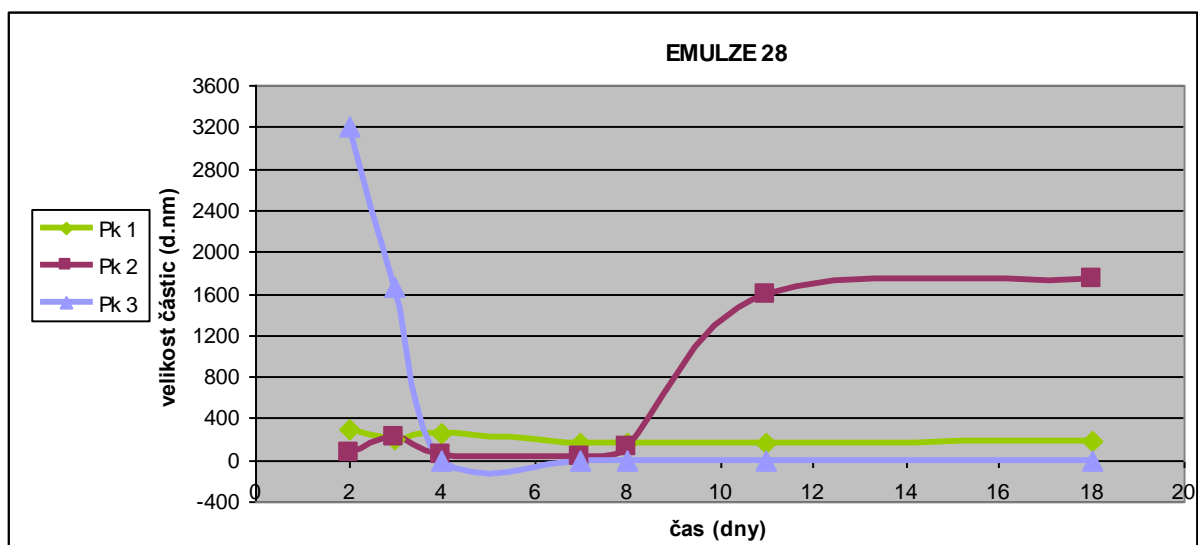
Tabulka 10: Časový průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 28

Dny	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
2	289	69	3205	68	31	2
3	201	221	1660	59	40	1
4	251	56	0	72	28	0
7	172	37	0	84	16	0
8	164	129	0	68	32	0
11	155	1599	0	90	10	0
18	178	1745	0	81	19	0

Graf 19: Časové změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 28



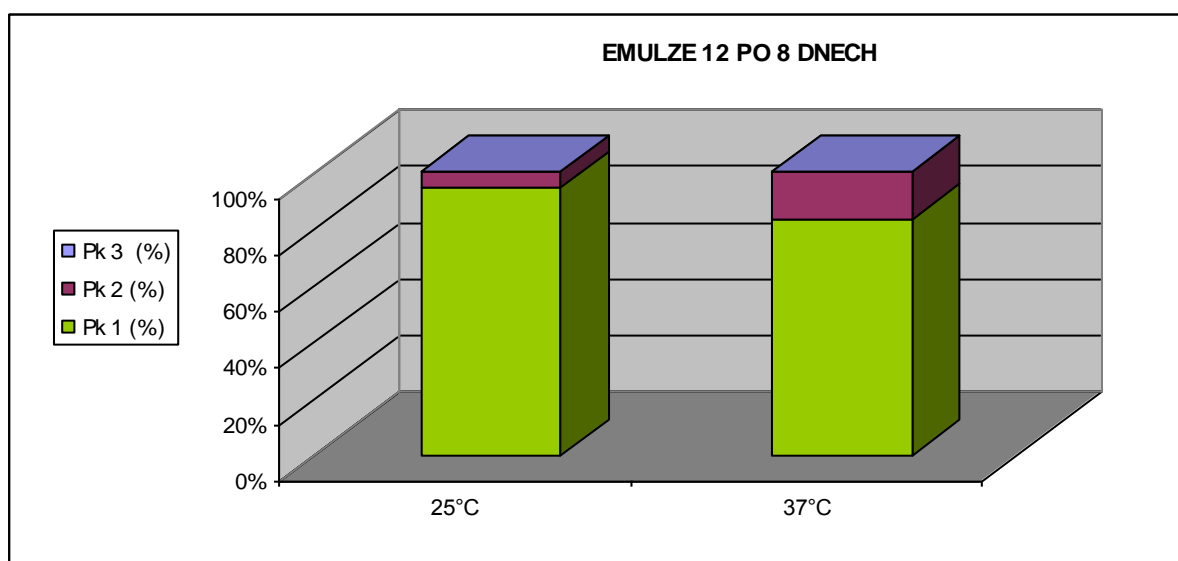
Graf 20: Časový průběh změn velikosti částic emulze 28



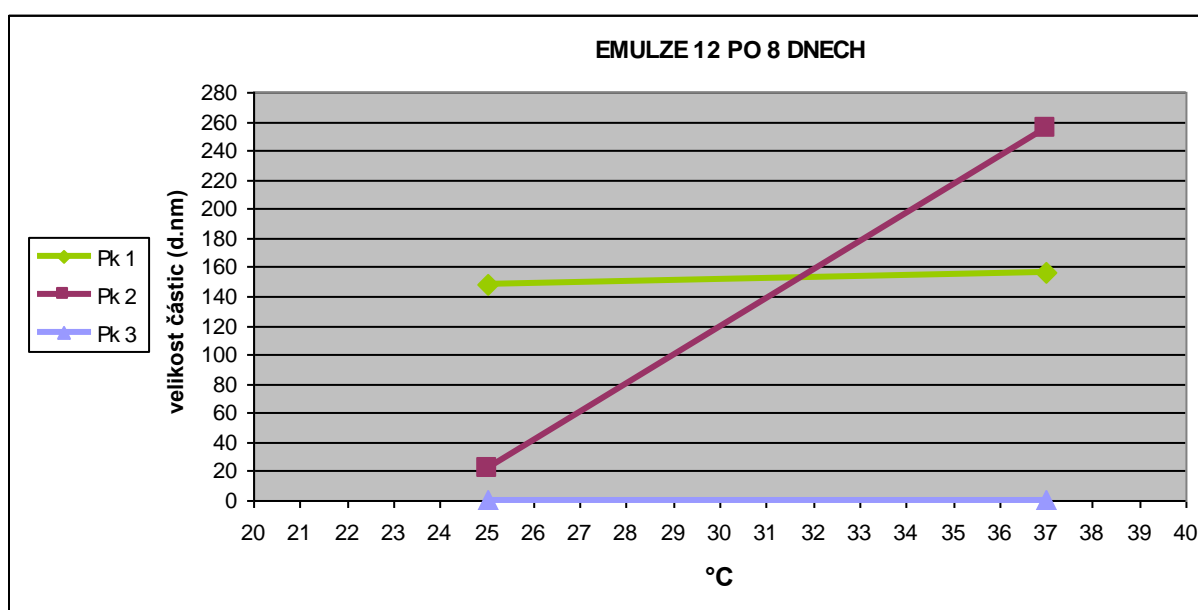
Tabulka 11: Teplotní průběh změn velikosti a četnosti částic emulze 12 po 8 dnech od data přípravy

	Pk 1 (nm)	Pk 2 (nm)	Pk 3 (nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 (%)	Pk 3 (%)
<b>25°C</b>	149	22	0	94	6	0
<b>37°C</b>	156	255	0	84	16	0

Graf 21: Teplotní změny poměrného zastoupení velikostních frakcí emulze 12 po 8 dnech od data přípravy



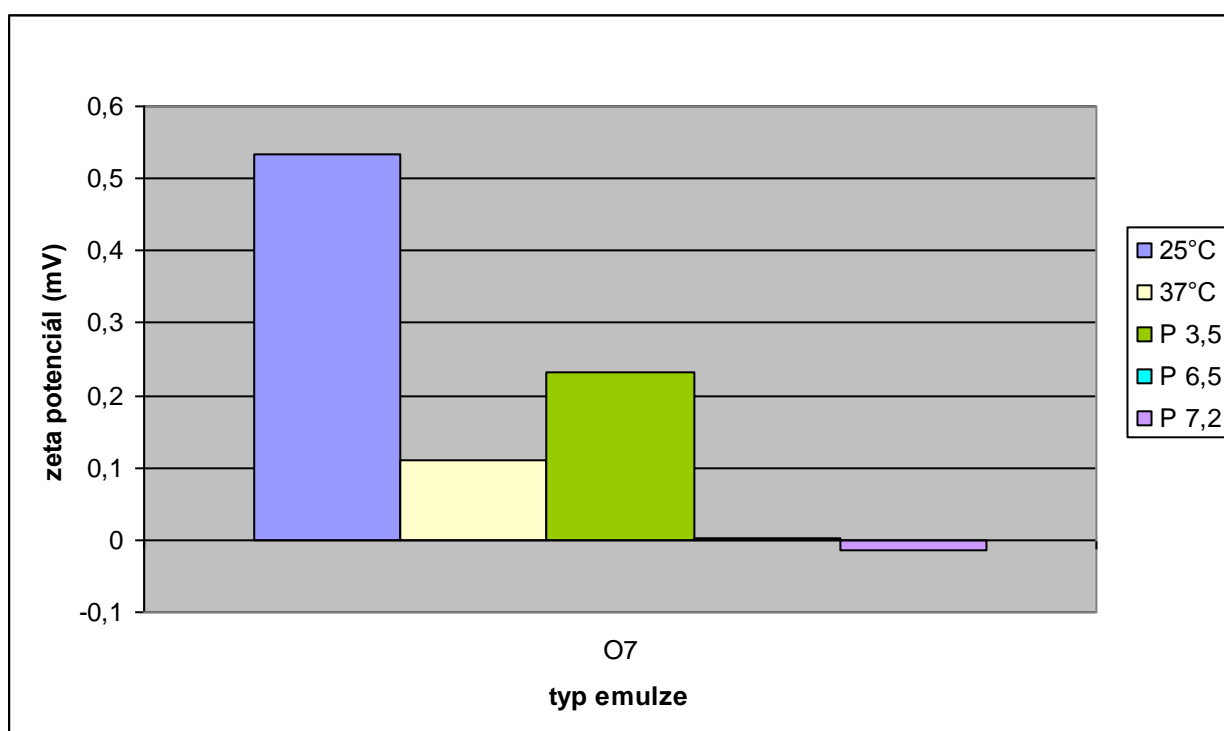
Graf 22: Teplotní průběh změn velikosti částic emulze 12 po 8 dnech od data přípravy



Tabulka 12: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 07

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
<b>07</b>	0,534	0,111	0,233	0,003	-0,013

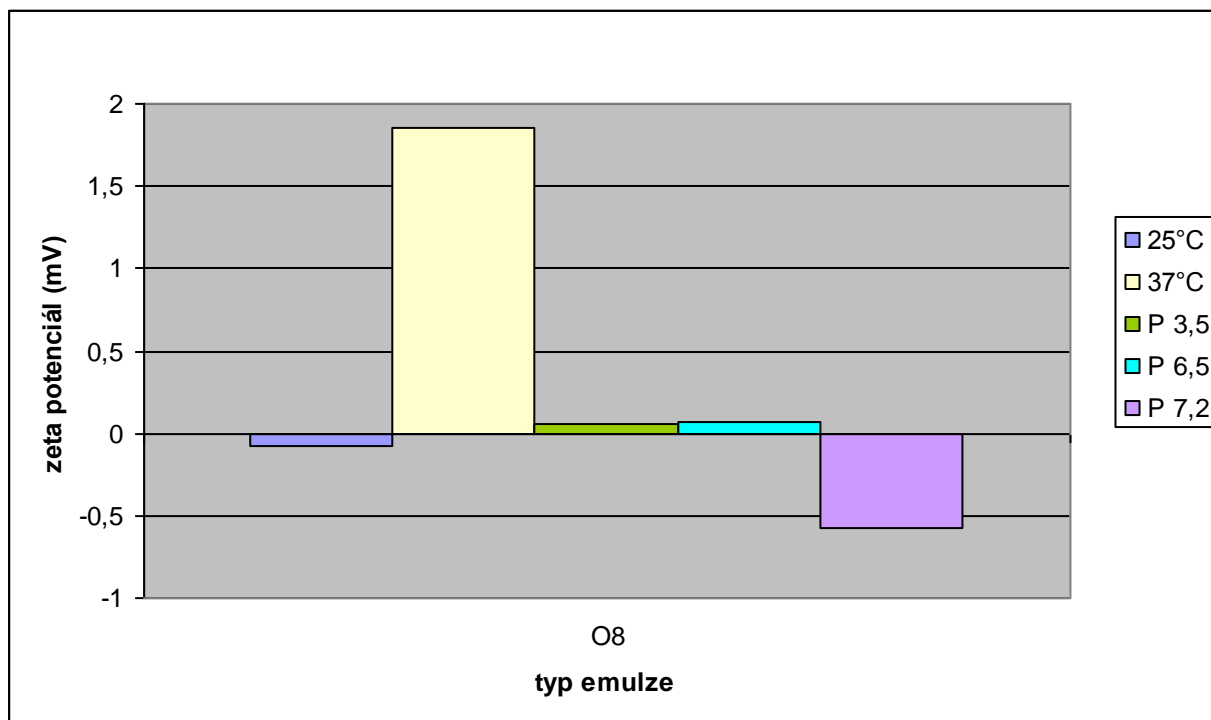
Graf 23: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 07



Tabulka 13: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 08

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
<b>08</b>	-0,074	1,850	0,054	0,075	-0,577

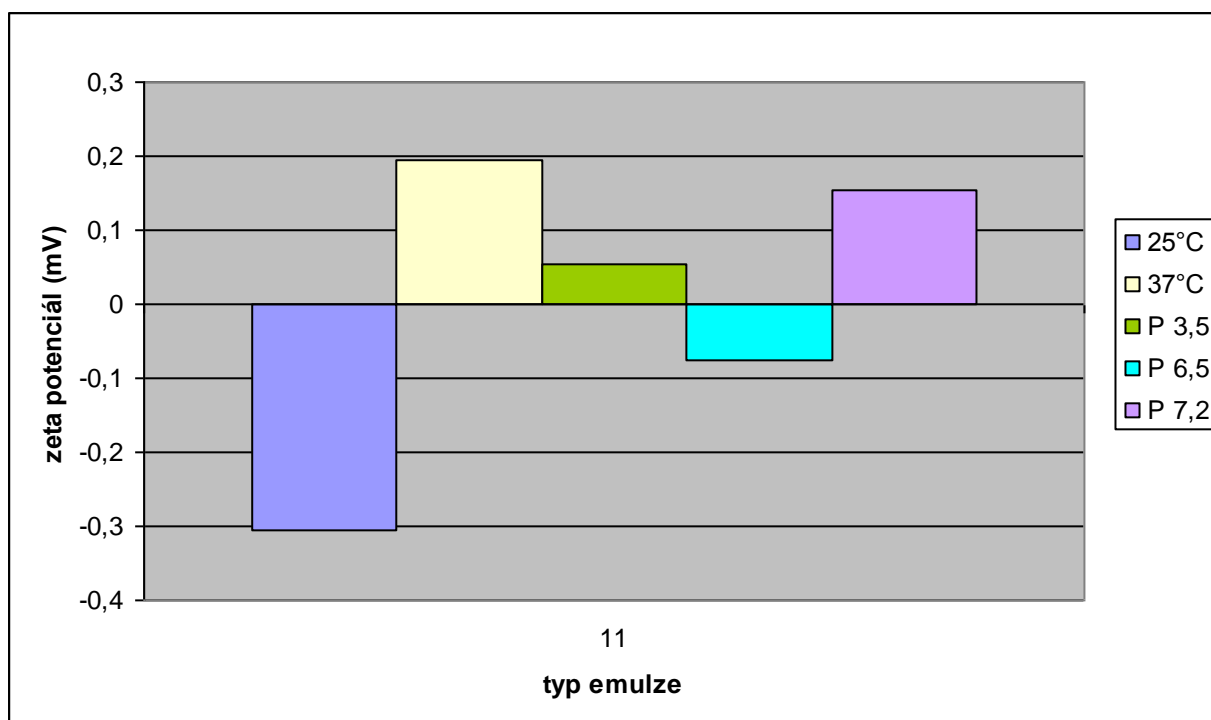
Graf 24: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 08



Tabulka 14: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 11

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
11	-0,307	0,194	0,055	-0,076	0,154

Graf 25: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 11

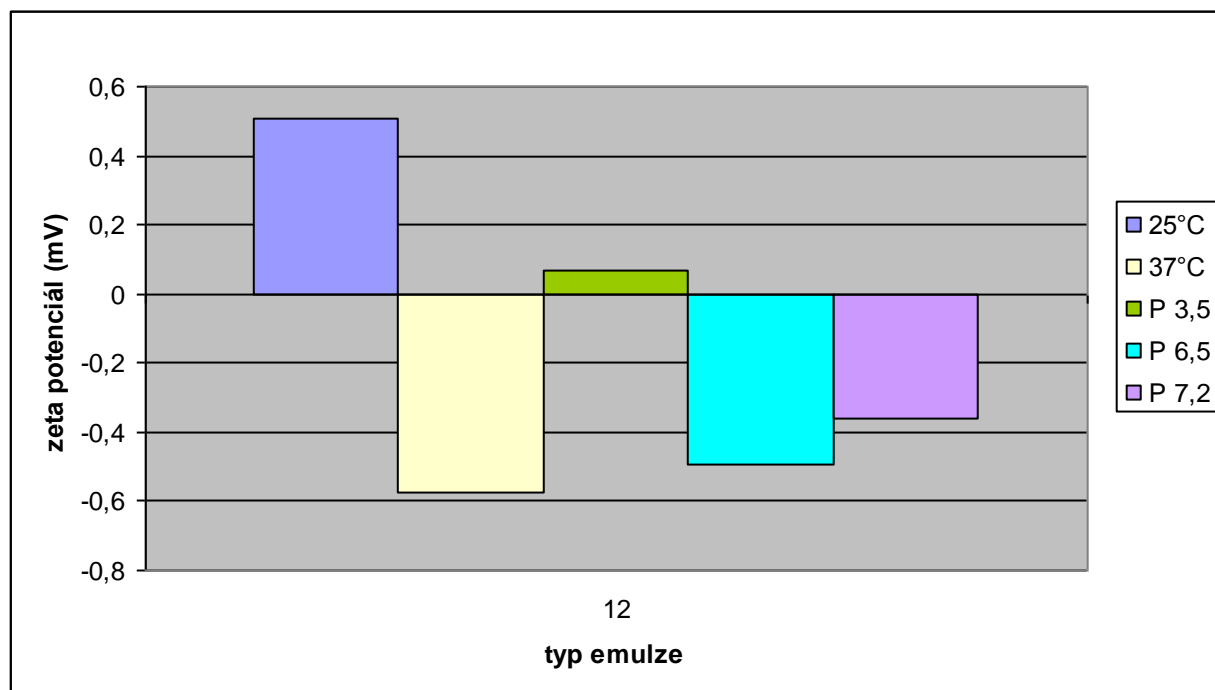


Tabulka 15: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 12

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
12	0,509	-0,572	0,069	-0,495	-0,359



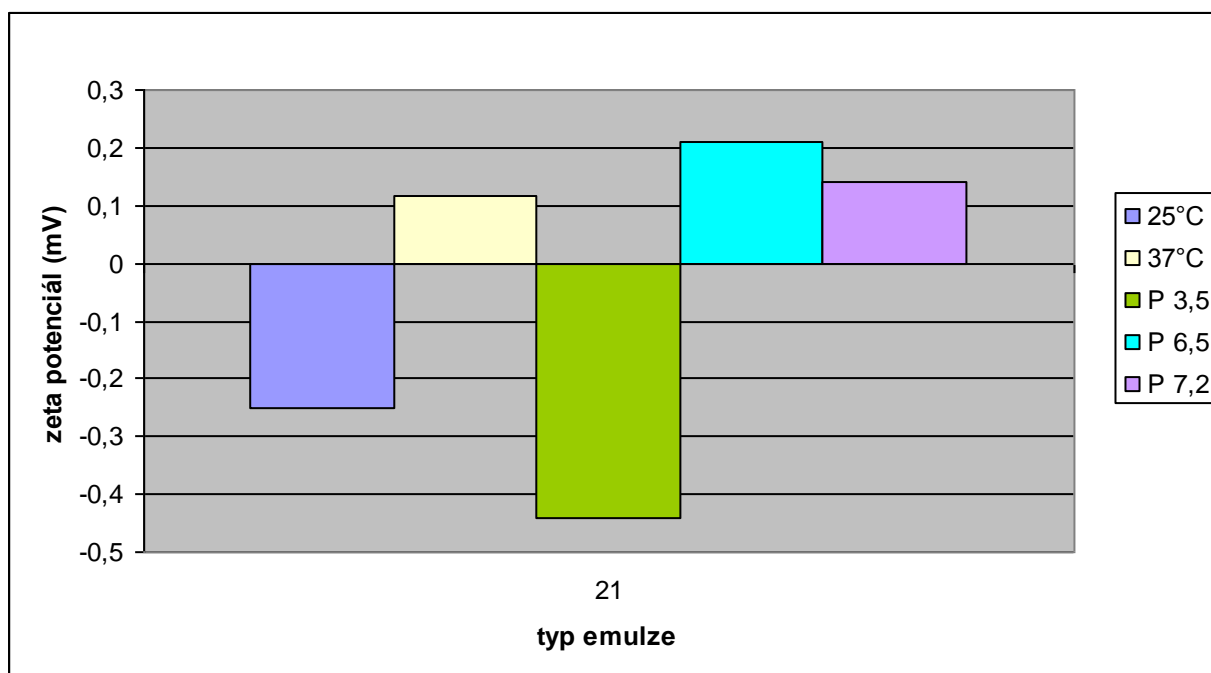
Graf 26: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 12



Tabulka 16: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 21

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
21	-0,251	0,118	-0,440	0,209	0,141

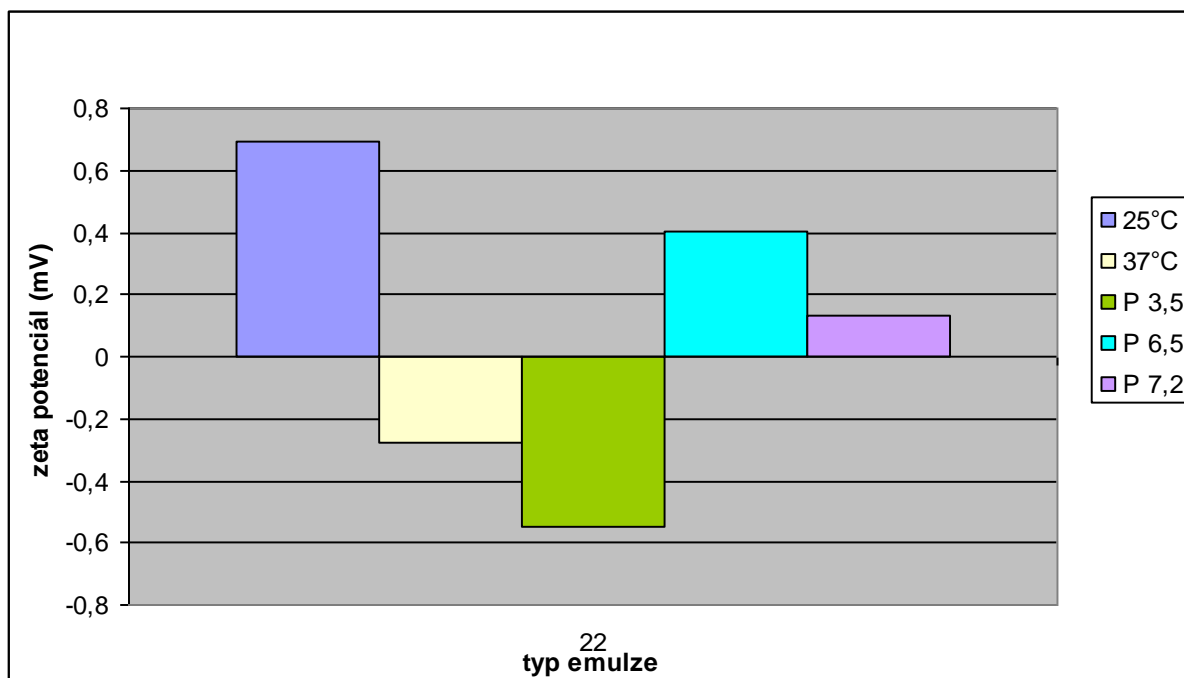
Graf 27: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 21



Tabulka 17: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 22

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
22	0,690	-0,280	-0,550	0,401	0,134

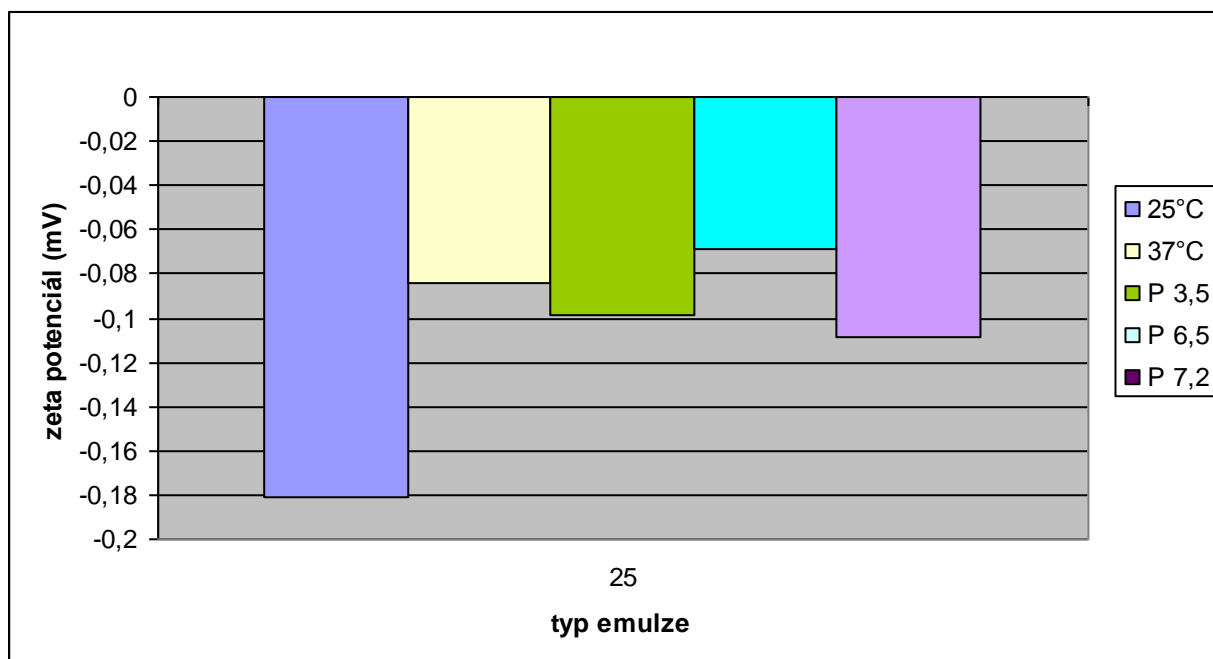
Graf 28: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 22



Tabulka 18: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 25

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
25	-0,181	-0,084	-0,099	-0,069	-0,109

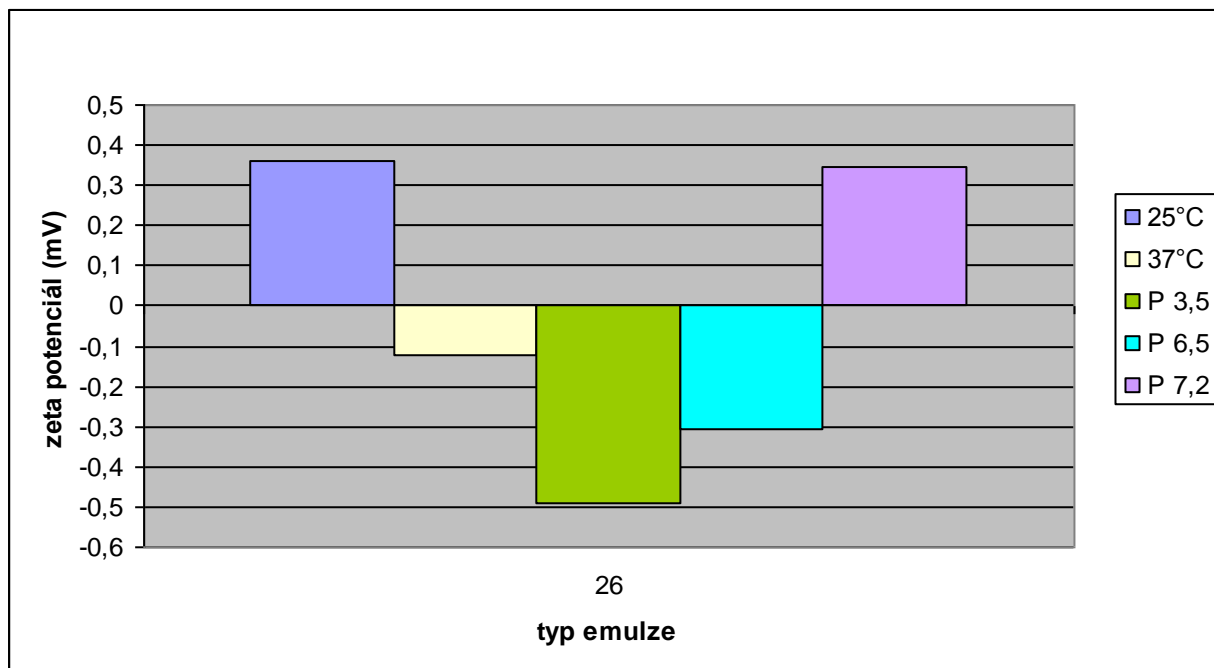
Graf 29: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 25



Tabulka 19: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 26

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
26	0,360	-0,122	-0,490	-0,308	0,346

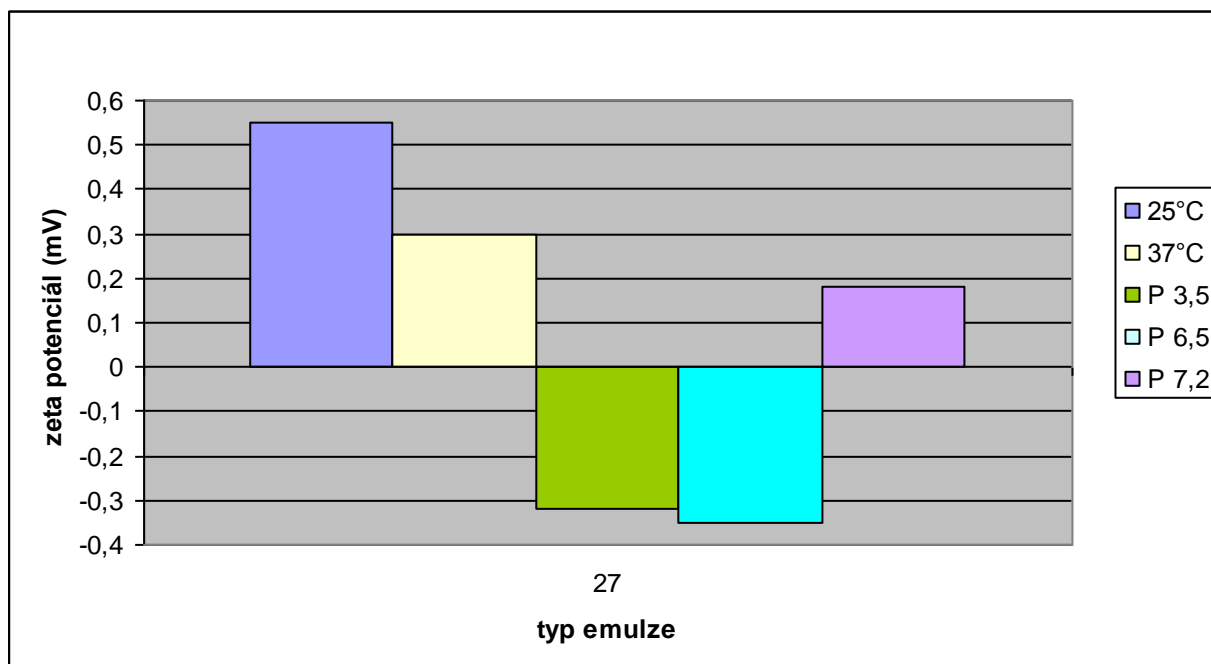
Graf 30: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 26



Tabulka 20: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 27

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
27	0,552	0,300	-0,318	-0,350	0,181

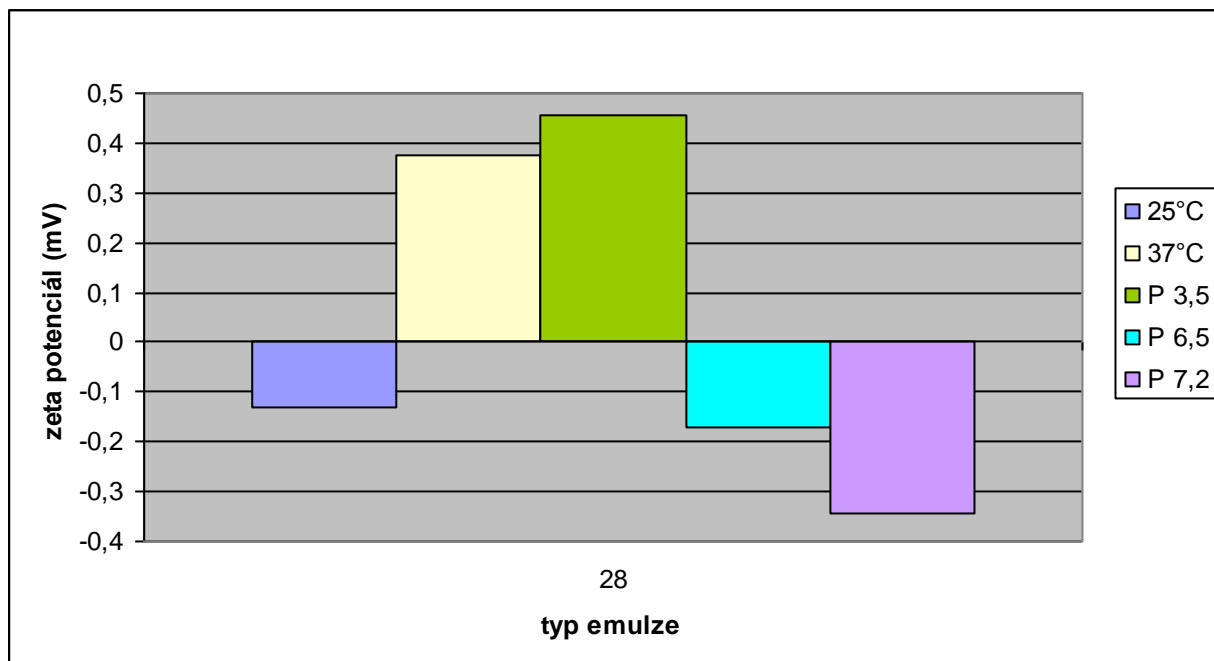
Graf 31: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 27



Tabulka 21: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrech o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 28

Typ emulze	25°C	37°C	pH 3,5	pH 6,5	pH 7,2
28	-0,129	0,377	0,455	-0,171	-0,343

Graf 32: Naměřené hodnoty zeta potenciálu při teplotách 25°C, 37°C a pufrch o velikosti pH 3,5, 6,5 a 7,2 emulze 28



Tabulka 22: Porovnání naměřených hodnot zeta potenciálu u emulze typu 07 při teplotě 25°C a různém složení

EMULZE 07			
zeta potenciál (mV)	emulze (25°C)	emulze + voda	emulze + pufr (pH 3,5)
		0,534	0,233

EMULZE 07			
zeta potenciál (mV)	emulze (25°C)	emulze + voda	emulze + pufr (pH 6,5)
		0,534	0,169

EMULZE 07			
zeta potenciál (mV)	emulze (25°C)	emulze + voda	emulze + pufr (pH 7,2)
		0,534	-0,248

Tabulka 23: Kinematická viskozita emulzí při 25°C (součin naměřené doby průtoku a konstanty viskozimetru)

	typ emulze				
	<b>07</b>	<b>08</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>21</b>
doba průtoku (s)	216,43	242,81	243,40	236,27	240,48
konstanta viskozimetru ( $m^2/s^2$ )	0,010286	0,00998	0,01008	0,010286	0,00998
<b>kinematická viskozita (<math>m^2/s</math>)</b>	2,22620	2,42328	2,45344	2,43024	2,39999
	typ emulze				
	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>
doba průtoku (s)	228,42	234,77	242,34	360,50	365,09
konstanta viskozimetru ( $m^2/s^2$ )	0,01008	0,010286	0,00998	0,01008	0,010286
<b>kinematická viskozita (<math>m^2/s</math>)</b>	2,30244	2,41484	2,41859	3,63384	3,75535

Tabulka 24: Kinematická viskozita emulzí při 37°C (součin naměřené doby průtoku a konstanty viskozimetru)

	typ emulze				
	<b>07</b>	<b>08</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>21</b>
doba průtoku (s)	199,17	237,93	232,62	204,32	204,46
konstanta viskozimetru ( $m^2/s^2$ )	0,010286	0,00998	0,01008	0,010286	0,00998
<b>kinematická viskozita (<math>m^2/s</math>)</b>	2,048697	2,374541	2,34481	2,10167	2,040478
	typ emulze				
	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>
doba průtoku (s)	196,13	207,81	210,99	324,19	326,55
konstanta viskozimetru ( $m^2/s^2$ )	0,01008	0,010286	0,00998	0,01008	0,010286
<b>kinematická viskozita (<math>m^2/s</math>)</b>	1,977024	2,137568	2,105647	3,267835	3,358928



Tabulka 25: Dynamická viskozita emulzí při 25°C (součin kinematické viskozity a hustoty emulze)

	typ emulze				
	<b>07</b>	<b>08</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>21</b>
kinematická viskozita (m <sup>2</sup> /s)	2,22620	2,42328	2,45344	2,43024	2,39999
hustota (kg/m <sup>3</sup> )	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985
<b>dynamická viskozita (Ns/m<sup>2</sup>)</b>	2,192806	2,386928	2,416637	2,393785	2,363991
	typ emulze				
	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>
kinematická viskozita (m <sup>2</sup> /s)	2,30244	2,41484	2,41859	3,63384	3,75535
hustota (kg/m <sup>3</sup> )	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985
<b>dynamická viskozita (Ns/m<sup>2</sup>)</b>	2,267903	2,378622	2,382308	3,579332	3,69902

Tabulka 26: Dynamická viskozita emulzí při 37°C (součin kinematické viskozity a hustoty emulze)

	typ emulze				
	<b>07</b>	<b>08</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>21</b>
kinematická viskozita (m <sup>2</sup> /s)	2,048697	2,374541	2,34481	2,10167	2,040478
hustota (kg/m <sup>3</sup> )	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985
<b>dynamická viskozita (Ns/m<sup>2</sup>)</b>	2,017966	2,338923	2,309637	2,070145	2,00987
	typ emulze				
	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>
kinematická viskozita (m <sup>2</sup> /s)	1,977024	2,137568	2,105647	3,267835	3,358928
hustota (kg/m <sup>3</sup> )	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985
<b>dynamická viskozita (Ns/m<sup>2</sup>)</b>	1,947369	2,105504	2,074062	3,218818	3,308544

## 6. DISKUZE

### 6.1 Obecné poznámky

Nanoemulze hodnocené v experimentální části byly připraveny v podniku Biomedica vysokotlakou homogenizací. Prvních šest nanoemulzí obsahovalo 20 % vnitřní olejové fáze, u zbývajících čtyř pak vnitřní fáze zaujímala 30 % hmotnostních.

Nejdříve jsem proměřila velikosti částic u jednotlivých typů emulzí při teplotě 25°C po 2, 3, 4, 7, 8, 11 a po 18 dnech od data přípravy. Dále pak následovalo změření velikosti částic při 37°C a to 8. den po přípravě emulzí. Uvedená teplota byla zvolena proto, že odpovídá teplotě lidského těla, v němž po podání nanoemulzí mohou nastat výrazné změny disperzity částic, a bylo proto nutné naměřené výsledky při těchto dvou různých teplotách porovnat.

V další fázi následovalo měření zeta potenciálu jednotlivých emulzí, a to opět při teplotách 25°C a 37°C a navíc ještě s přidanými pufrů o třech různých hodnotách pH – 3,5, 6,5 a 7,2. Poté byly ještě proměřeny kontrolní vzorky (emulze a voda bez pufrů).

Poslední fáze experimentální části práce se soustředila na přesné stanovení dynamické viskozity emulzí, která má zásadní vliv na výsledný průběh křivek disperzity částic a vlastní hodnoty veličin získaných při měření fonokorelační spektroskopii. Nejprve jsem změřila dobu průtoku emulze viskozimetrem a poté získanou hodnotu vynásobila příslušnou konstantou viskozimetru, aby byla vyčíslena kinematičká viskozita. Následný součin kinematičké viskozity a hustoty emulze poskytl potřebnou výslednou hodnotu dynamické viskozity.

### 6.2 Disperzita částic

Pokud se podrobněji podíváme na grafy znázorňující velikost částic a jejich četnost, vidíme, že po dvou dnech nejsou částice strukturálně dotvořené a stále se v obou parametrech mění. Postupně se vytváří rovnováha, která se přibližně po jednom týdnu ustaluje a dále již k výraznějším změnám nedochází. Toto konstatování je pro výstupní kontrolu ve výrobě důležité, neboť umožňuje správně,

realisticky a ekonomicky navrhnout kontrolní protokol. Je totiž zřejmé, že výsledky by naměřené v krátké době po výrobě, přibližně do třech dnů, nepřinesly použitelnou informaci.

Z naměřených výsledků naopak vyplývá, že v intervalu delším než týden od výroby jsou již v disperzních soustavách hodnoceného nenoemulzního typu všechny redistribuční procesy ukončeny a naměřené hodnoty velikosti částice se ustalují na rovnovážných hodnotách.

Důležité z hlediska stabilitního a aplikačního potenciálu hodnocených disperzí je také to, že disperzita všech emulzních soustav odpovídá jejich zamýšlené nanodisperzitě.

Podrobněji lze popsat situaci následujícím způsobem:

- 1. pík** - velikost částic se neustále zmenšuje, přibližně po 1 týdnu se disperzita soustav ustaluje, velikost částic zůstává přibližně stejná (cca 120 – 185 nm), částice této velikosti zabírají cca 85 % – 95 % plochy grafu
- 2. pík** - u většiny emulzí dochází k výraznému zmenšování částic – stávají se nejspíše součástí 1. píku, z čehož také vyplývá, že se zvětšuje jeho procentuální zastoupení. Naopak zastoupení částic v rámci 2. píku s časem klesá.
- 3. pík** – u všech emulzí dochází k úplnému vymizení 3. píku, což může být následkem spojení kapiček do většího celku a jejich vyplavování směrem k povrchu. To naznačují i makrofotografie – po čase začínáme pozorovat proužek olejové fáze, který může signalizovat právě toto oddělování (viz foto v příloze).

Velmi zajímavé je také porovnání hodnot fotonkorelační spektroskopii při teplotě 25°C a 37°C u jednoho typu emulze (viz tabulka 11). Jak je patrné z grafu 22, dochází u 1. píku k mírnému zvětšování velikosti částic se zvyšující se teplotou. Domníváme se však, a to je důležité, že tento proces nepřináší markantní změny, a proto ho není potřeba dále považovat za kritický

Totéž, ale vzhledem k menšímu počtu částic v této oblasti v relativně větším měřítku, zaznamenáváme u 2. píku. Naopak 3. pík zůstává zcela beze změny. Procentuální zastoupení částic 1. píku se pak se zvyšující se teplotou snižuje,

nejspíše ve prospěch 2. píku, což není ze stabilitního hlediska na závadu a z aplikačně praktického hlediska může být výhodné, zejména při perorálním podání.

### 6.3 Stabilita disperzí

Zeta potenciál soustav představuje stěžejní parametr související se stabilitou disperzních systémů. V rámci naměřených hodnot, jak jsou postupně pro jednotlivé emulze shrnuty v tabulkách 12 – 21 jsme došli k závěru, že se hodnoty zeta potenciálu nijak výrazně neměnily a leží rozmezí cca – 0,6 až + 2 mV.

Uspokojující v tomto smyslu je jednak to, že toto konstatování platí i pro soustavy při teplotě zvýšené na 37°C. Překvapující je ovšem zejména zjištění, že stejné stejné skutečnost byla zaznamenána také po přidání pufrů, a to jak kyselých, tak zásaditých. Z toho tedy můžeme vyvodit, že hodnocené nanoemulze jsou relativně stabilní. Zeta potenciál jejich nanodispergovaných částic je natolik malý, že částice jsou ve velmi jemných vzájemných interakcích a mohou být neustále redispergovány Brownovým pohybem, přičemž i vzhledem jejich velikosti v nanometrické oblasti nemají tendenci sedimentovat.

Je nutné ovšem říci, že výsledky u některých typů emulzí mohou být zkreslené, jelikož u nich posléze došlo ke kontaminaci mikroorganismy a na povrchu vzorků se po jisté době vytvořil „plísňový“ povlak. Proto je u později měřených vzorků nutné počítat s tím, že určitý podíl částic mohou tvořit kontaminující mikroorganismy.

## 7. ZÁVĚR

1. Disperzita částic se ustaluje cca po jednom týdnu, je třeba ovšem pokračovat ve sledování nanoemulzí, jelikož může dojít k dalším změnám během doby jejich použitelnosti (3 měsíce).

2. Vzhledem ke spojování větších kapiček do většího celků a jejich vyplavání směrem k povrchu by bylo vhodné najít optimální řešení tohoto problému.

V podstatě se nabízejí 3 možnosti, které navrhuje uplatit v pořadí

- a) optimálně snížit podíl olejové fáze
- b) užít optimální množství emulgátoru
- c) upravit technologický postup

3. Vyšší teplota na úrovni 37°C nemá za daných pokusných podmínek negativní vliv na parametry disperzity nanoemulzí.

4. Přísada použitých fosforečnanových pufrů o pH 3,5, 5,6 a 7,2 ani naředění soustav vodou nemá za daných pokusných podmínek a teplotě 25 °C nepříznivý vliv na hodnoty zeta potenciálu soustav, které jsou v intervalu – 0,6 až + 2mV.

Pokud porovnáme a zhodnotíme veškeré naměřené hodnoty, pro perorální či topické použití se jeví jako vhodná nanoemulze **12** (samozřejmě po její úpravě - viz bod 2).

## 8. SOUHRN

Teoretická část práce se nejprve zabývá přiblížením pojmů nanočástice a nanoemulze a jejich uplatněním při perorální a topickém podání léčiv. Další část se věnuje vysvětlení podstaty zeta potenciálu a DLVO teorie, které mají vliv na stabilitu částic. Je také zmíněn princip měření viskozity, protože viskozita je důležitým parametrem metody v práci použité k měření disperzity částic.

Experimentální část je zaměřena na stanovení velikosti částic fotonkorelační spektroskopii při teplotě 25°C a 37°C, a to v časovém sledu umožňujícím odhadnout stabilitu hodnocených disperzních soustav. Proměřen byl rovněž elektrokinetický parametr – zeta potenciál soustav, jako zásadní ukazatel zachování stability nanoemulzí.

Bylo prokázáno, že velikost částic se ustaluje po cca 1 týdnu, další změny již nejsou příliš markantní, a to ani při zvýšení teploty na 37°C. Největší podíl částic, asi 60 - 95 % jejich počtu patří po 1 týdnu od výroby velikostně do intervalu cca 120 – 175 nm.

Rovněž zeta potenciál zůstává při zvýšení teploty na 37°C a při přidání pufrů o třech různých velikostech pH ve rozmezí (+2 mV do -0,6 mV).

Z hodnot velikostních a elektrokinetických parametrů naměřených u studovaných nanoemulzí lze předběžně vyvodit, že jako nejstabilnější disperze a vhodná pro perorální i topické použití jeví nanoemulze 12.

## 9. SUMMERY

Theoretical part of this work is focused on explanation of such terms like nanoparticles and nanoemulsions and their usage within peroral and topical administration. Next part explains the merit of zeta potential and DLVO theory, which influence the stability of the elements. Of course, also the principle of the measuring of viscosity is mentioned, because viscosity is taken into consideration in case of measuring of the element dispersion.

The experimental part is focused on determination of the partije size by photon correlation spectroscopy by temperature of 25°C and 37°C. The measurement was taken in chronological succession to estimate the stability of dispersion system. It was also measured electrokinetic parameter - zeta potential, which plays a fundamental role by keeping the stability of nanoemulsions.

It was proved, that the size of the elements gets settled after approx. 1 week, further changes are not so striking anymore, not even by the increase of temperature to 37°C. Since creating the emulsion (approx. 1 week), the major share of the size of particles (about 60-95%) was ranging between 120-175 nm. As well zeta potencial remains in stable range (+2 mV - -0,6 mV) by the increase of temperature to 37°C and adding of three pH highs of buffers.

From the gained results we can draw conclusion, that after further modifications, the nanoemulsion type 12 is proper for peroral or topical administration.

## 10. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

**Z** ..... zeta potenciál

**$U_E$**  ..... elektroforetická pohyblivost

**$E_1$**  ..... dielektrická konstanta

**$\eta_1$**  ..... viskozita

**$f(Ka)$**  ..... Henryho funkce

**k** ..... Boltzmanova konstanta

**T** ..... teplota

**D** ..... difúzní koeficient

**u** ..... výsledná interakční energie

**$u_{el}$**  ..... odpudivé elektrostatické síly

**$u_{vdW}$**  ..... přitažlivé síly van der Waalsovy

**h** ..... vzdálenost povrchů přibližujících se částic

**$V_s$**  ..... potenciál Sternovy vrstvy

**R** ..... poloměr částic

**A** ..... Hamakerova konstanta (její hodnota je dána chemickou povahou disperzního prostředí a disperzních částic)

**$E_2$**  ..... permitivita prostředí

**$\ell$**  ..... efektivní tloušťka elektrické dvojvrstvy

**$\eta_2$**  ..... dynamická viskozita

**r** ..... poloměr kapiláry

**l** ..... délka kapiláry

**$Q_v$**  ..... objemový průtok

**$\Delta p$**  ..... tlakový rozdíl



## 11. POUŽITÁ LITERATURA

---

- <sup>1</sup> <http://www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie200610.pdf>
- <sup>2</sup> Sheikh Shafiq, Faiyaz Shakeel, Sushma Talegaonkar, Farhan J. Ahmad, Roop K. Khar, Mushir Ali: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 66, Iss. 2, Pag. 227-243, India (2007)
- <sup>3</sup> [http://www.hielscher.com/ultrasonics/emulsify\\_01.htm](http://www.hielscher.com/ultrasonics/emulsify_01.htm)
- <sup>4</sup> N. S. Santos-Magalhães, A. Pontes, V. M. W. Pereira, M. N. P. Caetano: International Journal of Pharmaceutics, Vol. 208, Iss. 1-2, Pag. 71-80, Brazil (2000)
- <sup>5</sup> Letícia Cruz, Leonardo U. Soares, Teresa Dalla Costa, Graziela Mezzalira, Nadya P. da Silveira, Sílvia S. Guterres, Adriana R. Pohlmann: International Journal of Pharmaceutics, Vol. 313, Iss. 1-2, Pag. 198-205, Brazil (2006)
- <sup>6</sup> Dongsheng Mou, Huabing Chen, Danrong Du, Chengwen Mao, Jiangling Wan, Huibi Xu, Xiangliang Yang: International Journal of Pharmaceutics, Vol. 353, Iss. 1-2, Pag. 270-276, China (2008)
- <sup>7</sup> Silbernagel S., Despoupoulos A.: Atlas fyziologie člověka, Praha (2004)
- <sup>8</sup> [http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/absorb\\_lipids.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/smallgut/absorb_lipids.html)
- <sup>9</sup> [http://is.muni.cz/elportal/estud/fsps/js06/t031/TUKY\\_LIPIDY\\_.pdf](http://is.muni.cz/elportal/estud/fsps/js06/t031/TUKY_LIPIDY_.pdf)
- <sup>10</sup> Sripriya Venkata Ramana Rao, Kavya Yajurvedi, Jun Shaw: International Journal of Pharmaceutics, Vol. 362, Iss. 1-2, Pag. 16-19, USA (2008)
- <sup>11</sup> Sripriya Venkata Ramana Rao, Jun Shaw: International Journal of Pharmaceutics, Vol. 362, Iss. 1-2, Pag. 2-9, USA (2008)
- <sup>12</sup> Huailiang Wu, Chandrasekharan Ramachandran, Norman D. Weiner, Blake J. Roessler: International Journal of Pharmaceutics, Vol. 220, Iss. 1-2, Pag. 63-75, USA (2001)
- <sup>13</sup> Marta P. Alves, Ana L. Scarrone, Marcos Santos, Adriana R. Pohlmann, Sílvia S. Guterres: International Journal of Pharmaceutics, Vol. 341, Iss. 1-2, Pag. 215-220, Brazil (2007)
- <sup>14</sup> Fernanda S. Poletto, Eliézer Jäger, Letícia Cruz, Adriana R. Pohlmann, Sílvia S. Guterres: Materials Science and Engineering: C, Vol. 28, Iss. 4, Pag. 472 – 478, Brazil (2008)

- 
- <sup>15</sup> Lombardi Borgia S., Regály M., Sivaramakrishnan R., Mehnert W., Korting H.C., Danker K., Röder B., Kramer K.D., Schäfer-Korting M.: Journal of Controlled Release, Vol. 110, Iss. 1, Pag. 151-163, Germany (2005)
- <sup>16</sup> [http://www.malvern.com/LabEng/products/zetasizer/zetasizer\\_nano.htm](http://www.malvern.com/LabEng/products/zetasizer/zetasizer_nano.htm)
- <sup>17</sup> Zeta potential in pharmaceutical formulation, Manuál firmy Malvern Instruments Ltd., United Kingdom (2003)
- <sup>18</sup> Zeta potential Theory, Manuál firmy Malvern Instruments Ltd., United Kingdom (2003)
- <sup>19</sup> Lukš T.: Rigorózní práce, Příspěvek vývoji biodegradabilního přípravku s koloidním stříbrem, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova (2008), Hradec Králové
- <sup>20</sup> Size Theory, Manuál firmy Malvern Instruments Ltd., United Kingdom (2003)
- <sup>21</sup> <http://blindeye.sweb.cz/fotky/brownuv-pohyb.jpg>
- <sup>22</sup> [http://www.malvern.com/LabEng/industry/colloids/dlvo\\_theory.htm](http://www.malvern.com/LabEng/industry/colloids/dlvo_theory.htm)
- <sup>23</sup> <http://kmlinux.fjfi.cvut.cz/~novotfil/skola/ROZHRANI/A-PREDN-07/32-Stabilita-disperz%ED.doc>
- <sup>24</sup> Bartovská L., Šišková M.: Co je co v povrchové a koloidní chemii - výkladový slovník, Praha (2005)
- <sup>25</sup> Kučerová H.: Vývoj zkušebních metod pro studium reologických vlastností systému cement-voda-přísada-příměs, Brno (2002)
- <sup>26</sup> <http://kf.upce.cz/Reologie%20a%20reometrie%20kapalin.doc>
- <sup>27</sup> <http://uprt.vscht.cz/ucebnice/mrt/F4/F4k46-sloz.htm>
- <sup>28</sup> [http://www.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res\\_stanoveni\\_viskozity\\_roztoku/teorie.htm](http://www.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res_stanoveni_viskozity_roztoku/teorie.htm)

---

## 12. PŘÍLOHY

Příloha 1: Fotografie nanoemulzí z 19. 8. 2008

