

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Monitorování liberačních testů pro uvolňování klotrimazolu z nanovláken

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant:

PhamDr. Martina Háková, Ph.D.

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Poděkování:

Dovolte mi, co nejsrdečněji a nejupřímněji poděkovat vedoucí mé diplomové práce, paní doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za nekonečnou trpělivost, ochotu pomoci, rady, připomínky a za stále pozitivní přístup, díky kterému bylo vypracování této práce velice příjemnou zkušeností. Rovněž bych rád poděkoval konzultantce PharmDr. Martině Hákové, Ph.D. za její pomoc při experimentální a teoretické části této diplomové práce. A dále bych chtěl poděkovat Technické univerzitě v Liberci za profesionální spolupráci, za poskytnuté informace a fotografie nanovláken, konkrétně panu Ing. Jakubovi Erbenovi za pomoc a opravy u teoretické části práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Radovan Ernest

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martina Háková, Ph.D.

Název diplomové práce: Monitorování liberačních testů pro uvolňování klotrimazolu z nanovláken

Diplomová práce je zaměřena na analýzu liberačních profilů klotrimazolu z různých typů vláken za využití neseparační průtokové metody, sekvenční injekční analýzy (SIA). Zároveň se zabývá hledáním ideálních podmínek pro sycení vláken roztokem klotrimazolu. Výroba nanovláken byla prováděna na půdě Technické univerzity v Liberci.

Práce se zabývá dvěma typy nanovláknenných nosičů – polymerní (polydioxanon a polykaprolakton) a keramické (křemičité). V práci jsou testovány dva postupy sycení vláken. Na první část vláken polydioxanonu a polykaprolaktonu byl zaváděn klotrimazol při výrobě v různém poměru polymeru a klotrimazolu. Takto připravená vlákna byla podrobena analýze v laboratoři. Druhá část polydioxanonových a polykaprolaktonových spolu s keramickými nanovláknny byla vyrobena v čistém stavu, tj. bez účinné látky. U těchto vláken bylo testováno sycení v laboratoři ethanolickým roztokem klotrimazolu o určité koncentraci po určitou dobu. Podmínky sycení se v průběhu práce měnily ve snaze podrobně sledovat závislost mezi podmínkami sycení a uvolněnou koncentrací klotrimazolu.

Měření probíhalo za přesně stanovených podmínek, které simulovaly neporušenou zdravou lidskou kůži při teplotě 32 °C a pH tlumivého roztoku 4,5. Při těchto podmínkách byly vloženy do 3 paralelně zapojených Franzových cel nanovláknenné membrány s navázaným klotrimazolem a po dobu 135 min byly podrobeny liberaci klotrimazolu do akceptorového média. Z tohoto média byly v pravidelných intervalech 15 min odebírány vzorky do systému

sekvenční injekční analýzy a obsah klotrimazolu byl on-line stanoven pomocí UV detekce. Výsledné liberační profily klotrimazolu z jednotlivých nanovláken byly porovnány. Hlavními sledovanými parametry byla rychlost uvolnění klotrimazolu do akceptorového média, koncentrace a profil uvolňování klotrimazolu.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Radovan Ernest

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Consultant: PhamDr. Martina Háková, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Monitoring of liberation tests for the release of clotrimazole from nanofibers

The diploma thesis was focused on the analysis of release profiles of clotrimazole from different types of nanofibres using non-separation flow technique, sequential injection analysis (SIA). Simultaneously the diploma thesis dealt with finding ideal conditions for saturation of the fibres with a solution of clotrimazole. Nanofibers were produced at the Technical university of Liberec.

The diploma thesis dealt with two types of nanofiber carriers - polymeric (polydioxanone and polycaprolactone) and ceramic (silica). Part of the fibre of polydioxanone and polycaprolactone was saturated directly during production in different ratios of polymer and clotrimazole. The saturated fibres were then analysed in the laboratory. The second part of polydioxanone and polycaprolactone together with ceramic nanofibers was produced in a pure state, i.e., without an active substance. These fibres were tested in the laboratory for saturation with an ethanolic solution of clotrimazole at a certain concentration for a certain time. The saturation conditions were changed during the work to closely monitor the relation between the saturation conditions and the released concentration of clotrimazole.

The measurements were performed under well-defined conditions that simulated intact healthy human skin at a temperature of 32 ° C and a pH of the buffer solution of 4.5. Under these conditions, nanofiber membranes with bound clotrimazole were placed in 3 Franz cells connected in parallel to a single SIA system and liberated level of clotrimazole in the acceptor medium was monitored for 135 min. Samples were aspirated from this medium at regular 15 min intervals

into a SIA system and the content of clotrimazole was determined on-line using UV detection. The resulting release profiles of clotrimazole from individual nanofibers were compared. The main monitored parameters were the release rate of clotrimazole into the acceptor medium, the concentration and the liberation profile of clotrimazole.

Obsah

1.	ÚVOD.....	1
2.	CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE.....	2
3.	TEORETICKÁ ČÁST	3
3. 1.	NESEPARAČNÍ PRŮTOKOVÉ TECHNIKY	3
3. 1. 1.	PRINCIP METODY	3
3. 1. 2.	VYUŽITÍ SYSTÉMU SIA	5
3. 1. 3.	AUTOMATIZACE V SYSTÉMU SIA	5
3. 2.	NANOVLÁKNA	7
3. 2. 1.	PŘÍPRAVA NANOVLÁKEN ELEKTROSTATICKÝM ZVLÁKŇOVÁNÍM	7
3. 2. 2.	VYUŽITÍ NANOVLÁKEN VE ZDRAVOTNICTVÍ	9
3. 2. 3.	POLYKAPROLAKTON.....	11
3. 2. 4.	POLYDIOXANON.....	12
3. 2. 5.	NANOVLÁKNA JAKO NOSIČE LÉČIV	14
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
4. 1.	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	15
4. 2.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	16
4. 3.	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	16
4. 4.	TESTOVÁNÍ NANOVLÁKEN	18
4. 5.	PARAMETRY MĚŘENÍ.....	19
4. 6.	LIBERACE KLOTRIMAZOLU.....	20
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	24
5. 1.	KALIBRAČNÍ ROZMEZÍ KLOTRIMAZOLU	24
5. 1. 1.	KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO VODNÝ ROZTOK	24
5. 1. 2.	KALIBRAČNÍ KŘIVKA V TLUMIVÉM ROZTOKU O PH 4,5.....	25
5. 2.	LIBERACE KLOTRIMAZOLU.....	27
5. 3.	LIBERAČNÍ STUDIE KLOTRIMAZOLU UVOLNĚNÉHO Z NANOVLÁKEN.....	29
5. 3. 1.	LIBERACE KLOTRIMAZOLU Z PDX A PCL SYCENÝCH KLOTRIMAZOLEM V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH PO DOBU 2,5 HOD.....	29
5. 3. 2.	LIBERACE KLOTRIMAZOLU Z PDX VLÁKEN SYCENÝCH PŘI VÝROBĚ V RŮZNÉM.....	32
5. 3. 3.	LIBERACE KLOTRIMAZOLU Z PCL VLÁKEN SYCENÝCH PŘI VÝROBĚ V RŮZNÉM POMĚRU POLYMERU A KLOTRIMAZOLU	36
5. 3. 4.	LIBERACE KLOTRIMAZOLU Z KŘEMIČITÝCH NANOVLÁKEN SYCENÝCH V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH	39
5. 3. 4. 1.	SYCENÍ KŘEMIČITÝCH VLÁKEN ETHANOLICKÝM ROZTOKEM KLOTRIMAZOLU O KONCENTRACI 2 MG/ML	39
5. 3. 4. 2.	SYCENÍ KŘEMIČITÝCH VLÁKEN ETHANOLICKÝM ROZTOKEM KLOTRIMAZOLU O KONCENTRACI 3 MG/ML	42

5. 3. 4. 3. SYCENÍ KŘEMIČITÝCH VLÁKEN ETHANOLICKÝM ROZTOKEM KLOTRIMAZOLU O KONCENTRACI 4 MG/ML	45
5. 3. 5. VZÁJEMNÉ POROVNÁNÍ LIBERACÍ KLOTRIMAZOLU Z PCL, PDX A KŘEMIČITÝCH VLÁKEN PŘI SYCENÍ V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH	48
5. 3. 6. LIBERACE KLOTRIMAZOLU Z PC VLÁKEN SYCENÝCH KLOTRIMAZOLEM PŘI LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH.....	49
6. ZÁVĚR.....	51
LITERATURA.....	53
PŘÍLOHY	57

Seznam zkratek

FIA – průtoková injekční analýza

NSF – Národní vědecká nadace

PC - polykarbonát

PCL – polykaprolakton

PDX – polydioxanon

PLLA – kyselina polyléčná

PVA - polyvinylalkohol

SIA – sekvenční injekční analýza

SIC – sekvenční injekční chromatografie

UV – VIS – ultrafialové-viditelné spektrum

1. Úvod

Sekvenční injekční analýza (SIA) byla vyvinuta během odstraňování nevýhod průtokové injekční analýzy. Tyto nevýhody spočívaly hlavně v kontinuálním toku, který v technice SIA lze kontrolovat, stejně tak i spotřeba činidel a reagensů [1].

Výhodou SIA systému je univerzálnost a jednoduchá manipulace s aspirovanými roztoky. Pořadí, objem, rychlost aspirovaných roztoků lze velice snadno měnit. Obousměrné čerpadlo umožňuje dokonalejší promísení vzorku s činidly a nosnou kapalinou. Do systému lze externě připojit velké množství procesů, které u systému SIA nevyžaduje velké úpravy uspořádání systému, ani optimalizace není tak náročná jako tomu bylo u průtokové injekční analýzy (FIA) [2]. SIA systém rovněž umožňuje monitorování procesů z dlouhodobého hlediska bez nutnosti zásahu obsluhy a tím je možné získat velmi podrobný profil daného procesu.

Nanovlákna jsou definována jako vlákna s průměrem menším než 500 nm. Ve zdravotnictví je to rozměr až do 1000 nm. Národní vědecká nadace (NSF) označuje nanovlákna jako ty, které mají alespoň jeden rozměr menší než 100 nm. Nanovlákna mají unikátní vlastnosti hlavně kvůli extrémně vysokému poměru povrchu k hmotnosti ve srovnání s běžnými netkanými textiliemi. Jejich využití je například v regenerativní medicíně, separačních procesech a izolacích [3].

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce je otestovat možné využití nanovláknenných materiálů jako nosičů pro klotrimazol a jeho liberační profil, popř. možnosti sycení nanovláknenného nosiče ethanolickými roztoky klotrimazolu za přesně definovaných podmínek. Experimentální část práce bude měřena s využitím systému SIA. Ve spolupráci s Technickou univerzitou v Liberci jsou k dispozici dva typy nanovláknenných nosičů, polymerní a keramické. A jeden komerčně dostupný nosič z polykarbonátu, který bude sloužit jako porovnávací, pro zjištění nejnižší možné koncentrace sycení.

Polymerní nosiče konkrétně polydioxanon (PDX) a polykaprolakton (PCL), na které bude v prvním případě zaváděn klotrimazol přímo při výrobě v různém poměru polymer : klotrimazol, budou přímo podrobeny liberačnímu testu a podle změřené absorbance bude přes rovnici kalibrační křivky zjištěno, jaká koncentrace klotrimazolu se vyskytuje v akceptorovém médiu a výsledky budou zaneseny do grafu liberačního profilu.

Nebo budou čisté polymerní nanovláknenné nosiče syceny v laboratorních podmínkách s využitím různého množství klotrimazolu a za různě dlouhou dobu. Takto nasycené nosiče budou podrobeny liberačním testům klotrimazolu a změřena absorbance aspirovaných vzorků. Poté bude následovat stejný postup jako u předchozího typu.

Jako druhé budou testovány keramické, konkrétně křemičité nanovláknenné nosiče, které jsou k dispozici pouze čisté, tj. bez navázaného klotrimazolu z výroby. Na těchto nosičích bude testována závislost mezi dobou sycení, koncentrací sytícího roztoku a množstvím uvolněného klotrimazolu do akceptorového média.

Následně bude provedeno porovnání možností sycení u různých typů nanovláken s cílem vybrat vhodný materiál a postup sycení pro rovnoměrnou a dlouhodobou liberaci klotrimazolu.

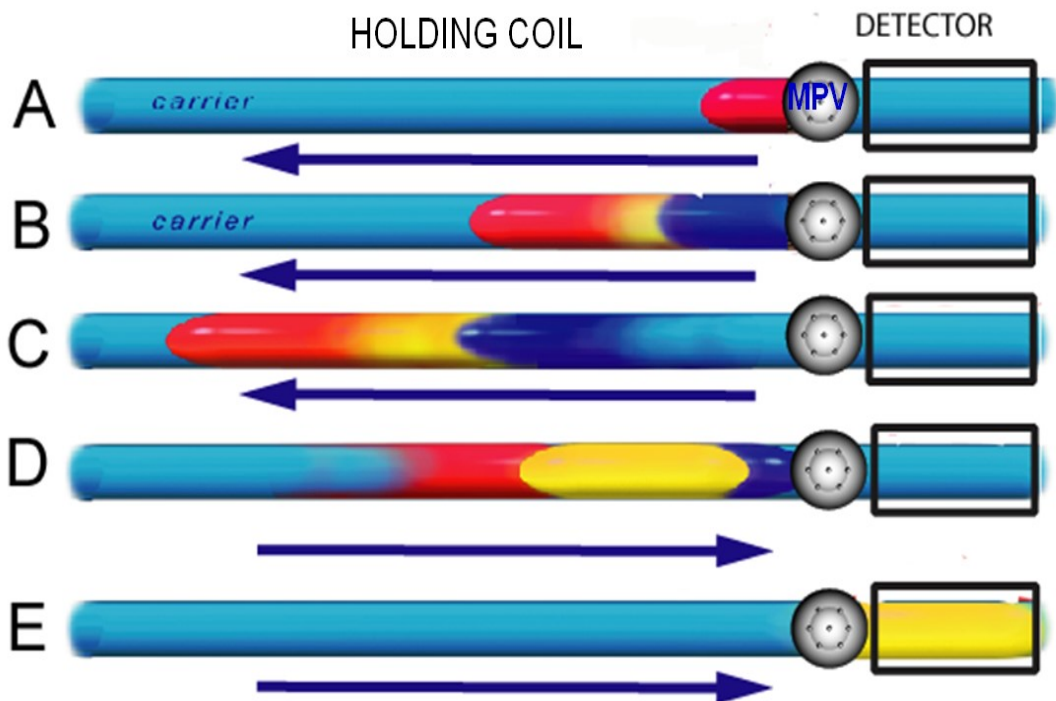
3. Teoretická část

3. 1. Neseparační průtokové techniky

Sekvenční injekční analýza (SIA) patří do skupiny průtokových analytických technik, které vynikají v tom, že díky nim lze automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků a díky tomu zvyšují produktivitu, přesnost a správnost zejména rutinních stanovení. SIA odstraňuje nevýhody a nedokonalosti průtokové injekční analýzy (FIA) [4]. Obrovskou výhodou techniky SIA je, že její provoz může být plně automatizovaný. Pomocí počítačového softwaru je umožněno ovládat objem a rychlost aspirace vzorku, reagentů a nosných kapalin [5]. Systém SIA dokáže využít různých druhů nosných kapalin, vyniká reprodukovatelností výsledků a velkou kapacitou systému [6].

3.1. 1. Princip metody

Principem SIA metody jsou oddělené cykly měření. Nejprve je aspirováno nosné médium, poté vzorek a činidla přímo do jednobanálního systému s využitím selektivního vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Následně dochází k obrácení pohybu čerpadla, tím dochází k dokonalejšímu promíslení kapalin uvnitř systému a vzniklý produkt je dopraven do detektoru; tím je jeden cyklus ukončen [4]. V detektoru dochází k detekci signálu stanovené látky a převodu do příslušného počítačového programu, který signál vyhodnotí jako pík. Speciální ovládací program umožňuje změny v nastavení SIA systému bez nutnosti zásahu do sestavení.



Obrázek 1 Princip SIA metody [7]

(Holding coil – mísící cívka, carrier – nosný proud, detector – detektor, MPV – vícecestný selekční ventil, červená – vzorek, modrá – činidlo, žlutá – produkt)

A – aspirace vzorku do mísící cívky

B – aspirace činidla

C – vzájemné promíchávání vzorku a činidla v mísící cívce

D – změna směru toku směsi, dokonalejší promísení, reakce, vznik produktu

E – transport produktu do detektoru a detekce signálu

3.1. 2. Využití systému SIA

Sekvenční injekční analýza nalézá uplatnění především při automatizovaném stanovení většiny anorganických iontů, které se běžně vyskytují v jednodušších vzorcích typu povrchové a pitné vody. Lze ji využít i pro stanovení velké skupiny organických látek včetně léčiv [4].

V oblasti farmacie lze využít systém SIA při hodnocení kvality a účinnosti léčiv, při stanovování obsahu účinné látky v substancích, lékových formách a biologických materiálech při současném využití citlivé detekce. V oblasti technologie léčiv se využívá ke zjišťování stejnoměrnosti obsahu účinné látky nebo k monitorování disolučního procesu pevných lékových forem [8].

SIA se uplatňuje při stanovení anorganických iontů ve vodě různého původu za účelem kontroly její kvality. Výhodné je současné stanovení několika druhů iontů bez nutnosti separace nebo opakovaného měření s různými činidly. Takto byly např. stanoveny ve vodě vápenaté, hořečnaté, železité, chloridové, fluoridové, dusitanové, dusičnanové ionty [4].

3.1.3. Automatizace v systému SIA

U časově náročných procesů je vhodné využít systém SIA, protože umožňuje on-line sledování kinetického profilu procesu bez nutnosti zásahu kvalifikované osoby. Výhoda automatizace spočívá v zabránění kontaminace vzorků, zamezení vzniku lidských chyb, snižují se náklady a zvyšuje se časová efektivita. Automatická analýza dále disponuje vyšší reprodukovatelností a spolehlivostí. U automatických systému většinou dochází k miniaturizaci a tím ke snížení nákladů na činidla a menší množství vyprodukovaného odpadu [9].

Kontrola kvality se u léčivých přípravků mimo jiné zabývá zjištěním obsahu uvolněné účinné látky z pevného léčivého přípravku, např. disoluční studie. Analytické metody, které se používají pro disoluční studie musí být selektivní, přesné a správné, protože jsou přítomny také pomocné látky (např. pojiva, suspenzační látky a konzervační látky). Automatizace pomocí techniky SIA splňuje všechny tyto požadavky a byla využita pro monitorování disolučních profilů s pomocí spektroskopické, luminiscenční a elektrochemické detekce [10]. Tabulka číslo 1 obsahuje výsledek rešerše, která byla provedena

s klíčovými slovy: Sequential Injection Analysis, Drug Liberation, Dissolution Test. Látky doxycyklin a ambroxol byly stanovovány pomocí metody SIC tak, že obě látky se nacházely v tobolce s prodlouženým uvolňováním.

Tabulka 1 Přehled farmaceutických látek monitorovaných a kvantifikovaných pomocí SIA systému

Stanovovaná látka	Léková forma	Detekce	Lineární rozsah	Doba testu (min)	Metoda stanovení	
Amoxicilin	Tablety	Spektrofotometricky při 210–340 nm	10–60 mg/l	2	Kvantifikace účinné látky	[11]
Doxycyklin	Tobolky s prodlouženým uvolňováním	Spektrofotometricky při 213 nm	2–100 µg/ml	6	SIC – sekvenční injekční analýza	[12]
Ambroxol	Tobolky s prodlouženým uvolňováním	Spektrofotometricky při 213 nm	2–100 µg/ml	4	SIC	[12]
Ibuprofen	Tablety	Spektrofotometricky při 222 nm	2– 350 mg/l	80	Disoluce	[13]
Indometacin	Mast	Fluorimetricky (λ_{ex} 330 nm; λ_{em} 385 nm)	0,05– 10 mg/l	360	Disoluce	[14]
Salicylová kyselina	Mast	Fluorimetricky (λ_{ex} 297 nm; λ_{em} 405 nm)	0,05– 10 µg/l	360	Disoluce	[15]
Vitamin C	Tablety	Spektrofotometricky při 262 nm	0 – 100 µg/ml	72	Disoluce	[16]
Kyselina acetylosalicylová	Tablety	Spektrofotometricky při 220–310 nm	44 – 220 mg/l	60	Disoluce	[17]

3. 2. Nanovlákna

Charakteristickou vlastností nanovláken je průměr vláken, která je menší než 1 mikrometr a délka vlákna je zpravidla o dva a více řádů vyšší. Nanovlákna se většinou nevyskytují samostatně, stejně jako například mikrovlákna, ale zaujímají postavení do vyšších strukturních a prostorových celků, se kterými lze manipulovat, [18] například v podobě vrstev na bázi netkané textilie. S nimi pak můžeme snáz manipulovat. Nanovlákenné netkané textilie svými vlastnostmi vybízejí k medicínskému využití. Ve vývoji jsou nové nanovlákenné materiály s řízenou biodegradabilitou [19]. Nanovlákna se mohou vyrábět různými způsoby jako je: elektrické zvlákňování, odstředivé zvlákňování, samoorganizování, meltblown technologie, tažení atd. Materiály pro jejich výrobu jsou nejčastěji polymery a keramika, které jsou převáděny do podoby nanovláken z roztokových prekurzorů organických rozpouštědel nebo z taveniny. Jejich specifickými užitnými vlastnostmi jsou vysoký měrný povrch, vysoká celková porozita spolu s interkonektivitou pórů, velmi dobrá schopnost krytí, široké možnosti jejich následné funkcionalizace.

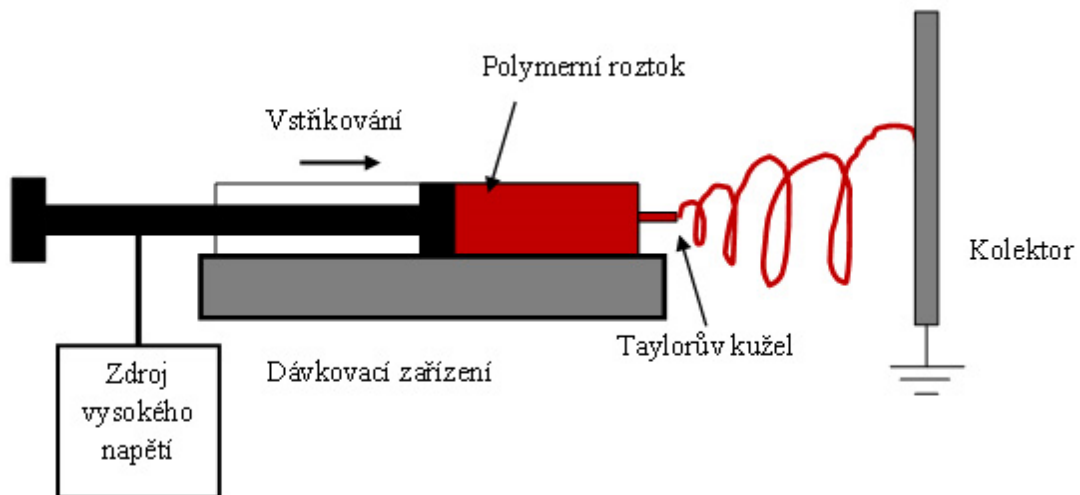
3. 2. 1. Příprava nanovláken elektrostatickým zvlákňováním

Na principu elektrostatického zvlákňování se mohou připravovat materiály pro tkáňové inženýrství, nosiče pro řízené uvolňování léčiv, kryty ran nebo vysoce účinné filtry. Příprava je založena na principu působení gradientu elektrického pole nejčastěji na polymerní roztok mezi dvěma elektrodami. Základní podoba technologie používaného k elektrickému zvlákňování se skládá ze dvou nabitých elektrod. Polymerní roztok je polarizovaný takzvanou zvlákňovací elektrodou nejčastěji v podobě kovové kapiláry, která je polarizovaná kladně. Od zvlákňovací elektrody je polymerní roztok přenášen elektrickým polem ve tvaru trysky formované do podoby nanovláken k záchytné protielektrodě (kolektoru), která je uzemněná nebo polarizovaná záporně. Tyto elektrody jsou připojeny na zdroj stejnosměrného proudu a vytvářejí systém na bázi asymetrického kondenzátoru.

Vlivem vnějšího elektrického pole, které zde vzniká mezi elektrodami, se polymerní roztok, který je v kontaktu se zvlákňovací elektrodou destabilizuje v podobě jemných trysek. Účinkem Coulombových sil se vzniklé trysky

prodlužují, a vzniká nepříčná úměra mezi poloměrem a kapilárním tlakem uvnitř trysky. Poloměr se zmenšuje a kapilární tlak uvnitř trysky stoupá. Neustále se zvyšující kapilární tlak způsobí, že jsou molekuly rozpouštědla vypuzovány a makromolekuly polymeru vytvoří pevná vlákna. Díky tomuto jevu se polymerní trysky přetvářejí v nanovlákna, která jsou zachycena na konci svého letu kolektorem. Tvar elektrody určuje zvláknitelnost. Existují dvě hlavní varianty elektrického zvláknování podle typu zvláknovací elektrody:

- Jehlové (kapilární) elektrické zvláknování – nízká výkonnost, starší technika
- Bezjehlové zvláknování – samovolný zrod několika stovek trysek z povrchu zvláknovacího roztoku (NanoSpider™) [19]



Obrázek 2 Princip kapilárního zvláknování [20]

Nanospider™

Tato metoda přípravy nanovláknenných vrstev využívá princip elektrostatického zvláknování z volné hladiny polymerního roztoku. U technologie Nanospider™ je jedna ze zvláknovacích elektrod, v tomto případě rotující válec, z části ponořen do roztoku polymeru, což je zcela odlišné od ostatních způsobů přípravy. Válec se neustále točí kolem své osy a na jeho povrchu ulpívá tenká vrstva polymerního roztoku. Kolektor v tomto způsobu přípravy má nejmenší vzdálenost s druhou elektrodou v horní části rotačního válce. Tato vzdálenost vlivem maximální intenzity elektrického pole způsobí vznik

Taylorových kuželů, které odstartují proces zvlákňování v horní části válce. Po dopadu na kolektor dochází k odpaření rozpouštědla a vlákna následně vytvoří pevnou strukturu [21].



Obrázek 3 Technologie NanoSpider™ [22]

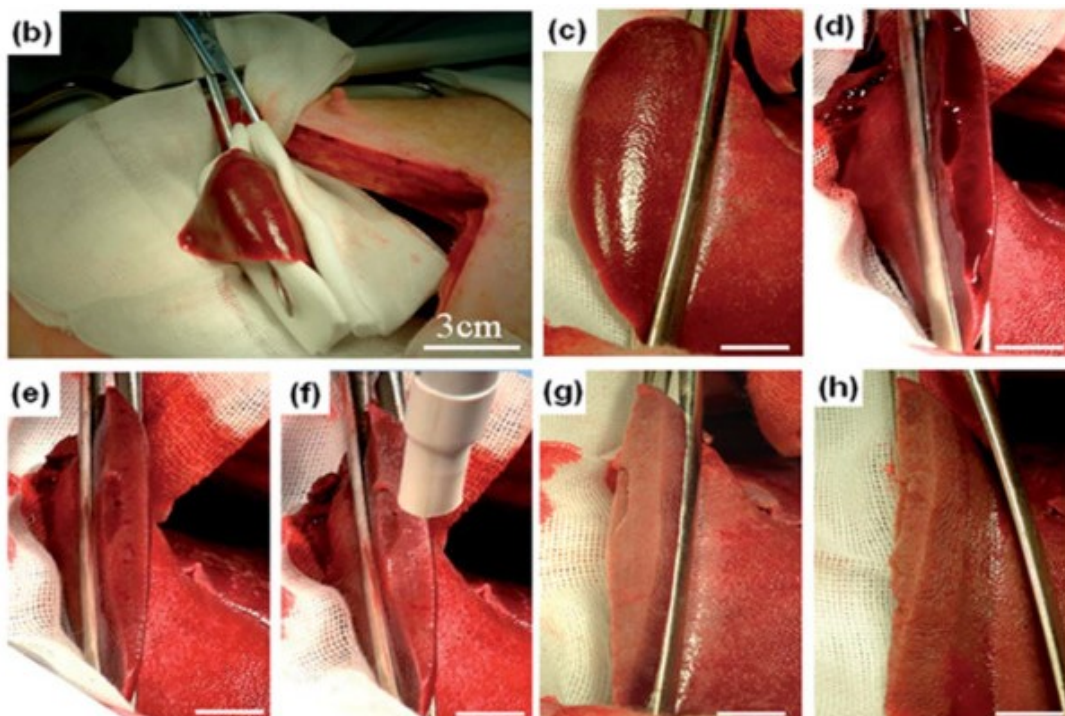
3. 2. 2. Využití nanovláken ve zdravotnictví

Nanovlákná vyrobená technologií elektrostatického zvlákňování poskytují vynikající platformu pro lokální podání léčivých látek. Jedná se například o antimikrobiální látky, antioxidanty, protizánětlivé léky, anestetika (Tabulka č. 2), které patří do skupiny látek využívaných pro účely hojení ran v kombinaci s elektrostaticky zvlákňovanými nanovláknami. Ve srovnání s tradičními systémy pro podání léčiv z nanovláken mohou elektricky zvlákněná nanovlákná rychleji reagovat na prostředí, umožnit kratší dobu odezvy organismu a přesnější kontrolu nad rychlostí uvolňování terapeutických látek v místě postižení [23].

Tabulka 2 Příklady využití nanovláken v lokální terapii [23]

Léčivá látka	Nanovlákná	Použití
Stříbro	Želatina, polyuretan	Antibakteriální
Gentamicin	Chitosan	Antibakteriální
Ciprofloxacin	Polyuretan/dextran, PVA (polyvinylalkohol)	Antibakteriální
Lidokain	PLLA (kyselina polymléčná)	Lokální anestetikum
Fibrinogen	PLLA	Hemostatikum

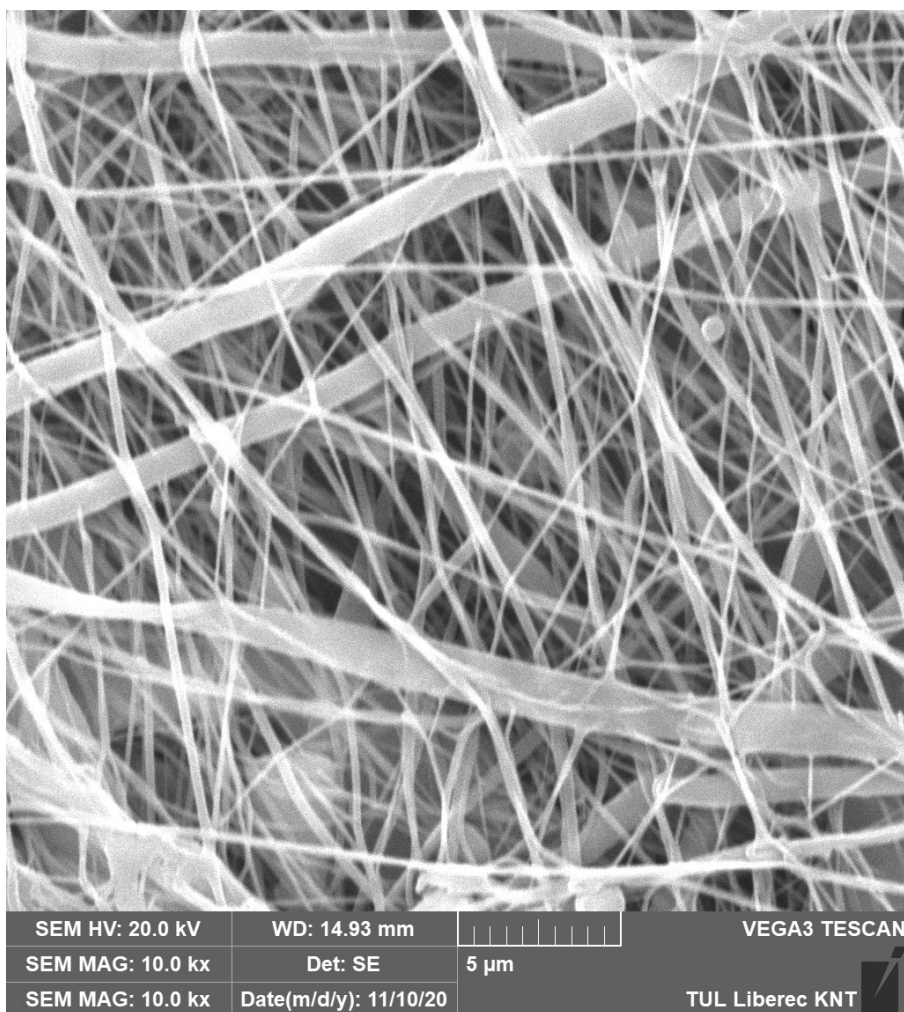
Dále je možné nanovlákná vyrobená elektrospiningem použít pro rychlou hemostázu, protože hemostatické složky mohou být smíchány přímo s vlákny při výrobě. Navíc nanovlákná s velkým specifickým povrchem a vysokou pórovitostí podporují proces hemostázy (viz. obrázek č. 4). Rychlá hemostáza obvykle vyžaduje počáteční aktivaci hemostatických složek v organismu. Proto dochází k začlenění hemostatických složek přímo do polymerního roztoku pomocí metody smísení složek v určitém poměru. Ve studiích nanovlákná s hemostatickými složkami a s berberinem, které byly začleněny do struktury poly-(ϵ - kaprolaktonového) membrány mohou podporovat *in vitro* hemostázu a tím dokážou minimalizovat krvácení z rány, inhibovat množení bakterií, tím zabránit infekci rány a podporovat růst buněk pro usnadnění hojení ran [24].



Obrázek 4 Ukázka zástavy krvácení s využitím nanovláknna [24]

3. 2. 3. Polykaprolakton

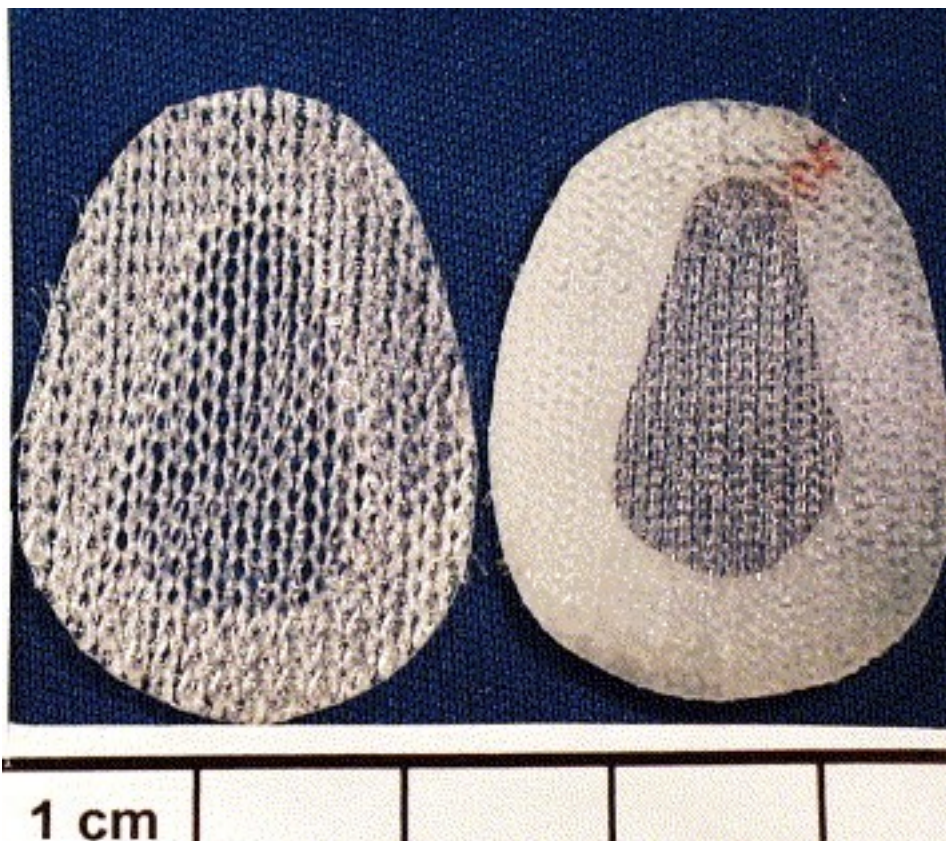
Poly-(ϵ -kaprolakton) je biologicky degradovatelný polymer řadící se do skupiny synteticky připravených alifatických polyesterů. Vlastností tohoto polymeru je hydrofobicita, semikrystalita a velice nízká teplota tání (60 °C). Struktura polykaprolaktonu obsahuje kvartérní dusík v hlavním řetězci a tím dochází k hydrolýze esterové vazby už za fyziologických podmínek. Tento polymer se může využívat jako tzv. scaffold, což jsou nosiče tkáňových kultur, využívaných při implantacích, dále jako materiál pro zastavení krvácení u vnitřních orgánů. Nízká odpověď lidského imunitního systému je důvodem jeho hojného použití v oblasti zdravotnictví [25]. PCL je také vhodný pro řízené uvolňování léčiv. Hlavně kvůli vysoké propustnosti pro mnoho léčiv, vynikající biokompatibilitě a jeho schopnosti být po absorpci v těle odbouráván. Biodegradace PCL je ve srovnání s jinými polymery pomalá, proto je nejvhodnější pro dlouhodobé uvolňování. Vlastnosti PCL umožňují také vytvářet kompatibilní směsi s jinými polymery, což může příznivě ovlivnit kinetiku degradace, a usnadní se tím cesta k požadovaným profilům uvolňování. Rychlost uvolňování léčiva závisí na způsobu přípravy, obsahu PCL, velikosti a procentu léčiva ve struktuře [26].



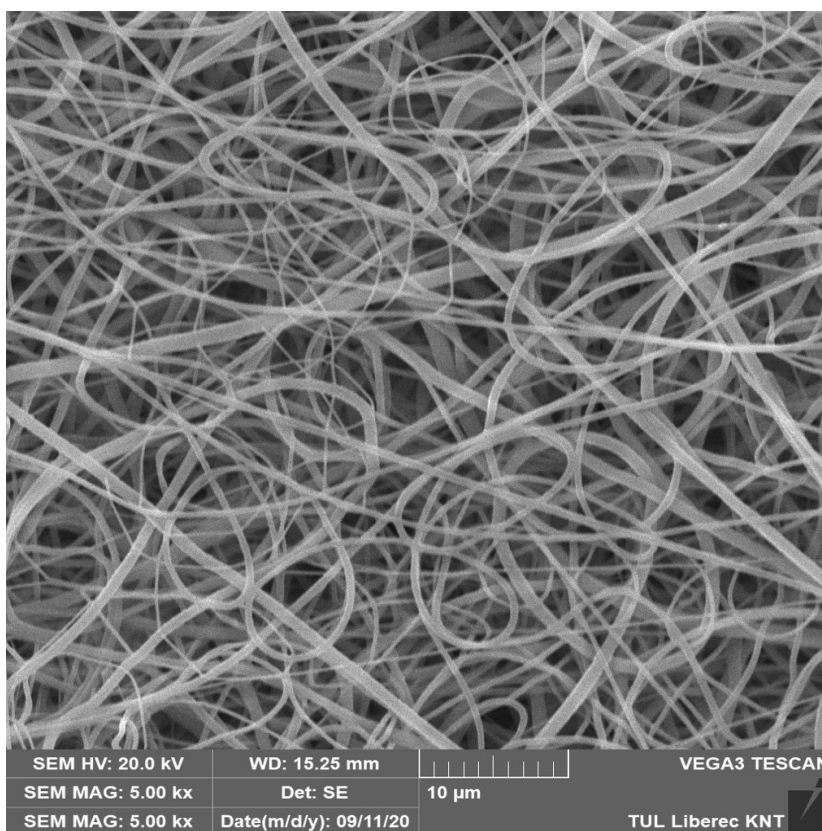
Obrázek 5 Vlákna polykaprolaktonu vyrobená technologií NanoSpider™, 5000x zvětšeno, zdroj: Technická univerzita v Liberci

3.2.4. Polydioxanon

Podle publikovaných studií má polydioxanon (PDX) vynikající biologickou degradovatelnost a biokompatibilitu. Díky těmto vlastnostem je široce využíván jako materiál pro opravu tkání a jako nosný materiál v lékařských oborech. Ale tento polymer vyžaduje další zkoumání z pohledu mechanismu *in vivo* a také jeho efektu na imunitní systém, aby bylo možné lépe porozumět úloze tohoto materiálu v imunitním systému [27].



Obrázek 6 Implantát z polydioxanonu na otevřené rány [28]



Obrázek 7 Vlákna polydioxanonu vyrobena technologií NanoSpider™, 5000x zvětšeno, zdroj: Technická univerzita v Liberci

3.2.5. Nanovlákná jako nosiče léčiv

Řízené uvolňování léčiv v sobě skrývá několik zásad, které je nutné dodržet, jednak je nutné dodržet rovnováhu mezi uvolňováním, vedlejšími účinky a pohodlím pacienta. Z tohoto pohledu jsou nanovlákná velice slibná. Léčivé látky mohou být jednoduše zakomponovány do struktury nanovláken díky metodě elektrostatického zvlákňování. Dle studií intenzita využívaného elektrického pole neovlivňuje stabilitu použité léčivé látky. Další vlastnosti nanovláken jako je měrný povrch, volba nosičů dle vlastností a elasticita jim dává nezměrné pole působnosti v různých oblastech medicíny. Zkoumaná léčiva měla různé farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti [29]. V tabulce číslo 3 se nachází výběr přípravků nalezených v odborné literatuře. Uvedené přípravky, které obsahují ibuprofen, donepezil, ondasetron mají již patentovou ochranu v USA zaměřenou na tento typ přípravy.

Tabulka 3 Přehled nanovlákných nosičů léčiv

Nanovlákný nosič	Léčivo	Indikace	Cesta podání	Čas disoluce/rozpadu	
Polyvinylpyrrolidon K30	Ibuprofen	Bolest, horečka, zánět	p.o.	8 sekund	[30]
Polyvinylalkohol	Donepezil	Alzheimer	p.o.	30 sekund	[31]
Polyvinylpyrrolidon K60	Paracetamol s kofeinem	Bolest, horečka	p.o.	0,5 sekundy	[32]
Polyvinylalkohol	Ondasetron	Nausea, zvracení	Bukální	10 sekund	[33]

4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje a pomůcky

SIA systém

- MicroSIA systém, FIALab Instruments, Bellevue, USA
- šesticestný selekční ventil + 5 ml pístové čerpadlo
- UV-VIS spektrofotometr Ocean Optics USB 4000, USA
- peristaltické čerpadlo Minipuls 3, Gilson
- peristaltické pružné hadičky (materiál PTFE, průměr 0,75 mm)
- FIALab software for Windows 5.0, verze 5.9.321, FIALab Instruments, Bellevue, USA

Tabulka 4 Membrány připravené Technickou univerzitou v Liberci

Zkratka	Název	Poměr zavádění klotrimazolu polymer : klotrimazol	Tloušťka membrány [μm]	Velikost pórů [μm]
PCL	Polykaprolakton	Sycen při přípravě	160	0,318
PCL	Polykaprolakton	4:1	40	0,433
PCL	Polykaprolakton	6:1	70	0,379
PCL	Polykaprolakton	8:1	80	0,369
PDX	Polydioxanon	Sycen při přípravě	160	0,569
PDX	Polydioxanon	2:1	160	0,779
PDX	Polydioxanon	4:1	100	0,721
PDX	Polydioxanon	6:1	110	0,719
PDX	Polydioxanon	8:1	140	0,687

Tabulka 5 Zkoušené membrány sycené za laboratorních podmínek

Zkratka	Název	Velikost pórů [μm]	Vlastnosti
Keramická	Křemičitá	0,237	Hydrofilní
PC	Polykarbonát	0,45	Hydrofilní
Zkratka	Koncentrace sytícího roztoku		Doba sycení
PDX	3 a 4 mg/ml		2,5 hodiny
PCL	4 mg/ml		2,5 hodiny
PC	2 mg/ml		2,5 hodiny

Franzovy difúzní cely (V = 15 ml)

Vodní lázeň

Termostat Julabo, Německo

Magnetická míchačka Cimarec – i Poly 15, Thermo Fisher Scientific, USA

pH 212 Microprocessor pH Meter, Hanna instruments, USA

Analytické váhy HR 120, A&D Japonsko

4.2. Použité chemikálie

Klotrimazol – 99–101 % Sigma, Praha, Česká republika

Ultračistá voda – připravená pomocí přístroje Millipore, Merck, Praha, Česká republika

Ethanol denaturovaný – Lihovar Kolín, Česká republika

Octan sodný 99,0 % - LACHEMA s. p. Brno, Česká republika

Kyselina octová 99,8 % - Penta, Praha, Česká republika

4.3. Příprava roztoků

Příprava zásobního roztoku klotrimazolu

Zásobní roztok byl připraven navážením 5 mg klotrimazolu a rozpuštěním v ethanolu v 10 ml odměrné baňce. Klotrimazol musel být rozpuštěn v ethanolu, protože je prakticky nerozpustný ve vodě. Výsledná koncentrace

byla 0,5 mg/ml. Roztok byl dle potřeby ředěn puřem či vodou pro přípravu pracovních roztoků k měření.

Připrava vodných standardních roztoků klotrimazolu

Před prvním měřením byly ze zásobního ethanolického roztoku klotrimazolu připraveny vodné standardní roztoky o koncentracích 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 $\mu\text{g/ml}$ do odměrných baněk s objemem 10 ml. Ze zásobního roztoku byl vždy odebrán přesný objem pomocí automatické pipety do odměrné baňky a ultračistou vodou doplněn po rysku.

Tabulka 6 Připrava vodných standardních roztoků klotrimazolu do celkového objemu 10 ml

Koncentrace standardu ($\mu\text{g/ml}$)	Množství zásobního roztoku (μl)
7,5	150
10,0	200
12,5	250
15,0	300
17,5	350
20,0	400

Připrava standardních roztoků klotrimazolu s puřem

Před prvním měřením byly ze zásobního ethanolického roztoku klotrimazolu připraveny tlumivé standardní roztoky o koncentracích 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20 $\mu\text{g/ml}$ do 10 ml odměrných baněk. Ze zásobního roztoku byl vždy odebrán přesný objem pomocí automatické pipety do odměrné baňky a tlumivým roztokem pH 4,5 doplněn po rysku (viz. Tabulka č. 6). Pro každodenní porovnání

byl připraven porovnávací roztok. Ze zásobního roztoku klotrimazolu $c = 0,5$ mg/ml. Bylo odpipetováno 0,6 ml zásobního roztoku klotrimazolu do odměrné baňky ($V = 20$ ml) a pufrem doplněno po rysku. Výsledná přibližná koncentrace byla 15 $\mu\text{g/ml}$.

Příprava octanového tlumivého roztoku o pH 4,5

Na 1 litr tlumivého roztoku bylo naváženo 2,990 g octanu sodného, který byl rozpuštěn ve 2 ml bezvodé kyseliny octové a doplněn na 1000 ml ultračistou vodou. Hodnota pH roztoku se pohybovala v rozmezí 4,5 \pm 0,01. Hodnota pH byla ověřena pH metrem, který byl před každým použitím kalibrován s využitím dvou standardních roztoků o známém pH (4,01; 7,01).

Příprava roztoků pro sycení nosičů

Roztoky pro sycení nanovlákných nosičů (PDX, PCL, křemičité) z Technické univerzity v Liberci měly koncentrace 2, 3, 4 mg/ml. Nižší koncentrace než 2 mg/ml nebyly měřitelné z důvodu nízkého signálu a při koncentraci vyšší než 5 mg/ml docházelo k vysrážení klotrimazolu uvnitř systému. Koncentrace 2, 3, 4 mg/ml byly připraveny navážením přesného množství klotrimazolu (40, 60, 80 mg) a kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 20 ml a doplněny ethanolem po rysku. Takto připravené roztoky sloužily jako sytící médium pro nosiče.

4.4. Testování nanovláken

V experimentu byly použity 4 druhy nanovláken viz. Použité přístroje. PCL, PDX a křemičitá membrána, byly vyrobeny Technickou univerzitou v Liberci za použití technologie NanoSpider.

Daný experiment se skládal ze dvou částí, v první jsme obdrželi nanovlákná ve formě vrstvy kulatého tvaru o průměru 3 cm a tloušťce 160 μm , které byly syceny v laboratorních podmínkách různou koncentrací roztoku klotrimazolu a po různě dlouhou dobu. Byla vytvořena série zásobních ethanolických roztoků klotrimazolu a ty byly použity k sycení. Nižší koncentrace než 2 mg/ml nedosahovaly dostatečného množství navázaného klotrimazolu a při koncentracích vyšších než 5 mg/ml docházelo k vysrážení klotrimazolu

uvnitř systému. Při výběru doby sycení byla jako nejnižší hodnota zvolena 1 hodina, poté bylo vyzkoušeno ještě sycení po dobu 2,5 hodiny a pro zjištění, zdali má doba sycení výrazný vliv na uvolněné množství, byla sycena série vzorků i 16 hodin. Dané nosiče byly vždy po 3 kusech umístěny do Petriho misky spolu s míchadlem a vloženy na magnetickou míchačku. Poté byly takto připravené nosiče zality 20 ml roztoku pro sycení o přesné koncentraci.

V druhé části bylo provedeno zavádění klotrimazolu přímo při výrobě nanovláken v Liberci. Při výrobě byl použit určitý poměr klotrimazolu a stavební jednotky polymeru, opět byly hodnoceny rozdíly při porovnání liberačních profilů získaných za stejných podmínek jako v předchozím případě.

Byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými typy sycení a hodnoceny v rámci liberačního profilu, ve kterém bylo sledováno, kolik klotrimazolu se z vláken uvolňuje v daném čase a do daného liberačního média tvořeného puřem o pH 4,5, které odpovídá fyziologickému pH neporušené lidské kůže.

4.5. Parametry měření

Pro vlastní měření byl využíván systém SIA s externě připojenými třemi liberačními jednotkami (Franzovy cely), který se skládal z těchto částí: zásobní lahev s ultračistou vodou, zásobní lahev s tlumivým roztokem o pH 4,5, osmicestný selekční ventil, teflonové spojovací hadičky, obousměrné pístové čerpadlo, USB Ocean Optics 4000 UV-VIS spektrofotometr, peristaltické čerpadlo, elastické hadičky pro peristaltické čerpadlo, odpadní lahev, termostat, magnetická míchačka. Systém SIA byl řízen pomocí počítačový program FIAlab for Windows 5.0.

Tabulka 7 Parametry měření v SIA systému

Objem Franzovy cely	15000 μ l
Aspirovaný objem nosného proudu (ultračistá voda)	1000 μ l
Objem pro promytí portu vzorkem	100 μ l
Rychlost aspirace vzorku	40 μ l/s
Objem pro doplnění Franzovy cely	180 μ l
Objem aspirovaného vzorku (dvě paralelní měření jednoho vzorku v daném čase)	2 x 40 μ l
Rychlost toku do detektoru	17 μ l/s
Detekce (vlnová délka)	210 nm
Otáčky magnetické míchačky	230 rpm
Rychlost peristaltické čerpadla	6
Teplota vodní lázně	32 °C

4.6. Liberace klotrimazolu

Vlastní měření probíhalo v SIA systému, který byl řízen ovládacím programem vytvořeným v software FIALab for Windows 5.0. SIA. Systém byl každé ráno po zapnutí dokonale promyt za použití většího objemu ultračisté vody a proces se několikrát opakoval (min. třikrát). Vzhledem k vysokým koncentracím klotrimazolu a jeho schopnosti se srážet ve vodném prostředí, bylo někdy nutné systém promýt ethanolem a následně několikrát ultračistou vodou. Výsledek promytí se dal snadno zjistit, podle odezvy signálu detektoru v detekční cele.

Proces liberace měl svá specifika. Vodní lázeň byla temperovaná na 32 °C (teplota povrchu nepoškozené lidské kůže), rychlost peristaltického čerpadla byla nastavena na 6 rpm a magnetická míchačka měla nastavenou rychlost 230 rpm (viz obrázek číslo 9). V takto připraveném SIA systému následovala příprava Franzových cel. Do dolní části byl až po okraj naplněn pufr pH 4,5 (přibližný objem 15,4 ml), bylo vloženo míchadlo a přes tuto dolní část byla pinzetou položena testovaná membrána. Muselo se s ní zacházet opatrně, při větším tlaku, by mohlo dojít k její poškození. Membrána musela být položena tak, aby v dolní části Franzovy cely nezůstaly bublinky vzduchu, které by zabránily kontaktu membrány s pufrem.

Přes dolní část s membránou byla vložena horní část, která byla zafixována pomocí elastických gumiček. Přes horní část byl přetažen proužek parafilmu, který měl zabraňovat případným únikům kapaliny odpařením. Takto zkompletovaná Franzova cela byla vložena do vytemperované vodní lázně. Do otvoru pro odběr vzorku byly vsunuty dvě hadičky, které byly spojeny se systémem přes peristaltické čerpadlo. Hadičky sloužily pro odběr vzorku a doplnění objemu tlumivého roztoku ve Franzově cele. Takto proběhlo zapojení 3 cel (zapojených přes různé porty selekčního ventilu), u kterých docházelo v pravidelných intervalech 5 minut k odběru a on-line proměření vzorku klotrimazolu.

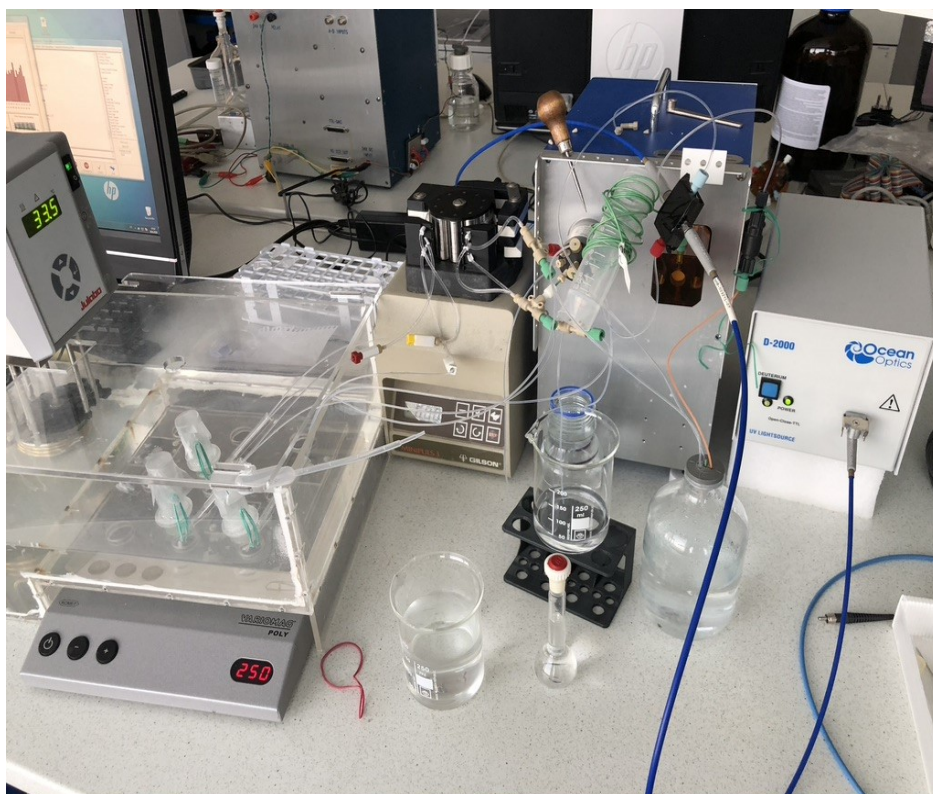
K měření vzorků byl zvolen přednastavený program, který analýzu řídil automaticky v délce jednoho cyklu 15 minut pro jednu celu. Základními kroky tohoto příkazu bylo promytí dávkovacího portu malým objemem vzorku a jeho následné odeslání do odpadu. Aspirace nosného proudu a vzorku a jeho odeslání do spektrofotometrického detektoru proběhlo dvakrát, potom následovalo doplnění přesného množství liberačního média (octanový pufr) do Franzovy cely (viz. Tabulka parametry a příloha s příkazy). Po každém měření byla část liberačního média (pufr 4,5) odeslána spolu s proměřeným vzorkem klotrimazolu do odpadu. Pokud by nedocházelo k doplnění liberačního média do Franzových cel, akceptorové médium by nebylo v přímém kontaktu s testovanou membránou a nedocházelo by k uvolnění klotrimazolu. Pro doplnění byl experimentálně zvolen objem 180 µl. Kdyby byl objem vyšší než objem média odeslaného do odpadu, docházelo by k úniku média raménkem Franzovy cely a hrozilo by poškození membrány.

Jelikož při každém doplnění média dojde k jeho naředění a postupnému snižování koncentrace klotrimazolu, je nutné s touto odchylkou při hodnocení výsledků počítat podle následujícího vzorce.

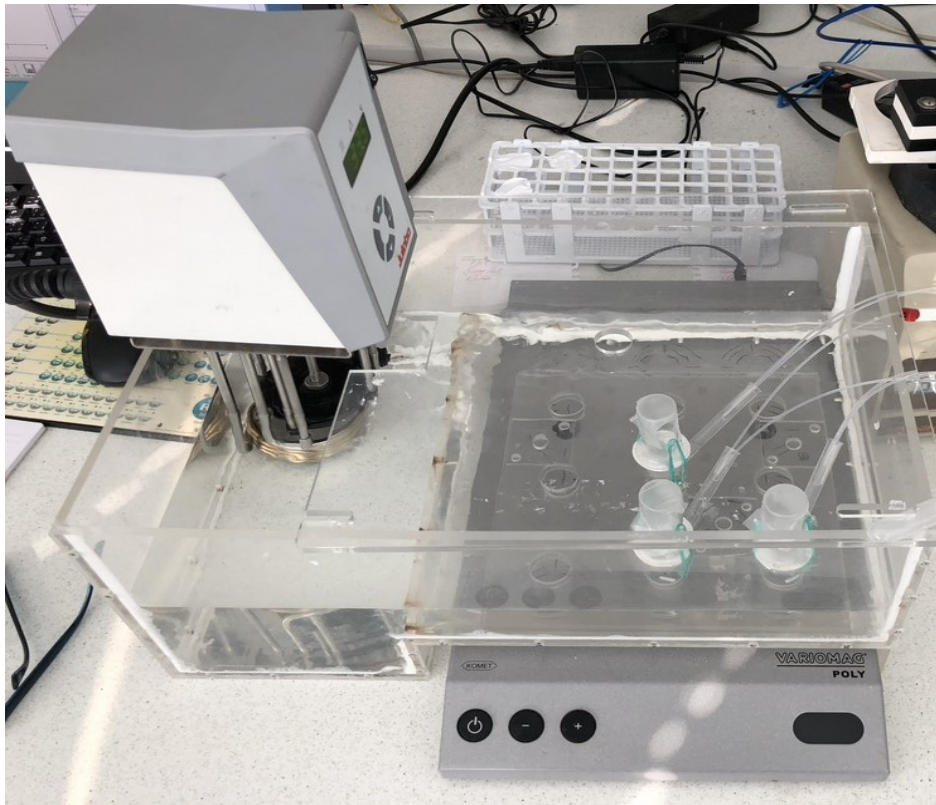
$$C_{n, \text{ korigovaná}} = C_{n, \text{ naměřená}} + \frac{\text{objem vzorku}}{\text{objem systému}} (c_1 + c_2 + \dots + c_{n-1})$$

Kalibrační rozsah

Pro testování kalibračního rozsahu bylo vybráno 6 různých koncentrací standardu klotrimazolu a samotné měření probíhalo ve dvou různých mediích, voda a pufr 4,5. Při měření bylo aspirováno 1000 μl nosného proudu a 40 μl vzorku. Každá koncentrace byla proměřena třikrát a byl vypočítán průměr těchto hodnot, který byl zanesen do grafu kalibrační závislosti. Byla tak ověřena linearita stanovení klotrimazolu v obou rozpouštědlech.



Obrázek 8 Zapojení systému SIA



Obrázek 9 Termostat, vodní lázeň, magnetická míchačka, Franzovy cely

5. Výsledky a diskuse

5.1. Kalibrační rozmezí klotrimazolu

Kalibrační rozmezí klotrimazolu bylo měřeno ve dvou prostředích, ve vodném médiu a v tlumivém pufru o pH 4,5. Minimální hodnota korelačního koeficientu „R“ 0,99 byla v obou případech dodržena.

5.1.1. Kalibrační křivka pro vodný roztok

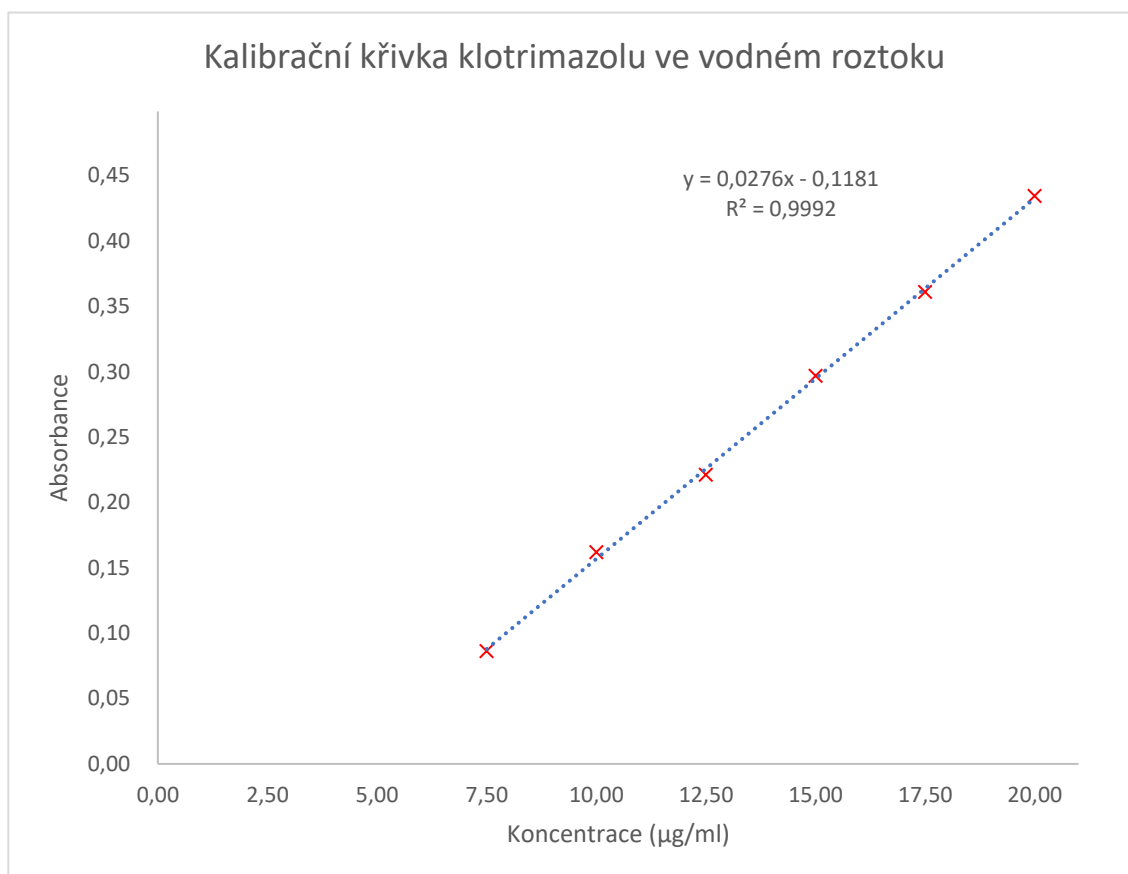
Pro změření kalibrační závislosti byly použity vodné roztoky klotrimazolu o koncentracích v rozsahu 7,5 – 20 µg/ml. Tyto roztoky byly připraveny ředěním zásobního ethanolickeho roztoku o koncentraci 0,5 mg/ml vodou na požadovanou koncentraci. Při vyšších koncentracích už nebylo možné udržet linearitu a docházelo také k vysrážení klotrimazolu.

Každý vzorek byl měřen čtyřikrát, kdy vždy první měření bylo vyškrtnuto z důvodu eliminace chyb a nežádoucích vlivů přechozích měření. Jako nosný proud se zde používala ultračistá voda o objemu 1 ml, bylo aspirováno 40 µl vzorku a rychlostí 17 µl/s byla tato směs poslána do detektoru. Byla měřena absorbance při vlnové délce 210 nm.

Výsledkem měření byla lineární závislost absorbance na koncentraci s rovnicí přímky $y = 0,0276x - 0,1181$ a korelační koeficient o hodnotě 0,9992, který udává dostatečnou linearitu.

Tabulka 8 Kalibrace v rozmezí 7,5 – 20,0 µg/m ve vodném prostředí

c (µg/ml)	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr	Směrodatná odchylka	RSD (%)
7,5	0,087	0,087	0,086	0,087	0,001	1,34
10,0	0,162	0,162	0,165	0,163	0,001	0,75
12,5	0,210	0,224	0,233	0,222	0,010	4,37
15,0	0,300	0,298	0,298	0,298	0,001	0,19
17,5	0,359	0,366	0,361	0,362	0,003	0,86
20,0	0,448	0,436	0,422	0,435	0,010	2,39



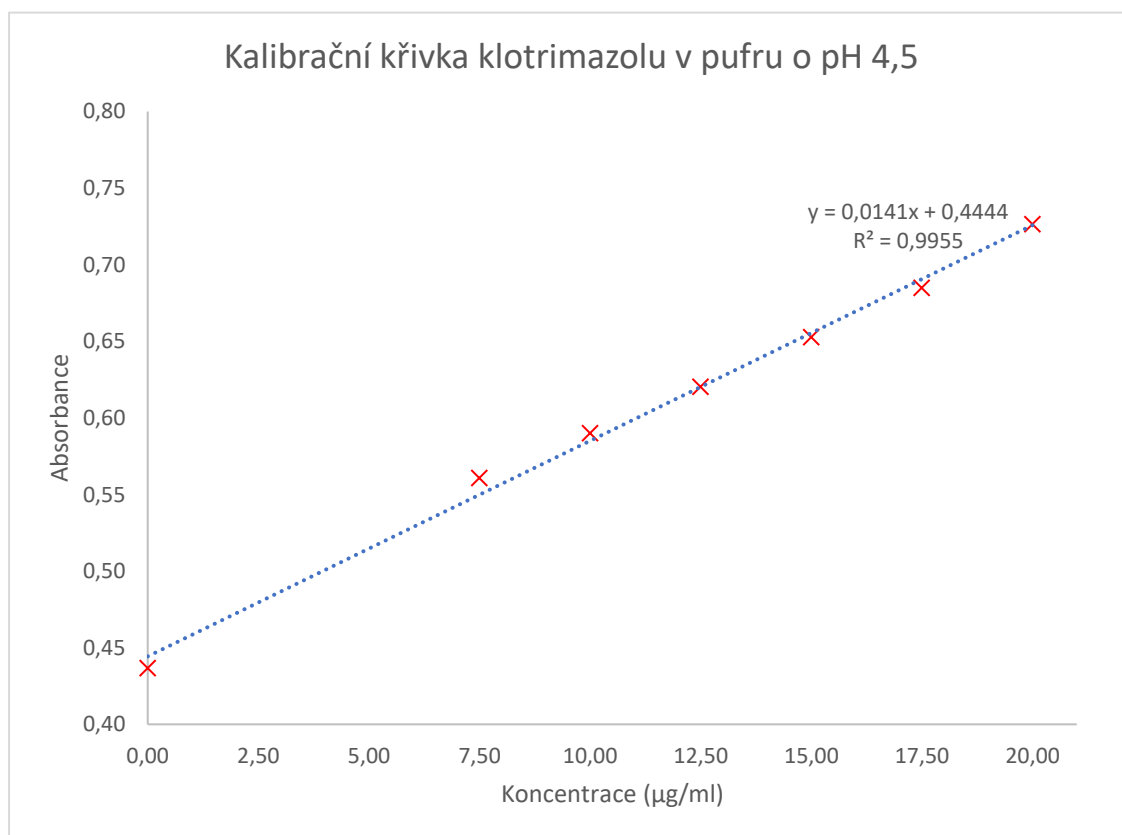
Obrázek 10 Kalibrační křivka klotrimazolu ve vodném prostředí

5. 1. 2. Kalibrační křivka v tlumivém roztoku o pH 4,5

V tomto případě byly kalibrační roztoky připraveny ze zásobního ethanolického roztoku $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ a naředěny pufrům o pH 4,5. Hodnoty koncentrací k proměření kalibrační závislosti zůstaly stejné, jako v případě vodného roztoku, ale jako nulová hodnota je zde pufr, který sám mírně absorbuje při dané vlnové délce. Výsledná rovnice přímky $y = 0,0141x + 0,4444$ a korelační koeficient o hodnotě 0,9955 vyjadřují lineární rozsah a vyhovující linearitu.

Tabulka 9 Kalibrace v rozmezí 7,5 – 20,0 µg/ml v tlumivém roztoku

c µg/ml	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	směrodatná odchylka	RSD (%)
pufr	0,440	0,438	0,432	0,437	0,003	0,78
7,5	0,564	0,556	0,562	0,561	0,004	0,64
10,0	0,564	0,602	0,604	0,590	0,019	3,16
12,5	0,616	0,637	0,608	0,620	0,012	1,97
15,0	0,644	0,659	0,656	0,653	0,007	1,02
17,5	0,688	0,679	0,688	0,685	0,004	0,63
20,0	0,705	0,746	0,728	0,726	0,017	2,29







Obrázek 11 Kalibrační křivka klotrimazolu za využití tlumivého roztoku o pH 4,5


5. 2. Liberace klotrimazolu


Měření probíhalo za využití různých druhů nanovláčených membrán (PC, PDX, PCL, keramická), které se lišily ve způsobu výroby, sycení, v koncentraci roztoku klotrimazolu použitého k sycení a v době sycení. Teplota vodní lázně 32 °C a pH 4,5 akceptorového média byly zvoleny tak, aby simulovaly zdravou neporušenou kůži.

Výsledkem měření byly dva píky o určité hodnotě absorbance, vzhledem k nedokonalosti systému (šum základní linie) byla výsledná absorbance odečítána ručně. Každá hodnota pak byla podrobena korekci, vzhledem k naředění akceptorového média. Průměrná hodnota ze dvou měření v daném časovém intervalu byla přepočítána (vzhledem k porovnávacímu roztoku, který byl každý den nově připravený a změřený před začátkem nebo na konci měření) na koncentraci a vynesena do grafu, kde reprezentovala koncentraci klotrimazolu uvolněnou v daném čase z určitého typu membrány. Ke všem bodům byly přidány chybové úsečky, které ukazují směrodatnou odchylku.

Tabulka 10 PDX a PCL membrány z Technické univerzity v Liberci, které byly sycené roztokem klotrimazolu v laboratoři.

Typ membrány / podmínky sycení	3 mg/ml po dobu 2,5 hodiny	4 mg/ml po dobu 2,5 hodiny
PDX	 *	 *
PCL	 *	 *

*  Membrány označené tímto symbolem byly připravené a použité v tomto experimentu

 Membrány označené tímto symbolem nebyly připravené a použité v tomto experimentu

Tabulka 11 PDX a PCL membrány, na které byl zaváděn klotrimazol přímo při výrobě na Technické univerzitě v Liberci.

Membrány/ poměr polymer: klotrimazol	2:1	4:1	6:1	8:1
PDX	✓ *	✓ *	✓ *	✓ *
PCL	✗ *	✓ *	✓ *	✓ *

* ✓ Membrány označené tímto symbolem byly připravené a použité v tomto experimentu

✗ Membrány označené tímto symbolem nebyly připravené a použité v tomto experimentu

Keramická – křemičitá nanovlákná

Tento typ membrány byl sycen pouze laboratorně, tj. z Technické univerzity v Liberci byla dodána pouze čistá nanovlákná. Pro každou membránu byla zvolena koncentrace sytícího roztoku a čas, po který byla membrána sycena, aby byla vytvořena jistá závislost mezi koncentrací sytícího roztoku, časem sycení a množstvím uvolněného klotrimazolu do akceptorového média.

Tabulka 12 Keramické membrány a způsob sycení

Koncentrace / čas sycení	1 hodina	2,5 hodiny	16 hodin
2 mg/ml	✓ *	✓ *	✓ *
3 mg/ml	✓ *	✓ *	✓ *
4 mg/ml	✓ *	✓ *	✓ *

* ✓ Membrány označené tímto symbolem byly připravené a použité v tomto experimentu

PC membrána

Tato komerčně prodávaná polykarbonátová membrána, byla vybrána pro porovnání výsledků. Jedná se o hydrofilní membránu s velikostí pórů 0,45 μm , která byla sycena roztokem o koncentraci 2 mg/ml po dobu 2,5 hodiny.

5. 3. Liberační studie klotrimazolu uvolněného z nanovláken

5. 3. 1. Liberace klotrimazolu z PDX a PCL sycených klotrimazolem v laboratorních podmínkách po dobu 2,5 hod

Tabulka 13 PDX nanovlákná sycená klotrimazolem o koncentraci 3 mg/ml po dobu 2,5 hodiny

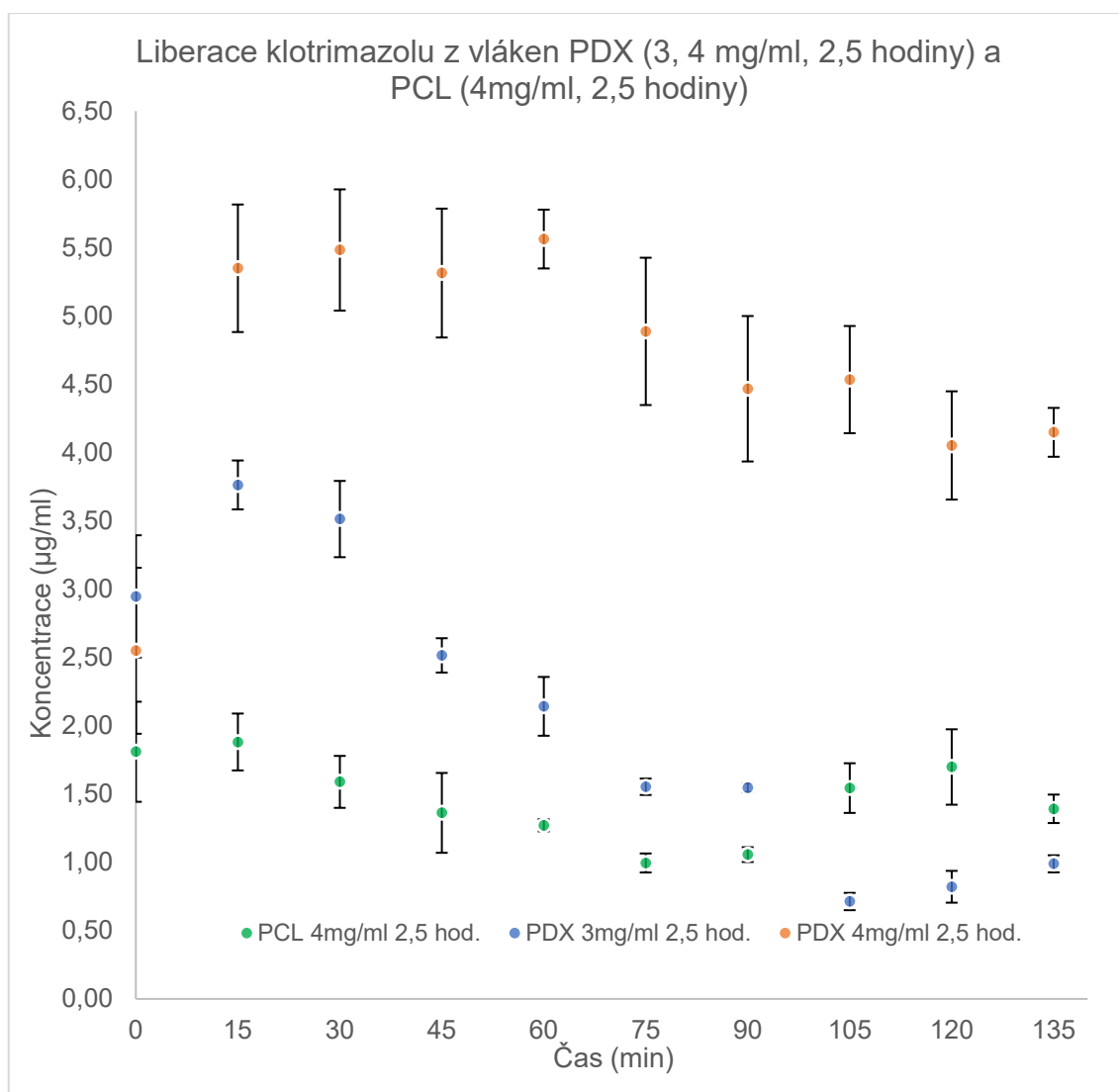
Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	suma před. měření	dopočet c [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	SD	RSD (%)
0	0,436	0,467	0,455	0,452	2,947	0,000	2,947	0,013	2,84
15	0,458	0,470	0,461	0,463	3,679	6,626	3,763	0,005	1,11
30	0,465	0,464	0,447	0,459	3,386	10,012	3,513	0,008	1,75
45	0,443	0,449	0,440	0,444	2,358	12,370	2,515	0,004	0,81
60	0,447	0,433	0,435	0,438	1,960	14,330	2,142	0,006	1,41
75	0,431	0,430	0,427	0,430	1,354	15,684	1,553	0,002	0,40
90	0,430	0,428	0,430	0,429	1,331	17,015	1,546	0,001	0,22
105	0,416	0,416	0,420	0,417	0,491	17,506	0,713	0,002	0,44
120	0,420	0,414	0,422	0,419	0,592	18,099	0,821	0,003	0,80
135	0,423	0,419	0,421	0,421	0,750	18,849	0,989	0,002	0,43

Tabulka 14 PDX nanovlákná sycená klotrimazolem o koncentraci 4 mg/ml po dobu 2,5 hodiny

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,422	0,459	0,459	0,447	2,549	0,000	2,549	0,017	3,91
15	0,468	0,499	0,489	0,485	5,250	7,799	5,349	0,013	2,68
30	0,469	0,497	0,493	0,486	5,317	13,116	5,483	0,012	2,51
45	0,469	0,500	0,480	0,483	5,084	18,200	5,314	0,013	2,67
60	0,479	0,493	0,486	0,486	5,266	23,466	5,563	0,005	1,12
75	0,458	0,494	0,473	0,475	4,532	27,998	4,887	0,015	3,07
90	0,451	0,486	0,469	0,468	4,061	32,059	4,467	0,014	3,03
105	0,456	0,481	0,469	0,469	4,076	36,134	4,534	0,010	2,14
120	0,447	0,467	0,469	0,461	3,550	39,684	4,052	0,010	2,20
135	0,458	0,467	0,461	0,462	3,600	43,284	4,148	0,004	0,82

Tabulka 15 PCL nanovlákná sycená klotrimazolem o koncentraci 4 mg/ml po dobu 2,5 hodiny

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,524	0,498	0,508	0,510	1,809	0,000	1,809	0,011	1,26
15	0,518	0,504	0,510	0,510	1,835	3,644	1,881	0,006	0,05
30	0,508	0,511	0,498	0,506	1,524	5,168	1,589	0,005	0,13
45	0,502	0,492	0,513	0,502	1,280	6,448	1,362	0,008	0,08
60	0,499	0,503	0,501	0,501	1,174	7,623	1,271	0,001	1,18
75	0,497	0,494	0,498	0,497	0,887	8,510	0,995	0,002	0,15
90	0,498	0,496	0,499	0,497	0,937	9,447	1,057	0,001	0,23
105	0,505	0,498	0,510	0,504	1,406	10,853	1,544	0,005	0,19
120	0,517	0,499	0,503	0,506	1,541	12,394	1,698	0,008	0,16
135	0,505	0,499	0,501	0,501	1,219	13,613	1,392	0,003	1,04



Obrázek 12 Závislost koncentrace na čase pro vzorky PDX (3 a 4 mg/ml) a PCL (4 mg/ml) při sycení v laboratorních podmínkách 2,5 hodiny

Zhodnocení: Membrána z polykaprolaktonu (PCL), která byla sycena ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 4 mg/ml, dosahovala pouze minimální hodnoty koncentrace uvolněné do akceptorového média, která začala ihned po začátku měření klesat. Hodnota změřené koncentrace byla zřejmě způsobena pouze malým množstvím povrchově navázaného klotrimazolu na polymerní materiál. Oproti tomu sycený nanovlákněný polymer polydioxanon (PDX) vykazoval vyšší koncentrace i při nižší koncentraci sytícího roztoku než polykaprolakton. Nicméně profily obou polydioxanonových vzorků nasvědčují tomu, že došlo k velmi rychlému uvolnění veškerého navázaného klotrimazolu a k následnému pomalému poklesu koncentrace v akceptorovém

médiu. Chybové úsečky jsou vztaženy na hodnoty směrodatné odchylky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulkách č. 13 – 15.

5. 3. 2. Liberace klotrimazolu z PDX vláken, na které byl klotrimazol zaváděn při výrobě, v různém poměru polymeru a klotrimazolu

Tabulka 16 PDX nanovláknna, na které byl zaváděn klotrimazol v poměru 2:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [μg/ml]	suma před. měření	dopočet c [μg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,513	0,551	0,581	0,548	4,453	0,000	4,453	0,028	5,08
15	0,528	0,606	0,619	0,584	6,963	11,417	7,108	0,041	6,94
30	0,523	0,613	0,629	0,588	7,234	18,651	7,470	0,047	7,96
45	0,527	0,631	0,658	0,606	8,422	27,073	8,765	0,057	9,36
60	0,548	0,635	0,661	0,615	9,056	36,130	9,514	0,048	7,82
75	0,539	0,634	0,686	0,620	9,405	45,535	9,982	0,061	9,83
90	0,537	0,635	0,691	0,621	9,508	55,043	10,205	0,064	10,25
105	0,539	0,633	0,657	0,610	8,717	63,761	9,525	0,051	8,33
120	0,526	0,616	0,672	0,604	8,348	72,108	9,261	0,060	9,96
135	0,527	0,616	0,678	0,607	8,517	80,625	9,538	0,062	10,24

Tabulka 17 PDX nanovláknna, na které byl zaváděn klotrimazol v poměru 4:1

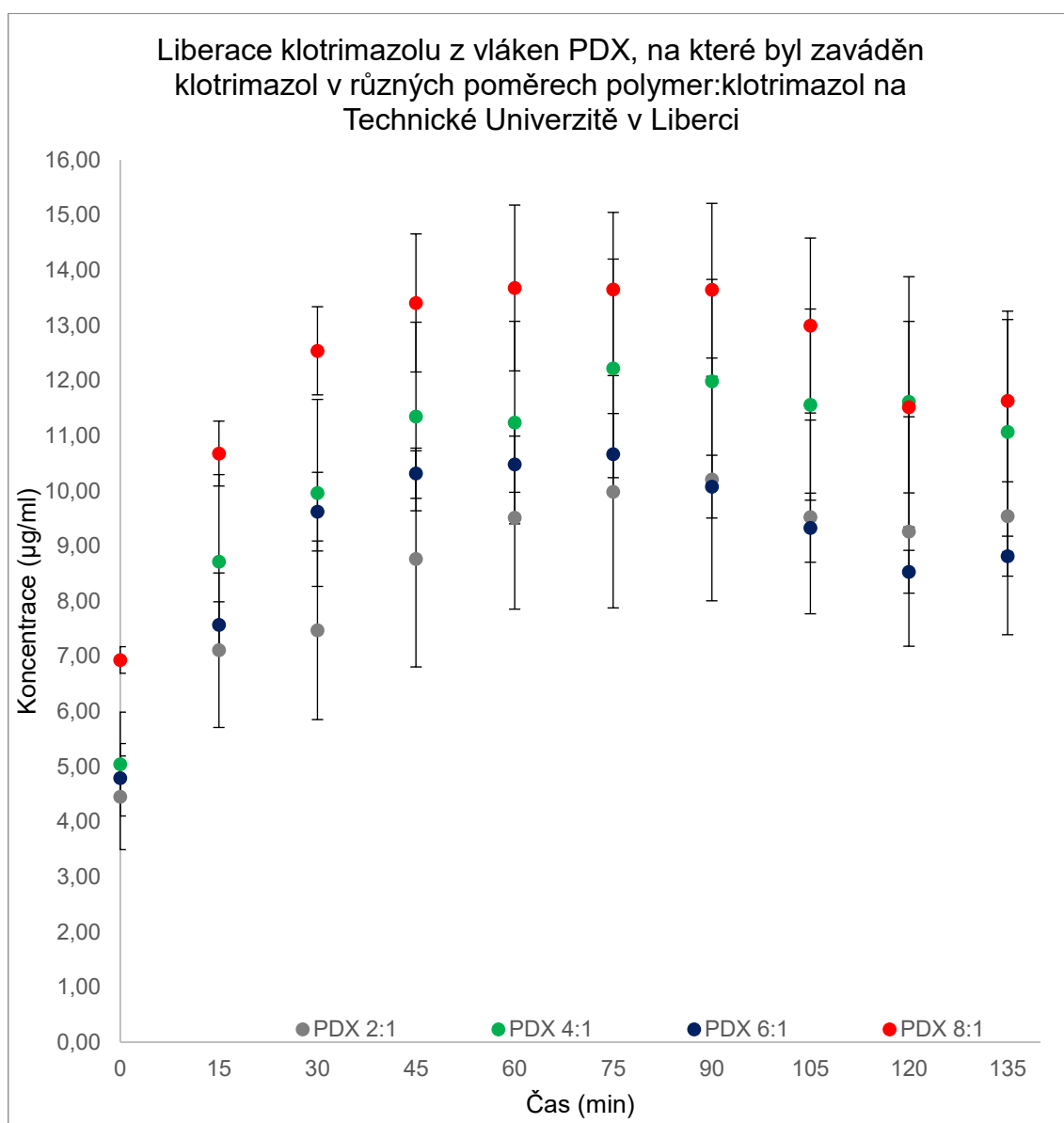
Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,521	0,563	0,586	0,557	5,043	0,000	5,043	0,027	4,89
15	0,545	0,632	0,645	0,607	8,546	13,589	8,718	0,045	7,35
30	0,556	0,659	0,655	0,624	9,666	23,255	9,961	0,048	7,63
45	0,575	0,672	0,678	0,642	10,914	34,169	11,347	0,047	7,38
60	0,567	0,676	0,672	0,638	10,669	44,838	11,237	0,050	7,90
75	0,578	0,708	0,664	0,650	11,505	56,343	12,219	0,054	8,33
90	0,577	0,695	0,662	0,645	11,132	67,475	11,987	0,050	7,68
105	0,574	0,683	0,653	0,637	10,573	78,048	11,562	0,046	7,17
120	0,553	0,697	0,656	0,635	10,491	88,539	11,613	0,060	9,51
135	0,551	0,690	0,637	0,626	9,825	98,364	11,071	0,057	9,16

Tabulka 18 PDX nanovláknna, na které byl zaváděn klotrimazol v poměru 6:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,447	0,471	0,472	0,463	4,792	0,000	4,792	0,012	2,55
15	0,488	0,517	0,501	0,502	7,414	12,207	7,569	0,012	2,42
30	0,527	0,558	0,508	0,531	9,347	21,554	9,620	0,021	3,93
45	0,537	0,557	0,525	0,540	9,918	31,472	10,317	0,013	2,41
60	0,556	0,545	0,520	0,540	9,956	41,429	10,481	0,015	2,75
75	0,563	0,548	0,512	0,541	10,014	51,442	10,665	0,021	3,95
90	0,540	0,543	0,508	0,530	9,305	60,747	10,074	0,016	3,02
105	0,528	0,532	0,493	0,518	8,453	69,200	9,330	0,017	3,38
120	0,510	0,513	0,490	0,504	7,559	76,759	8,531	0,010	2,03
135	0,505	0,520	0,497	0,507	7,743	84,502	8,814	0,009	1,85

Tabulka 19 PDX nanovlákna, na které byl zaváděn klotrimazol v poměru 8:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [μg/ml]	suma před. měření	dopočet c [μg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,485	0,501	0,499	0,495	6,931	0,000	6,931	0,007	1,45
15	0,532	0,571	0,540	0,547	10,453	17,384	10,674	0,017	3,15
30	0,556	0,606	0,557	0,573	12,164	29,548	12,538	0,023	4,06
45	0,562	0,634	0,553	0,583	12,868	42,416	13,405	0,036	6,22
60	0,557	0,646	0,552	0,585	12,976	55,392	13,677	0,043	7,39
75	0,559	0,638	0,550	0,582	12,788	68,179	13,651	0,040	6,79
90	0,547	0,642	0,550	0,580	12,620	80,799	13,643	0,044	7,61
105	0,543	0,630	0,531	0,568	11,824	92,623	12,997	0,044	7,76
120	0,525	0,603	0,503	0,544	10,214	102,837	11,517	0,043	7,84
135	0,506	0,599	0,526	0,544	10,202	113,038	11,633	0,040	7,30



Obrázek 13 Závislost koncentrace na čase pro vzorky typu PDX v poměrech zavádění klotrimazolu (polymer:klotrimazolu) 2:1, 4:1, 6:1, 8:1

Zhodnocení: Nanovláknenné polymery s navázaným klotrimazolem při výrobě vykazují velice podobné profily liberace. U vzorku PDX 8:1 můžeme vidět nejvyšší nárůst koncentrace z důvodu lepšího navázání klotrimazolu při výrobě. Maximální přidané množství klotrimazolu je ovlivněno mnoha faktory, například jeho rozpustností ve zvláknovacím roztoku, nebo ovlivnění zvláknitelnosti polymerního roztoku v elektrickém poli. V praxi existuje limit pro zvláknění. V tomto případě se pohybujeme okolo zmíněného limitu. Čím vyšší poměr, tím nižší výsledné koncentrace z důvodu menšího množství nanovláken a tím horší schopnosti navázat klotrimazol. Velké chybové úsečky jsou zřejmě

dány nejednotnými podmínkami při výrobě. Chybové úsečky jsou vztaženy na hodnoty směrodatné odchylky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulkách č. 16 – 19.

5. 3. 3. Liberace klotrimazolu z PCL vláken, na které byl klotrimazol zaváděn při výrobě, v různém poměru polymeru a klotrimazolu

Tabulka 20 PCL nanovláknna, na které byl zaváděn klotrimazol v poměru 4:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,431	0,477	0,474	0,461	4,616	0,000	4,616	0,021	4,59
15	0,513	0,510	0,509	0,511	7,974	12,589	8,133	0,001	0,28
30	0,529	0,530	0,518	0,526	8,995	21,584	9,268	0,006	1,05
45	0,545	0,548	0,531	0,541	10,042	31,626	10,442	0,007	1,33
60	0,544	0,551	0,529	0,541	10,021	41,647	10,549	0,009	1,71
75	0,547	0,528	0,511	0,529	9,181	50,828	9,824	0,015	2,78
90	0,540	0,550	0,519	0,537	9,730	60,558	10,497	0,013	2,40
105	0,533	0,550	0,519	0,534	9,530	70,088	10,418	0,013	2,38
120	0,530	0,538	0,510	0,526	8,995	79,083	9,997	0,011	2,18
135	0,528	0,514	0,505	0,515	8,291	87,374	9,397	0,010	1,85

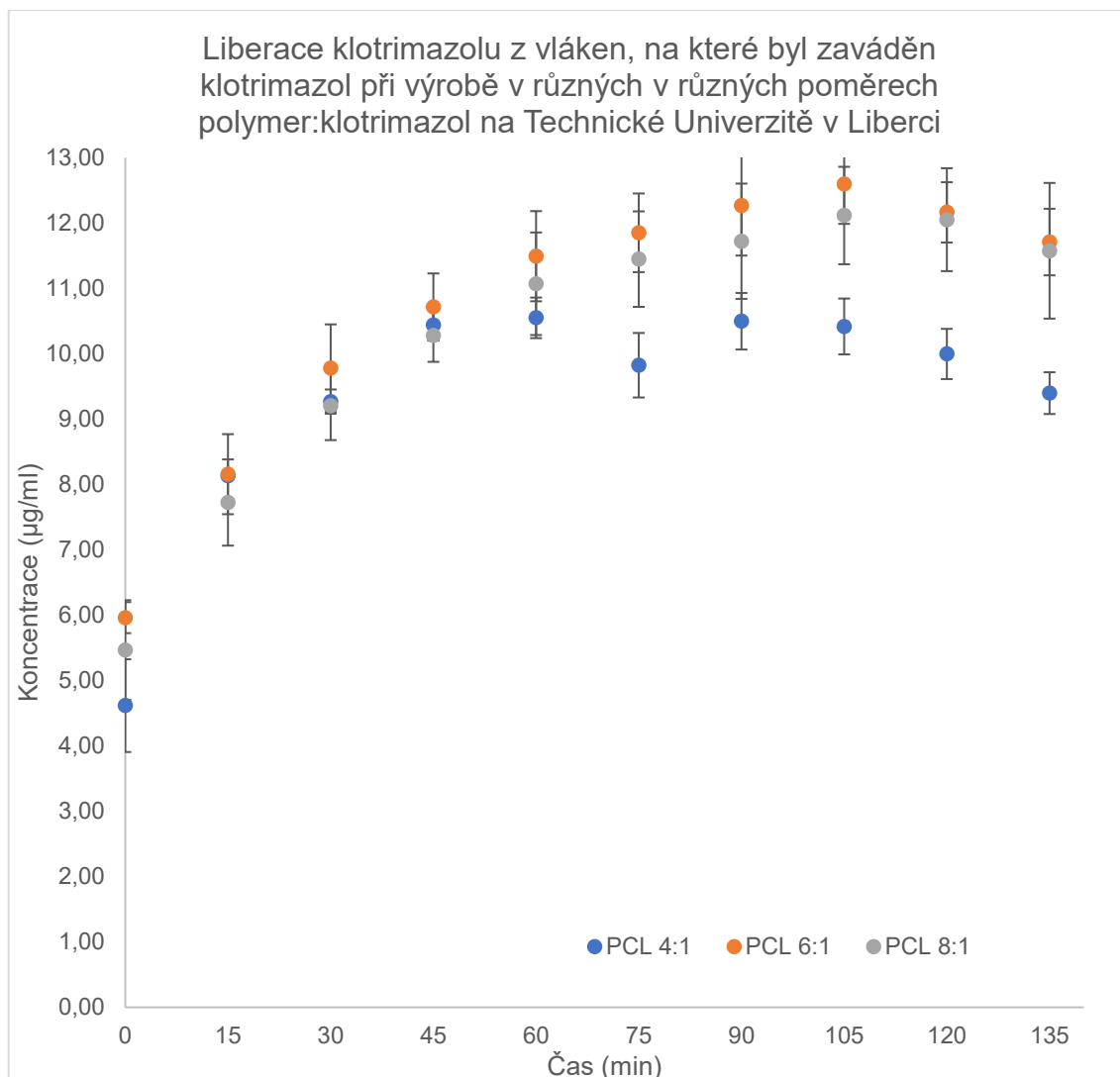
Tabulka 21 PCL nanovláknna, na které byl zaváděn klotrimazol v poměru 6:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,476	0,475	0,491	0,481	5,962	0,000	5,962	0,007	1,47
15	0,486	0,529	0,517	0,511	7,981	13,943	8,157	0,018	3,57
30	0,508	0,557	0,534	0,533	9,483	23,426	9,780	0,020	3,74
45	0,525	0,548	0,562	0,545	10,288	33,714	10,715	0,015	2,81
60	0,526	0,574	0,564	0,555	10,927	44,641	11,492	0,021	3,70
75	0,532	0,569	0,572	0,558	11,144	55,785	11,851	0,018	3,21
90	0,530	0,580	0,576	0,562	11,416	67,201	12,267	0,023	4,05

105	0,539	0,576	0,579	0,565	11,598	78,799	12,596	0,018	3,21
120	0,537	0,567	0,564	0,556	11,026	89,824	12,163	0,014	2,47
135	0,527	0,563	0,553	0,547	10,439	100,263	11,709	0,015	2,77

Tabulka 22 PCL nanovlákná , na které byl zaváděn klotrimazol v poměru 8:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,445	0,474	0,501	0,473	5,467	0,000	5,467	0,023	4,79
15	0,477	0,518	0,519	0,504	7,559	13,026	7,724	0,020	3,89
30	0,504	0,541	0,530	0,525	8,927	21,953	9,205	0,016	2,99
45	0,532	0,556	0,529	0,539	9,877	31,830	10,280	0,012	2,23
60	0,528	0,581	0,537	0,549	10,534	42,364	11,071	0,023	4,26
75	0,541	0,583	0,533	0,552	10,775	53,138	11,448	0,022	3,94
90	0,534	0,591	0,537	0,554	10,910	64,049	11,722	0,026	4,74
105	0,540	0,589	0,545	0,558	11,162	75,211	12,115	0,022	3,98
120	0,547	0,587	0,531	0,555	10,959	86,170	12,051	0,023	4,22
135	0,528	0,589	0,520	0,546	10,353	96,523	11,575	0,031	5,66



Obrázek 14 Závislost koncentrace na čase pro vzorky typu PCL v poměrech zavádění klotrimazolu (polymer:klotrimazol) 2:1, 4:1, 6:1, 8:1

Zhodnocení: Jednotlivé křivky liberačních profilů jsou si velice podobné. Na začátku vidíme u všech velice rychlý nárůst koncentrace, přičemž pro vzorek PCL 4:1 vidíme rychlejší růst koncentrace, ale také že se růst dříve než u ostatních zastavil a stagnoval. Pokles začal přibližně u všech stejně, okolo 110. minuty měření. I zde můžeme vidět, že vyšší poměr mezi polymerem a klotrimazolem (vyšší obsah klotrimazolu ve zvláknovacím roztoku) u vzorku 4:1, má za následek nižší hodnoty výsledné koncentrace uvolněného klotrimazolu. To může být způsobeno například nedostatečnou rozpustností léčiva ve zvláknovacím roztoku. Profily poměrů 6:1 a 8:1 jsou téměř identické. Chybové úsečky jsou vztahy na hodnoty směrodatné odchylky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulkách č. 20 – 22.

5. 3. 4. Liberace klotrimazolu z křemičitých nanovláken sycených v laboratorních podmínkách

5. 3. 4. 1. Sycení křemičitých vláken ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml

Tabulka 23 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml po dobu 1 hodiny

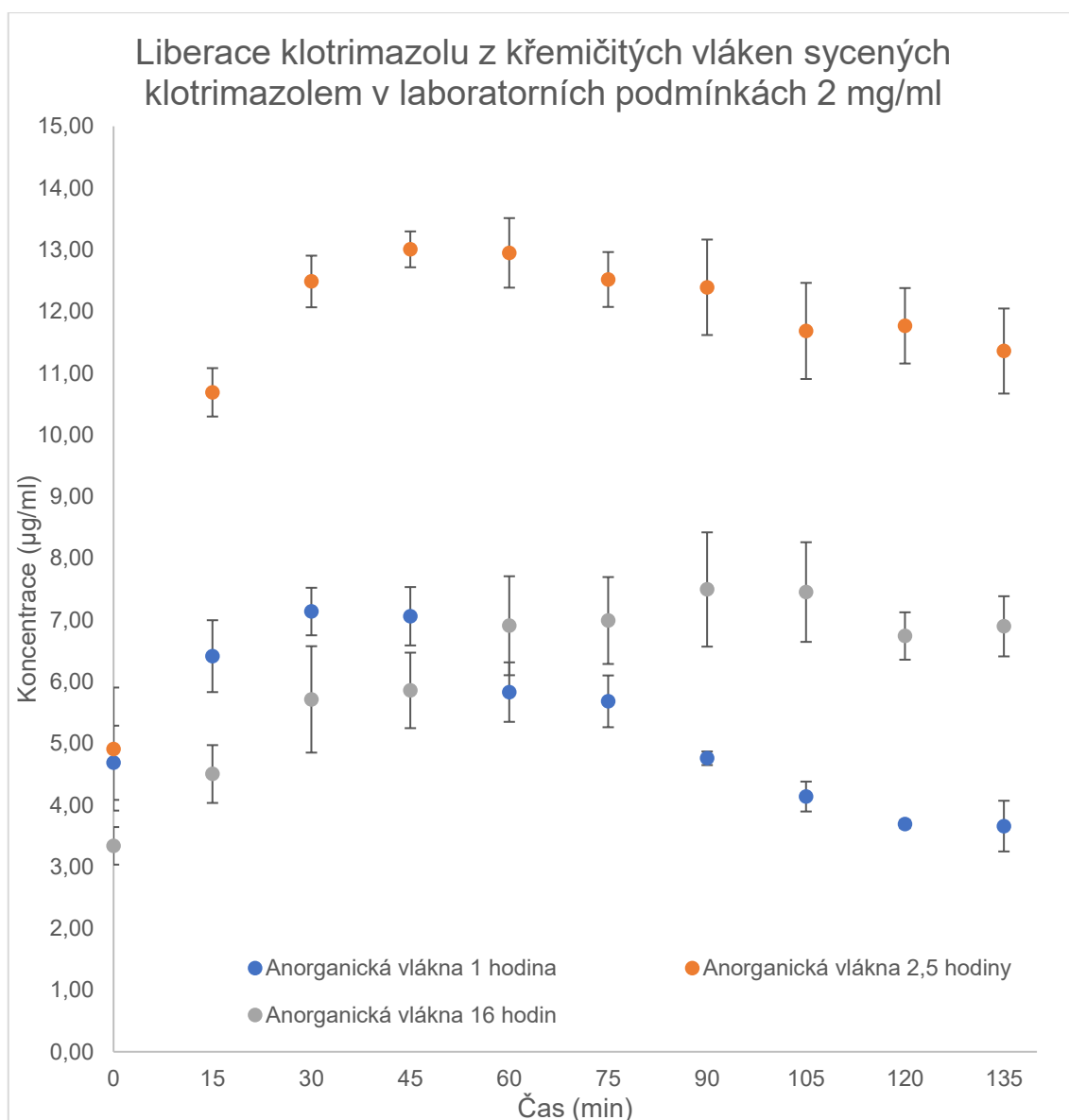
Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,543	0,577	0,580	0,567	4,684	0,000	4,684	0,017	3,00
15	0,566	0,605	0,596	0,589	6,273	10,957	6,412	0,016	2,80
30	0,584	0,611	0,599	0,598	6,909	17,866	7,135	0,011	1,82
45	0,577	0,608	0,602	0,596	6,747	24,613	7,059	0,013	2,24
60	0,561	0,595	0,576	0,577	5,448	30,062	5,829	0,014	2,36
75	0,558	0,586	0,579	0,574	5,232	35,294	5,680	0,012	2,06
90	0,558	0,559	0,565	0,561	4,256	39,550	4,757	0,003	0,56
105	0,544	0,560	0,550	0,551	3,590	43,140	4,137	0,007	1,24
120	0,543	0,543	0,547	0,544	3,104	46,244	3,690	0,002	0,34
135	0,530	0,542	0,558	0,543	3,033	49,277	3,657	0,012	2,14

Tabulka 24 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml po dobu 2,5 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,530	0,585	0,596	0,570	4,906	0,000	4,906	0,029	5,02
15	0,635	0,653	0,662	0,650	10,493	15,399	10,688	0,011	1,73
30	0,662	0,690	0,670	0,674	12,136	27,535	12,484	0,012	1,78
45	0,674	0,691	0,672	0,679	12,498	40,033	13,005	0,008	1,23
60	0,663	0,699	0,666	0,676	12,286	52,319	12,948	0,016	2,39
75	0,650	0,681	0,671	0,668	11,706	64,024	12,517	0,013	1,91
90	0,635	0,690	0,666	0,664	11,435	75,459	12,390	0,022	3,34
105	0,628	0,682	0,645	0,652	10,593	86,052	11,683	0,022	3,43
120	0,633	0,675	0,645	0,651	10,543	96,595	11,767	0,018	2,69
135	0,621	0,669	0,640	0,643	10,007	106,602	11,357	0,020	3,07

Tabulka 25 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml po dobu 16 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,420	0,435	0,414	0,423	3,338	0,000	3,338	0,009	2,09
15	0,441	0,454	0,421	0,439	4,403	7,741	4,501	0,014	3,10
30	0,460	0,483	0,422	0,455	5,543	13,284	5,711	0,025	5,51
45	0,456	0,478	0,434	0,456	5,617	18,901	5,857	0,018	3,90
60	0,485	0,488	0,437	0,470	6,582	25,483	6,905	0,023	4,96
75	0,485	0,485	0,441	0,470	6,583	32,067	6,990	0,020	4,35
90	0,496	0,495	0,438	0,476	6,998	39,064	7,492	0,027	5,65
105	0,491	0,491	0,441	0,474	6,869	45,933	7,451	0,023	4,95
120	0,471	0,471	0,447	0,463	6,080	52,013	6,738	0,011	2,41
135	0,473	0,475	0,444	0,464	6,159	58,172	6,896	0,014	3,05



Obrázek 15 Závislost koncentrace na čase pro křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml po dobu 1, 2,5 a 16 hodin

Zhodnocení: Vlákna sycená pouze po dobu 1 hodiny vykazují navázání menšího množství klotrimazolu. Vlákna sycená 2,5 hodiny zde jeví stejný problém, avšak díky delší době dokázala na sebe navázat větší množství, a proto je koncentrace vyšší. U vzorku, který byl sycen 16 hodin vidíme postupný nárůst koncentrace, což je žádoucí a dokazuje postupnou liberaci navázaného klotrimazolu z křemičitých vláken, ale naopak jsou zde nízké hodnoty koncentrace. Chybové úsečky jsou vztaženy na hodnoty směrodatné odchylky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulkách č. 23 – 25.

5. 3. 4. 2. Sycení křemičitých vláken ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 3 mg/ml

Tabulka 26 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 3 mg/ml po dobu 1 hodiny

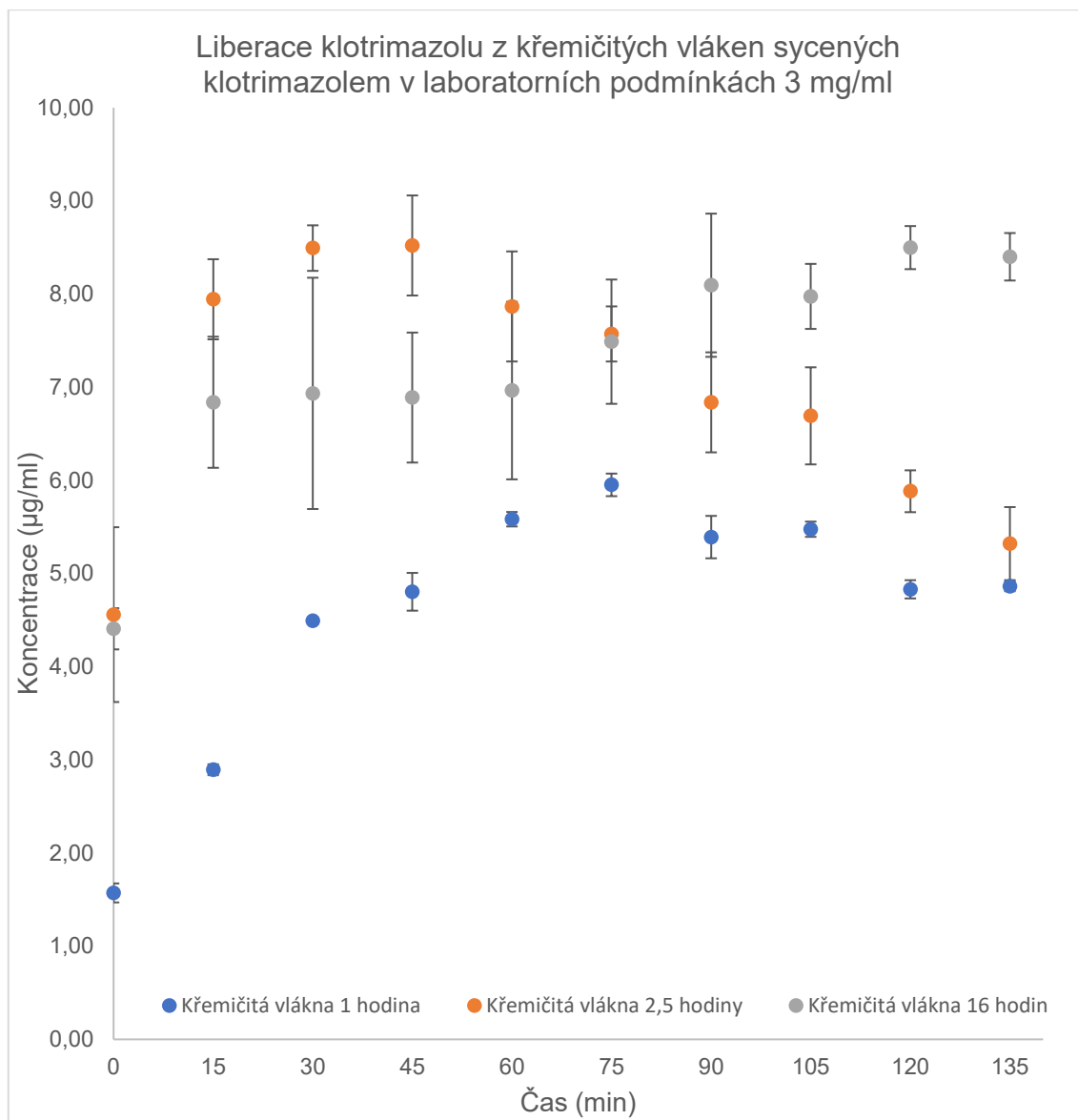
Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,396	0,395	0,402	0,397	1,572	0,000	1,572	0,003	0,74
15	0,415	0,415	0,418	0,416	2,838	4,410	2,894	0,002	0,40
30	0,440	0,438	0,437	0,438	4,380	8,791	4,492	0,001	0,22
45	0,438	0,438	0,450	0,442	4,634	13,425	4,804	0,006	1,33
60	0,453	0,454	0,449	0,452	5,345	18,770	5,583	0,002	0,50
75	0,455	0,461	0,453	0,457	5,643	24,413	5,952	0,004	0,77
90	0,456	0,440	0,447	0,448	5,018	29,431	5,391	0,007	1,48
105	0,446	0,451	0,446	0,448	5,039	34,470	5,476	0,002	0,53
120	0,442	0,435	0,436	0,438	4,339	38,809	4,831	0,003	0,65
135	0,439	0,438	0,435	0,437	4,315	43,124	4,861	0,001	0,34

Tabulka 27 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 3 mg/ml po dobu 2,5 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,527	0,580	0,585	0,564	4,559	0,000	4,559	0,027	4,72
15	0,593	0,621	0,616	0,610	7,787	12,347	7,944	0,012	2,00
30	0,606	0,621	0,622	0,616	8,233	20,579	8,493	0,007	1,13
45	0,599	0,636	0,611	0,615	8,157	28,737	8,521	0,015	2,48
60	0,589	0,628	0,597	0,605	7,409	36,146	7,867	0,017	2,77
75	0,591	0,611	0,595	0,599	7,025	43,171	7,572	0,008	1,40
90	0,569	0,606	0,587	0,588	6,212	49,383	6,838	0,015	2,59
105	0,572	0,605	0,576	0,584	5,991	55,374	6,693	0,015	2,53
120	0,563	0,575	0,578	0,572	5,117	60,491	5,883	0,006	1,11
135	0,554	0,579	0,557	0,563	4,498	64,989	5,321	0,011	1,98

Tabulka 28 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 3 mg/ml po dobu 16 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,447	0,432	0,437	0,439	4,407	0,000	4,407	0,006	1,46
15	0,498	0,449	0,469	0,472	6,698	11,105	6,839	0,020	4,33
30	0,522	0,439	0,455	0,472	6,708	17,813	6,934	0,036	7,64
45	0,496	0,447	0,467	0,470	6,580	24,393	6,889	0,020	4,31
60	0,509	0,449	0,452	0,470	6,572	30,965	6,964	0,028	5,89
75	0,503	0,458	0,468	0,476	7,008	37,973	7,489	0,019	4,07
90	0,512	0,482	0,458	0,484	7,518	45,491	8,095	0,022	4,62
105	0,493	0,480	0,469	0,481	7,306	52,798	7,975	0,010	2,11
120	0,494	0,488	0,478	0,487	7,732	60,529	8,499	0,007	1,38
135	0,492	0,486	0,474	0,484	7,538	68,067	8,400	0,007	1,53



Obrázek 16 Závislost koncentrace na čase pro křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 3 mg/ml po dobu 1, 2,5 a 16 hodin

Zhodnocení: Výsledek je totožný s předešlým grafem (obrázek č. 15), kdy u doby sycení (1 a 2,5 hodin) se navázalo pouze malé množství klotrimazolu. U sycení po dobu 16 hodin vidíme nárůst koncentrace, takže dochází k uvolnění klotrimazolu navázaného zřejmě do struktury membrány. Chybové úsečky jsou vztaheny na hodnoty směrodatné odchylky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulkách č. 26 – 28.

5. 3. 4. 3. Sycení křemičitých vláken ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 4 mg/ml

Tabulka 29 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 4 mg/ml po dobu 1 hodiny

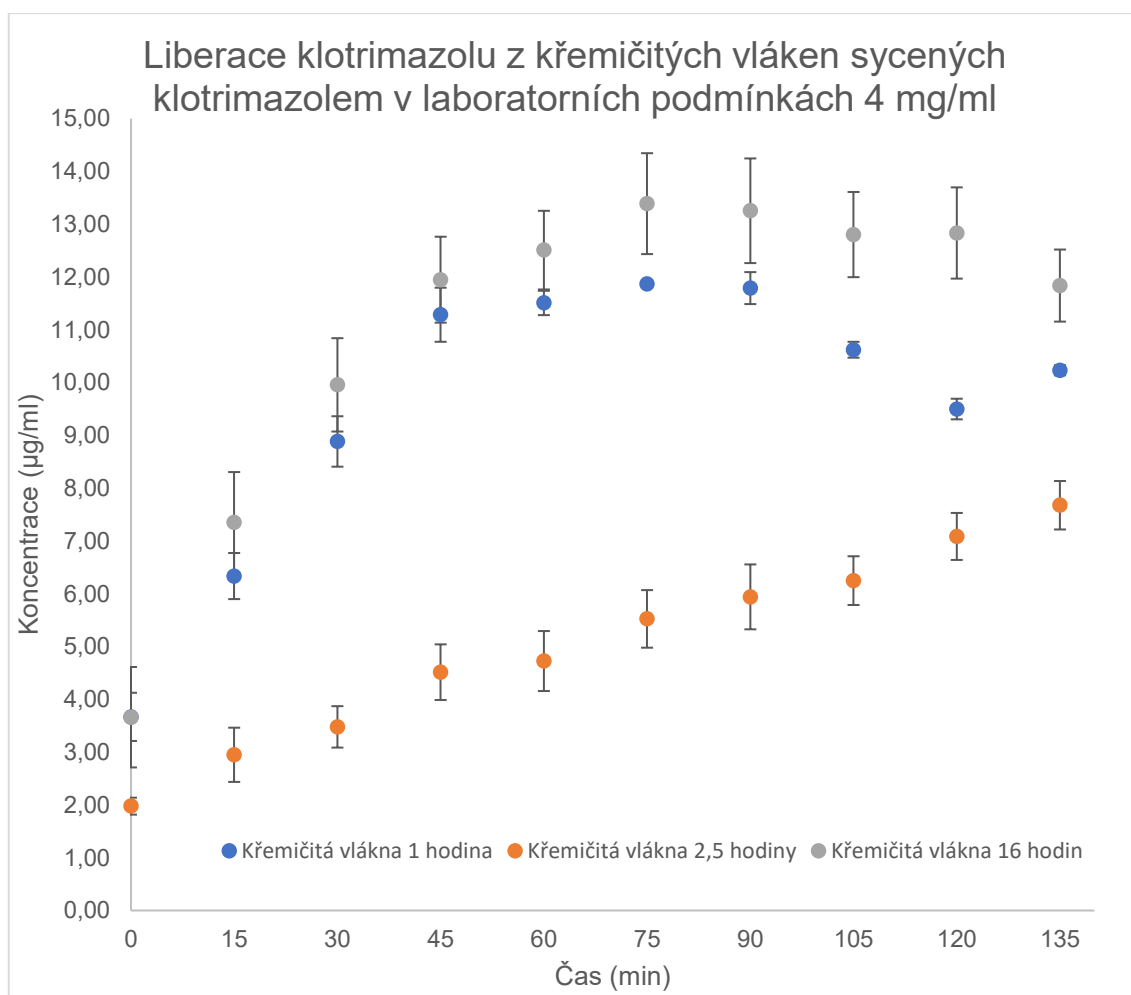
Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,545	0,541	0,570	0,552	3,668	0,000	3,668	0,013	2,33
15	0,571	0,599	0,594	0,588	6,211	9,879	6,336	0,012	2,10
30	0,612	0,614	0,642	0,623	8,650	18,529	8,885	0,014	2,17
45	0,635	0,661	0,668	0,655	10,913	29,442	11,286	0,014	2,21
60	0,647	0,659	0,662	0,656	10,997	40,439	11,509	0,007	0,99
75	0,659	0,661	0,658	0,659	11,216	51,656	11,871	0,001	0,19
90	0,649	0,668	0,651	0,656	10,997	62,653	11,791	0,009	1,30
105	0,638	0,642	0,632	0,638	9,706	72,359	10,623	0,004	0,67
120	0,628	0,617	0,616	0,620	8,476	80,835	9,500	0,006	0,89
135	0,632	0,629	0,625	0,629	9,095	89,930	10,234	0,003	0,43

Tabulka 30 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 4 mg/ml po dobu 2,5 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,403	0,409	0,398	0,403	1,977	0,000	1,977	0,005	1,15
15	0,432	0,396	0,422	0,417	2,888	4,865	2,949	0,015	3,55
30	0,432	0,408	0,431	0,424	3,374	8,239	3,479	0,011	2,63
45	0,459	0,427	0,428	0,438	4,355	12,594	4,515	0,015	3,41
60	0,461	0,423	0,436	0,440	4,509	17,103	4,726	0,016	3,60
75	0,468	0,431	0,453	0,451	5,241	22,344	5,524	0,015	3,33
90	0,478	0,437	0,453	0,456	5,587	27,932	5,941	0,017	3,69
105	0,470	0,442	0,466	0,459	5,822	33,753	6,249	0,012	2,68
120	0,487	0,460	0,463	0,470	6,575	40,328	7,086	0,012	2,49
135	0,491	0,462	0,480	0,477	7,077	47,405	7,677	0,012	2,49

Tabulka 31 Křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 4 mg/ml po dobu 16 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0	0,498	0,555	0,557	0,537	3,661	0,000	3,661	0,028	5,13
15	0,549	0,611	0,603	0,588	7,215	10,876	7,352	0,028	4,69
30	0,591	0,653	0,628	0,624	9,697	20,573	9,958	0,026	4,10
45	0,618	0,674	0,660	0,651	11,543	32,117	11,950	0,024	3,62
60	0,629	0,682	0,659	0,657	11,951	44,068	12,510	0,022	3,28
75	0,629	0,693	0,680	0,667	12,672	56,740	13,390	0,028	4,14
90	0,623	0,674	0,691	0,663	12,380	69,120	13,256	0,029	4,33
105	0,623	0,678	0,661	0,654	11,780	80,899	12,804	0,023	3,57
120	0,617	0,674	0,666	0,652	11,662	92,561	12,835	0,025	3,83
135	0,609	0,654	0,645	0,636	10,533	103,094	11,838	0,020	3,10



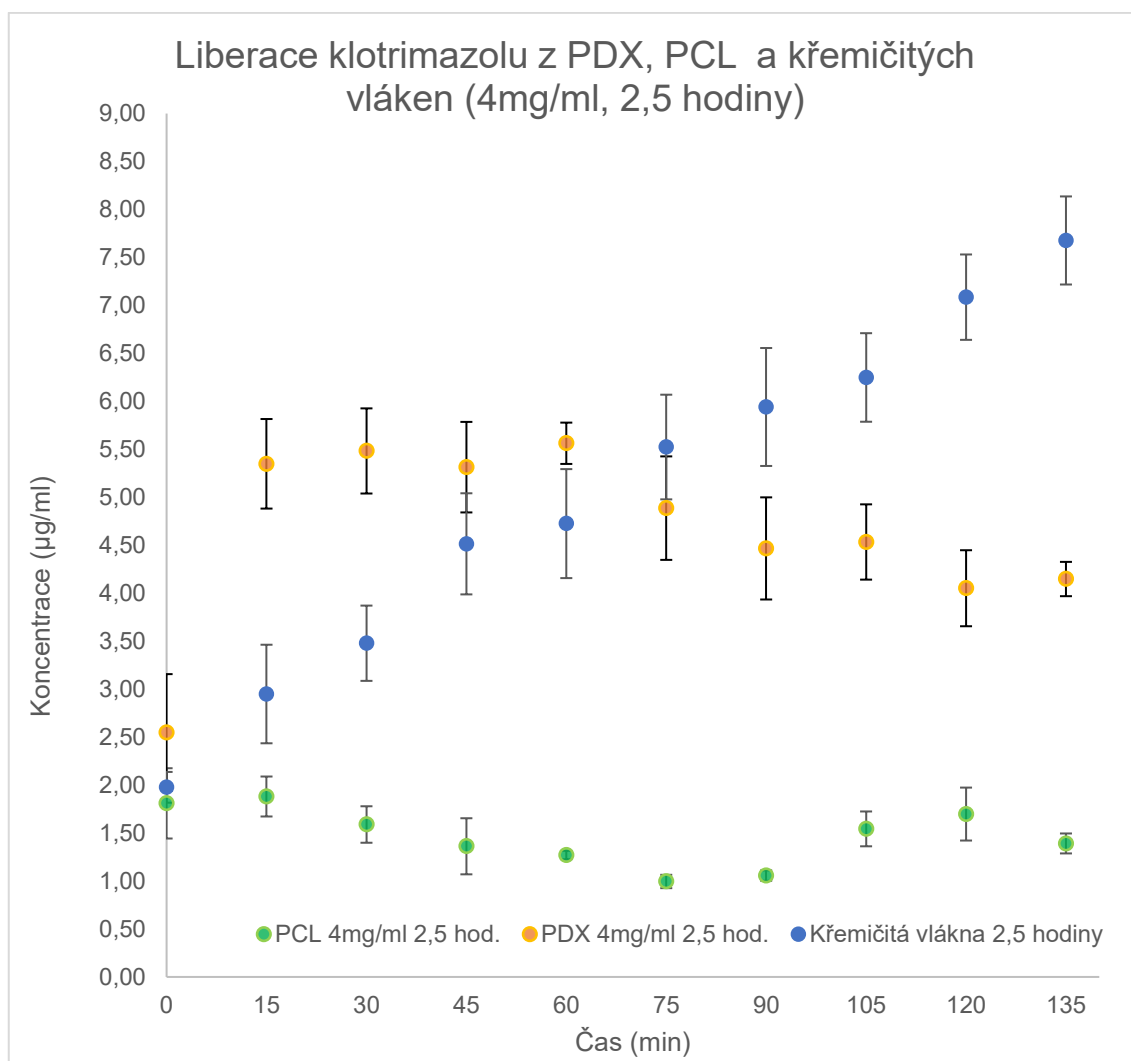
Obrázek 17 Závislost koncentrace na čase pro křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 4 mg/ml po dobu 1, 2,5 a 16 hodin

Zhodnocení: V tomto grafu sycení po dobu 1 a 16 hodin způsobilo navázání většího množství klotrimazolu, než tomu bylo v předchozích případech (obrázek č. 16), ale uvolňování není postupné. Kdežto sycení roztokem o koncentraci 4 mg/ml po dobu 2,5 hodiny způsobilo postupné uvolňování klotrimazolu do akceptorového média. Klotrimazol byl v tomto případě zřejmě navázán do struktury nanovláknenného nosiče. Profil této liberace je skoro idelání stav. Chybové úsečky jsou vztaženy na hodnoty směrodatné odchylky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulkách č. 29 – 31.

Vzájemné porovnání všech tří grafů: U koncentrací sytícího roztoku 2 a 3 mg/ml můžeme vyjádřit závislost mezi dobou sycení a následným profilem liberace. Při delší době sycení (v experimentu 16 hodin) byla liberace postupná s možnými poklesy koncentrací. Maximální koncentrace se docílí až po delší

době. U sytícího roztoku 4 mg/ml došlo k vytvoření této závislosti u času sycení 2,5 hodiny, tento model vykazuje téměř lineární nárůst koncentrace uvolněného klotrimazolu.

5. 3. 5. Vzájemné porovnání liberací klotrimazolu z PCL, PDX a křemičitých vláken při sycení v laboratorních podmínkách



Obrázek 18 Závislost koncentrace na čase pro PCL, PDX a křemičitá vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 4 mg/ml po dobu 2,5 hodin

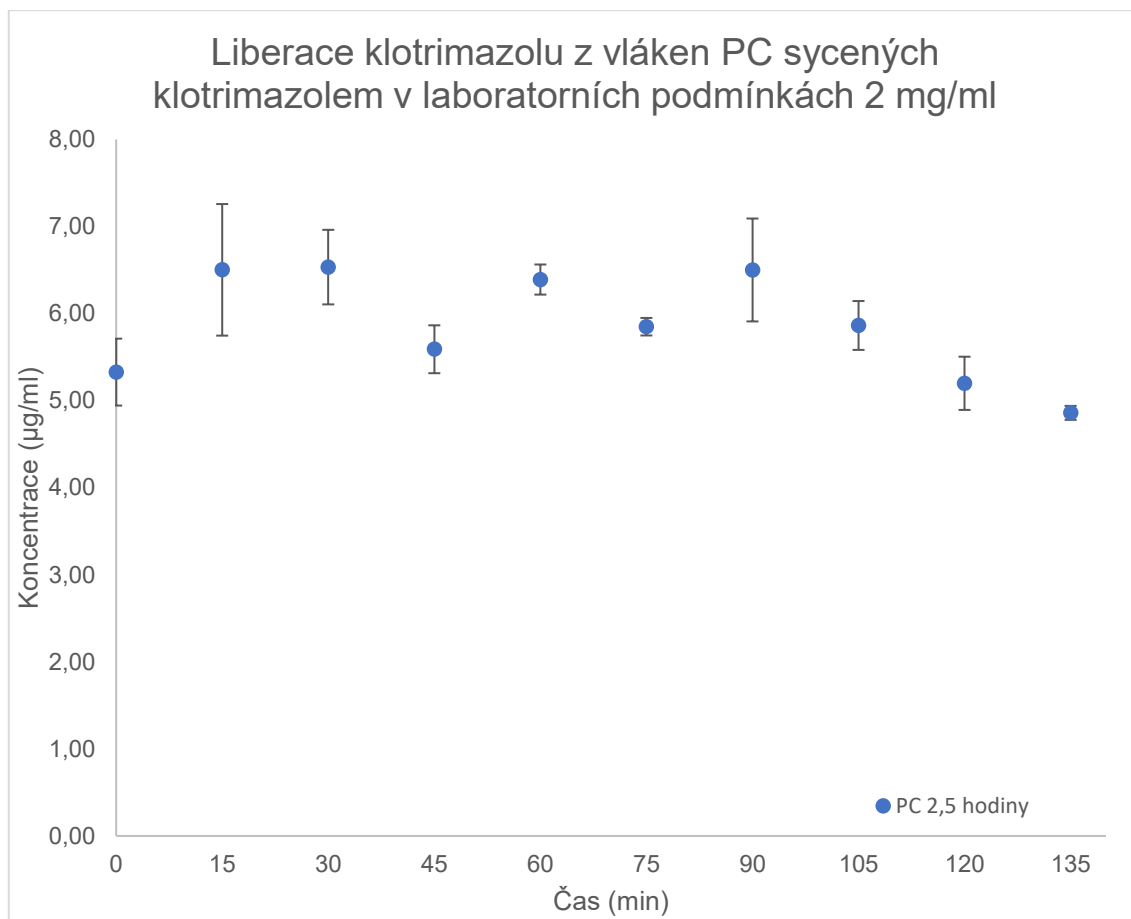
Zhodnocení: Ze vzájemného porovnání grafů pro model vlastního sycení v laboratorních podmínkách, při stejné koncentraci sytícího roztoku a době sycení, můžeme usoudit, že křemičitá vlákna vykazují nejvyšší koncentraci v čase a mají nejideálnější profil liberace. PDX a PCL vlákna sycená v laboratoři poskytují údaje o navázání menšího množství klotrimazolu zřejmě pouze na povrch nanovláknenného nosiče. Chybové úsečky jsou vztaženy na hodnoty

směrodatné odchytky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulkách č. 14, 15, 30.

5. 3. 6. Liberace klotrimazolu z PC vláken sycených klotrimazolem při laboratorních podmínkách

Tabulka 32 Vlákná PC sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml po dobu 2,5 hodiny

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	průměr	c [µg/ml]	suma před. měření	dopočet c [µg/ml]	SD	RSD (%)
0		0,564	0,586	0,575	5,328	0,000	5,328	0,011	1,89
15	0,561	0,611	0,597	0,590	6,354	11,682	6,502	0,021	3,63
30	0,573	0,603	0,591	0,589	6,306	17,988	6,534	0,012	2,06
45	0,566	0,574	0,585	0,575	5,295	23,283	5,590	0,008	1,36
60	0,592	0,580	0,583	0,585	6,020	29,303	6,391	0,005	0,84
75	0,573	0,576	0,580	0,576	5,410	34,713	5,849	0,003	0,49
90	0,575	0,570	0,608	0,584	5,986	40,699	6,501	0,017	2,86
105	0,586	0,570	0,567	0,574	5,281	45,980	5,864	0,008	1,38
120	0,553	0,565	0,574	0,564	4,559	50,539	5,199	0,009	1,53
135	0,557	0,557	0,562	0,559	4,167	54,706	4,860	0,002	0,41



Obrázek 19 Závislost koncentrace na čase pro PC vlákna sycená ethanolickým roztokem klotrimazolu o koncentraci 2 mg/ml po dobu 2,5 hodin

Zhodnocení: Profil liberace klotrimazolu u PC vláken odpovídá navázání malého množství klotrimazolu, jak tomu bylo i u předchozích příkladů. Jde o velice podobný profil liberace, kdy začínáme měřit relativně vyšší koncentraci uvolněného klorimazolu (vztaženo k obrázku č. 19) a v následujících desítkách minut koncentrace kolísá až dochází k postupnému poklesu. Chybové úsečky jsou vztaženy na hodnoty směrodatné odchylky koncentrace nikoliv absorbance, které jsou uvedené v tabulce č. 32.

6. Závěr

Tato diplomová práce sledovala liberační profily antimykotické látky – klotrimazolu, který byl zaváděn buď při výrobě nanovláken, nebo přímo v laboratoři na nanovláknenné polymerní (PDX, PCL) a keramické (křemičité) nosiče, které byly připraveny Technickou univerzitou v Liberci. Pro porovnání sloužila komerčně dostupná polykarbonátová membrány. Liberační profily byly sledovány s využitím systému SIA.

Cílem bylo zjistit, zdali bude možné použití nanovláknenných materiálů jako nosičů klotrimazolu a zdali se bude klotrimazol kontinuálně z nanovláknenných nosičů uvolňovat a jaké podmínky ovlivňují jeho uvolňování. PC membrány sloužily jako porovnávací vzorek k nanovláknům.

Důvod použití nosiče PC, který je komerčně dostupný, byl takový, že jsme chtěli zjistit jakou nejnižší koncentraci sytícího roztoku můžeme detekovat a jak daný liberační profil klotrimazolu vypadá.

Z hodnocení profilů u nanovláknenných polymerních nosičů, na které byl klotrimazol zaváděn při výrobě na pracovišti Technické univerzity v Liberci lze vyčíst určitou závislost mezi poměry polymerního materiálu a klotrimazolu. Čím nižší poměr (nižší obsah klotrimazolu a vyšší obsah nanovláken), tím vyšší hodnoty koncentrace a plynulejší uvolňování klotrimazolu. Profily liberace si byly velice podobné a z těchto údajů nelze s přesností říct, který typ polymerního nanovláknenného nosiče je optimální pro další použití, lze vytvořit premisu, že nižší poměr nahrává kontinuálnějšímu uvolňování.

Z hodnocení profilů u polymerních nanovláknenných nosičů sycených v laboratorních podmínkách naší fakulty lze říct, že ani jeden typ nosiče nevyhovoval potřebám a ani vyšší koncentrace roztoku klotrimazolu použitého k sycení nepomohla k vytvoření vazeb uvnitř nosiče a nevedla k optimálním hodnotám liberace, ať z hlediska doby uvolňování tak i koncentrace. Klotrimazol se ve všech případech zřejmě navázal pouze povrchově a ihned po ponoření do akceptorového média se uvolnil a po krátkém čase začala koncentrace klesat.

Z hodnocení profilů keramického nanovláknenného nosiče syceného v laboratorních podmínkách naší fakulty lze konstatovat, že byla sledována závislost mezi časem, koncentrací a profilem liberace. U nižších koncentrací bylo

nutné po delší dobu (16 hodin) sytit, aby došlo k dostatečnému navázání a tím dosažení plynulejšího profilu liberace. U vyšší koncentrace sycení (4 mg/ml) stačilo pouze 2,5 hodiny k vytvoření téměř dokonalé (plynulé) křivky liberace. Proto se tyto nosiče jeví jako potencionálně vhodné pro další výzkum.

Závěrem práce lze konstatovat, že ze vzorků polymerních nanovlákených nosičů zatím nebylo možné potvrdit jejich možné využití jako nosiče pro klotrimazol. Jeho uvolňování nebylo kontinuální, což by bylo žádoucí, ale můžeme se domnívat, že nižší poměr může být vhodnější při následné liberaci klotrimazolu. Zato u křemičitých nanovláken byla vytvořena závislost mezi časem, koncentrací sycení a profilem liberace a byly nalezeny jejich kombinace, u kterých se vyskytovalo kontinuální uvolňování klotrimazolu po sledovanou dobu.

Literatura

[1] Mesquita R. B.R., Rangel A. O.S.S, A review on sequential injection methods for water analysis, *Analytica Chimica Acta*, 2009, 648, 1, 7- 22.

[2] Sklenářová H., Automatizace a průtokové analytické techniky, 2019, Prezentace k předmětu Speciální metody instrumentální analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.

[3] Bharat S., Kattamuri K., Potti L., Vin A., Bandi V., Chagantipati S., Rk M., (2012). *Nanofibers In Pharmaceuticals-A Review*.

[4] Paseková H., Polášek M., Solich P., Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy*, 1999, 93, 354-356.

[5] Laiwattanapaisala W., Kunanuvat U., Intharachutia W., Chinvongamornb C., Hannongbuac S., Chailapakul O., Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria. *Talanta*, 2009, 79, 1104–1110.

[6] Perez-Olmos R., Soto J. C., Zárate N., Araújo A. N., Lima J. L. F. C., Saraiva M. L. M. F. S., Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis. *Food Chemistry*, 2005, 90, 471–490.

[7] Flowinjectiontutorial.cz Růžička, J. Flow Injection Analysis: Tutorial & News on Flow Based micro Analytical Techniques [Online]. 2019 ed. [cit. 2021-03-18].

[8] Sklenářová, H., Neseparační průtokové metody, 2013, Prezentace k přednášce z předmětu Speciální metody instrumentální analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.

[9] Horstkotte, H. Sklenářová, Introduction to laboratory automation using analytical flow techniques, 2018, Prezentace k předmětu Speciální metody instrumentální chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.

- [10] Pimenta A.M., Montenegro M. C. B .S. M., Araujo A. N., Calatayud J. M., Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 40, 16–34.
- [11] Pasamontes A., Callao M.P., Determination of amoxicillin in pharmaceuticals using sequential injection analysis and multivariate curve resolution, *Analytica Chimica Acta*, 2004, 485, 159-165.
- [12] Šatínský D., Santos L. M. L., Sklenářová H., Solich P., Montenegro M. C. B. S. M., Araújo A. N., Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycykline in pharmaceutical preparations, *Analytica Chimica Acta*, 2005, 68, 214 – 218.
- [13] Liu X. - Z., Fang Z. L., Sequential-injection system for drug-dissolution studies of ibuprofen tablets and sustained-release formulations, *Analytica Chimica Acta*, 1998, 358, 103.
- [14] Solich P., Sklenářová H., Huclová J., Šatínský D., Schaefer U.F., Fully automated drug liberation apparatus for semisolid preparations based on sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, 2003, 499, 1-2, 9-16.
- [15] Klimundová, J., Sklenářová H., Schaefer U.F., Solich P., Automated system for release studies of salicylic acid based on a SIA method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37, 5, 893-898.
- [16] Legnerová Z., Šatínský D., Solich P., Using on-line solid phase extraction for simultaneous determination of ascorbic acid and rutin trihydrate by sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, 2003, 497, 1-2, 14, 165-174
- [17] Liu X. - Z., Liu S. - S., Wu J. - F., Fang Z. - L., Simultaneous monitoring of aspirin, phenacetin and caffeine in compound aspirin tablets using a sequential injection drug-dissolution testing system with partial least squares calibration, *Analytica Chimica Acta*, 1999, 392, 2-3, 273-281.

- [18] Petráš D., Kimmer D., Soukup K., Klusoň P., Bezpečná nanovlákná, *Chemické Listy*, 2009, 103, 1009–1016.
- [19] Krchová S., Dzan L., Lukáš D., Mikeš P., Jenčová V., Horáková J., Pilařová K., Nanovlákná v hojení kožních ran, *Česká Dermatovenerologie*, 2014, 4, 4, 234–240.
- [20] NANOPHARMA, Nanopharma.cz [online], 2015, Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>, [cit.2020-01-03].
- [21] Belháčová M., Příprava nanovláken z vybraných polymerů s fosfazenovými aditivami, 2012 Brno, Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie, Vedoucí práce Alberti M.
- [22] Czech innovation expo, Ciexpo.cz [online], Dostupné z: <http://www.ciexpo.cz/rodokmen/oldrich-jirsak/>, [cit. 2020-01-15].
- [23] Chen S., Liu B., Carlson M. A., Gombart A. F., Reilly D. A., Xie J., Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing, *Nanomedicine*, 2017, 12 (11), 1335–1352.
- [24] Liu M., Duan X. – P., Li Y. – M., Yang D. – P., Long Y. – Z., Electrospun nanofibers for wound healing, *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 76, 1413-1423.
- [25] Neumayerová Z., Polykaprolakton jeho syntéza, charakterizace a degradabilita, 2010, Brno, Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická Ústav chemie materiálů, Vedoucí práce, Hermanová S.
- [26] Woodruff M., Hutmacher D., The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science*, 2010, 35(10), 1217-1256.

[27] Qu L., Cao J., Huang X. – M., Clinical application of biodegradable polydioxanone, *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011, 15(2), 527-530.

[28] Kontio R., Ruuttill P., Lindroos L., Suuronen R., Salo A., Lindqvist C., Virtanen I., Konttinen Y.T., Biodegradable polydioxanone and poly(l/d)lactide implants: an experimental study on peri-implant tissue response, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2005, 34, 7, 766-776.

[29] Stránská D., Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv, 2018 Hradec Králové, Disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce Doležal P.

[30] Yu D.G. , Shen X.X., White C. B., White K., Zhu L.M. , Bligh S. W. A., Oral fast-dissolving drug delivery membranes prepared from electrospun polyvinylpyrrolidone ultrafine fibers, *Nanotechnology*, 2009, 20, 055104.

[31] Nagy Z. K. , Nyúl K., Wagner I., Molnár K. , Marosi G. , Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of Donepezil HCl, *Express Polymer Letters*, 2010, 4, 763-772.

[32] Illangakoon U. E., Gill H., Shearman G. C., Parhizkar M., Mahalingam S., Chatterton N. P., Williams G. R., Fast dissolving paracetamol/caffeine nanofibers prepared by electrospinning, *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 477, 369-379.

[33] Vuddanda P. R., Mathew A. P., Velaga S., Electrospun nanofiber mats for ultrafast release of ondansetron, *Reactive and Functional Polymers*, 2016, 99, 65-72.

Přílohy

Program pro kalibraci

Příkaz	Parametr
Loop Start (#)	3
Multiposition Valve port 2	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	80
Syringe Pump Aspirate (microliter)	2500
Syringe Pump Delay Until Done	
Multiposition Valve port 3	
Analyte New Sample	
Analyte Name clotr. 10	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	20
Syringe Pump Delay Until Done	
Syringe Pump Aspirate (microliter)	40
Syringe Pump Delay Until Done	
Multiposition Valve port 8	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	25
Syringe Pump Delay Until Done	
Syringe Pump Empty	
Spectrometer Reference Scan	
Spectrometer Absorbance Scanning	
Syringe Pump Delay Until Done	
Spectrometer Stop Scanning	
Loop End	

Příkaz pro liberaci (pro 1 celu)

Příkaz	Parametr
Loop Start (#)	10
Hardware Settings Scan Rate (Hz)	4
Hardware Settings Integration Time (msec)	50
Hardware Settings Wavelength 1 (nm)	210
Hardware Settings Wavelength 2 (nm)	220
Hardware Settings Wavelength 4 (nm)	460
Hardware Settings Use Wavelength 4 as Reference	
'aspiration of carrier	
Multiposition Valve port 7	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	70
Syringe Pump Aspirate (microliter)	1200
Syringe Pump Delay Until Done	
'aspiration of the sample first time	
Multiposition Valve port 2	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	70
Syringe Pump Delay Until Done	
Syringe Pump Aspirate (microliter)	100
Syringe Pump Delay Until Done	
'first send to WASTE	
Multiposition Valve port 1	
Syringe Pump Delay Until Done	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	70
Syringe Pump Delay Until Done	
Syringe Pump Empty	
Syringe Pump Delay Until Done	

'aspiration of carrier

Multiposition Valve port 7	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	70
Syringe Pump Aspirate (microliter)	1000
Syringe Pump Delay Until Done	

'aspiration of the sample first time

Analyte New Sample	
Analyte Name Clotrimazol	
Multiposition Valve port 2	
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	30
Syringe Pump Aspirate (microliter)	40
Syringe Pump Delay Until Done	

'first send to Detector

Multiposition Valve port 8

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	17
Syringe Pump Delay Until Done	
Syringe Pump Empty	
Spectrometer Reference Scan	
Spectrometer Absorbance Scanning	
Syringe Pump Delay Until Done	
Spectrometer Stop Scanning	