

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



Automatizace liberačních testů pro uvolnění klotrimazolu z různě sycených
polymerních nanovláken

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:
doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant:
PhamDr. Martina Háková, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Bc. Sabina Mukařovská

PROHLÁŠENÍ

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

Poděkování

Ráda bych upřímně a srdečně poděkovala své vedoucí diplomové práce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, připomínky a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala i konzultantce PhamDr. Martině Hákové, Ph.D. a Technické Univerzitě v Liberci za spolupráci v experimentální části.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Sabina Mukařovská

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

Název diplomové práce: Automatizace liberačních testů pro uvolnění klotrimazolu z různě sycených polymerních nanovláken

Tato diplomová práce se věnuje liberačním profilům klotrimazolu uvolněného z nanovláknenného nosiče za využití automatizované neseparační průtokové techniky, sekvenční injekční analýzy. Jako membrány byly zvoleny polymerní nanovláknena vyrobená z polydioxanonu a polykaprolaktonu. Nanovláknenné membrány byly vyrobeny Technickou Univerzitou v Liberci.

Postupně byly testovány dva postupy sycení nanovláken. Nejdříve byly použity membrány, která byla syceny při výrobě v různém poměru obsahu polymeru a klotrimazolu. Tato vlákna byla analyzována v laboratoři. V druhé části se testovala vlákna bez účinné látky, tedy neobsahovaly klotrimazol. Takto připravené nanovláknenné membrány byly syceny ethanolickými roztoky o různé koncentraci a po určitou dobu. Tyto analýzy pomohly v hledání ideálních podmínek pro sycení nanovláken.

Liberační testy byly prováděny za podmínek, které simulovaly stav neporušené zdravé lidské kůže. Byl použit tlumivý roztok o pH 4,5 a teplota 32°C. Za těchto podmínek byla měřena liberace klotrimazolu ve třech paralelně zapojených Franzových celách. V těchto celách byl umístěn nanovláknenný nosič s navázaným klotrimazolem. Měření probíhalo po dobu 135 minut, kdy byla látka uvolňována do média. Každých 15 minut byl z tohoto média odebírán vzorek do systému sekvenční injekční analýzy. Jako detektor byl použit UV-VIS spektrofotometr. Jednotlivé liberační profily byly porovnány. Hlavními sledovanými parametry byl liberační profil, rychlost uvolňování a koncentrace klotrimazolu uvolněná v daném čase.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Sabina Mukařovská

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

Title of the diploma thesis: Automation of liberation tests for clotrimazole released from differently saturated polymer nanofibers

This diploma thesis deals with the liberation profiles of clotrimazole released from a nanofiber carrier using an automated non-separation flow technique, sequential injection analysis. Polymer nanofibers polydioxanone and polycaprolactone were chosen as membranes. Nanofiber membranes were manufactured by the Technical University of Liberec.

Two nanofiber saturation procedures were successively tested. First, membranes were used which were saturated during production in different ratios of polymer and clotrimazole content. These fibers were analysed in the laboratory. In the second part, the fibers without the active substance were tested, it means they originally did not contain clotrimazole. The nanofiber membranes thus prepared were saturated with ethanolic solutions of various concentrations and for a certain period of time in laboratory conditions. These analyses helped to find ideal conditions for nanofiber saturation.

Liberation tests were performed under conditions that simulated the condition of intact healthy human skin. A buffer solution of pH 4.5 and a temperature of 32 ° C was used. Under these conditions, the release of clotrimazole was measured in three Franz cells connected in parallel. A nanofiber carrier with bound clotrimazole was placed in these cells. The measurement was performed for 135 minutes, when the substance was released into the medium. Every 15 minutes, a sample was taken from this medium for sequential injection analysis. A UV-VIS spectrophotometer was used as a detector. The individual liberation profiles were compared. The main parameters monitored were the release profile, release rate and concentration of clotrimazole released in the respective time.

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Cíl a popis zadání práce	5
3. Teoretická část.....	6
3.1. Neseparační průtokové techniky	6
3.2. Sekvenční injekční analýza	7
3.2.1. Princip SIA techniky.....	8
3.2.2. Přístrojové vybavení	9
3.2.3. Využití SIA systému	10
3.2.4. Monitorování liberačních testů pomocí SIA techniky.....	10
3.3. Nanovlákná.....	13
3.3.1. Formy nanovláken	14
3.3.2. Příprava nanovláken	14
3.3.3. Elektrostatické zvlákňování	15
3.3.1. Využití nanovláken	19
4. Experimentální část	21
4.1. Použité přístroje a pomůcky	21
4.2. Použité chemikálie	22
4.3. Příprava roztoků	22
4.4. Testované nanovláknenné membrány.....	23
4.5. Parametry měření	24
4.6. Postup měření liberace klotrimazolu	26
5. Výsledky a diskuse	30
5.1. Kalibrační stanovení klotrimazolu.....	30
5.1.1. Kalibrace pro vodný roztok.....	30
5.1.2. Kalibrace pro tlumivý roztok o PH 4,5	31

5.2. Liberace klotrimazolu	33
5.2.1. Liberace klotrimazolu z PDX nanomembrán sycených při výrobě Technickou univerzitou v Liberci	34
5.2.2. Liberace klotrimazolu z PCL nanomembrán sycených při výrobě Technickou univerzitou v Liberci	38
5.2.3. Liberace klotrimazolu z PDX nanomembrán sycených v laboratorních podmínkách	43
5.2.4. Liberace klotrimazolu z PCL nanomembrán sycených v laboratorních podmínkách	45
5.3. Stanovení obsahu klotrimazolu HPLC metodou	48
6. Závěr	51
Použitá literatura	53

Seznam použitých zkratk

BIA	Bead injection analysis
CFA	Kontinuální průtoková analýza
ECM	Extracelulární matrix
FIA	Průtoková injekční analýza
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
PCL	Polykaprolakton
PDX	Polydioxanon
PEO	Polyethylenoxid
PVB	Polyvinylbutyral
SFA	Segmentovaná průtoková analýza
SIA	Sekvenční injekční analýza
UTLC	Chromatografie na ultratenké vrstvě
UV-VIS	Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra

1. Úvod

V dnešní době je pozornost věnována vývoji automatizovaných analytických postupů. A k nim je možné využít i neseparační průtokové techniky. Výhodou automatizace analytických postupů je například zvýšení frekvence zpracování vzorků, minimalizace kontaminace nebo záměny vzorku, miniaturizace analytického systému [1].

Jednou z dalších popsaných instrumentálních technik byla sekvenční injekční analýza (SIA), která vznikla z průtokové injekční analýzy. SIA byla vyvinuta jako pokročilá forma manipulace s roztokem pro míchání a transport vzorků, činidel a produktů chemických reakcí do místa detekce. SIA je vysoce univerzální technika založená na vícepolohovém selekčním ventilu a dvousměrném čerpadle. Využívá se pro aplikaci v mnoha oblastech analýzy, především pro sledování dlouhodobých procesů a provádění složitějších operací na základě snadné optimalizace a programovatelnosti reakčních podmínek [2].

Nedávný a intenzivní rozvoj nanotechnologií dává vzniknout novým směrům využití nanomembránových materiálů, které jsou definovány jako struktury s tloušťkou vláken omezenou na jeden až několik set nanometrů [3]. Materiály pro výrobu syntetických nanovláken jsou často anorganické oxidy kovů nebo organické polymery. Vyznačují se velkou plochou a porozitou. Využití nalézají ve spoustě odvětví jako v medicíně, pro krytí ran, nebo ve farmacii jako nosiče léčiv [4].

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce je porovnat liberační profily klotrimazolu uvolněného z nanovlákněné membrány pomocí automatizovaného systému SIA. Technická Univerzita v Liberci poskytla dva polymerní nosiče a to polykaprolakton (PCL) a polydioxanon (PDX). Na tyto nosiče byl zaveden klotrimazol přímo při výrobě v daném poměru polymer : klotrimazol. Dále byla poskytnuta nanovlákněná čistá, bez zavedené látky, kde jsme sledovali možnost sycení v laboratorních podmínkách pomocí ethanolických roztoků o různé koncentraci a po různou dobu. U takto připravených nanovlákněných membrán proběhne liberační test. Z naměřených absorbancí bude pomocí kalibrační křivky stanovena koncentrace klotrimazolu v akceptorovém médiu. Ze zjištěných hodnot bude vytvořen liberační profil pro každý nanovlákněný nosič.

Porovnáním liberačních profilů studovaných nanovlákněných membrán má za cíl zvolit vhodný materiál a způsob sycení pro rovnoměrnou a dlouhodobou liberaci. Pomocí HPLC metody se stanoví obsah klotrimazolu v testovaných nosičích pro ověření navázaného množství. Tato diplomová práce navazuje na předchozí práce kolegů PharmDr. Marie Kodedové (Schneidrové), která sledovala liberaci tetracyklinu z nanovláken upravených silanizací [5], a Mgr. Radovana Ernesta, který sledoval uvolnění klotrimazolu ze stejných nanovlákněných membrán do čistě vodného acetátového pufru [6]. Tato práce vychází z předchozích výsledků, doplňuje je z pohledu využití liberačního media s obsahem ethanolu, aby liberační profil nebyl ovlivněn rozpustností klotrimazolu, a přináší také hodnocení celkového množství navázaného klotrimazolu s využitím HPLC stanovení.

3. Teoretická část

3.1. Neseparační průtokové techniky

Průtoková analýza je jedním z přístupů k mechanizaci v analytické chemii. Do průtokového systému se zavede přesný objem vzorku a nosným proudem je unášen k detektoru. Disperze pomáhá k promísení vzorku s činidlem a vzniku produktu. Průchod detektorem vede k signálu, který je ideálně úměrný koncentraci analytu ve vzorku [7]. Mezi významné vlastnosti průtokových technik patří automatizace, miniaturizace, univerzálnost, vysoká vzorkovací/dávkovací frekvence, nízká spotřeba vzorku a činidla, minimalizace kontaminace nebo záměny vzorku. Díky automatizaci se zlepšuje opakovatelnost a reprodukovatelnost metod, protože je zabráněno lidské chybě analytický systém pracuje uzavřeně od vnějšího prostředí [1, 8]. Neseparační průtokové techniky zahrnují některé starší techniky jako kontinuální průtoková analýza (CFA) a segmentovaná průtoková analýza (SFA). Další modernější jsou průtoková injekční analýza (FIA) a její modifikace sekvenční injekční analýza (SIA), Lab-On-Valve, bead injection analysis (BIA) [9].

Tabulka 1 Přehled základních neseparačních průtokových metod [7, 10, 11, 12, 13]

Typ metody	Popis	Výhody/Nevýhody
CFA – kontinuální průtoková analýza	Celý systém je naplněn vzorkem a činidlem. Reakce probíhá kvantitativně do dosažení rovnovážného stavu.	Citlivost Dlouhá doba analýzy, vysoká spotřeba reagensů
SFA – segmentovaná průtoková analýza	Po nadávkování se vzorky segmentují vložením vzduchových bublin do nosného proudu. Ty jsou následně odstraněny, než se dostanou k detektoru.	Pomalá analýza, velká spotřeba reagensů Zamezení kontaminace vzorků

FIA – průtoková injekční analýza	Do proudu nosné kapaliny a činidla je dávkován vzorek, vzniká zóna produktu díky disperzi.	Pulzace toku, neúplné promísení vzorku a činidla Rychlost, jednoduchá výbava, vysoká reprodukovatelnost
SIA – sekvenční injekční analýza	Použitím pístového čerpadla je zajištěn obousměrný tok. Vícecestný selekční ventil umožňuje aspiraci různých roztoků.	Vyšší rychlost, nižší spotřeba reagensů, dokonalejší mísení
Lab-On-Valve	Miniaturizovaná modifikace SIA systému, kde reakce probíhá ve ventilu místo v hadičkách.	Miniaturizace, nízká spotřeba reagensů
BIA – bead injection analysis	Definovaný objem suspenze mikrokuliček je vstřikován do nosného proudu a zachycen na určitém místě. Injektovaný vzorek prochází přes vrstvu a interaguje s funkčními skupinami na povrchu kuliček.	Snížení rizika kontaminace, vysoká přesnost, miniaturizace a automatizace SPE

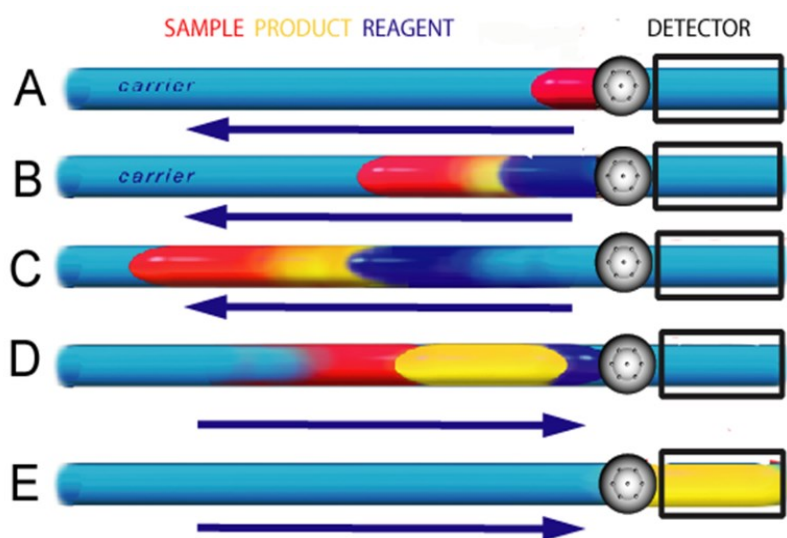
3.2. Sekvenční injekční analýza

SIA vyvinuli J. Růžička a G. Marshall jako alternativu k FIA. SIA prokázala, že její rozsah se výrazně liší od rozsahu dřívější techniky [1].

3.2.1. Princip SIA techniky

Všechny injekční průtokové techniky jsou založeny na postupné disperzi zóny vzorku, která tvoří koncentrační gradient, když se vzorek pohybuje směrem k detektoru [13]. Podobně závisí SIA na principu řízené částečné disperze v kombinaci s obousměrným tokem zajištěným obousměrným nízkotlakým pístovým čerpadlem a vícecestným selekčním ventilem, který je provozován synchronizovaně, což usnadňuje použití různých roztoků a jejich mísení v průtokovém systému. Pohyb reagentů v kapilárách/hadičkách je umožněn právě pomocí pístového čerpadla [14].

V jednoduchém provedení je do nosného proudu dávkován přesný objem vzorku a činidla přes vícecestný selekční ventil. Obrácením pohybu pístového čerpadla dojde k promísení látek v mísící cívce a vzniku reakčního produktu. Ten pak směřuje do průtokové cely detektoru a signál je detekován, většinou ve formě píků, a přenesen do počítače. V ovládacím programu dochází ke sběru dat, jejich vyhodnocení a dají se snadno upravovat a optimalizovat podmínky měření [15]. Princip je graficky znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1 Princip SIA metody [13]

(carrier – nosný proud, detector – detektor, červená – vzorek, žlutá – produkt, modrá – činidlo)

A – aspirace vzorku

B – aspirace činidla

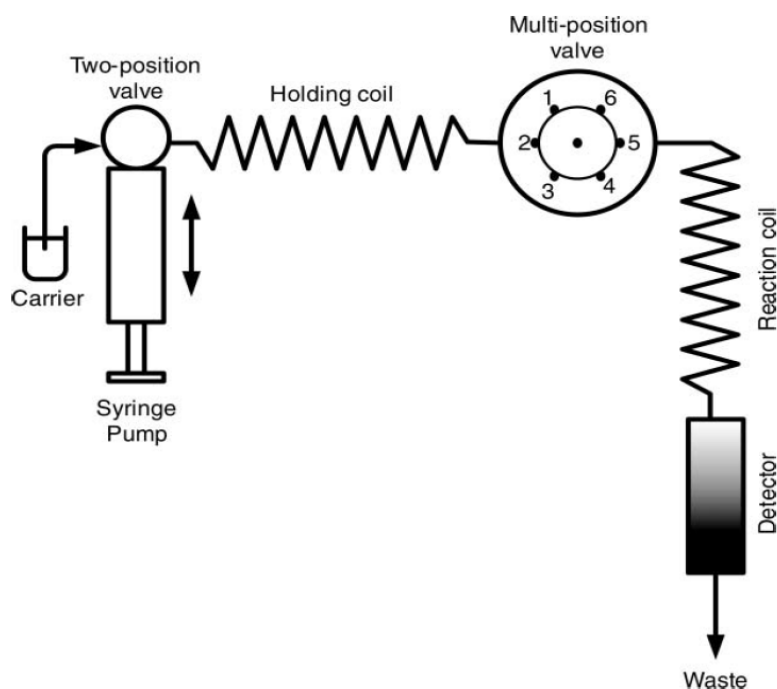
C – promíchání vzorku a činidla

D – obrácení toku směrem k detektoru

E – detekce produktu v průtokové detekční cele

3.2.2. Přístrojové vybavení

Systém tvoří nízkotlaké obousměrné pístové čerpadlo, používané k nasávání a dávkování roztoků a změně toku nosného proudu, následuje dvoucestný ventil a mísící cívka, kde se tvoří produkt reakce. Dále vícecestný selekční ventil (nejčastěji 6 až 10cestný), který je spojen s činidly a vzorky, což umožňuje programovatelné dávkování, reakční cívka a detektor spojený s počítačem. Často se k detekci používají spektrofotometry, fluorimetry, elektrochemické detektory. Na základě ovládacího programu je prováděno měření na SIA přístroji, který lze jednoduše upravovat na základě konkrétních potřeb. Vysoká robustnost a reprodukovatelnost měření je zajištěna díky synchronizaci jednotlivých kroků a pohybů systému [11]. Schéma zapojení systému SIA je na obrázku 2.



Obrázek 2 Schéma SIA systému [11]

(syringe pump – pístová pumpa, two-position valve – dvoucestný selekční ventil, carrier – nosný proud, holding coil – mísící cívka, multi-position valve – vícecestný selekční ventil, reaction coil – reakční cívka, detector – detektor, waste – odpad)

3.2.3. Využití SIA systému

SIA je všestranná výzkumná analytická technika, která umožňuje využití v mnoha různých oborech jako oceánografie, biochemie, farmakologie, studium půd nebo buněčné studie [13]. Díky ní lze automatizovat monitorování dlouho trvajících procesů, extrakční procesy nebo ve spojení s moderními detekčními metodami automatizovat přípravu vzorku [1].

SIA byla úspěšně aplikována pro stanovení různých analytů ve vzorcích potravin a nápojů jako vápník v mléce, redukující cukry ve víně a mnoho dalších. Dále se využívá k analýze životního prostředí například pro stanovení těžkých kovů v půdě a vodě, zde je výhodou možnost stanovení více iontů najednou. SIA se také ukázala jako účinný přístup pro automatizaci imunoanalýzy, kde je díky speciálním typům detekčních cel umožněno imobilizovat protilátky nebo antigeny v SIA systému [14].

Ve farmacii má SIA metoda potenciál především v oblasti výzkumu nových léčiv, farmakologických testů a studií přípravy farmaceutických přípravků (farmaceutická technologie). Může se použít ke stanovení obsahu účinné látky v různých lékových formách nebo biologických materiálech a dále pro monitorování disolučních testů pro kontrolu (bio)dostupnosti léčivých látek [16].

3.2.4. Monitorování liberačních testů pomocí SIA techniky

Liberace léčiva je začátek farmakokinetického procesu, který následuje po podání. Popisuje proces, při kterém se účinná složka z podané polotuhé lékové formy uvolňuje a stává se dostupnou pro průchod kožní bariérou. Liberační kinetika je proto důležitou charakteristikou každého léčiva, která vyžaduje důkladné vyhodnocení [17]. Aby se při liberačních nebo disolučních testech prokázaly jedinečné vlastnosti lékové formy, měl by být postup založen na fyzikálních a chemických vlastnostech léčivé látky a také na designu lékové formy. Některé z fyzikálně-chemických vlastností léčivé látky a média, které ovlivňují charakteristiky uvolnění účinné látky, jsou rozpustnost ve vodě a dalších vhodných rozpouštědlech, ionizační konstanty, stabilita roztoku, velikost částic/povrch, krystalická forma, iontová síla, pufovací účinky [18].

Automatizované systémy používané pro liberační a disoluční studie by měli splňovat několik předpokladů, jako je robustnost, univerzálnost, selektivnost, přesnost, správnost, spolehlivost a dlouhodobá stabilita. Právě technika SIA splňuje tyto požadavky [19]. Franzovy difúzní cely se často používají v liberačních studiích, ale uplatňují se i v permeačních nebo jiných interakčních testech. Mezi dvě části Franzových cel je umístěna membrána, která umožňuje snadnou difuzi testované látky do prostředí za stálého promíchávání [17].

Tabulka 2 Příklad y látek monitorovaných pomocí techniky SIA

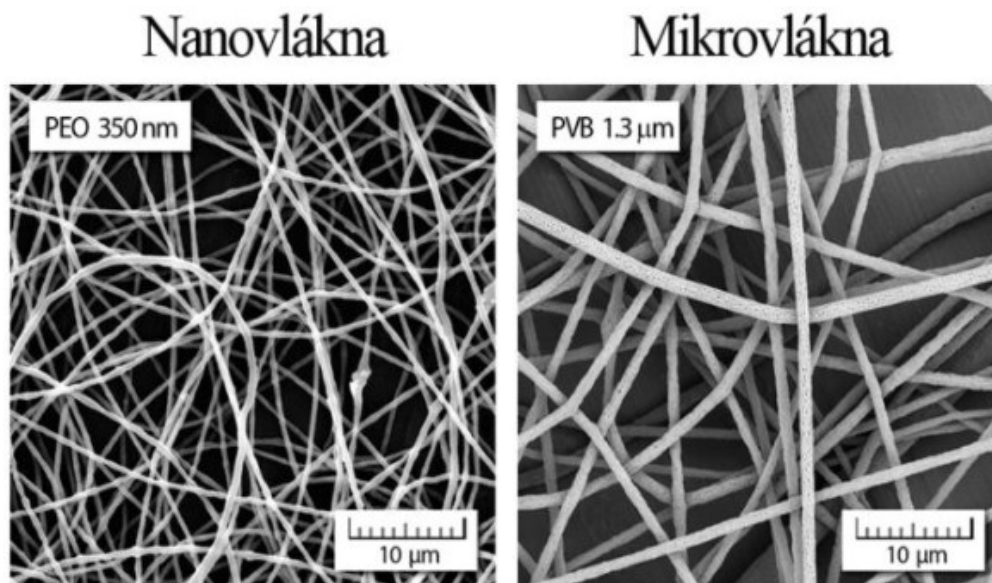
Stanovovaná látka	Matrice	Detekce	Lineární rozsah	Doba testu	Interval dávkování	
Hydrochlorid prazosinu	Tablety	Fluorimetr ($\lambda_{\text{ex}} = 244 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 389 \text{ nm}$)	0.02– 2.43 mg/l	60 min	70/hod	[20]
Propofol	Emulze	Spektrofotometr $\lambda = 485 \text{ nm}$	0.005– 0.100 mg/ mL	45 min	14/hod	[21]
Kyselina aminokapronová	Roztok	Fluorimetr ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$)	2.5×10^{-7} – 6×10^{-5} mol/l	45 min	3 min	[22]
Ergotamin	Tablety	Fluorimetr ($\lambda_{\text{ex}} = 236 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$)	0.03-0.61 mg/l	20 min	120/h	[23]
Kyselina salicylová	Mast	Fluorimetr ($\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 405 \text{ nm}$)	0,05–10 $\mu\text{g/l}$	360 min	10 min	[24]
Famotidin	Tablety	Spektrofotometr $\lambda = 265 \text{ nm}$	20-60 mg/l	2 min	30/h	[25]
Lutein	Prášek	Spektrofotometr $\lambda = 445$	0.1–10.0 $\mu\text{g/mL}$	90 min	5 min	[26]

Metamizol sodný	Tableta	Iontově selektivní elektroda	1×10^{-4} – 1×10^{-2} mol/l	60 min	5 min	[27]
Pseudoefedrin sulfát	Tableta	Iontově selektivní elektroda	1×10^{-4} – 1×10^{-2} mol/l	60 min	5 min	[27]

V tabulce číslo 2 jsou uvedené výsledky rešerše provedené s klíčovými slovy Sequential Injection Analysis, Liberation, Dissolution. Studie se zabývají dalšími látkami, u kterých lze monitorovat liberaci nebo disoluci pomocí SIA techniky. V převážném množství se používají k detekci spektrofotometrie a fluorimetrie, v menší míře pak elektrochemické metody. Způsob detekce se volí na základě vlastností dané látky. U některých látek dochází k úpravě, aby vyhovovali požadavkům na použití dané detekční metody. Třeba u kyseliny aminokapronové je nutné použít derivativaci, protože samotná kyselina je původně nefluorescenční. Metody jsou různorodé z hlediska doby testu a intervalu dávkování. Časy se pohybují v rámci několika desítek minut až po hodiny.

3.3. Nanovláknna

Nanovláknna jsou útvary, kde délka vlákna několikanásobně převyšuje průměr. Průměr bývá menší než 1 mikrometr. Nanovláknna většinou nenalzáme osamoceně, ale uspořádané do vyšších strukturně prostorových celků, se kterými je snadná manipulace [28]. Nanovláknna mohou být tvořena z různých organických i anorganických látek jako kolagen, celulóza, polykaprolakton (PCL), uhlík, oxidy kovů, a proto se liší velikostí, tvarem, rozměrem a ve svých fyzikálních a chemických vlastnostech. Všechna polymerní nanovláknna jsou jedinečná pro svůj velký poměr plochy povrchu k objemu, vysokou poréznost, znatelnou mechanickou pevnost a flexibilitu ve povrchové modifikaci ve srovnání s mikrovlákny [29]. Vzhledem ke svojí velikosti, nanovláknna lze studovat pod elektronovým mikroskopem [28]. Na obrázku 3 je porovnání mezi nanovláknny a mikrovlákny.



Obrázek 3 Porovnání nanovláknna a mikrovlákna [30]

PEO – polyethylenoxid, PVB – Polyvinylbutyral

3.3.1. Formy nanovláken

Tabulka 3 Základní formy nanovláken [31]

Forma	Charakteristika	Použití
Lineární nanovlákná	Nitě a příze, dobré mechanické vlastnosti Nezařazují se útvary vyrobené na bázi nití s nánosem nanovláken na povrchu.	Neprůstřelné vesty, nosná lana
Nanovlákná v plošných strukturách	Ve vrstvách, jednotlivá vlákna nevystupují z roviny, existují dva typy – tkané a netkané textilní útvary. Netkaná mají vlákna nahodile umístěna přes sebe. Tkaná má uspořádaná vlákna.	Filtrace, krytí ran, regenerativní medicína
Nanovlákná v prostorových strukturách	Podobný plošnému typu, ale vlákna vystupují do prostoru. Útvar připomíná vatu.	Tkáňové inženýrství, separace/extrakce

3.3.2. Příprava nanovláken

K přípravě nanovláken se využívá velké množství materiálů. Obecně je můžeme dělit na organické a anorganické látky. Jako materiály anorganické se často používají kovy nebo oxidy kovů, například to jsou zlato, stříbro, měď, olovo, oxid titaničitý, oxid železitý, oxid hlinitý nebo oxid zinečnatý. Z organických materiálů se používají polymery buď přírodní nebo syntetické. Zástupci přírodních polymerů mohou být kolagen, keratin,

polysacharidy a syntetických polykaprolakton, kyselina polymléčná nebo polyuretan [29].

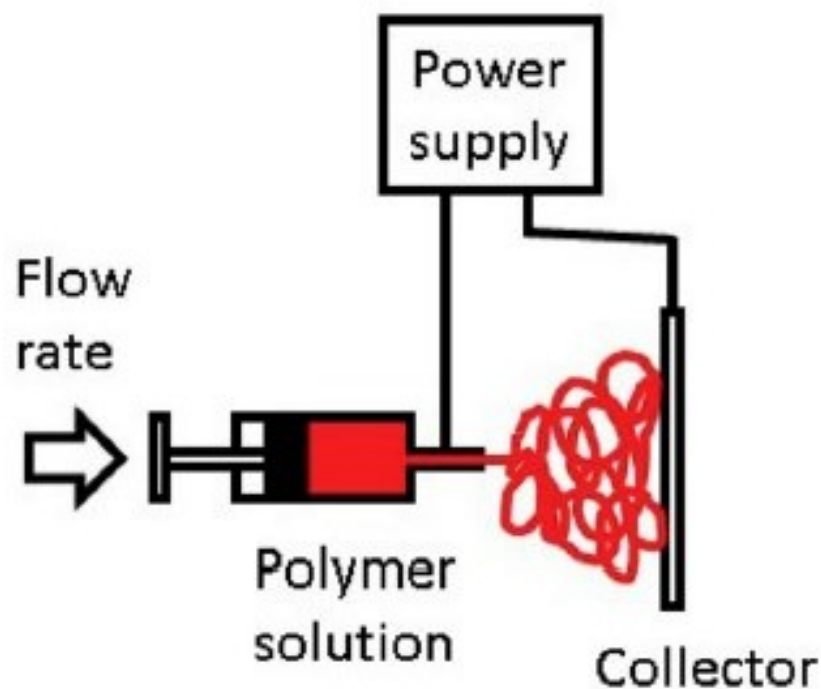
Mezi metody, které se uplatňují při přípravě nanovláken řadíme sonochemickou syntézu, kde základním principem je akustická kavitace, jev, při kterém ultrazvukové vlny v médiu vedou k tvorbě, růstu a kolapsu bublin, které mají fyzikální a chemické účinky. Předpokládá se, že tyto bubliny fungují jako mikroreaktory a kolabují, aby generovaly vysoké tlaky a teploty, a tak napomáhaly chemickým reakcím probíhajícím na rozhraní bublin [32]. Další metoda je templátová syntéza. Zde se využívá templát nanoporézní membrány složený z válcových pórů jednotného průměru. Ty umožňují kontrolu rozměrů vláken, takže lze vyrábět nanovlákná s velmi malými průměry. Nevýhodou této metody je, že nedokáže vyrobit kontinuální nanovlákná jedno po druhém [33]. Pomocí techniky samouspořádání se může příprava nanovláken dosáhnout spontánním uspořádáním jednotlivých makromolekul do uspořádaných a stabilních nanoúrovňových struktur pomocí nekovalentních interakcí mezi jednotlivými komponenty. Ve srovnání s elektrovlákňovanými nanovlákná mají samosestavená nanovlákná mnohem menší průměr v rozsahu několika nanometrů. Vlastní montáž je však složitá a málo výkonná, navíc vyžaduje komplikované nastavení.

Ze všech současných strategií pro syntézu nanovláken je jednou z nejvíce zavedených a široce používaných technik elektrostatické zvlákňování. Kromě konvenční techniky elektrostatického zvlákňování bylo vyvinuto několik variant této metody. Patří mezi ně vícejehlové, bezjehlové a koaxiální elektrostatické zvlákňování [34].

3.3.3. Elektrostatické zvlákňování

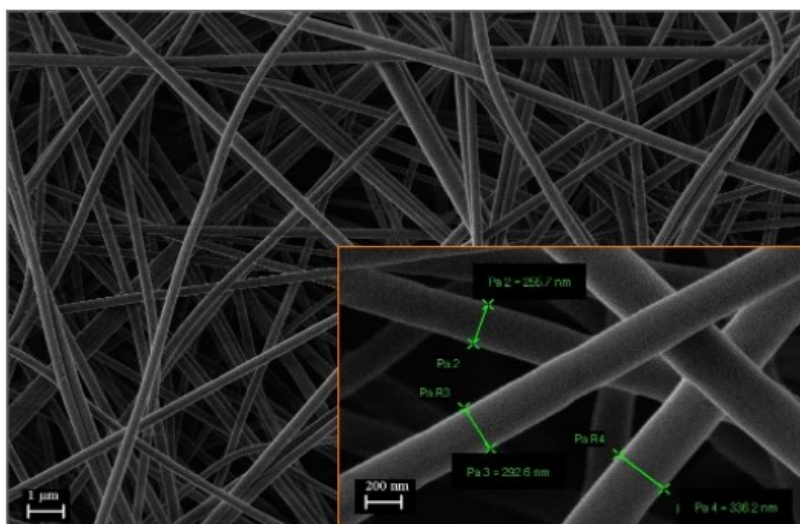
Proces elektrostatického zvlákňování je metoda pro přípravu nanovláken z polymerních roztoků v elektrickém poli při atmosférickém tlaku a laboratorní teplotě. Za hlavní tři součásti zařízení pro elektrostatické zvlákňování jsou považovány napájecí zdroj (vysoké napětí), jehla (zvlákňovací tryska) a kolektor (elektroda). Zdroj vysokého napětí generuje na připojeném polymerním roztoku elektrický náboj a ten se hromadí na jeho povrchu. Tyto náboje se vzájemně odpuzují, takže při kritické síle elektrického pole jsou schopny překonat povrchové napětí roztoku a vytvořit z kulovitěho útvaru polymerního roztoku na konci kapiláry kónický tvar nazývaný Taylorův kužel. Ze špičky Taylorova kužele je vypuzena nabitá tryska, která se táhne dále v elektrickém poli. Ta se

nakonec přemění na pevná vlákna v důsledku odpařování rozpouštědla. Stabilní tryska získaná na jehle zvlákňovací trysky se poté přemění na nestabilní trysku za vzniku elektrospřádaných vláken. Když aplikované elektrické pole dosáhne své kritické hodnoty, síla odpuzování náboje překoná povrchové napětí a proud vyrazí z hrotu kužele a přenesení tahovou sílu na polymer a vytvoří nestabilitu tohoto polymeru. Poté proudí z vrcholu kužele do kolektoru s opačnými náboji, které mají schopnost přitahovat nabitá vlákna. Rozpouštědlo se odpařuje proudem a zanechává suché vlákno na kolektoru [35]. Schéma elektrostatického zvlákňování je na obrázku 4. Na obrázku 5 je znázorněna struktura nanovlákná vytvořeného elektrostatickým zvlákňováním.



Obrázek 4 Princip elektrostatického zvlákňování [35]

Jehla vstříkuje roztok polymeru v elektrickém poli vytvořeném vysokonapěťovým zdrojem. Vysoké napětí je aplikováno mezi zvlákňovací trysku a uzemněným kolektorem.



Obrázek 5 Struktura nanovláknna vytvořeného klasickým zvlákňováním [36]

Variety elektrostatického zvlákňování

Technologie vícejehlového elektrostatického zvlákňování je založena na tradiční metodě s jednou jehlou, ale využívá kombinaci více jehel. V systémech s více jehlami se zvyšuje počet Taylorových kuželů vytvořených během procesu. Taylorovy kužely se mohou působením síly elektrického pole rozdělit na více trysek a výrazně tak zvýšit výtěžnost přípravy nanovláken [37].

Bezjehlová varianta je proces výroby nanovláken elektrostatickým zvlákňováním polymerního roztoku přímo z otevřeného povrchu kapaliny. Může se použít rotační válec jako zvlákňovací tryska. Ten je částečně ponořen a rotuje v polymerním roztoku a umožňuje vytvoření tenké vrstvy roztoku a tím vznik hrotů, které po aplikaci elektrického pole iniciují proces elektrostatického zvlákňování. Tuto variantu využívá technologie Nanospider™, která byla vyvinuta na Technické univerzitě v Liberci výzkumným týmem profesora Oldřicha Jirsáka [38].

Koaxiální elektrostatické zvlákňování je vyvinuto pro syntézu jádro-plášť a vícevrstevných kompozitních nanovláknenných struktur. Při této variantě jsou dva odlišné stavební bloky nanovláken dodávány prostřednictvím různých koaxiálních kapilárních kanálů a poté integrovány do kompozitních nanovláken typu jádro-plášť [34].

Parametry ovlivňující zvlákňování

Tvorba nanovláken je do značné míry ovlivněna experimentálními parametry, včetně použitého napětí, vzdálenosti mezi dvěma elektrodami a průtokem roztoku. Kromě toho

jsou důležitými faktory také vodivost roztoku, viskozita roztoku, vlhkost a teplota. Aplikované napětí je kritickým parametrem pro tvorbu vlákna. K nabitým proudům vypuzeným z Taylorova kužele dochází pouze tehdy, když použité napětí překročí prahové napětí. V opačném případě se kapka roztoku zastaví na zvlákňovací trysce. Vlastnosti roztoku pro elektrostatické zvlákňování určují hodnoty prahového napětí. Průtok je závislý na vlastnostech polymerizačního roztoku. Pomalý průtok může mít za následek tuhnutí polymeru uvnitř špičky zvlákňovací trysky, která se tak nemůže zformovat do Taylorova kužele. Jakékoli zvýšení rychlosti průtoku vede ke zvětšení průměru elektrostatických vláken. Vzdálenost mezi zvlákňovací tryskou a sběračem je dalším zásadním parametrem pro určení morfologie vláken. Zvětšení vzdálenosti přispěje ke zvýšení doby letu trysek a doby odpařování rozpouštědla. Pokud se tedy vzdálenost mezi elektrodami zvětší, mohou být shromážděna tenčí vlákna. Je však třeba poznamenat, že k takovým jevům dojde pouze tehdy, když pracovní vzdálenost nepřekročí vhodný rozsah [39].

Tabulka 4 Vliv parametrů roztoku a okolí na tvorbu a morfologii nanovláken [39]

Parametr	Vliv na elektrovlákňování
Vodivost	Zvýšení vodivosti roztoku může usnadnit natahování trysky, snížit možnosti tvorby kuliček a průměr vlákna
Viskozita	Vysoká viskozita roztoku vede k nedostatečné pevnosti k roztažení trysky do vláken, pokud je viskozita příliš nízká, trysky se rozpadnou na kapičky a žádná vlákna se nevytvoří
Povrchové napětí	Snížení povrchového napětí přispívá k hladké morfologii vláken
Těkavost rozpouštědla	Obecně se těkavé rozpouštědlo může rychle odpařovat a usnadnit tryskové tuhnutí, příliš těkavé rozpouštědlo může vést k rychlému zablokování hrotu jehly
Vlhkost	Vysoká okolní vlhkost může zabránit odpařování rozpouštědla během procesu tuhnutí v proudu a vést k nežádoucím morfologiím vláken

Teplota	Zvýšení okolní teploty zvýší rychlost odpařování rozpouštědla a současně sníží viskozitu roztoku a bude mít za následek zmenšení průměru vlákna
---------	---

3.3.1. Využití nanovláken

Nanovlákná jsou materiály, které nacházejí uplatnění ve velkém množství oborů. Dají se používat v biomedicíně, textilním průmyslu, tkáňovém inženýrství, ochraně životního prostředí, analytické chemii a mnoha dalších oborech [39].

Nanovlákná mohou být aplikována v různých analytických technikách a procesech. U optických metod lze nanovlákná využít jako nosiče chromogenních látek, fluoroforů, chemiluminiscenčních činidel, což vedlo k zvýšení citlivosti a selektivity, takže nanovlákná byla intenzivně aplikována v různých technikách, jako je kolorimetrie, fluorescence, chemiluminiscence a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie. Dále nalézáme uplatnění v chromatografii na ultratenké vrstvě (UTLC). Zde se nanovlákná mohou využít jako stacionární fáze. Metoda elektrostatického zvlákňování pro výrobu UTLC desek má několik výhod, včetně snadno laditelné tloušťky stacionární fáze, různou funkčnost nebo modifikaci, minimální množství polymeru a více možností výběru prekurzorů. Nanovlákná se dají také využívat u přípravy vzorku. Je možná aplikace nanovláken jako extrakční materiál v různých technikách přípravy vzorků, protože vykazují vysokou sorpční kapacitu pro cílové analyty [40].

V životním prostředí jsou nanovlákná aktivně zkoumána jako pokročilé filtry pro odstraňování znečišťujících látek, jako jsou pevné či prachové částice, toxické ionty a organické molekuly ze znečištěného vzduchu a odpadních vod. Byly také použity k rozkladu škodlivých chemikálií a získávání drahých kovů [41].

Nanotechnologie se dají využívat pro dodávání a uvolňování biomolekul. Tyto přístupy se zdají být slibnou alternativní strategií pro ochranu biomolekul, kontrolu jejich uvolňování a zlepšení klinických studií. Nanovlákná mají velkou kontaktní plochu a mohou být zatížena více než jednou molekulou, z nichž každá se může uvolnit v jiném čase. Pomocí nanovláken lze podat látky jako jsou antibiotika, protizánětlivá a protirakovinná léčiva. Využitím toho systému se snižuje jejich cytotoxicita a zvyšuje účinnost [42].

Nanovlákna připravené elektrostatickým zvlákňováním lze využít i při tkáňové regeneraci. Díky své dostupnosti, schopnosti napodobovat kožní extracelulární matrix (ECM) a neschopnosti přenášet nemoci na rozdíl od běžných kožních štěpů jsou jedním ze slibných řešení pro lepší léčbu ran [43]. Oprava nebo regenerace tkáně zahrnuje integraci materiálů nosiče, buněk a/nebo biologických faktorů pro podporu růstu tkáně poskytnutím vhodné kombinace mechanické podpory, topografického vedení a biochemických pokynů buňkám. Je důležité při vývoji napodobit co nejlépe nativní ECM. Z hlediska složení existuje široká škála syntetických a přírodních polymerů, které lze přímo elektrostaticky zvlákňovat [41].

4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje a pomůcky

System SIA

- systém Mikro SIA, FIALab instruments, Bellevue USA
- osmicestý selekční ventil s 5ml pístovým čerpadlem
- UV-VIS-NIR spektrofotometr, Ocean Optics
- 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
- Franzovy liberační cely (15 ml)
- vodní lázeň
- termostat Julabo, Německo
- magnetická míchačka POLY 15 Variomag, H+P Labor Technik AG, Německo
- membrány – viz. tabulky 5 a 6

Tabulka 5 Testované membrány připravené Technickou univerzitou v Liberci

Označení	Materiál	Poměr polymer: klotrimazol	Velikost pórů
PDX	Polydioxanon	8:1	0,687
PDX	Polydioxanon	6:1	0,719
PCL	Polykaprolakton	8:1	0,369
PCL	Polykaprolakton	6:1	0,379

Tabulka 6 Testované membrány sycené v laboratoři

Označení	Materiál	Koncentrace sytícího roztoku
PDX	Polydioxanon	2 mg/ml
PDX	Polydioxanon	1 mg/ml
PCL	Polykaprolakton	2 mg/ml
PCL	Polykaprolakton	1 mg/ml

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

Základní roztok klotrimazolu

Základní roztok byl připraven rozpuštěním 5 mg klotrimazolu v 10 ml ethanolu v odměrné baňce. Klotrimazol je omezeně rozpustný ve vodě, proto musel být použit ethanol jako rozpouštědlo. Výsledná koncentrace roztoku byla 0,5 mg/ml. Ředěním základního roztoku ultračistou vodou či pufrům byli připraveny další roztoky.

Kalibrační vodné roztoky klotrimazolu

Ze základního roztoku klotrimazolu byly postupně připraveny vodné kalibrační roztoky. Dané roztoky byly připraveny v koncentracích 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 $\mu\text{g/ml}$. Do 10 ml odměrných baněk byl na pipetován pomocí automatických pipet daný přesný objem základního roztoku a po rysku doplněn ultračistou vodou.

Tabulka 7 Příprava kalibračních roztoků

Koncentrace kalibračního roztoku ($\mu\text{g/ml}$)	Množství základního roztoku (μl)
2	40
4	80
6	120
8	160
10	200
12	240
14	280
16	320

Kalibrační roztoky klotrimazolu s octanovým pufrům

Kalibrační roztoky klotrimazolu s pufrům byly připraveny ze základního roztoku o koncentracích 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 $\mu\text{g/ml}$. Do 10 ml odměrných baněk byl na pipetován přesný objem základního roztoku pomocí automatické pipety a doplněn po rysku octanovým pufrům o pH 4,5.

Tlumivý roztok o pH 4,5

Pro přípravu 250 ml octanového pufru bylo naváženo 0,7475 g octanu sodného. Ten byl rozpuštěn v 0,5 ml bezvodé kyseliny octové a objem byl doplněn ultračistou vodou po rysku. V předchozí diplomové práci testy probíhaly s čistě vodným pufrům a bylo tu vždy riziko snížené rozpustnosti, která by mohla ovlivnit liberační profil. Proto jsme tentokrát zvolili pufr s 10 % ethanolu. Ověření hodnoty pH roztoku bylo provedeno pH metrem před každým použitím a kalibrace byla provedena pomocí dvou standardních kalibračních roztoků o známém pH (4; 7).

Roztoky pro sycení nanovláken

Roztoky pro sycení nanovláken měly koncentraci 2 a 1 mg/ml klotrimazolu v ethanolu. Byla použita nanovlákná PDX a PCL vyrobená Technickou univerzitou v Liberci. Roztoky byly připraveny navážením přesného množství klotrimazolu, a to 100 a 50 mg. Navážka byla kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna po rysku ethanolem. Tyto roztoky byly poté použity jako sytící medium pro oba typy nanovláknenných membrán.

4.4. Testované nanovláknenné membrány

Pro práci byla použita nanovlákná vyrobená Technickou univerzitou v Liberci za využití technologie NanoSpider, takto získaná struktura byla dvourozměrná. Byly použity dva druhy nanovláken, a to PDX a PCL viz. Použité přístroje a pomůcky.

Nejdříve proběhlo testování nanovláken sycených přímo při výrobě ve formě kruhových membrán o průměru 3 cm. Klotrimazol byl použit v určitém poměru ke stavební jednotce polymeru nanovlákná. Pro hodnocení byly porovnány liberační profily jednotlivých koncentrací a typů nanovláken. U těchto membrán bylo provedeno i HPLC stanovení obsahu navázaného klotrimazolu.

Pro druhou část experimentu byla nanovlákná sycena přímo v laboratoři. Pro sycení nanovláken byla zvolena koncentrace 2 a 1 mg/ml. Při nižších koncentracích nedocházelo k dostatečnému navázání klotrimazolu. K sycení byly použity ethanolicke roztoky klotrimazolu. Membrány byly vloženy do misek po třech kusech s míchadlem a zality 50 ml roztoku. Takto připravené misky byly vloženy na magnetickou míchačku. Sycení PDX membrán probíhalo 2 hodiny. Pro PCL membrány byl zvolen čas sycení 4 hodiny. Delší doba sycení PCL nanovláken byla vybrána z důvodu nedostatečného navázání klotrimazolu při kratším časovém úseku. Hodnocení probíhalo stejně jako u vláken sycených při výrobě.

V rámci liberačního profilu bylo hodnoceno množství klotrimazolu uvolněného v daném čase z nanovláken do pufru o pH 4,5, který simuloval fyziologické podmínky neporušené kůže. Jednotlivé rozdíly mezi typy nanovláken a typem sycení byly rovněž zachyceny v liberačním profilu.

4.5. Parametry měření

Pro měření byl využit systém SIA, ke kterému byly externě připojeny tři liberační jednotky (Franzovy cely). Celý systém se skládal z následujících částí: obousměrného pístového čerpadla, osmicestného selekčního ventilu, mísící cívky, peristaltického čerpadla, UV-VIS spektrofotometru, pružných hadiček pro peristaltické čerpadlo, zásobní lahve s nosným proudem, zásobní lahve s pufrem o pH 4,5, odpadní lahve, termostatu, magnetické míchačky. Systém byl řízen pomocí ovládacího programu vytvořeného ve FIALab for Windows 5.0.

Tabulka 8 Parametry měření

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	200 μ l
Objem aspirovaného vzorku (dvě paralelní měření jednoho vzorku v daném čase)	2x 40 μ l
Rychlost toku do detektoru	16 μ l/s
Vlnová délka detekce	210 nm
Otáčky magnetické míchačky	230 rpm
Rychlost peristaltické čerpadla	6 rpm
Teplota vodní lázně	32 °C
Celkový čas 1 měřicího cyklu	15 min

Kalibrace

Pro kalibraci bylo testováno 8 různých koncentrací standardu klotrimazolu a probíhala ve dvou mediích. Příprava těchto roztoků byla popsána v kapitole Příprava roztoků. Všechny koncentrace byly změřeny třikrát a z naměřených hodnot byla spočítána průměrná hodnota. Kalibrační přímka byla popsána rovnicí $y=kx+q$, kde x je koncentrace, y je hodnota signálu, k je směrnice přímky a q je absolutní člen směrnice přímky. Pomocí korelačního koeficientu byla hodnocena linearita.

4.6. Postup měření liberace klotrimazolu

Měření probíhalo v SIA systému ovládaného pomocí programu vytvořeného ve FIALab for Windows 5.0.

V prvním kroku bylo nutné promýt celý systém ultračistou vodou ve větším objemu. K tomu byly připraveny programy pro promytí veškerých používaných součástí systému. Celý proces se opakoval minimálně třikrát. Z důvodu snížené rozpustnosti klotrimazolu ve vodě bylo nutné promývat systém i ethanolem a poté znovu vodou. Ověření efektivity promytí se dalo snadno zjistit odezvou detektoru.

Před začátkem měření liberace byla provedena zkrácená kalibrace s využitím kalibračních roztoků. Současně byl zapnut termostat k vytemperování vodní lázně na 32 °C. Peristaltické čerpadlo bylo nastaveno na rychlost 6 rpm a rychlost magnetické míchačky na 230 rpm.

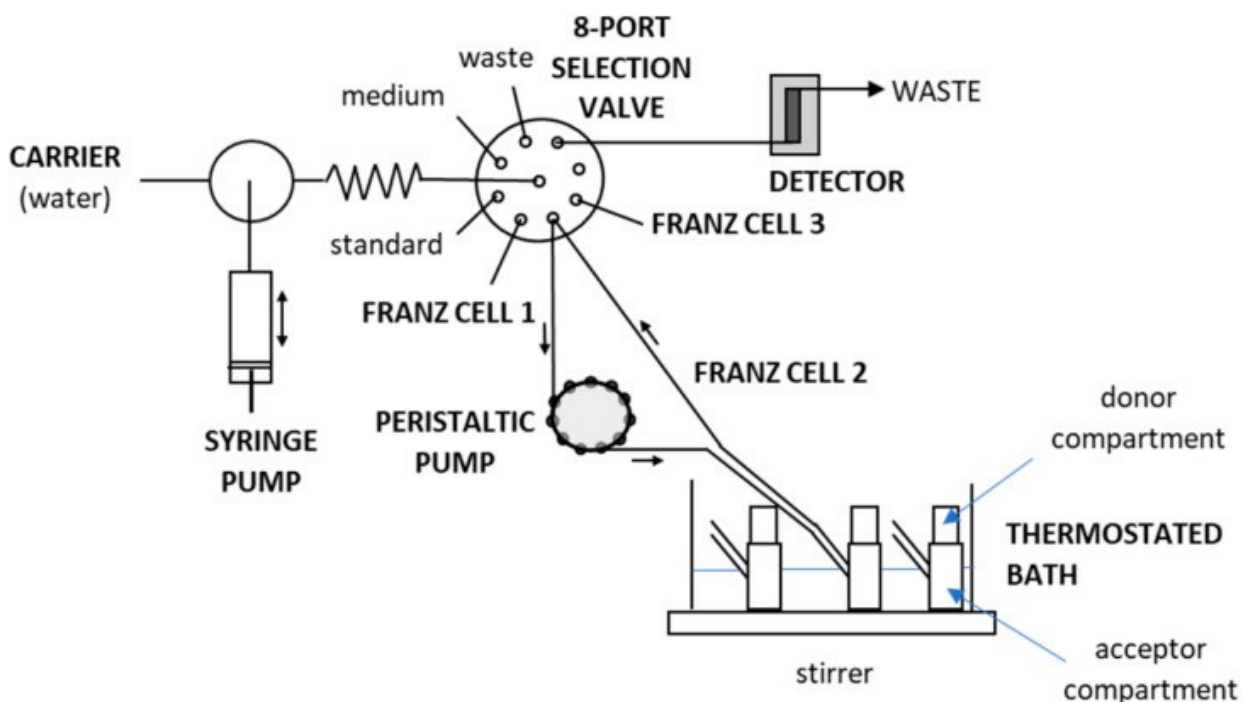
Dále byla zahájena samotná příprava na měření. Do Franzových cel byl na pipetován po okraj tlumivý roztok o pH 4,5, přibližný objem 15 ml. Takto naplněné cely byly umístěny do vytemperované vodní lázně a bylo vloženo míchadlo pro udržení stálé koncentrace. Do otvoru ve Franzově cele byly zasunuty hadičky pro odběr vzorku a doplnění tlumivého roztoku. Přes takto připravenou část cely se pinzetou opatrně umístila testovaná nanovlákná membrána. Membrána musela být umístěna tak, aby nedošlo k jejímu poškození a aby nevznikaly pod membránou vzduchové bublinky. Pomocí elastických gumiček byl připevněn horní díl cely. Vršek se pak přiklopil víčkem z umělé hmoty, aby nedocházelo k odpařování kapaliny. Experiment probíhal pomocí tří Franzových cel s postupným dávkováním po 5 minutách. Jeden cyklus tedy trval 15 minut.

Pro monitorovací měření byl použit přednastavený program. Pro jednu celu trval cyklus 5 minut. Základní kroky zahrnují promytí dávkovacího portu a odeslání tohoto objemu do odpadu. Dále aspirace nosného proudu a vzorku a odeslání do detektoru. Dávkování vzorku proběhlo vždy dvakrát. Zbytek aspirovaných roztoků byl odeslán do odpadu a poté bylo doplněno liberační médium (tlumící roztok). Doplnění bylo nutné, aby nedocházelo k poklesu hladiny média v cele, a tím ztráty kontaktu hladiny s nanovláknennou membránou. Experimentálně byl zvolený objem 200 μl .

V důsledku doplňování média do Franzových cel docházelo k zředování koncentrace klotrimazolu. Proto bylo nutné korigovat výpočet výsledné koncentrace podle následujícího vzorce.

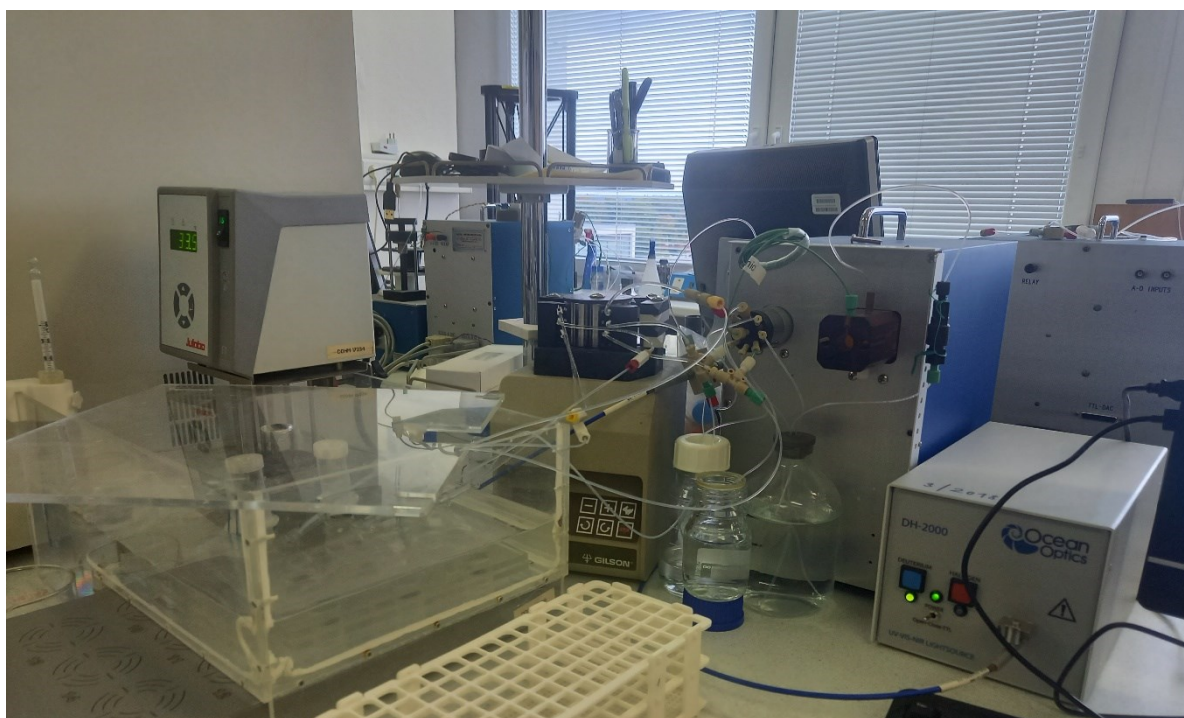
$$c_{\text{korigovaná}} = c_{\text{naměřená}} + \frac{\text{objem doplněného media}}{\text{objem systém}} (c_1 + c_2 + \dots c_{(n-1)})$$

Na obrázku 6 je znázorněno schéma zapojení SIA systému. A na obrázcích 7 a 8 je SIA systém a zapojené Franzovy cely. Na obrázku 9 je záznam z měření liberace klotrimazolu.

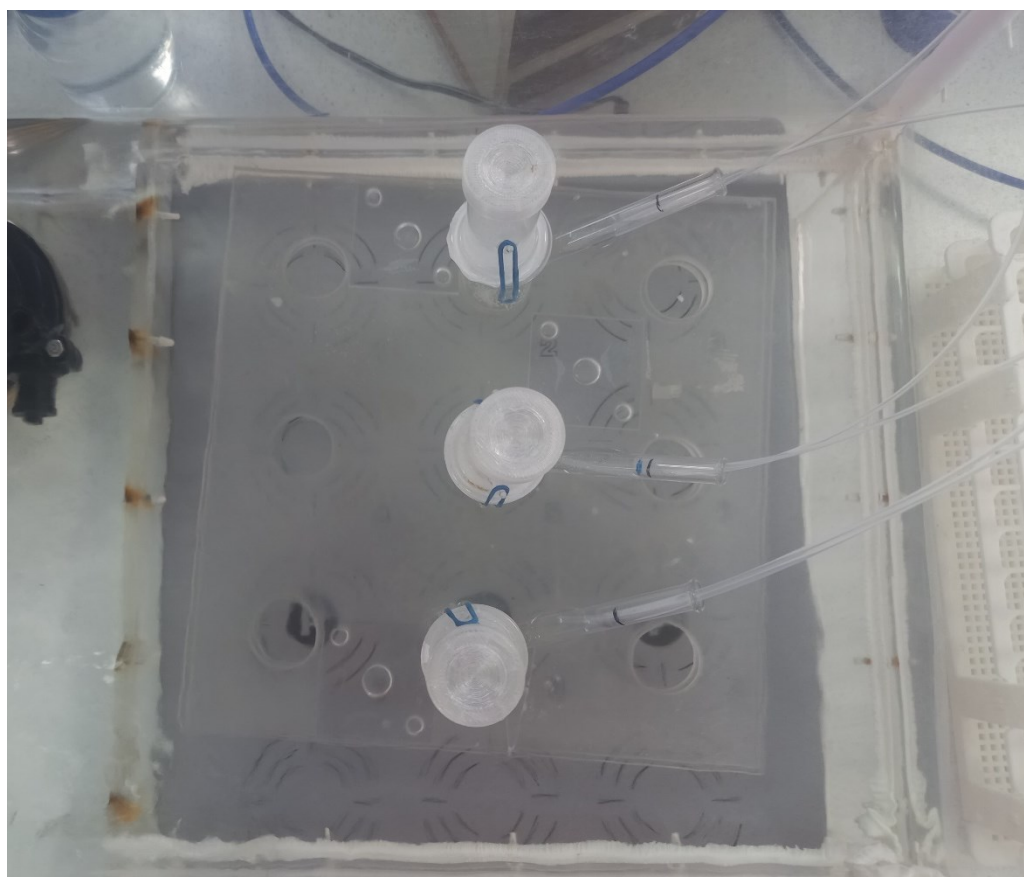


Obrázek 6 Schéma systému SIA při liberaci [17]

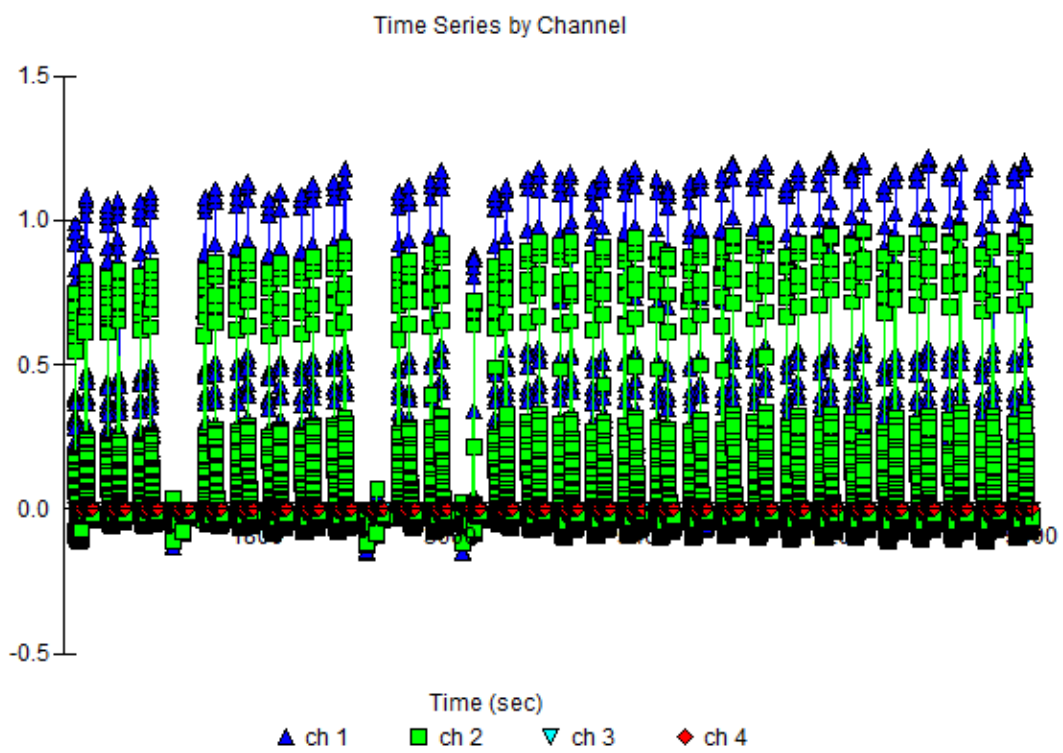
(Franz cell – Franzova cela, stirrer – míchadlo, thermostated bath – vyhřívaná vodní lázeň, akceptor compartment – akceptorová část, donor compartment – donorová část, peristaltic pump – peristaltické čerpadlo, 8-port selection valve – 8cestný selekční ventil, waste – odpad, carrier – nosný proud, syringe pump – pístové čerpadlo, detector – detektor)



Obrázek 7 Systém SIA



Obrázek 8 Franzovy cely ve vodní lázni



Obrázek 9 Záznam měření liberace klotrimazolu

5. Výsledky a diskuse

Pro hodnocení všech výsledků byl použit program FIALab for Windows 5.0 a dále zpracovány v programu Microsoft Office Excel.

5.1. Kalibrační stanovení klotrimazolu

Lineární závislost koncentrace klotrimazolu byla stanovena ve dvou prostředích, a to ve vodném, a v tlumivém roztoku o pH 4,5. Pro praktické měření je stanovena minimální hodnota korelačního koeficientu 0,99. V obou případech měření byla tato podmínka splněna.

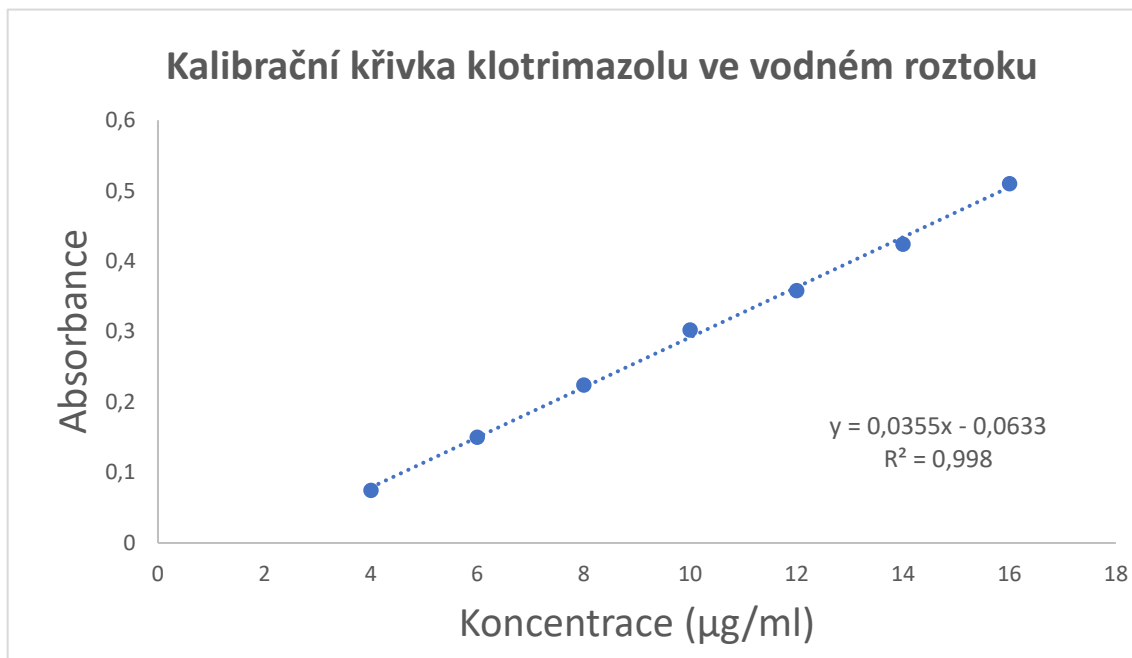
5.1.1. Kalibrace pro vodný roztok

Pro měření vzorků ve vodném prostředí byly zvoleny kalibrační roztoky o koncentracích 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 a 16 $\mu\text{g/ml}$. Z toho první koncentrace byla vyřazena z výsledků, protože se nacházela pod limitem kvantifikace. Ten je 2,9 $\mu\text{g/ml}$ a byl spočítán jako koncentrace, která produkuje 10krát vyšší signál, než je signál šumu. Všechny vzorky byly měřeny celkem čtyřikrát a první měření bylo vyškrtnuto, z důvodů eliminace nežádoucích vlivů z předchozích měření. Výsledkem byla kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentrace s korelačním koeficientem 0,998 a rovnicí přímky $y = 0,0355x - 0,0633$ (Tabulka 9). Na obrázku 10 je zobrazena kalibrační křivka pro kalibraci klotrimazolu.

Tabulka 9 Kalibrace ve vodném roztoku pro rozmezí 2–16 $\mu\text{g/ml}$

Koncentrace ($\mu\text{l/ml}$)	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Průměr	SD	RSD (%)
2	0,048	0,043	0,051	0,048	0,003	6,81
4	0,072	0,067	0,084	0,074	0,007	9,71
6	0,138	0,154	0,155	0,149	0,008	5,46
8	0,229	0,247	0,197	0,224	0,020	9,25
10	0,285	0,319	0,304	0,302	0,013	4,62
12	0,349	0,366	0,359	0,358	0,006	1,85

14	0,445	0,407	0,420	0,424	0,016	3,78
16	0,503	0,516	0,511	0,510	0,005	1,01



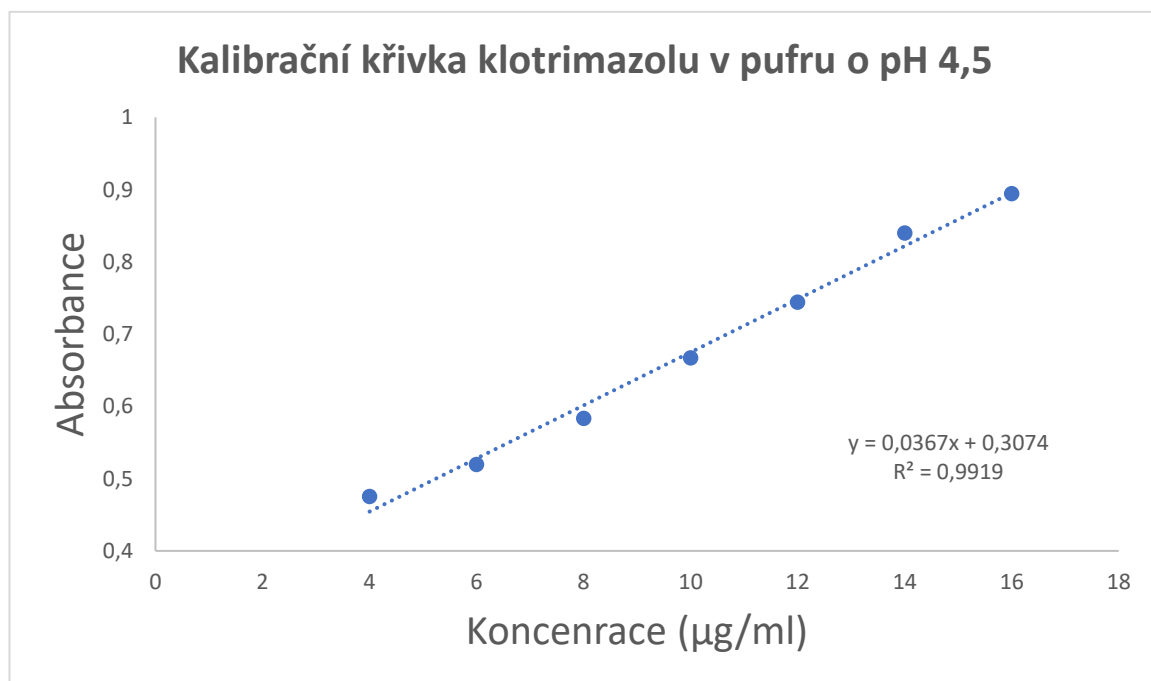
Obrázek 10 Kalibrační křivka klotrimazolu ve vodném prostředí

5.1.2. Kalibrace pro tlumivý roztok o PH 4,5

Pro kalibraci v prostředí tlumivého roztoku o pH 4,5 byly použity roztoky ve stejném koncentračním rozsahu jako ve vodném prostředí. A stejně jako v předchozím případě byla první koncentrace vyškrtnuta z výsledků, jelikož se nacházeli pod limitem kvantifikace. Ten byl 3,6 µg/ml a byl spočítán jako koncentrace, která produkuje 10krát vyšší signál, než je signál šumu. Pufr byl zvolen jako nulová hodnota, protože sám absorbuje při měřené vlnové délce. Dané kalibrační rozmezí bylo popsáno rovnicí $y = 0,0367x + 0,3074$ a korelační koeficient byl 0,9919. Na obrázku 11 je zobrazena kalibrační křivka pro stanovení klotrimazolu v acetátovém pufru s obsahem 10 % ethanolu.

Tabulka 10 Kalibrace v tlumivém roztoku pro rozmezí 2–16 µg/ml

Koncentrace (µg/ml)	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Průměr	SD	RSD
Pufr	0,459	0,475	0,468	0,467	0,007	1,39
2	0,471	0,467	0,467	0,468	0,002	0,59
4	0,471	0,479	0,476	0,475	0,004	0,74
6	0,511	0,525	0,522	0,519	0,006	1,15
8	0,593	0,593	0,564	0,583	0,014	2,33
10	0,670	0,671	0,660	0,667	0,004	0,74
12	0,691	0,749	0,793	0,744	0,042	5,63
14	0,871	0,859	0,790	0,839	0,035	4,24
16	0,931	0,857	0,895	0,894	0,030	3,40



Obrázek 11 Kalibrační křivka klotrimazolu v pufru o pH 4,5

5.2. Liberace klotrimazolu

K měření se využívaly dva druhy nanovláknenných membrán (PDX, PCL). Ty byly rozděleny na základě použité koncentrace roztoků při sycení, délky a způsobu sycení. Podmínky pro akceptorové medium byly stanoveny tak, aby modelovaly stav zdravé neporušené kůže, tedy pH 4,5. Teplota vodní lázně byla 32°C.

Výsledky byly popsány výškou píků, které odpovídaly dané hodnotě absorbance. Výsledné absorbance byly porovnány se standardním roztokem o koncentraci 16 µg/ml, který se před každým měřením připravoval nový a byl měřen před nebo po liberaci klotrimazolu. Vzhledem k ředění akceptorového média byla nutná korekce výsledných hodnot. Z průměrných absorbancí pro konkrétní časový úsek byla vypočtena hodnota koncentrace, která byla zanesena do grafu v závislosti na čase. Ke každému bodu byla přidána chybová úsečka, která znázorňuje směrodatnou odchylku. Porovnáním sestavených grafů můžeme zhodnotit, která z nanovláknenných membrán a jaká koncentrace byla vhodnější jako nosič pro klotrimazol.

Tabulka 11 Membrány PDX a PCL sycené při výrobě Technickou univerzitou v Liberci

Typ membrány	Poměr polymer:klotrimazol	
PDX	8:1	6:1
PCL	8:1	6:1

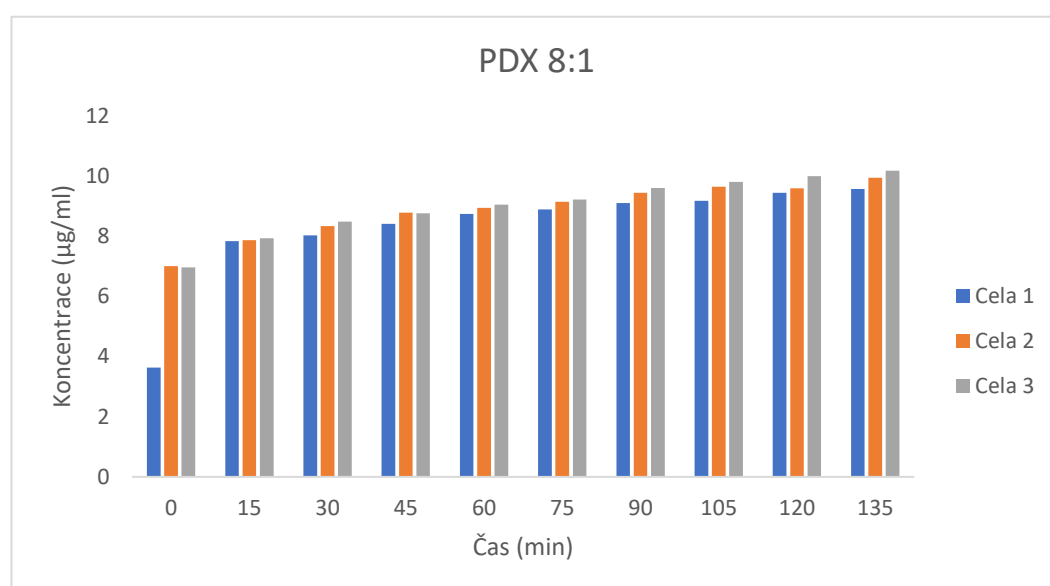
Tabulka 12 Membrány PDX a PCL sycené v laboratoři

Typ membrány	Koncentrace sytícího roztoku (mg/ml)		Doba sycení (hod)
PDX	2	1	2
PLC	2	1	4

5.2.1. Liberace klotrimazolu z PDX nanomembrán sycených při výrobě Technickou univerzitou v Liberci

Tabulka 13 PDX membrány sycené při výrobě v poměru 8:1

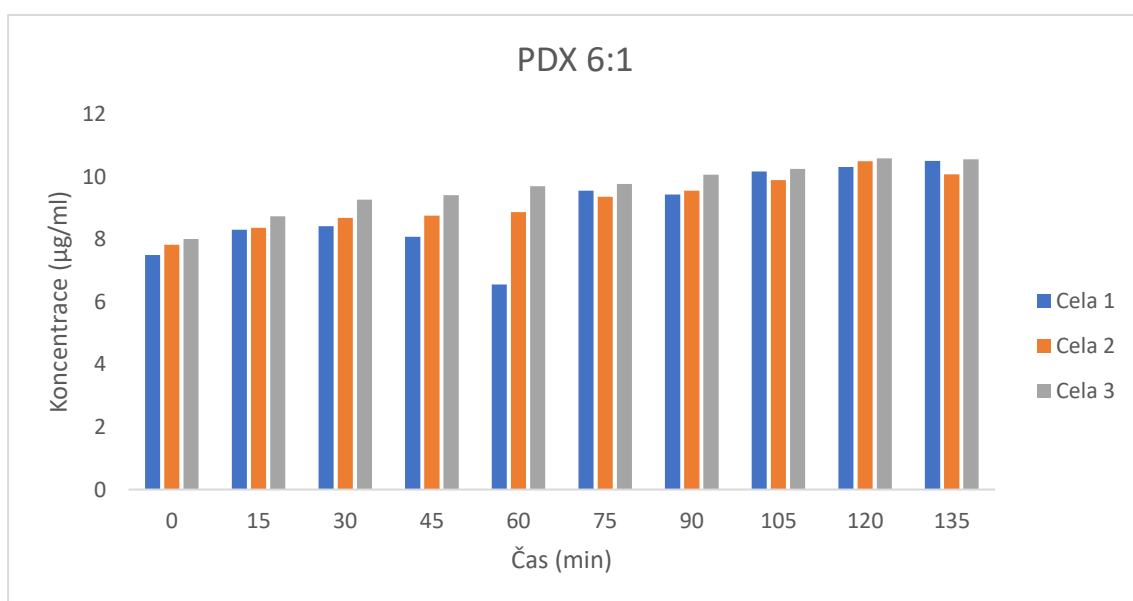
Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (µg/ml)	Suma	Korigovaná c (µg/ml)	SD	RSD (%)
0	0,734	1,007	1,001	0,913	5,861	0	5,861	0,002	0,19
15	1,058	1,057	1,063	1,059	7,692	13,553	7,873	0,003	0,27
30	1,065	1,086	1,098	1,083	7,994	21,547	8,281	0,006	0,53
45	1,087	1,112	1,111	1,104	8,249	29,796	8,647	0,001	0,06
60	1,105	1,116	1,125	1,116	8,399	38,196	8,909	0,004	0,38
75	1,108	1,124	1,129	1,120	8,457	46,653	9,079	0,003	0,25
90	1,116	1,138	1,150	1,134	8,639	55,291	9,376	0,006	0,53
105	1,113	1,146	1,158	1,139	8,688	63,979	9,541	0,006	0,53
120	1,125	1,132	1,163	1,140	8,701	72,681	9,671	0,015	1,36
135	1,126	1,151	1,168	1,148	8,808	81,488	9,894	0,009	0,75



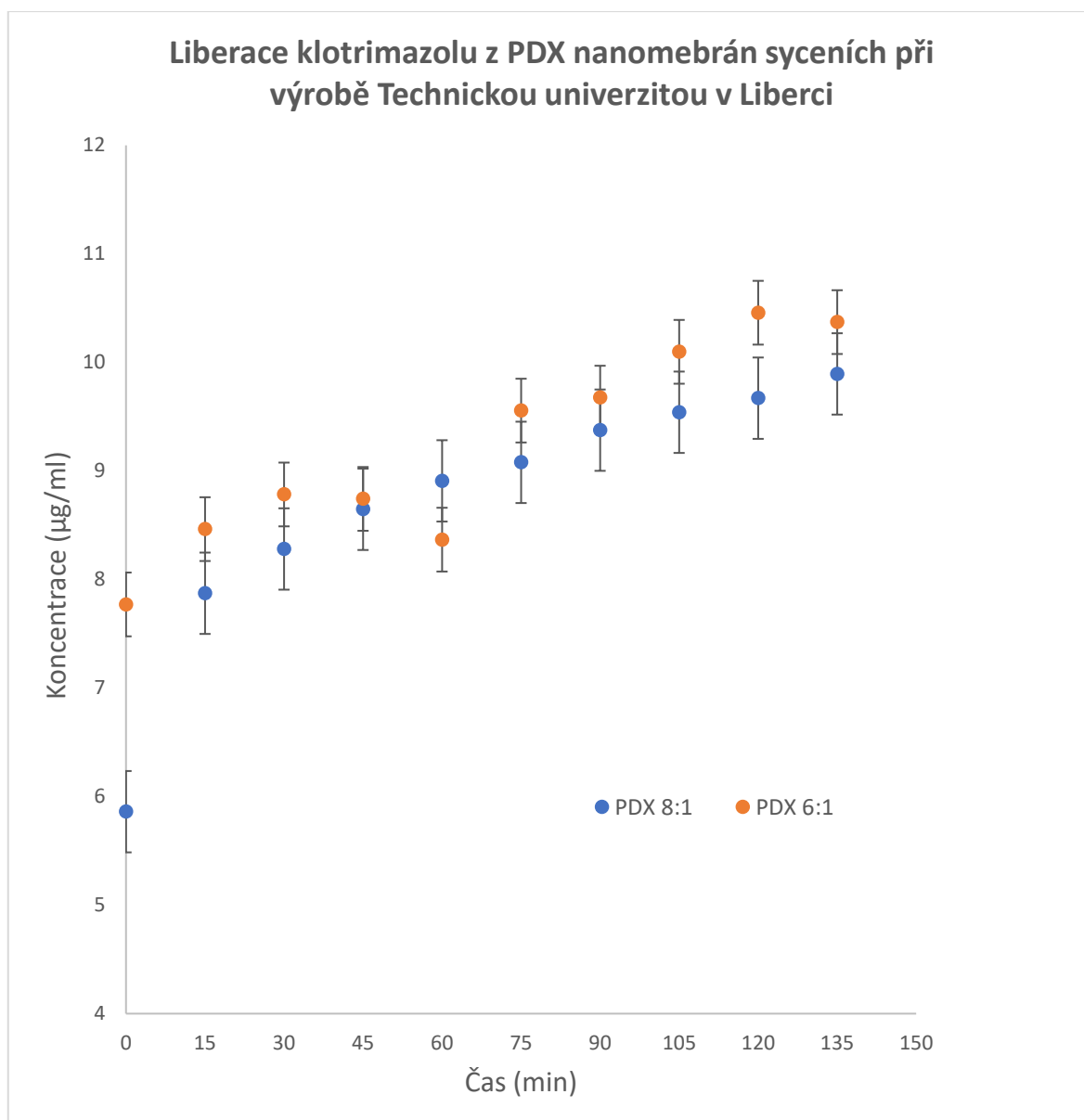
Obrázek 12 Naměřené koncentrace při liberaci klotrimazolu z membrány PDX 8:1

Tabulka 14 PDX membrány sycené při výrobě v poměru 6:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (µg/ml)	Suma	Korigovaná c (µg/ml)	SD	RSD (%)
0	1,043	1,069	1,084	1,065	7,770	0	7,770	0,007	0,68
15	1,091	1,096	1,124	1,104	8,251	16,021	8,464	0,014	1,31
30	1,091	1,112	1,158	1,120	8,457	24,478	8,783	0,023	2,04
45	1,056	1,109	1,159	1,108	8,306	32,783	8,743	0,025	2,29
60	0,928	1,109	1,172	1,070	7,826	40,690	8,367	0,032	2,30
75	1,159	1,139	1,169	1,155	8,896	49,505	9,556	0,015	1,27
90	1,139	1,145	1,182	1,156	8,897	58,402	9,676	0,019	1,61
105	1,188	1,163	1,187	1,179	9,196	67,598	10,098	0,012	1,06
120	1,189	1,201	1,204	1,198	9,431	77,029	10,458	0,001	0,15
135	1,195	1,158	1,191	1,181	9,221	86,250	10,371	0,017	1,46



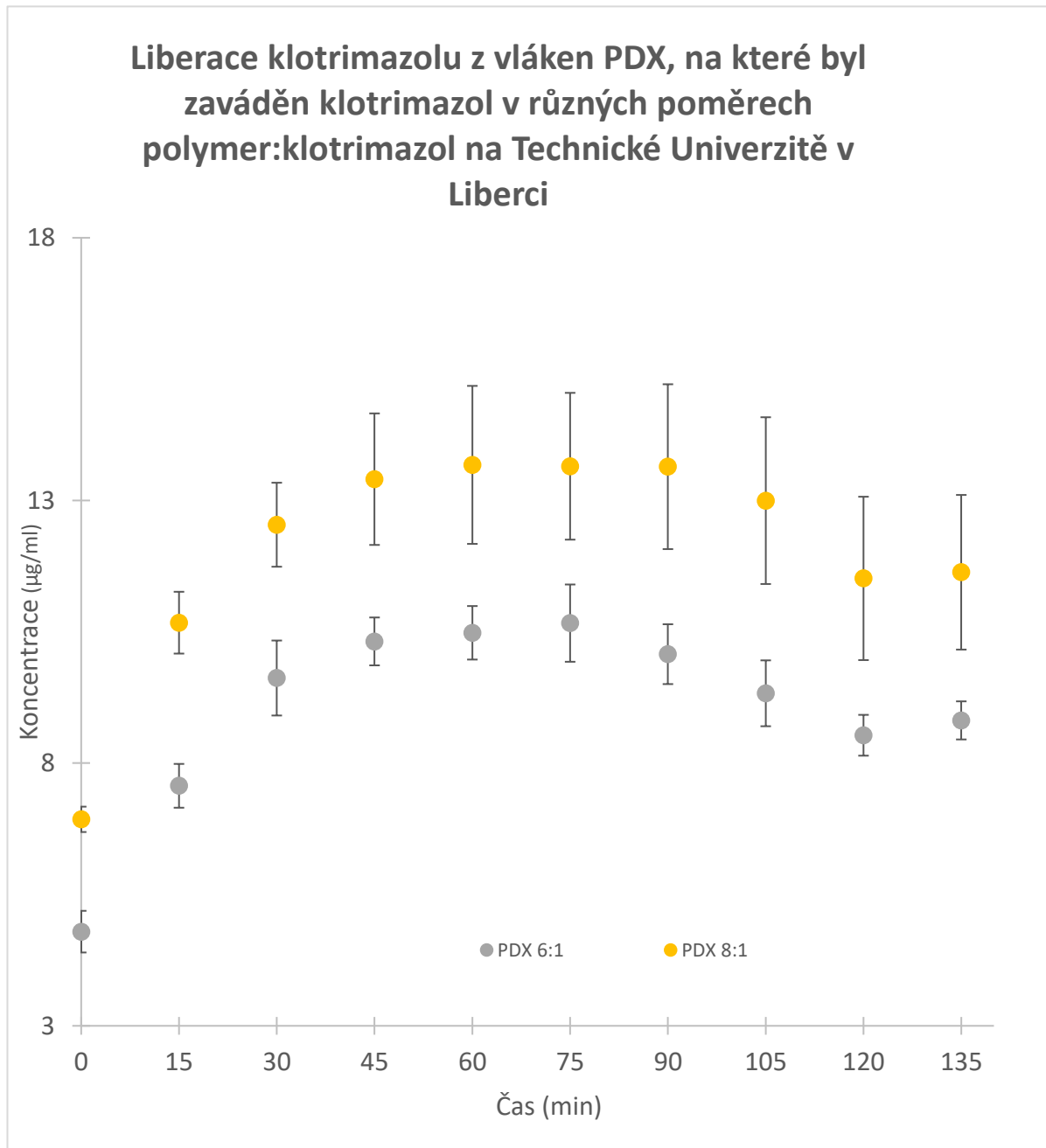
Obrázek 13 Naměřené koncentrace při liberaci klotrimazolu z membrány PDX 6:1



Obrázek 14 Graf závislosti koncentrace na čase pro PDX nanomembrány sycené při výrobě v poměru 8:1 a 6:1

Zhodnocení: Liberační profily použitých nanovláčkových nosičů sycených při výrobě mají velmi podobný průběh. Membrána PDX v poměru 8:1 má na začátku o něco strmější růst koncentrace než druhá testovaná membrána PDX 6:1. Ta má růst koncentrace velmi pozvolný a v čase 60 minut dochází k malému poklesu. Membrány PDX 6:1 svého maxima dosahuje v čase 120 minut a poté dochází k postupnému poklesu koncentrace. To může být z důvodu, že se už veškerý navázaný klotrimazol uvolnil. U membrány PDX 8:1 po rychlém růstu koncentrace nastává zpomalení a ke konci

měření až stagnace liberačního profilu. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky jednotlivých měření, které jsou uvedené v tabulkách č. 13 a 14. Na obrázcích 12 a 13 jsou zobrazeny naměřené hodnoty koncentrace uvolněné z nanomembrán PDX pro možnost porovnání s liberačním profilem. Obrázek 14 znázorňuje liberační profil PDX nanomembrán.



Obrázek 15 Liberace klotrimazolu z předešlé diplomové práce pro PDX nanovlákná [6]

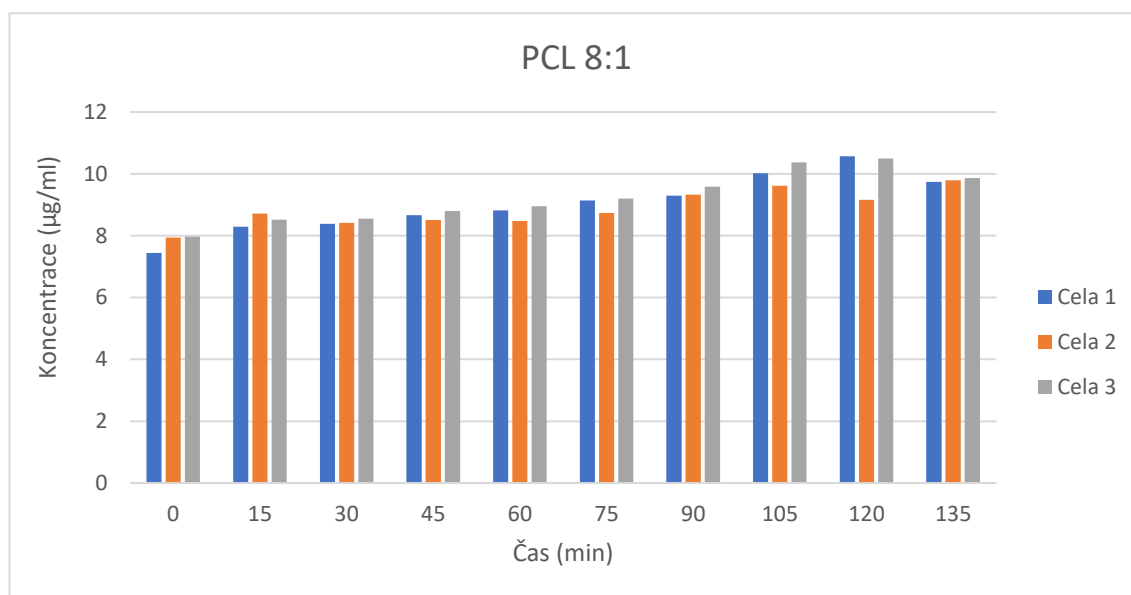
Pro porovnání profilů liberace je zde uveden i profil, na obrázku 15, z předchozí diplomové práce. V obou případech měření dosahujeme podobných výsledných liberačních koncentrací. U těchto předešlých výsledků dochází k poklesu koncentrace

klotrimazolu dříve, než u mnou naměřených dat. Avšak chybové úsečky ukazují, že přidáním ethanolu do acetátového pufru se u liberačního profilu zlepšuje opakovatelnost.

5.2.2. Liberace klotrimazolu z PCL nanomembrán sycených při výrobě Technickou univerzitou v Liberci

Tabulka 15 PCL membrány sycené při výrobě v poměru 8:1

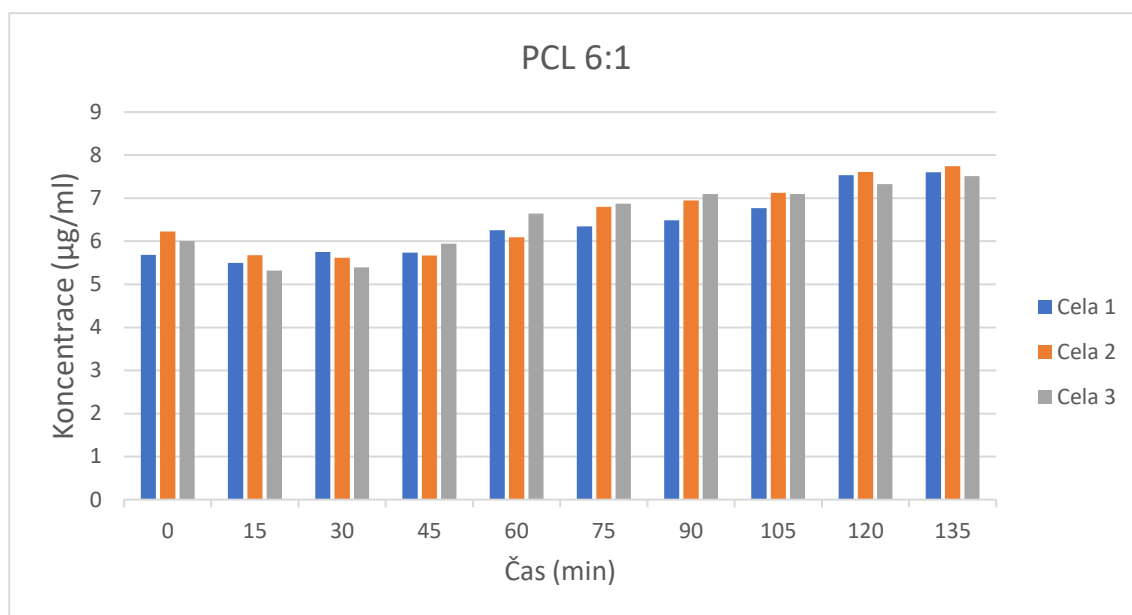
Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (µg/ml)	Suma	Korigovaná c (µg/ml)	SD	RSD (%)
0	1,039	1,079	1,081	1,066	7,784	0,000	7,784	0,001	0,11
15	1,090	1,123	1,108	1,107	8,296	16,080	8,511	0,007	0,67
30	1,089	1,091	1,102	1,094	8,128	24,208	8,450	0,005	0,50
45	1,103	1,089	1,112	1,102	8,226	32,433	8,658	0,011	1,01
60	1,106	1,078	1,116	1,100	8,207	40,640	8,749	0,018	1,67
75	1,123	1,091	1,127	1,114	8,376	49,016	9,029	0,018	1,61
90	1,127	1,129	1,148	1,134	8,634	57,650	9,402	0,009	0,83
105	1,174	1,143	1,201	1,173	9,115	66,765	10,005	0,029	2,48
120	1,208	1,098	1,201	1,169	9,065	75,830	10,076	0,052	4,41
135	1,133	1,139	1,141	1,137	8,672	84,501	9,799	0,001	0,11



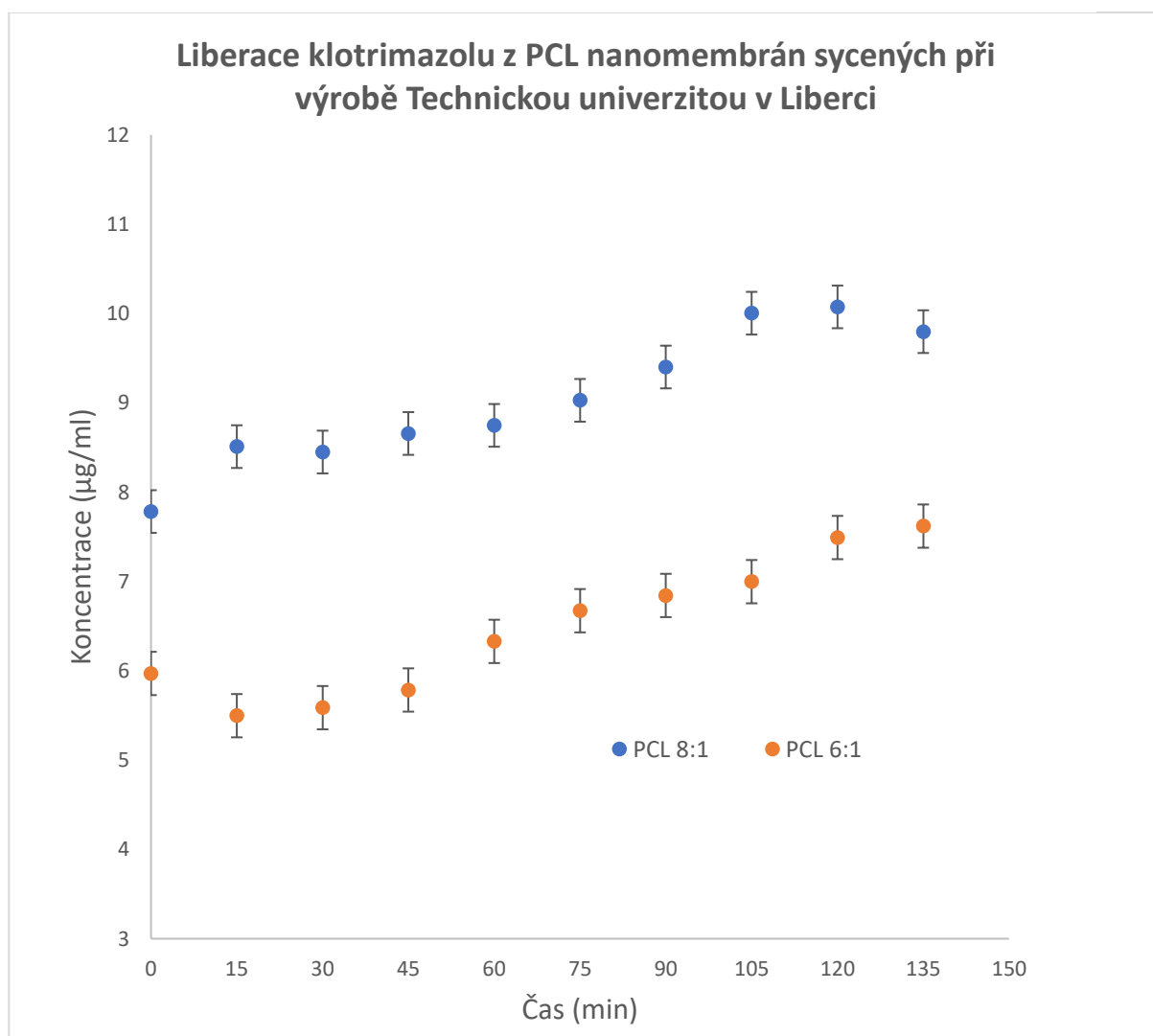
Obrázek 16 Naměřené koncentrace při liberaci klotrimazolu z membrány PCL 8:1

Tabulka 16 PCL membrány sycené při výrobě v poměru 6:1

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (µg/ml)	Suma	Korigovaná c (µg/ml)	SD	RSD (%)
0	0,442	0,458	0,451	0,450	5,971	0,000	5,971	0,003	0,70
15	0,433	0,438	0,428	0,433	5,347	11,317	5,498	0,005	1,15
30	0,438	0,434	0,428	0,433	5,365	16,682	5,587	0,003	0,70
45	0,436	0,433	0,441	0,437	5,490	22,172	5,785	0,004	0,90
60	0,448	0,443	0,459	0,450	5,955	28,127	6,330	0,008	1,72
75	0,448	0,461	0,463	0,457	6,215	34,342	6,673	0,001	0,21
90	0,450	0,462	0,466	0,460	6,302	40,644	6,844	0,002	0,45
105	0,455	0,465	0,464	0,462	6,372	47,016	6,999	0,000	0,10
120	0,474	0,476	0,468	0,473	6,775	53,791	7,493	0,004	0,83
135	0,474	0,477	0,471	0,474	6,813	60,604	7,621	0,003	0,67

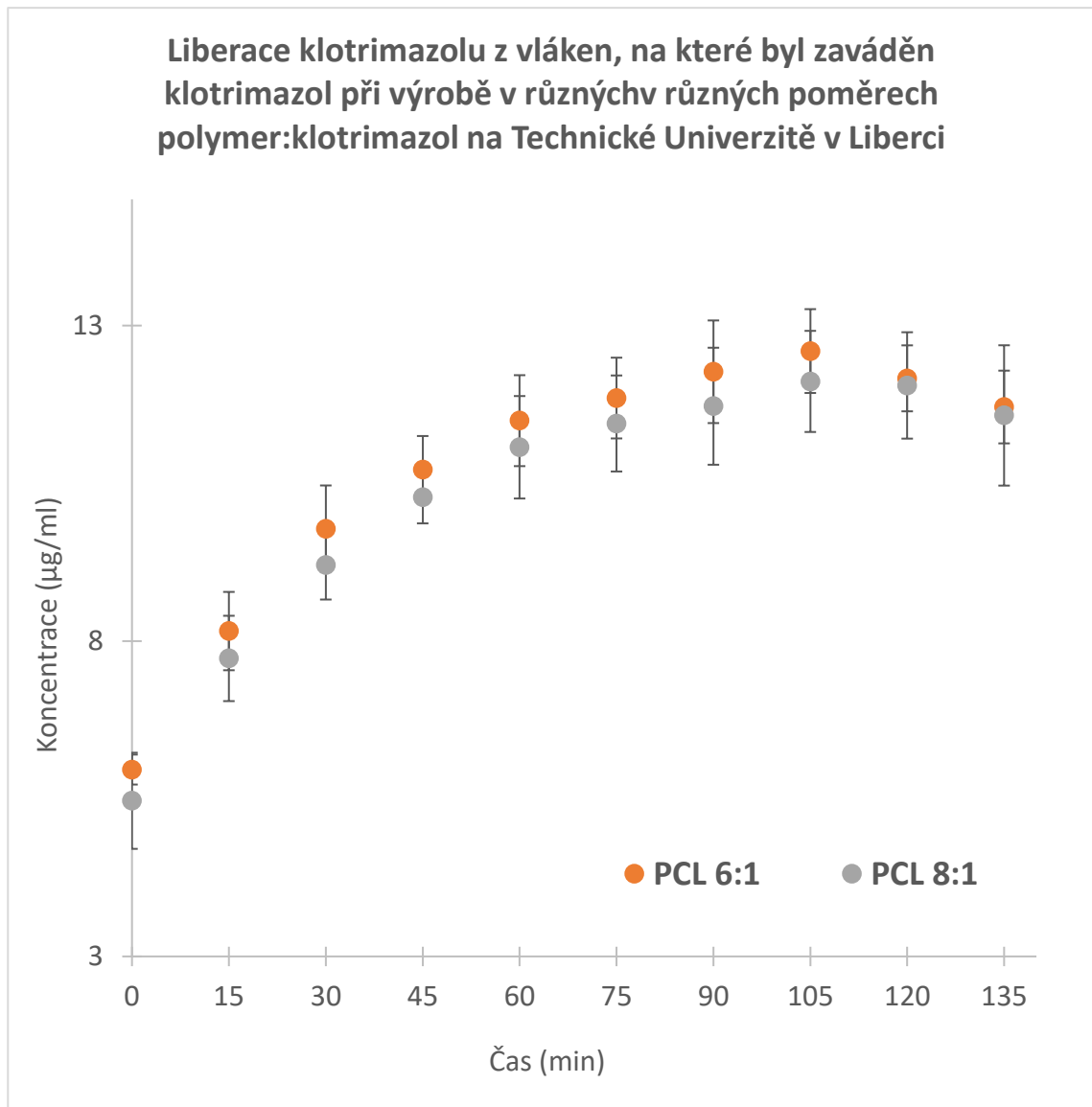


Obrázek 17 Naměřené koncentrace při liberaci klotrimazolu z membrány PCL 6:1



Obrázek 18 Graf závislosti koncentrace na čase pro PCL nanomembrány syčené při výrobě v poměru 8:1 a 6:1

Zhodnocení: U liberačního profilu membrány PCL 8:1 pozorujeme pomalý nárůst koncentrace klotrimazolu. Dosahuje však vyšších naměřených hodnot než druhá testovaná membrána PCL 6:1. Maximální koncentrace je v čase 120 minut a poté dochází k poklesu. Pokles na konci profilu může být způsoben také ustavením jakési rovnováhy, kdy se klotrimazol může i zpětně vychytávat z pufru na membránu. Liberační profil PCL membrány 6:1 začíná poklesem koncentrace a následně pozvolným nárůstem. Ke konci měřícího cyklu, okolo 120 a 135 minuty, to vypadá že dochází ke stagnaci nárůstu koncentrace klotrimazolu. Rozdíly v koncentracích obou nanomembrán mohou být způsobené nižším množstvím klotrimazolu navázaného na PCL 6:1 při výrobě. Na výsledné množství navázaného klotrimazolu má vliv několik faktorů. Jedním z nich může být omezená rozpustnost klotrimazolu ve výrobním roztoku, nebo ovlivněním zvláknitelnosti polymerního roztoku v elektrickém poli. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací, které jsou uvedené v tabulkách č. 15 a 16. Obrázky 16 a 17 zobrazují naměřené hodnoty koncentrace uvolněné z nanomembrán PCL pro možnost porovnání s liberačním profilem. Na obrázku 18 můžeme vidět liberační profil PCL nanomembrán.



Obrázek 19 Liberace klotrimazolu z předešlé diplomové práce pro PCL nanovlákná [6]

Na obrázku 19 je liberační profil z předchozí diplomové práce pro porovnání s mým změřeným profilem. I v tomto případě jsou výsledné profily dosahují podobných naměřených hodnot. V mém liberačním profilu se klotrimazol uvolňuje více pozvolna. Chybové úsečky ukazují nižší odchylky liberačních profilů s přidáním ethanolu do pufru, než je tomu tak u čistě vodného liberačního media.

5.2.3. Liberace klotrimazolu z PDX nanomembrán sycených v laboratorních podmínkách

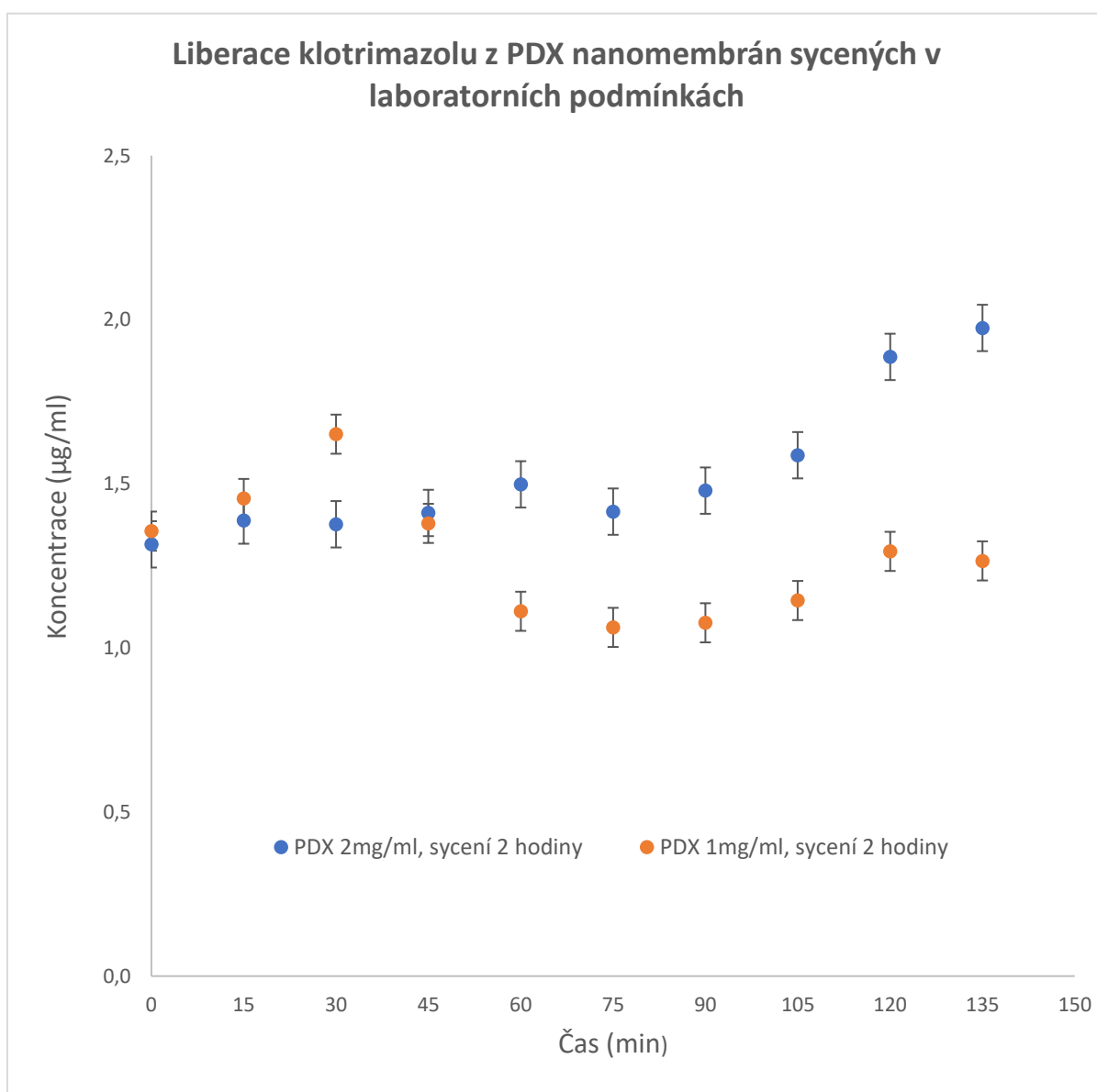
Tabulka 17 PDX membrány sycené v laboratorních podmínkách roztokem o koncentraci 2 mg/ml po dobu 2 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (µg/ml)	Suma	Korigovaná c (µg/ml)	SD	RSD (%)
0	0,560	0,538	0,549	0,549	1,316	0,000	1,316	0,005	0,98
15	0,559	0,537	0,559	0,552	1,353	2,668	1,388	0,011	1,94
30	0,545	0,544	0,560	0,549	1,324	3,992	1,377	0,008	1,46
45	0,550	0,549	0,553	0,551	1,340	5,332	1,411	0,002	0,36
60	0,547	0,556	0,565	0,556	1,408	6,740	1,498	0,005	0,82
75	0,548	0,563	0,533	0,548	1,308	8,048	1,415	0,015	2,77
90	0,564	0,540	0,552	0,552	1,354	9,402	1,479	0,006	1,07
105	0,558	0,548	0,571	0,559	1,443	10,845	1,587	0,011	2,02
120	0,567	0,598	0,578	0,581	1,719	12,564	1,887	0,010	1,70
135	0,584	0,580	0,595	0,586	1,784	14,348	1,975	0,007	1,26

Tabulka 18 PDX membrány sycené v laboratorních podmínkách roztokem o koncentraci 1 mg/ml po dobu 2 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (µg/ml)	Suma	Korigovaná c (µg/ml)	SD	RSD (%)
0	0,539	0,549	0,548	0,545	1,356	0,000	1,356	0,001	0,11
15	0,543	0,546	0,558	0,549	1,418	2,774	1,455	0,006	1,09
30	0,556	0,557	0,568	0,560	1,593	4,367	1,651	0,006	1,06
45	0,542	0,537	0,546	0,542	1,304	5,671	1,379	0,005	0,89
60	0,517	0,519	0,534	0,524	1,022	6,694	1,112	0,008	1,45

75	0,513	0,525	0,520	0,520	0,961	7,654	1,063	0,003	0,52
90	0,516	0,521	0,522	0,520	0,962	8,616	1,077	0,001	0,10
105	0,530	0,514	0,526	0,523	1,016	9,632	1,144	0,006	1,16
120	0,537	0,517	0,542	0,532	1,150	10,782	1,294	0,012	2,33
135	0,525	0,522	0,540	0,529	1,107	11,889	1,265	0,009	1,62



Obrázek 20 Graf závislosti koncentrace na čase pro PDX nanomembrány sycené v laboratorních podmínkách roztoky o koncentrace 2 a 1 mg/ml po dobu 2 hodin

Zhodnocení: PDX membrána sycená roztokem o koncentraci 2 mg/ml po dobu dvou hodin vykazuje pozvolné uvolňování klotrimazolu. Hodnoty měřené koncentrace jsou celkem nízké, pohybují se pod limitem kvantifikace, přesto je možné jejich hodnotu odhadnout, ale přesnost takového stanovení je nízká. Maximální hodnota je na konci měření v 135 minutě a nemůžeme říct, zda koncentrace dále stoupala, nebo už začala klesat. Oproti tomu u membrány PDX sycené roztokem o koncentraci 1 mg/ml dochází k rychlému uvolnění navázaného klotrimazolu a následně poklesu koncentrace. Nejspíše došlo k navázání malého množství látky zpátky na povrch nosiče. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací, které jsou uvedené v tabulkách č. 17 a 18. Na obrázku 20 je liberační profil PDX nanomembrán.

5.2.4. Liberace klotrimazolu z PCL nanomembrán sycených v laboratorních podmínkách

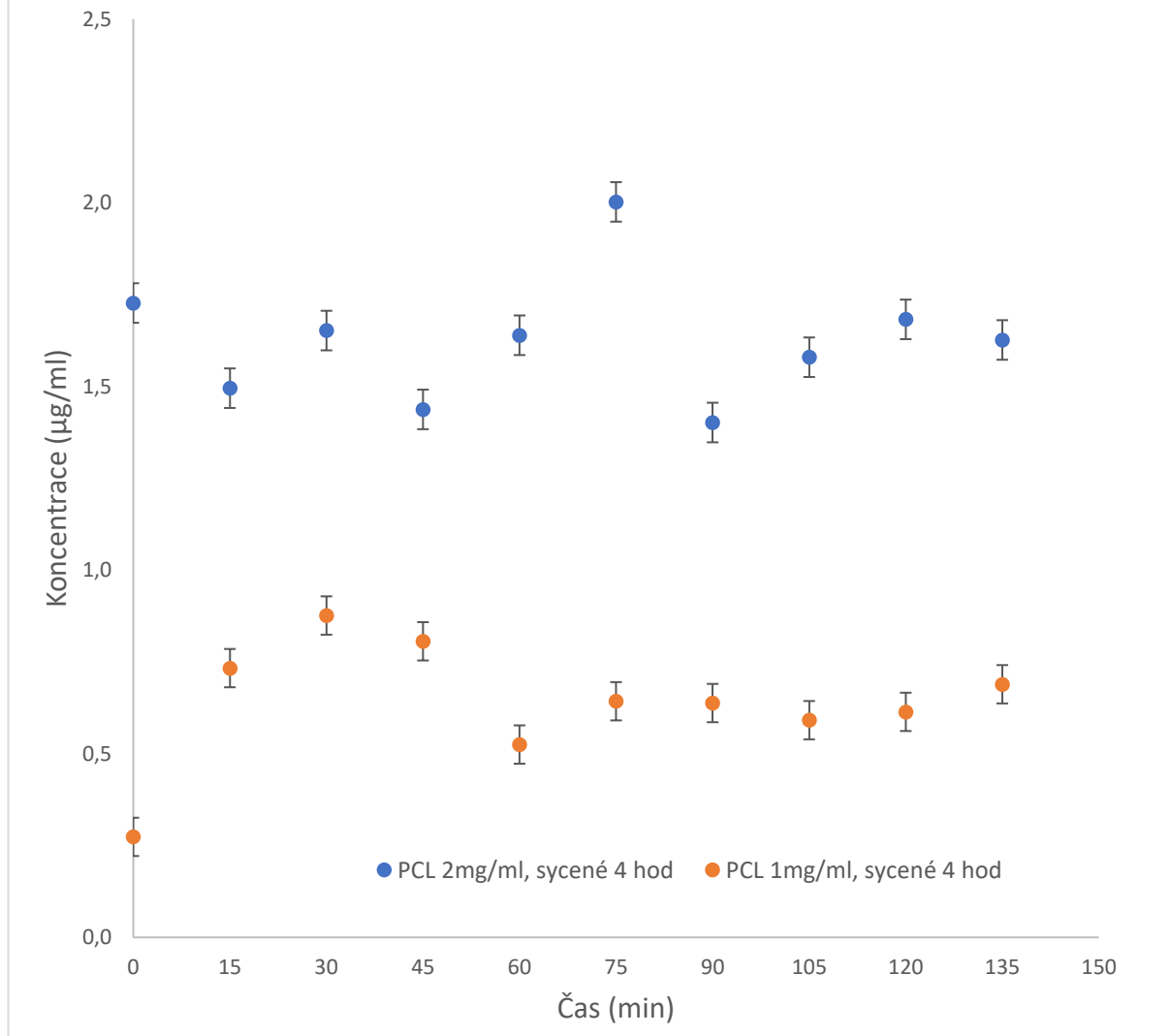
Tabulka 19 PCL membrány sycené v laboratorních podmínkách roztokem o koncentraci 2 mg/ml po dobu 4 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (µg/ml)	Suma	Korigovaná c (µg/ml)	SD	RSD (%)
0	0,365	0,390	0,383	0,379	1,727	0,000	1,727	0,004	0,93
15	0,363	0,378	0,366	0,369	1,453	3,359	1,498	0,006	1,63
30	0,369	0,382	0,371	0,374	1,589	4,948	1,655	0,005	1,41
45	0,363	0,373	0,361	0,365	1,356	6,303	1,440	0,006	1,61
60	0,379	0,367	0,371	0,372	1,537	7,841	1,642	0,002	0,47
75	0,384	0,384	0,386	0,385	1,875	9,716	2,005	0,001	0,21
90	0,357	0,366	0,363	0,362	1,258	10,974	1,404	0,002	0,44
105	0,368	0,355	0,380	0,368	1,417	12,391	1,582	0,013	3,48
120	0,376	0,364	0,372	0,371	1,500	13,890	1,685	0,004	1,13
135	0,362	0,368	0,373	0,368	1,425	15,315	1,629	0,003	0,69

Tabulka 20 PCL membrány sycené v laboratorních podmínkách roztokem o koncentraci 1 mg/ml po dobu 4 hodin

Čas (min)	1. cela	2. cela	3. cela	Průměr	c (μg/ml)	Suma	Korigovaná c (μg/ml)	SD	RSD (%)
0	0,241	0,243	0,243	0,242	0,274	0,000	0,274	0,000	0,02
15	0,253	0,255	0,254	0,254	0,720	0,994	0,733	0,001	0,20
30	0,259	0,256	0,260	0,258	0,852	1,845	0,876	0,002	0,88
45	0,256	0,256	0,256	0,256	0,771	2,616	0,806	0,000	0,04
60	0,248	0,248	0,247	0,248	0,484	3,100	0,525	0,001	0,21
75	0,253	0,251	0,249	0,251	0,594	3,694	0,643	0,001	0,30
90	0,250	0,249	0,252	0,251	0,581	4,275	0,638	0,001	0,51
105	0,251	0,247	0,250	0,249	0,527	4,802	0,591	0,001	0,58
120	0,251	0,249	0,249	0,249	0,543	5,345	0,614	0,000	0,00
135	0,249	0,253	0,251	0,251	0,610	5,955	0,689	0,001	0,39

Liberace klotrimazolu z PCL nanomembrán sycených v laboratorních podmínkách



Obrázek 21 Graf závislosti koncentrace na čase pro PCL nanomembrány sycené v laboratorních podmínkách roztoky o koncentrace 2 a 1 mg/ml po dobu 4 hodin

Zhodnocení: Liberační profil membrány PCL sycené roztokem o koncentraci 2mg/ml po dobu 4 hodin je na začátku nesouvislý. Hodnoty koncentrace střídavě stoupají a klesají. V čase 75 minut byla naměřena nejvyšší koncentrace a následně dochází k prudkému poklesu. To může být z důvodu nedokonalého navázání klotrimazolu na povrch nanomembrány. U druhého liberačního profilu pro PCL membránu sycenou roztokem o koncentraci 1 mg/ml po dobu 4 hodin vidíme rychlý nárůst koncentrace, poté dochází poklesu a stagnaci hodnot. Nejspíše je to způsobené navázáním malého množství klotrimazolu na membránu. Chybové úsečky znázorňují

směrodatné odchylky jednotlivých koncentrací, které jsou uvedené v tabulkách č. 19 a 20. Na obrázku 21 je liberační profil PCL nanomembrán.

Vzájemné porovnání grafů: Při porovnávání grafů můžeme vidět, že liberační profily u membrán sycených při výrobě Technickou univerzitou v Liberci mají podobný průběh, až na PCL 6:1, která vykazuje nižší naměřené hodnoty koncentrace. Membrány sycené v laboratorních podmínkách značí snížené množství klotrimazolu navázaného na nosič. Docházelo k rychlému uvolnění navázané látky, to mohlo být z důvodu navázání klotrimazolu pouze na povrch membrány, a následnému poklesu koncentrace.

5.3. Stanovení obsahu klotrimazolu HPLC metodou

Metodou HPLC byly stanoveny všechny změřené vzorky, jako v systému SIA, pro porovnání obsahu klotrimazolu v nanovláčkových membránách. Extrakce byla provedena pomocí 5 ml acetonitrilu po dobu 1 hodiny, a tento roztok byl po přefiltrování nylonovým stříkačkovým filtrem o velikosti pórů 0,22 μm nastříknut na kolonu. Měření každého vzorku proběhlo dvakrát. Pro vzorky sycené při výrobě byl nastříkovaný objem 5 μl , a pro vzorky sycené v laboratorních podmínkách 10 μl . Výsledné hodnoty byly charakterizované plochou pod píky a kvantitativně vyhodnoceny porovnáním s roztokem standardu.

Tabulka 21 Podmínky HPLC systému

HPLC chromatograf	Nexera X2, Shimadzu Corporation, Japonsko
Kolona	Ascentis® Express RP Amide, 100 x 4,6 mm, 2,7 μm , Merck, SRN
Dávkování	10 ml
Detekce	258 nm
Mobilní fáze (MF)	Hydrogenfosforečnan draselný R (1,088 g/250,0 ml) a methanol R v poměru 20:60
Průtok	1,0 ml/min
Teplota	28,0 °C
Vyhodnocení	LabSolutions, verze 5.57, 2003-2013 Shimadzu Corporation, Japonsko

Tabulka 22 Výsledné plochy pod píkem pro membrány sycené při výrobě

	Plocha pod píkem		Průměr
PDX 8:1	208542	207469	208005,5
PDX 6:1	210848	214274	212561
PCL 8:1	147936	148492	148214
PCL 6:1	173212	175988	174600

Tabulka 23 Obsah klotrimazolu při HPLC stanovení pro membrány sycené při výrobě

	PDX 8:1	PDX 6:1	PCL 8:1	PCL 6:1
Obsah klotrimazolu (mg/ml)	0,3105	0,3173	0,2212	0,2606
Obsah klotrimazolu (mg/5 ml)	1,5524	1,5864	1,1062	1,3031
Obsah klotrimazolu (mg/mg nanovlákná)	0,1265	0,1334	0,0994	0,1286
Obsah klotrimazolu (%)	12,65	13,34	9,94	12,86

Tabulka 24 Výsledné plochy pod píkem pro membrány sycené v laboratorních podmínkách

	Plocha pod píkem		Průměr
PDX 1 mg/ml	16795	16761	16778
PDX 2 mg/ml	79901	80233	80067
PCL 1mg/ml	79806	79532	79669
PCL 2 mg/ml	145372	145479	145425,5

Tabulka 25 Obsah klotrimazolu při HPLC stanovení pro membrány sycené v laboratorních podmínkách

	PDX 1mg/ml	PDX 2mg/ml	PCL 1mg/ml	PCL 2mg/ml
Obsah klotrimazolu (mg/ml)	0,0131	0,0624	0,0621	0,1133
Obsah klotrimazolu (mg/5 ml)	0,0654	0,3119	0,3104	0,5665
Obsah klotrimazolu (mg/mg nanovlákná)	0,0071	0,0259	0,0155	0,0305
Obsah klotrimazolu (%)	0,71	2,59	1,55	3,05

V tabulkách 23 a 25 můžeme porovnat obsah navázaného klotrimazolu na membránách sycených při výrobě a v laboratorních podmínkách. Zatímco u vláken sycených při výrobě se obsah navázaného klotrimazolu pohybuje v desítkách procent, u vláken sycených v laboratoři je obsah daleko nižší, pouze v jednotkách procent. Při pokračování v experimentech se sycením vláken v laboratoři by se měli volit koncentrace sytícího roztoku o něco vyšší, například 2, 2,5 a 3 mg/ml. Dále je možné zkoušet i různé doby sycení a jejich vliv.

6. Závěr

V této diplomové práci byly porovnány liberační profily klotrimazolu. Jako nosiče pro klotrimazol byly použity polymerní vlákna PDX a PCL, které byly vyrobeny Technickou univerzitou v Liberci. Sycení probíhalo buď při výrobě, nebo v laboratoři. Pro měření liberace byl zvolen systém SIA.

Cílem bylo ověřit možnost použití nanovlákných membrán jako nosiče pro klotrimazol a zda bude docházet k rovnoměrnému a kontinuálnímu uvolňování do akceptorového media. Obsah se stanovil i pomocí HPLC metody, pro ověření množství navázaného klotrimazolu na membrány.

Liberační profily nanovlákných nosičů sycených při výrobě vykazovaly podobnost. Z naměřených dat můžeme říct, že existuje určitá závislost mezi poměrem klotrimazolu a polymeru. Čím máme nižší obsah klotrimazolu vůči polymeru, tím bylo uvolňování klotrimazolu kontinuálnější. Vzhledem k velké podobnosti mezi liberačními profily, nelze potvrdit, který z nanovlákných nosičů je optimálnější pro liberaci. Při porovnání liberačních profilů z předchozí diplomové práce můžeme říct, že přidání 10 % ethanolu do acetátového pufru zlepšuje opakovatelnost liberačních profilů, odchylky jsou nižší. U PDX nanomembrán tento pokles odchylek je větší než u PCL. I když při porovnání PDX i PCL vychází odchylky profilů lépe u PCL nanomembrán v obou pracích. Bylo tedy potvrzeno, že liberační profily změřené s využitím čistě vodného liberačního média nebyly ovlivněny rozpustností klotrimazolu, ale při využití média s nízkým obsahem ethanolu byla zjištěna lepší opakovatelnost změřených profilů a tím i větší přesnost a možnost lepšího porovnání získaných výsledků.

Při hodnocení liberačních profilů nanovlákných membrán sycených v laboratoři se ukázalo, že ani jedna z testovaných membrán nesplňuje požadavky k optimální liberaci. Výsledné koncentrace uvolněného klotrimazolu do akceptorového média jsou nízké. Nejspíš došlo během sycení k navázání klotrimazolu pouze na povrch membrány. Během liberace docházelo k nárůstu koncentrace a následně k poklesu a stagnaci.

I ze stanovení obsahu klotrimazolu pomocí HPLC metody můžeme potvrdit, že při sycení nanovláken při výrobě se naváže několikanásobně větší množství klotrimazolu než během sycení v laboratorních podmínkách.

Závěrem můžeme říct, že nelze jednoznačně potvrdit testované polymerní nanovlákněné membrány jako vhodné nosiče pro klotrimazol. Liberace nebyla plynulá a rovnoměrná, ale můžeme konstatovat, že existuje závislost mezi poměrem polymer : klotrimazol. Čím je nižší obsah klotrimazolu vůči polymeru, tím jsou podmínky pro liberaci vhodnější a jeho uvolňování v čase plynulejší.

Použitá literatura

- [1] CERDÀ, Víctor, Laura FERRER, Jessica AVIVAR a Amalia CERDÀ. Evolution and Description of the Principal Flow Techniques. Flow Analysis [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 1-42. ISBN 9780444595966. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-59596-6.00001-2
- [2] CHOCHOLOUŠ, Petr, Petr SOLICH a Dalibor ŠATÍNSKÝ. An overview of sequential injection chromatography. Analytica Chimica Acta [online]. 2007, 600(1-2), 129-135. ISSN 00032670. Dostupné z: doi: 10.1016/j.aca.2007.02.018
- [3] HUANG, Gaoshan a Yongfeng MEI. Assembly and Self-Assembly of Nanomembrane Materials-From 2D to 3D. *Small* [online]. 2018, **14**(14). ISSN 16136810. Dostupné z: doi:10.1002/sml.201703665
- [4] JAKŠIĆ, Zoran a Olga JAKŠIĆ. Biomimetic Nanomembranes: An Overview. *Biomimetics* [online]. 2020, **5**(2). ISSN 2313-7673. Dostupné z: doi:10.3390/biomimetics5020024
- [5] SCHNEIDROVÁ, Marie. Automatizace liberačních testů pro uvolňování biologicky aktivních látek z nanovláken. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Sklenářová, Hana.
- [6] ERNEST, Radovan. Monitorování liberačních testů pro uvolňování klotrimazolu z nanovláken. Hradec Králové, 2021. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Sklenářová, Hana.
- [7] ZAGATTO, E.A.G., A.C.F. VIDA a P.J. WORSFOLD. Flow Analysis: Overview☆. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2016, 2016. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12202-4

- [8] MESQUITA, Raquel B.R. a António O.S.S. RANGEL. A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **648**(1), 7-22. ISSN 00032670. Dostupné z: doi: 10.1016/j.aca.2009.06.030
- [9] VAKH, Christina, Marina FALKOVA, Irina TIMOFEEVA, Alexey MOSKVIN, Leonid MOSKVIN a Andrey BULATOV. Flow Analysis: A Novel Approach For Classification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **46**(5), 374-388. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2015.1087301
- [10] GRIEMAN, Mackenzie M., Helene M. HOFFMANN, Jack D. HUMBY, et al. Continuous flow analysis methods for sodium, magnesium and calcium detection in the Skytrain ice core. *Journal of Glaciology* [online]. 2022, **68**(267), 90-100. ISSN 0022-1430. Dostupné z: doi:10.1017/jog.2021.75
- [11] IDRIS, Abubakr M. An Overview of the Generations and Recent Versions of Flow Injection Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2010, **40**(3), 150-158. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408340903103437
- [12] YU, Yong-Liang, Ying JIANG, Ming-Li CHEN a Jian-Hua WANG. Lab-on-valve in the miniaturization of analytical systems and sample processing for metal analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, **30**(10), 1649-1658. ISSN 01659936. Dostupné z: doi: 10.1016/j.trac.2011.04.024
- [13] RŮŽIČKA, J. Flow injection analysis. *Bead injection* [online]. [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: <https://www.flowinjectiontutorial.com/index.html>
- [14] LENEHAN, Claire E., Neil W. BARNETT a Simon W. LEWIS. Sequential injection analysis. *The Analyst* [online]. **127**(8), 997-1020. ISSN 00032654. Dostupné z: doi:10.1039/b106791p
- [15] ECONOMOU, A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *TrAC Trends in Analytical*

- Chemistry* [online]. 2005, **24**(5), 416-425. ISSN 01659936. Dostupné z: doi: 10.1016/j.trac.2004.12.004
- [16] PIMENTA, A.M., M.C.B.S.M. MONTENEGRO, A.N. ARAÚJO a J. Martínez CALATAYUD. Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, **40**(1), 16-34. ISSN 07317085. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpba.2005.10.006
- [17] SKLENÁŘOVÁ, Hana, Marek BERAN, Lucie NOVOSVĚTSKÁ, Daniela ŠMEJKALOVÁ a Petr SOLICH. Sequential Injection Analysis for Automation and Evaluation of Drug Liberation Profiles: Clotrimazole Liberation Monitoring. *Molecules* [online]. 2021, **26**(18). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26185538
- [18] GRAY, Vivian A. a Thomas W. ROSANSKE. Dissolution. *Specification of Drug Substances and Products* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 481-503. ISBN 9780081028247. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102824-7.00018-X
- [19] PEREIRA, Sarah A.P., Marieta L.C. PASSOS, Alexandra CORREIA, Ermei MÄKILÄ, Jarno SALONEN, André R.S.T. ARAUJO, Hélder A. SANTOS a M. Lúcia M.F.S. SARAIVA. Automatic methodologies to perform loading and release assays of anticancer drugs from mesoporous silicon nanoparticles. *Talanta* [online]. 2019, **196**, 277-283. ISSN 00399140. Dostupné z: doi: 10.1016/j.talanta.2018.12.025
- [20] LEGNEROVÁ, Z, J HUCLOVÁ, R THUN a P SOLICH. Sensitive fluorimetric method based on sequential injection analysis technique used for dissolution studies and quality control of prazosin hydrochloride in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2004, **34**(1), 115-121. ISSN 07317085. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpba.2003.08.014
- [21] ŠRÁMKOVÁ, Ivana, Céilia G. AMORIM, Hana SKLENÁŘOVÁ, Maria C.B.M. MONTENEGRO, Burkhard HORSTKOTTE, Alberto N. ARAÚJO a Petr SOLICH. Fully

automated analytical procedure for propofol determination by sequential injection technique with spectrophotometric and fluorimetric detections. *Talanta* [online]. 2014, **118**, 104-110. ISSN 00399140. Dostupné z: doi: 10.1016/j.talanta.2013.09.059

[22] PINTO, Paula C.A.G., M. Lúcia M.F.S. SARAIVA, João L.M. SANTOS a José L.F.C. LIMA. Fluorimetric determination of aminocaproic acid in pharmaceutical formulations using a sequential injection analysis system. *Talanta* [online]. 2006, **68**(3), 857-862. ISSN 00399140. Dostupné z: doi: 10.1016/j.talanta.2005.06.008

[23] MOTZ, Stephan A., Jana KLIMUNDOVÁ, Ulrich F. SCHAEFER, Stefan BALBACH, Thomas EICHINGER, Petr SOLICH a Claus-Michael LEHR. Automated measurement of permeation and dissolution of propranolol HCl tablets using sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, **581**(1), 174-180. ISSN 00032670. Dostupné z: doi: 10.1016/j.aca.2006.07.080

[24] KLIMUNDOVÁ, J., H. SKLENÁŘOVÁ, U.F. SCHAEFER a P. SOLICH. Automated system for release studies of salicylic acid based on a SIA method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2005, **37**(5), 893-898. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2004.08.018

[25] LEGNEROVA, Z. Automated sequential injection fluorimetric determination and dissolution studies of Ergotamine Tartrate in pharmaceuticals. *Talanta* [online]. 2002, **58**(6), 1151-1155. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-9140(02)00416-2

[26] DING, Zhuang, Xiao WANG, Lili WANG, et al. Characterisation of spray dried microencapsules with amorphous lutein nanoparticles: Enhancement of processability, dissolution rate, and storage stability. *Food Chemistry* [online]. 2022, 383. ISSN 03088146. Dostupné z: doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132200

[27] WESOŁY, Małgorzata, Marcin ZABADAJ, Krzysztof CAL, Patrycja CIOSEK-SKIBIŃSKA a Wojciech WRÓBLEWSKI. Dissolution studies of metamizole sodium

and pseudoephedrine sulphate dosage forms – comparison and correlation of electronic tongue results with reference studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, 149, 242-248. ISSN 07317085. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpba.2017.11.009

- [28] RAMAKRISHNA, Seeram, Kazutoshi FUJIHARA, Wee-Eong TEO, Teik-Cheng LIM a Zuwei MA. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers* [online]. WORLD SCIENTIFIC, 2005, 2005-06-26, s. 192-246. ISBN 978-981-256-415-3. Dostupné z: doi:10.1142/9789812567611_0005
- [29] NASROLLAHZADEH, Mahmoud, Zahra ISSAABADI, Mohaddeseh SAJJADI, S. Mohammad SAJADI a Monireh ATAROD. Types of Nanostructures. *An Introduction to Green Nanotechnology* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 29-80. Interface Science and Technology. ISBN 9780128135860. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813586-0.00002-X
- [30] Nanovlákná. Ústav pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i. [online]. [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: <https://www.ih.cas.cz/nanovlakna/>
- [31] PETRÁŠ, D., KIMMER, D., SOUKUP, K. a KLUSOŇ, P. Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. 2009, (103), s. 1009.
- [32] SINGH, Avtar, Nirmaljeet KAUR, Anupama PARMAR a Harish Kumar CHOPRA. The Fundamental perspectives of greener synthesis. *Handbook of Greener Synthesis of Nanomaterials and Compounds* [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 3-36. ISBN 9780128219386. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-821938-6.00001-3
- [33] SABZEHMEIDANI, Mohammad Mehdi a Mehrorang GHAEDI. Adsorbents based on nanofibers. *Adsorption: Fundamental Processes and Applications* [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 389-443. Interface Science and Technology. ISBN 9780128188057. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818805-7.00005-9

- [34] KENRY a Chwee Teck LIM. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science* [online]. 2017, **70**, 1-17. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002
- [35] IBRAHIM, Hassan M. a Anke KLINGNER. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polymer Testing* [online]. 2020, **90**. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2020.106647
- [36] Nanopharma - technologie [online]. ©2015 nanopharma. [cit.2022-04-15]. Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>
- [37] HE, Jianxin a Yuman ZHOU. Multineedle Electrospinning. *Electrospinning: Nanofabrication and Applications* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 201-218. ISBN 9780323512701. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-51270-1.00006-6
- [38] PARTHENIADIS, Ioannis, Ioannis NIKOLAKAKIS, Ivo LAIDMÄE a Jyrki HEINÄMÄKI. A Mini-Review: Needleless Electrospinning of Nanofibers for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Processes* [online]. 2020, 8(6). ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr8060673
- [39] ZHANG, Wenshuo, Ziyang HE, Ying HAN, Qinyuan JIANG, Chenhao ZHAN, Kaiji ZHANG, Zekun LI a Rufan ZHANG. Structural design and environmental applications of electrospun nanofibers. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* [online]. 2020, **137**. ISSN 1359835X. Dostupné z: doi: 10.1016/j.compositesa.2020.106009
- [40] ZHANG, Bo-Tao, Hong LIU, Yan LIU a Yanguo TENG. Application trends of nanofibers in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **131**. ISSN 01659936. Dostupné z: doi: 10.1016/j.trac.2020.115992
- [41] XUE, Jiajia, Tong WU, Yunqian DAI a Younan XIA. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical*

Reviews [online]. 2019, **119**(8), 5298-5415. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593

[42] SOUSA, Maurício G.C., Taia M.B. REZENDE a Octávio L. FRANCO. Nanofibers as drug-delivery systems for antimicrobial peptides. *Drug Discovery Today* [online]. 2021, **26**(8), 2064-2074. ISSN 13596446. Dostupné z: doi: 10.1016/j.drudis.2021.03.008

[43] ARIDA, Islam A., Isra H. ALI, Maha NASR a Ibrahim M. EL-SHERBINY. Electrospun polymer-based nanofiber scaffolds for skin regeneration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2021, **64**. ISSN 17732247. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jddst.2021.102623