Detekce přítomnosti lipozomů při interakci Fidaru LZC - Lipozomálný vytamín C s vodným prostředím

V Praze dne 12. 2. 2018

Vypracoval: Mgr. Radek Divín

Obsah

1	Úvo	od3
2	Materiál a metody	
	2.1	Příprava roztoků pro optickou mikroskopii a měření velikosti částic
	2.2	Příprava roztoků pro měření zeta-potenciálu4
	2.3	Příprava roztoků pro měření absorbance a fluorescence
	2.4	Příprava vzorků pro SEM
	2.5	Metoda optické mikroskopie
	2.6	Metoda SEM
	2.7	Metoda měření velikosti částic
	2.8	Metoda měření zeta-potenciálu
	2.9	Metoda měření absorbance
	2.10	Metoda měření fluorescence
3	Výsledky měření	
	3.1	Analýza optickou mikroskopií7
	3.2	Anaýza SEM9
	3.3	Měření velikosti částic11
	3.4	Měření zeta-potenciálu
	3.5	Měření absorbance16
	3.6	Měření fluorescence
4	Záv	ěr
5	5 Literatura:	

1 Úvod

Detekce lipozomů v přípravku Fidaru LTC (Lipozomálný VITAMÍN C) byla prováděna za pomocí několika rozličných metod: snímání optickým mikroskopem, snímání skenovacím elektronovým mikroskopem (dále jen SEM), měření velikostí částic a jejich zeta-potenciál v různých roztocích obsahujících přípravek Fidaru LZC.

Lipozomy jsou tvořeny lipidovou dvojvrstvou tvořící těleso obvykle kulovitého až oválného tvaru. Lipidová dvojvrstva je složena z molekul obsahující polární a nepolární část tak, že hydrofóbní části lipidů směřují k sobě, kdežto polární konce lipidů směřují od sebe. Pro utvoření lipozomů je tedy nutná přítomnost lipidů v polárním prostředí jako je například voda.

Pokud jsou v roztoku obsaženy lipidy, může docházet k tvorbě micel. V rámci této studie není kladen důraz na kvantifikaci obsažených micel či lipozomů v připravených roztocích

Vzhledem k povaze produktu bylo testováno, zda je produkt schopen samovolně utvořit lipozomy svým rozpuštěním ve vodném prostředí, jelikož právě takto bude uživatelem spotřebováván. Požadovaná teplota vodného prostředí je od 23 °C do 37 °C.

2 Materiál a metody

2.1 Příprava roztoků pro optickou mikroskopii a měření velikosti částic

Testovaným produktem byl Fidaru LZC (viz. obr. 1) dodávaný ve formě krystalického cihlově zbarveného prášku. Z prášku byly vytvořeny čtyři druhy základních testovaných roztoků a to rozpuštěním 1 g Fidaru LZC v 20 ml konkrétního rozpouštědla: n-hexanu (99%, Sigma-Aldrich), toluenu (99.8%, Sigma-Aldrich), ethanolu (96%, EMSURE®, Merck) nebo deionizované vodě (dále jen voda). Roztoky byly následně míchány magnetickým míchadlem (350 RPM) po dobu tří hodin při teplotě 37 °C.



Obr. 1: Testovaný produkt Fidaru LZC.

Výsledné roztoky/suspenze (viz. obr. 2) pro rozpouštědla etanol, n-hexan a toluen obsahovaly nerozpuštěnou frakci produktu Fidaru LZC, kdežto roztok Fidaru LZC s vodou neobsahoval okem viditelné částice.

Analýza optickou mikroskopii i měření velikostí částic probíhalo na odebraných množstvích roztoků/suspenzí bez okem pozorovatelných částic.



Obr. 2: Testované roztoky Fidaru LZC ve: (zleva) vodě, etanolu, n-hexanu a toluenu.

2.2 Příprava roztoků pro měření zeta-potenciálu

Pro analýzu vzorků metodou měření zeta-potenciálu a skenovací elektronové mikroskopie byly příslušné základní testované roztoky zředěny. Ředění roztoků bylo provedeno po 15 minutách, kdy roztoky nebyly nadále míchány. Z jednotlivých základních testovaných roztoků byl odebráním 1ml příslušného roztoku z objemu přibližně 1 cm pod hladinou roztoku, za účelem snížení koncentrace Fidaru LZC a poměr jeho nerozpuštěné frakce v roztoku.

2.3 Příprava roztoků pro měření absorbance a fluorescence

Pro měření absorbance byl připraven 0.1 µM roztok 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) (98%, Sigma-Aldrich) s n-hexanem a to za účelem zjištění optimální excitační vlnové délky pro měření fluorescence vzorků s obsahem DPH.

Pro měření fluorescence se vycházelo z předpokladu, že základní roztok 1 g Fidaru LZC v 500 ml deionizované vody obsahuje micely či lipozomy. Dle [2] je možné do nepolární části membrán micel či lipozomů inkorporovat fluorescenční sondu DPH, jež vykazuje fluorescenční záření pouze v nepolárním prostředí. Pro tyto účely byl vytvořen 1 mM roztok DPH s tetrahydrofuranem (THF) (99%, Sigma-Aldrich) a následně byl tento roztok (DPH+THF) smísen se základním roztokem Fidaru ZLC ve vodě tak, aby vznikl 0,5 μ M roztok DPH. Jako referenční vzorek byl připraven i 0,5 μ M roztok DPH s vodou.

2.4 Příprava vzorků pro SEM

Pro tyto účely byly připraveny roztoky Fidaru LZC s vodou a Fidaru LZC s vodou a DPH dle kapitoly výše (2.3). Dále pak byl připraven vzorek 0,01 g Fidaru LZC v 5 ml benzenu (99,8%, Sigma-Aldrich).

Z těchto jednotlivých roztoků bylo z hladiny odpipetováno množství dostatečné na vytvoření vždy jedné kapky na jedno podkladové sklíčko o průměru 10 mm umístěné v jamce. Následně byly jednotlivé kapky překryty vrstvou 2.5% roztoku glutaraldehydu připraveného za pomocí PBS z 25% roztoku glutaraldehydu (Sigma-Aldrich).

Nahrazení vody ve vzorku etanolem a jeho vysušení bylo provedeno pomocí etanolové řady 35%, 48%, 70%, 96%, a dvakrát 100% roztoku etanolu, kdy vzorek byl v etanolové lázni ponechán vždy 10 minut.

Popsané vzorky byly vytvořeny ve dvou sériích přičemž druhá série vzorků byla překryta ještě ochrannou vrstvou z hexamethyldisilazane (HMDS) (Sigma-Aldrich). Vzorky pak byly ponechány v digestoři po dobu tří hodin, než se odpařila toxická část z HMDS.

2.5 Metoda optické mikroskopie

Z objemu roztoku asi 1 cm pod hladinou bylo odpipetováno 20 µl roztoku tak, aby nebylo odebráno makroskopicky pozorovatelné množství nerozpuštěné frakce roztoku. Část z odpipetovaného množství byla kápnuta na podkladové laboratorní sklíčko a překrytata krycím sklíčkem. Jednotlivé vzorky roztoků/suspenzí byly následně snímány za pomocí invertovaného mikroskopu značky Novel Optic s objektivem 40x/0.6; $\infty/1.2$. Snímky byly pořízeny fotoaparátem Canon EOS 5D Mark II bez objektivu přímo na čip CMOS Full Frame 21 MPx.

2.6 Metoda SEM

Metoda SEM umožňuje skenovat povrch vzorku fokusovaným elektronovým svazkem. Díky vlnové délce urychleného elektronu v elektronovém svazku, která je kratší než vlnová délka fotonu ve viditelném spektru, SEM analýza umožňuje morfologickou analýzu povrchu vzorku s vyšším rozlišením, než jaké by byl schopen poskytnout optický mikroskop.

Aby se zamezilo hromadění náboje na povrchu vzorku byl povrch vzorku naprášen zhruba 20 nm \pm 10 nm zlatých nanočástic za pomocí přístroje Sputter Coater/Carbon Coater Q150R.

Elektronová mikroskopie byla prováděna na přístroji Vega3 SB (VG12401382CZ) firmy TESCAN a.s. s wolframovou katodou.

Při snímání vzorků bylo použito urychlovací napětí 20 kV.

2.7 Metoda měření velikosti částic

Metoda měření velikosti částic vychází z měření Brownova pohybu částic v roztoku za pomocí dynamického rozptylu světla na částicích [1].

Měření vzorků roztoků probíhalo za pomocí kyvety PCS1115 (Malvern) na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern) laserovým svazkem o vlnové délce 632.8 nm. V případě měření distribute velikosti části byla využita konfigurace zpětně odraženého signálu. Měření každého vzorku roztoku z kapitoly 2.1 probíhalo ve třech cyklech, kde každý cyklus obsahoval deset měření po deseti sekundách. Výsledné měření vzniklo jako průměr všech měření. Během měření byly vzorky temperovány na 37 °C.

2.8 Metoda měření zeta-potenciálu

Metoda měření zeta-potenciálu vychází z principu měření elektroforézy a laserové doplerovské velocimetrie.

Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole (2.7) měření probíhalo na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern) laserovým svazkem o vlnové délce 632.8 nm. Přičemž bylo využito konfigurace detekce prošlého signálu vzorkem. K tomuto účelu byla použita kyveta typu DTS1070 (Malvern). Měření opět probíhalo ve třech cyklech, kde každý cyklus obsahoval deset měření po deseti sekundách. Výsledné měření vzniklo jako průměr všech měření. Během měření byly vzorky temperovány na 37 °C.

2.9 Metoda měření absorbance

Metoda je založená na principu kvantifikace množství pohlceného záření specifické vlnové délky v testovaném vzorku. Pro metodu měření absorbance byl využit přístroj Synergy H1 společnosti BioTec s xenonovým světelným zdrojem. Jako zásobník vzorků byl využit Costar 96 clear bottom black side vhodný i pro měření fluorescence vzorků. Do jednotlivých jamek bylo vždy odpipetováno 100 µl testovaného roztoku. Vzorky byly ohřívány na teplotu 26.4 °C.

Měření bylo provedeno jako absorbanční spektroskopie od 300 nm do 600 nm s krokem 2 nm, kde rozmezí bylo vybráno na základě současného stavu poznání [2].

2.10 Metoda měření fluorescence

Snímání fluorescence jakožto emisního záření vzorků excitovaných zářením o konkrétní excitační vlnové délce bylo taktéž prováděno na přístroji Synergy H1 společnosti BioTec s xenonovým světelným zdrojem. Jako zásobník vzorků byl opět využit Costar 96 clear bottom black side. Do jednotlivých jamek bylo vždy odpipetováno 100 µl testovaného roztoku. Vzorky byly ohřívány na teplotu 26.4 °C.

Skenování bylo prováděno v rozmezí 400 nm - 500 nm s krokem 1 nm. Excitační vlnová délka 350 nm byla vybrána na základě měření absorbance a dle dosavadního stavu poznání [2].

3 Výsledky měření

3.1 Analýza optickou mikroskopií

Z obr. 3, 4 a 5 je patrné, že roztoky utvořené alespoň parciálním rozpuštěním Fidaru ZLC v n-hexanu, toluenu či etanolu neobsahují objekty, jež by mohly připomínat lipozomy či micely. Takto lze usuzovat z tvarů částic v roztoku. Částice z obr. 3, 4 a 5 se vyznačují nepravidelným tvarem bez alespoň částečné sférické symetrie. Částice mají navíc nepravidelné okraje s neplynulými ostrými přechody, což není ve shodě s možným tvarem lipozomů či micel.

V roztoku Fidaru ZLC s vodou (viz. obr. 6) lze pozorovat drobné objekty vyznačujícími se oválným či kulovým tvarem, které mohou být hledanými lipozomy a/nebo micelami. Snímky pořízené optickým mikroskopem nejsou dostatečným důkazem přítomnosti lipozomů v roztoku Fidaru ZLC s vodou, tudíž vzorky byly dále analyzovány.



Obr. 3: Snímek roztoku Fidaru ZLC s n-hexanu pořízený optickým mikroskopem.



Obr. 4: Snímek roztoku Fidaru ZLC s toluenem pořízený optickým mikroskopem.



Obr. 5: Snímek roztoku Fidaru ZLC s etanolem pořízený optickým mikroskopem.



Obr. 6: Snímek roztoku Fidaru ZLC s vodou pořízený optickým mikroskopem.

3.2 Anaýza SEM

Jak již bylo předesláno měření probíhala na přístroji Vega3 SB (Tescan) ve vysokém vakuu při urychlovacím napětí 20 kV. Vzorky byly upraveny dle postupu popsaném v kapitolách 2.4 a 2.6.

Nepolární rozpouštědla n-hexan a toluen zde byly nahrazeny benzenem. Skenovací elektronovou mikroskopií byly analyzovány vzorky:

Obr. 7: Fidaru ZLC s vodou

Obr. 8: Fidaru ZLC s benzenem

Velikost objektů vyobrazených na SEM snímcích byla zjištěna pomocí měření v programu ImageJ.

Na obr. 7 jsou patrné objekty kulového popřípadě oválného tvaru, což tvarem odpovídá tvarům lipozomů a/nebo micel. Objekty kulovitého tvaru nabývají velikostí od 200 nm do 570 nm. Tyto objekty mohou být rávě jak lipozomy, tak i micelami. Oválné útvary mají v průměru 634 nm \pm 47 nm a na délku od 1,2 µm do 2,8 µm. Pro oválné útvary s těmito parametry je pravděpodobnost, že se jedná o micely velmi malá, vzhledem k interakcím v lipidové monovrstvě a interakcím lipidové mono-vrstvy s okolním prostředím, a lze očekávat, že se může jednat spíše o lipozomy.



Obr. 7: SEM snímky různého zvětšení pro připravené vzorky z roztoku Fidaru ZLC s vodou nepřekryté vrstvou HMDA (A, B, C) a vzorek překrytý ochranou vrstvou HMDS.

Další analyzované vzorky byly vzorky Fizaru ZLC v benzenu (viz. obr. 8). Nepolární rozpouštědla n-hexan a toluen zde byly nahrazeny právě nepolárním rozpouštědlem benzenem. Benzen stejně jako toluen či n-hexan vzhledem k nepolárnosti molekul neumožňuje uspořádání lipidů do lipidové mono či dvojvrstvy a neumožňuje tedy ani vytvoření lipozomů či micel.



Obr. 8: SEM snímky téhož zvětšení z různých lokací vzorku Fidaru ZLC s benzenem.

Jak je vidět na obr. 8. vlevo, vzorek neobsahoval objekty připomínající tvarem či velikostí lipozomy/micely, což koresponduje s efektem nepolárních rozpouštědel na tvorbu lipozomů. Na obr. 8 vpravo se vyskytují málo zastoupené drobné kulové objekty o rozměrech 218 nm \pm 30 nm. Vzhledem k množství těchto objektů, rozmístění, a že bylo použito nepolární rozpouštědlo, musí se jednat o nerozpuštěnou frakci Fidaru ZL C nebo znečištění během přípravy vzorků.

Dle porovnání četnosti kulových objektů z obr. 7 a 8 není pravděpodobné, že objekty z obr. 7 jsou nečistotami či nerozpuštěnou frakcí Fidaru ZLC, aby se tento závěr potvrdil, byly provedeny následující experimenty.

3.3 Měření velikosti částic

Měření velikostí částic probíhalo na vzorcích z kap. 2.1 pomocí metody popsané v kapitole 2.7.



<u>Obr. 9</u>: Měření velikosti částic obsažených v roztocích Fidaru ZLC s n-hexanem (vlevo nahoře), toluenem (vpravo nahoře), etanolem (vlevo dole) a deionizovanou vodou (vpravo dole).

Z měření velikosti částic obsažených v roztocích (viz. obr. 9) je patrné, že pouze v polárních rozpouštědlech jako je etanol a voda byly detekovány částice o velikosti kolem 1,1µm, které odpovídají oválným částicím z obr. 7 v předchozí části. To, že byly v roztocích s n-hexanem, či toluenem detekovány části o velikosti od 30 nm do 1000 nm jen potvrzuje pozorování na obr. 3, 4, 5 a 8, že v roztoku je nerozpuštěná frakce Fidaru ZLC.

Z obr. 9 dále vyplývá, že v roztoku Fidaru ZLC s vodou více než 50% veškerého objemu částic vyskytujících se v roztoku tvoří částice o velikosti kolem od 100 nm do 600 nm. Porovnáním intenzit píků a distribucí velikostí částic vyplývá, že více než 80 % částic v roztoku je menších než 600 nm, což koresponduje i s pozorováním na obr. 7.

3.4 Měření zeta-potenciálu

Měření zeta-potenciálu bylo provedeno za účelem detekce lipozomů. Lipozomy se vyznačují pouze polárními skupinami po celém svém povrchu, tudíž lipozomy určité velikosti a navázaných skupin vykazují charakteristický zeta-potenciál. S ohledem na data získaná v kapitole 3.2 a především 3.3 bylo zjištěno, že v roztoku Fidaru ZLC s vodou je vice než 80 % z celkového počtu přítomných částic kulového tvaru s průměrem od 100 nm do 600 nm. Pokud se tedy v roztoku Fidaru ZLC s vodou jednalo o částice lipozomálního charakteru bylo možné očekávat poměrně úzký píku v záporné škále zeta-potenciálu (-mV).

Naopak pro roztoky neobsahující částice s nepravidelnou distribucí náboje na svém povrchu a tedy neobsahující micely ani lipozomy, bylo možné očekávat velmi širokou funkci popisující zeta-potenciál.



Obr. 10: Graf fázového posunu během měření zeta-potenciálu (nahoře) a graf výsledného zeta-potenciálu (dole) pro roztok Fidaru ZLC s vodou.

Jak již bylo předesláno, měření zeta-potenciálu roztoku Fidaru ZLC rozpuštěného ve vodě (viz. obr. 10) poskytlo další důkaz přítomnosti lipozomů/micel. Vzhledem k vykreslenému fázovému posunu detekovaného signál lze usoudit, že měření nebylo zkresleno dalšími částicemi s nepravidelného tvaru, či nerovnoměrnou distribucí náboje na svém povrchu. Získaná data korelují i s výsledky objevující se v současné literatuře [3].



Obr. 11: Graf fázového posunu během měření zeta-potenciálu (nahoře) a graf výsledného zeta-potenciálu (dole) pro roztok Fidaru ZLC s etanolem.

0

Apparent Zeta Potential (mV)

20 40

80

100

60

-40 -20

-80 -60

Z grafů měřeného zeta-potenciálu roztoku Fidaru ZLC s etanolem (viz. obr. 11 dole) lze poukázat, že v roztoku byla možná přítomnost lipozomů/micel, což koreluje s faktem, že etanol je polární rozpouštědlo. Na druhou stranu, graf fázového posunu (viz. obr. 11 nahoře) spolu s šířkou a rozmezím píku zeta-potenciálu (viz. obr. 11 dole) poukazuje na přítomnost částic nepravidelného tvaru, objemu a rozmístění náboje, které nemohou být lipozomálního/micelárního charakteru a toto měření nelze považovat za průkazné pro přítomnost těchto útvarů

Z grafů na obr. 12 a 13 pro rozpouštědla n-hexan a toluen lze konstatovat přítomnost částic nepravidelného tvaru, objemu a rozmístění náboje, které nemohou být lipozomy ani micelami.

Fidaru ZLC v etanolu

To potvrzuje jak průběh funkce zeta-potenciálu, tak i nahodilý průběh funkce popisující fázový posun detekovaného signálu oproti vyslanému signálu. Funkce fázového posunu signálu nemají krátký intervalu stanovujícího globální minimum funkce, jak tomu bylo například v obr. 10 nahoře.



Obr. 12: Graf fázového posunu během měření zeta-potenciálu (nahoře) a graf výsledného zeta-potenciálu (dole) pro roztok Fidaru ZLC s n-hexanem.







3.5 Měření absorbance

Měření absorbance bylo prováděno jako přípravné měření pro následující měření fluorescence vzorků. Měření absorbance bylo provedeno jako absorbanční spektroskopie od 300 nm do 600 nm s krokem 2 nm na přístroji Synergy H1 společnosti BioTec s xenonovým světelným zdrojem. Jako zásobník vzorků byl využit Costar 96 clear bottom black side vhodný i pro měření fluorescence vzorků. Vzorky byly ohřívány na teplotu 26.4 °C.

Měření bylo provedeno na vzorku 0.1 µM roztoku DPH s n-hexanem. N-hexan byl použit záměrně, jelikož DPH vykazuje fluorescenci pouze je-li v nepolárním prostředí jako např.

v nepolárním n-hexanu lipidové dvojvrstvě či nepolární části micel. Naopak DPH nevykazuje fluorescenci v polárním prostředí jako je např. voda. Této vlastnosti bylo dále využito při dokazování přítomnosti lipozomů/micel během měření fluorescence vzorků.

Cílem měření absorbance bylo najít její maximum, jelikož právě při této vlnové délce dochází k největšímu pohlcení světelné energie, která je následně převedena na fluorescenci DPH. Vlnová délka absorbčního maxima byla následně použita jako excitační vlnová délka pro měření fluorescence vzorků.



Obr. 14: Měření absorbance 0.1 µM roztoku DPH s n-hexanem.

Z naměřených hodnot bylo odečteno pozadí změřené jako obsorbance vody. Naměřené body byly proloženy křivkou (červená čára) vzniklou fittem dle čtyř Gaussových křivek v oblasti předpokládaných píků. V obr. 14 jsou zelenou čarou vyznačeny tři ze čtyř Gaussových křivek náležející třem nejvýraznějším lokálním maximům, kde pro vlnovou délku 350 nm se jedná i o globální maximum absorbance. Právě vlnová délka 350 nm byla na základě tohoto měření zvolena jako excitační vlnová délka pro měření fluorescence. Zpracování všech naměřených hodnot v kapitole 3.5 a 3.6 probíhalo v programu OriginPro 8.

3.6 Měření fluorescence

Měření fluorescence vzorků bylo prováděno na přístroji Synergy H1 společnosti BioTec s xenonovým světelným zdrojem. Jako zásobník vzorků byl opět využit Costar 96 clear bottom black side. Vzorky byly ohřívány na teplotu 26.4 °C.

Snímání fluorescence jakožto emisního záření vzorků excitovaných zářením o vlnové délce 350 nm dle měření v kapitole 3.5 bylo prováděno v rozmezí 400 nm - 500 nm [2] s krokem 1 nm.

Aby bylo zřejmé, ve kterých oblastech spektra hledat emisní píky DPH bylo proměřeno emisní fluorescenční spektrum roztoku 0.01 μ M roztoku DPH s n-hexanem (viz. obr.15). Jak již bylo předesláno v předchozí kapitole, DPH vykazuje fluorescenci pouze v nepolárních prostředích. Naměřené body byly opět proloženy křivkou vzniklou fittem dle čtyř Gaussových křivek v oblasti předpokládaných píků. Na obr. 15 jsou zelenou čarou vyznačeny dvě ze čtyř Gaussových křivek a to náležející dvěma hlavním fluorescenčním emisním maximum pro DPH příslušející vlnovým délkám 425 nm a 449 nm ± 3 nm.



<u>**Obr. 15:**</u> Emisní spektrum fluorescence 0.01 μ M roztoku DPH s n-hexanem při excitační vlnové délce 350 nm.

Dalším krokem bylo stanovení vlastní fluorescence vody a prokázání, že DPH nevykazuje fluorescenci ve vodě. Pro tyto účely byly proměřeny fluorescenční spektra 0.5 µM roztoku DPH s vodou (černá sada bodů, obr. 16) a dále fluorescence samotné deionizované vody (modrá sada bodů, obr. 16). Naměřené křivky byly interpolovány hladkou funkcí na 50 bodů.



<u>**Obr. 16:**</u> Fluorescenční spektrum 1 μ M roztoku DPH s vodou (černá sada bodů), fluorescenční spektrum deionizované vody (modrá sada bodů) a jejich rozdíl (červená sada bodů).

Měření z obr. 16 prokázaly, že DPH ve vodě jakožto polárním rozpouštědle nevykazuje fluorescenci. Tento závěr vyplývá z pozorování, že pokud by se v grafu z obr. 16 od funkce funkce popsané černými body odečetlo pozadí, tedy funkce popsaná modrými body, byla by výsledná intenzita detekované fluorescence zanedbatelná až shodná s chybou měření.

Závěrečným experimentem bylo proměření fluorescenčních spekter roztoku Fidaru ZLC ve vodě s 0.5μ M DPH připraveným dle kapitoly 2.3., od kterého bylo odečteno spektrum pozadí naměřené na vzorku roztoku Fidaru ZLC ve vodě bez DPH (viz. obr. 17). Získané body byly opět proloženy křivkou vzniklou na základě fittu dle čtyř Gaussových křivek v oblastech předpokládaných píků. Obr. 17 opět vykresluje zelenou čarou dvě z Gaussových křivek náležejícím dvěma hlavním maximům a to pro vlnové délky 426 nm a 451 nm ± 3 nm.

Při porovnáním měření fluorescence DPH v nepolárním prostředí (viz. obr. 15) a emisního spektra fluorescence Fidaru LZC ve vodě s fluorescenčníční sondou DPH v koncentraci 0.5 μ M (viz. obr. 17) byly spektra vzhledem ke svému profilu a poloh lokálních i globálních maxim shledána jako totožná. Vezme-li v úvahu i měření z obr. 16, které prokázalo, že fluorescence DPH v grafu. 17 nemůže pocházet z DPH rozpuštěného ve vodě, je zřejmé, že DPH v roztoku Fidaru LZC s vodou se nachází ve stabilním prostředí tvořeném nepolárními molekulami nebo alespoň nepolárními částmi molekul.

Na základě předešlých poznatků lze s vysokou pravděpodobností tvrdit, že roztok Fidaru LZC s vodou obsahuje micely a/nebo lipozomy.



<u>**Obr. 17:</u>** Fluorescenční spektrum Fidaru ZLC ve vodě s 1 μ M DPH (černá sada bodů), fluorescenční spektrum Fidaru ZLC ve vodě bez DPH (modrá sada bodů), rozdíl fluorescenčních spekter roztoků s DPH a bez DPH (červená sada bodů).</u>

4 Závěr

Na základě pozorování optickým i elektronovým mikroskopem roztoku Fidaru ZLC s vodou byly pozorovány středově symetrické objekty kulovitého až oválného tvaru velikosti od 200 nm do 2.8 µm, které nebyly pozorovány v nepolárních rozpouštědlech jako n-hexan či toluen. Tento fakt koreluje s poznatky vhodného prostředí pro tvorbu micel či lipozomů.

Domněnku přítomnosti micel či lipozomů dále potvrdilo i měření zeta-potenciálu, které koresponduje s daty a poznatky současné odborné literatury [3].

Přítomnost lipozomů či micel v roztoku Fidaru ZLC s vodou byla dále podpořena i porovnáním fluorescenčních měření z obr. 15 a 16, kde pomocí fluorescenční sondy DPH bylo v roztoku Fidaru ZLC s vodou prokázáno stabilním prostředí tvořeném nepolárními molekulami nebo alespoň nepolárními částmi molekul, což může být právě vnitřní prostor micel či lipidová dvojvrstva [2]. Zde je důležitý fakt, že se jedná o stabilní nepolární

prostředí, které nemůže být v testovaných koncentracích tvořeno volně dispergovanými nepolárními molekulami, jelikož jak ukazuje obr. 16, tyto volně dispergované molekuly nemohou dostatečně ovlivnit fluorescenční měření.

Kombinací provedených metod lze konstatovat, že přípravek Fidaru ZLC je po rozpuštění ve vodě schopen utvořit micelární a/nebo lipozomální útvary.

5 Literatura:

[1] Malvern, user manual, Zetasizer nano siries.

[2] J. Plášek, P. Jarolím, Interaction of the Fluorescent Probe 1,6-Diphenyl-1, 3, 5-Hexatriene with Biomembranes, Gen. Physiol. Biophys. (1987), 6, 425-437.

[3] M. C. Smith, R. M. Crist, J. D. Clogston, S. E., McNeil, Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes, Anal Bioanal Chem (2017) 409:5779–5787, DOI 10.1007/s00216-017-0527-z.