

Fotonová korelační spektroskopie v charakterizaci nanočástic

Bc. Lucie Píšťková

Diplomová práce
2015

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Pišťková**
Osobní číslo: **T13408**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Fotonová korelační spektroskopie v charakterizaci nanočástic**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma. Definujte nanočástice, popište jejich přípravu a vlastnosti a soustředte se na legislativní aspekty problematiky nanočástic v kosmetických přípravcích. Uvedte metody vhodné pro charakterizaci jejich velikosti a podrobněji se zaměřte na fotonovou korelační spektroskopii.

II. Praktická část

1. V praktické části se věnujte vývoji a ověření analytické metody vhodné pro stanovení velikosti nanočástic pomocí fotonové korelační spektroskopie. Analyzujte vzorky koloidního nanostříbra, nano formy ZnO a TiO₂, případně kosmetických přípravků s jejich obsahem. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích.

[2] Barth H.G., Ed: Modern methods of particle size analysis, John Wiley & sons, New York, 1984, ISBN 0-471-87571-6, 309 p..

[3] Brar S.K., Verma M.: Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. Trends in analytical chemistry. 2011, vol.30, n.1, p.4-17.

[4] Mihranyan, A.; Ferraz, N.; Stromme, M.: Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics PROGRESS IN MATERIALS SCIENCE Volume: 57 Issue: 5 Pages: 875-910, JUN 2012.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: PÍŠŤKOVÁ LUCIE Obor: CHTP-TTDK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 15.5.2015

P. Pišťková Lucie

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.
²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předmětem diplomové práce je stanovení velikosti nanočástic a popis jejich chování ve fyziologických a gastrických tekutinách s využitím metody dynamického rozptylu světla (DLS). Teoretická část popisuje vlastnosti nanočástic, legislativu týkající se nanočástic v kosmetice, vybrané oblasti jejich použití a jsou diskutovány i toxikologické účinky těchto materiálů. V praktické části je představeno stanovení stříbrných nanočástic v komerčních vzorcích pomocí DLS a je studováno chování nanočástic stříbra ve fyziologických a gastrických tekutinách. Dále je také charakterizována velikost částic oxidu titaničitého v zadaných vzorcích.

Klíčová slova: nanočástice, stříbro, oxid titaničitý, dynamický rozptyl světla

ABSTRACT

The subject of the diploma thesis is to determine the size of nanoparticles and their behavior in physiological and gastric fluids using dynamic light scattering (DLS). The theoretical part describes properties of nanoparticles, legislation on nanoparticles in cosmetics and their application in selected areas. Their toxicological effects are also presented. In the experimental part, the measurements of particle size in commercial samples using DLS are introduced. Behavior of the silver nanoparticles in physiological and gastric fluids is also examined. In addition, size of the titanium dioxide nanoparticles in specified samples is investigated.

Keywords: nanoparticles, silver, titanium dioxide, dynamic light scattering

Ráda bych zde poděkovala mé vedoucí paní doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za trpělivost, čas, pomoc, připomínky a cenné rady, které umožnily vznik této práce.

Moje poděkování také patří paní RNDr. Kristině Kejlové, Ph.D. ze SZÚ za poskytnuté vzorky nanočástic.

Dále bych chtěla poděkovat panu RNDr. Danielu Krskovi ze SZÚ za poskytnutí TEM mikroskopických obrázků studovaných nanočástic.

Velký dík pak patří mé rodině za jejich podporu jak při vzniku této práce, tak i během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Dále prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 NANOČÁSTICE	13
1.1 ÚVOD DO NANOSVĚTA.....	13
1.2 HISTORIE NANOČÁSTIC.....	13
1.3 VLASTNOSTI NANOČÁSTIC.....	14
1.4 KLASIFIKACE NANOČÁSTIC	14
1.5 VÝROBA NANOČÁSTIC	16
1.5.1 Metoda top down.....	16
1.5.2 Metoda bottom up	17
1.5.3 Fyzikální a chemické metody syntézy nanočástic.....	17
2 LEGISLATIVA	18
2.1 VYBRANÉ ČÁSTI NAŘÍZENÍ Č. 1223/2009 TÝKAJÍCÍ SE NANOMATERIÁLŮ.....	18
2.1.1 Kapitola 1 – Oblast působnosti a definice.....	18
2.1.2 Kapitola III – Posouzení bezpečnosti, informační dokumentace k přípravku, oznamovací povinnost	18
2.1.3 Kapitola IV – Omezení pro některé látky	19
2.1.4 Kapitola VI – Informace pro spotřebitele	20
2.1.5 Příloha 1 – Zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku	20
2.2 NORMA ISO/TS 27687:2008.....	20
2.3 POKYNY PRO POSUZOVÁNÍ BEZPEČNOSTI NANOMATERIÁLŮ V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH SCCS/1484/12.....	20
3 NANOČÁSTICE V KOSMETICE	21
3.1 NEKOVOVÉ NANOČÁSTICE JAKO AKTIVNÍ LÁTKY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH	23
3.1.1 Přípravky pro vylepšení vzhledu.....	23
3.1.2 Přípravky pro péči o vlasy.....	23
3.1.3 Přípravky pro péči o pleť	24
3.2 KOVOVÉ NANOČÁSTICE JAKO SOUČÁST KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	24
3.2.1 Přípravky pro vylepšení vzhledu.....	25
3.2.2 Přípravky pro péči o vlasy.....	25
3.2.3 Přípravky pro péči o pleť	26
3.2.4 Přípravky pro péči o ústní dutinu	26
3.2.5 Deodoranty	27
3.2.6 Přípravky s antibakteriálními účinky	27
3.2.7 Opalovací přípravky.....	27
4 PENETRACE NANOČÁSTIC KOŽNÍ BARIÉROU	29
4.1 MOŽNÉ MECHANISMY PENETRACE NANOČÁSTIC DO KŮŽE.....	29
4.1.1 Penetrace anorganických nanočástic lidskou kůží: rozbor nano efektu	30
4.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PENETRACI NANOČÁSTIC DO KŮŽE.....	31
5 NANOTOXIKOLOGIE	33
5.1 NANOČÁSTICE A BUŇKY	33
5.1.1 Interakce buněčných membrán s nanočásticemi	34

5.1.2	Vliv nanočástic na proteiny a makromolekuly.....	34
5.2	VSTUPNÍ CESTY NANOČÁSTIC DO LIDSKÉHO TĚLA	34
5.3	TOXICITA VYBRANÝCH ANORGANICKÝCH NANOČÁSTIC.....	35
5.3.1	Nanočástice stříbra (AgNP)	35
5.3.2	Nanočástice zlata (AuNP).....	36
5.3.3	Nanočástice oxidu titaničitého	36
6	VYBRANÉ METODY PRO CHARAKTERIZACI NANOČÁSTIC	37
6.1	MIKROSKOPICKÉ METODY	37
6.1.1	Transmisní elektronová mikroskopie (TEM).....	37
6.1.2	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	38
6.1.3	Mikroskopie atomárních sil (AFM)	39
6.2	METODY ROZPTYLU SVĚTLA	39
6.3	DALŠÍ METODY PRO CHARAKTERIZACI NANOČÁSTIC	40
6.3.1	Zeta potenciál	40
6.3.2	Metody založené na rentgenovém záření	40
6.3.3	Hyperspektrální snímkování	40
7	DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA.....	41
7.1	PRINCIP METODY	41
7.2	PŘÍSTROJ PRO MĚŘENÍ DYNAMICKÉHO ROZPTYLU SVĚTLA	43
8	CÍL PRÁCE	45
II	PRAKTICKÁ ČÁST	46
9	MATERIÁLY A METODY	47
9.1	ANALYZOVANÉ VZORKY NANOČÁSTIC	47
9.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	49
9.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	49
9.4	METODIKA	50
9.4.1	Příprava vzorků nanostříbra	50
9.4.2	Příprava vzorků koloidního stříbra pro stanovení velikosti částic v různých disperzních médiích.....	50
9.4.3	Příprava vzorku koloidního stříbra pro měření v simulovaných gastrických tekutinách.....	50
9.4.4	Příprava vzorků UV filtrů s obsahem TiO ₂	51
9.4.5	Stanovení velikosti nanočástic metodou DLS.....	52
9.4.5.1	Kontrola měření (opakovatelnost)	52
9.4.6	Stanovení zeta potenciálu.....	52
9.4.7	Příprava vzorků pro TEM	52
9.4.8	Transmisní elektronová mikroskopie	52
10	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
10.1	VLIV ÚPRAVY VZORKU NA VELIKOST NANOČÁSTIC STŘÍBRA.....	54
10.2	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC NANOSTŘÍBRA.....	55
10.3	STABILITA AGNP	58
10.4	CHOVÁNÍ AGNP VE FYZIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH.....	60
10.4.1	PBS.....	61
10.4.2	DMEM bez séra	63
10.4.3	DMEM s 10% telecím sérem	65

10.5	CHOVÁNÍ AGNP V SIMULOVANÝCH GASTRICKÝCH TEKUTINÁCH	67
10.5.1	SGF (pH 1,2)	67
10.5.2	SGF (pH 1,2) s pepsinem	69
10.5.3	SGF (úprava pH na 6,8)	71
10.5.4	SGF s pepsinem (úprava pH na 6,8)	72
10.5.5	SIF (pH 6,8)	74
10.5.6	SIF (pH 6,8) s pankreatinem	75
10.6	TEM	77
10.7	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC VE VZORCÍCH OBSAHUJÍCÍCH TiO ₂	81
10.8	STANOVENÍ ZETA POTENCIÁLU	84
	ZÁVĚR	86
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	88
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	98
	SEZNAM OBRÁZKŮ	101
	SEZNAM TABULEK.....	103

ÚVOD

Nanomateriály jsou stále častěji využívány v různých oblastech průmyslu, ve spotřebních výrobcích i při poskytování zdravotní péče. Očekává se, že v roce 2015 dosáhnou celosvětové prodeje výrobků s obsahem nanomateriálů částky 4,1 bilionu eur. Znalost toxikologického působení těchto látek však zaostává za exponenciální rychlostí růstu výzkumů zaměřených na syntézu, charakterizaci nebo aplikaci nanomateriálů v praxi. V současnosti se však tato situace mění a výzkum bezpečnosti nanočástic se dostává do popředí zájmu. Vědci po celém světě hledají odpovědi na otázky, zda se nanočástice TiO_2 z opalovacích přípravků mohou dostat kůží do těla, zda jsou uhlíkové nanotrubičky z elektronických zařízení nebezpečné pro plíce, tak jako býval azbest, nebo zda nanočástice z potravin mohou přecházet ze střeva do krve. Díky velkému zájmu veřejnosti a dotacím výzkumných fondů stále stoupá počet vědeckých projektů zabývajících se tímto tématem; zatímco v letech 1980 až 2010 byly zveřejněny výsledky 5000 výzkumných projektů, stejný počet výstupů byl publikován v následujících třech letech (tj. 2011–2014). I přes značné vědecké úsilí jsou však informace o chování nanočástic stále nedostatečné.

Z praktického hlediska se výzkum soustřeďuje na řadu cílů. Je to např. sledování chování nanočástic v životním prostředí, zkoumání toxicity těchto látek, či popis procesu jejich rozkladu. Důležitou otázkou rovněž je, jak se nanočástice mohou dostávat do lidského organismu. Teoreticky existují tři hlavní vstupní cesty: kůží, plícemi nebo zažívacím ústrojím. Většina studií se shoduje, že zdravá, nepoškozená kůže je účinnou ochranou bariérou proti nanočásticím. Co se týká možnosti průniku nanočástic zažívacím traktem, názory vědců již tak jednotné nejsou. Je tedy jasné, že popis a pochopení chování nanočástic v organismu vyžaduje další výzkumné aktivity

Výzkum nanočástic je rovněž úzce spojen s probíhajícím vývojem analytických metod pro jejich charakterizaci. Mezi techniky, které poskytují nejdůležitější informace, patří transmisní emisní mikroskopie (TEM), kterou lze určit velikost a tvar částic nebo dynamický rozptyl světla (DLS), který umožňuje rychlé stanovení jejich rozměrů. Nelze opomenout ani ultrafiltraci a ultracentrifugaci poskytující informace o stabilitě nanočástic v různých médiích. [1, s. 53], [2, s. 4], [3].

Diplomová práce je příspěvkem k výzkumu stanovení velikosti nanočástic a chování nanočástic stříbra ve fyziologických a gastrických tekutinách za pomoci DLS.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NANOČÁSTICE

Biotechnologie a nanotechnologie jsou klíčovými technologiemi jednadvacátého století s velkým potenciálem dalšího růstu. Nanotechnologie je obor, který se rychle rozvíjí v důsledku velkého pokroku dosaženého v oblastech elektroniky, mechaniky, medicíny, kosmetiky nebo potravinářství. Vlastnosti organických a anorganických nanočástic, jako jsou malé rozměry, složení, struktura povrchu, rozpustnost, tvar či schopnost agregace umožňují neomezené úpravy jejich základních užitečných vlastností, např. vodivosti, rozpustnosti nebo stability [1, s. 38], [4, s. 5], [5, s. 53].

1.1 Úvod do nanosvěta

Nanotechnologie jsou založeny na zpracování materiálů na atomární a molekulární úrovni za účelem vytvoření nových molekulárních struktur, známých jako nanomateriály (NM). Nanomateriály mají jedinečné vlastnosti, které se liší od původních materiálů, ze kterých byly odvozeny.

Nanomateriál je definován jako materiál s jedním nebo více vnějšími rozměry, anebo vnitřní strukturou v řádu nanometrů, což mu dává nové vlastnosti v porovnání se stejným materiálem, jehož rozměry jsou tradiční. Nanočástice jsou podmnožinou NM a jsou definovány jako jednotlivé částice s průměrem menším než 100 nm, i když jejich aglomeráty mohou být větší. Obecně se velikost nanočástic pohybuje v rozmezí 1–100 nm [6, s. 40–41], [7, s. 1].

Nanočástice nemusí být nutně produktem lidské činnosti, lze je nalézt také v přírodě. Přirozeně se vyskytující nanočástice mohou být jak organické (proteiny, polysacharidy, atd.), tak i anorganické (např. oxyhydroxidy železa, aluminosilikáty či kovové nanočástice), které mohou vznikat při zvětrávání, sopečných erupcích, blescích nebo mikrobiálními procesy [8, s. 262].

1.2 Historie nanočástic

Historie nanočástic sahá hluboko do minulosti, její stopy vedou až do starověku. Jednoduchým použitím přírodních nanomateriálů byla aplikace jílu. Zajímavější ale je, že již před více než 4500 lety byla využívána přírodní azbestová nanovlákna k vyztužení keramiky. Nejpozoruhodnější však bylo použití kovových nanočástic jako barevných pigmentů. V 9. století byla vyráběna glazovaná keramika s metalickým leskem. Na těchto ozdobách byly poté pozorovány zajímavé optické vlastnosti, které souvisely s přítomností nanočástic stříbra

či mědi rozptýlených ve vnějších vrstvách glazury. Kromě keramiky byly metalické nanočástice využívány k barvení skla. Známe je využití zlata k nanášení nápadné červené barvy na sklo [8, s. 262]. Jedním z nejslavnějších příkladů tohoto jevu jsou Lykurgovy poháry, které se nachází v Britském muzeu v Londýně. Tyto poháry vyrobené Římany ve 4. století mají na denním světle smaragdově zelenou barvu s kovově zlatým leskem. Pokud je však pohár osvětlen zevnitř, jeho barva se změní v rubínově červenou. Analýza skla odhalila, že tyto poháry obsahují malé množství drobných kovových krystalků stříbra a zlata v molárním poměru přibližně 14:1. Právě přítomnost nanočástic způsobuje toto zvláštní zabarvení [7, s. 2–3], [9].

1.3 Vlastnosti nanočástic

U nanočástic jsou fyzikální charakteristiky jako bod tání, viskozita, nebo oblast maximální absorpce fotonů odlišné od běžných struktur s makro rozměry, které jsou jinak z chemického hlediska identické. U částic s rozměry přibližně 1 až 100 nm se začíná projevovat jejich vlnový charakter. Mezi důležité faktory ovlivňující chování nanočástic patří atomové síly, vlastnosti chemických vazeb nebo kvantové jevy [10, s. 263].

Nanočástice lze popsat jejich tvarem, velikostí nebo morfologickou substrukturou. Mohou vyskytovat ve formě aerosolu (většinou pevná nebo kapalná fáze ve vzduchu/plynu), suspenzi (pevná látka v kapalině) nebo emulze (dvě nemísitelné kapalně fáze). V přítomnosti surfaktantů mohou být pozměněny jejich povrchové a mezifázové vlastnosti. Nepřímo mohou tyto látky fungovat také jako stabilizátory proti koagulaci či agregaci částic (zachovávají náboj částice nebo upravují svrchní vrstvu částice) [11, s. 3].

1.4 Klasifikace nanočástic

Nanočástice lze klasifikovat podle řady hledisek, z nichž nejběžnější je členění na organické a anorganické nanočástice. Mezi organické můžeme zařadit uhlíkové nanočástice (fullerény), do skupiny anorganických nanočástic pak řadíme například magnetické nanočástice, nanočástice ušlechtilých kovů (zlato, stříbro) a polovodivé nanočástice (oxid titaničitý, oxid zinečnatý) [11, s. 4].

Dále lze nanočástice dělit na základě jejich chemické struktury na nanostruktury na bázi uhlíku, nanočástice oxidů kovů, kvantové tečky, kovové nanočástice a organické nanočástice. Nanostruktury na bázi uhlíku se dále dělí na dvě hlavní skupiny. První skupinou jsou

fullereny, které obsahují nejméně 60 atomů uhlíku, druhou skupinu pak tvoří uhlíkové nanotrubičky vyznačující se dobrými elektrickými, mechanickými a chemickými vlastnostmi, které své uplatnění nacházejí zejména v oblasti elektroniky, polymerního průmyslu, energetiky nebo medicíny.

Mezi nanočástice oxidů kovů patří řada oxidů přechodných kovů (Fe_2O_3 , CuO , TiO_2 , ZnO nebo CeO_2) a také SiO_2 . Tyto částice jsou součástí řady spotřebních výrobků (kosmetika, opalovací přípravky, katalyzátory, biomedicína) [1, s. 40–41].

Kvantové tečky neboli tzv. quantum dots (QD) jsou fluoreskující polovodičové nanokrystaly o velikosti několika nanometrů [1, s. 40–41]. Jedná se o anorganické nanočástice, které jsou využívány v biologii a bioanalytické chemii, kde mají podobné uplatnění jako již dříve známé organické fluorofory. Kvantové tečky jsou nositeli některých jedinečných optických a chemických vlastností, což umožňuje jejich využití při detekci iontů, bakterií, virů, nukleotidových sekvencí nebo proteinů. Mohou se vyskytovat samostatně, nebo mohou být uspořádány do klastrů [12, s. 611].

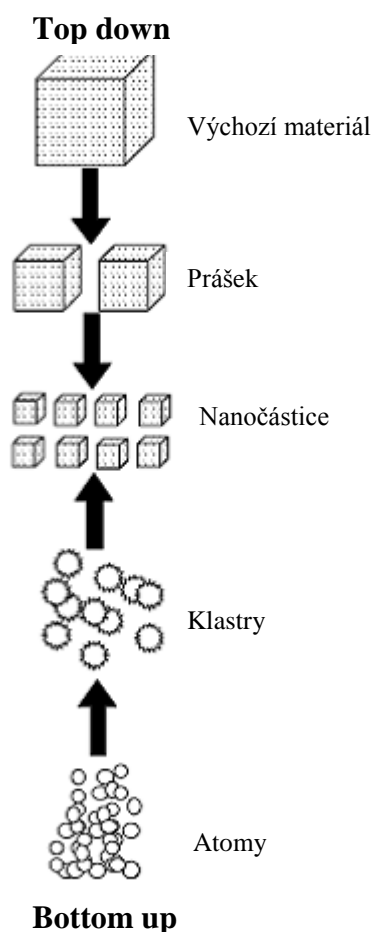
Skupina kovových nanočástic zahrnuje zejména nanočástice ušlechtilých prvků (zlato, stříbro), ale zařazují se sem také některé přechodné kovy (železo, zinek). Použití těchto látek je široké, uplatňují se při katalýze, biodegradaci, detekování biomolekul či v medicíně. Známa je také aplikace nanočástic stříbra pro jejich antimikrobiální aktivitu. Poslední širokou skupinou jsou organické polymerní nanočástice, které jsou stabilní při kontaktu s biologickými tekutinami. Tyto polymerní nanočástice (na bázi biodegradabilních či standardních polymerů) s vhodně modifikovaným povrchem mohou být využívány jako nosiče léčivých látek v lidském těle.

Kromě výše zmíněných způsobů lze nanočástice dělit také dle jejich oblasti aplikace. První oblastí jsou biologické aplikace. V této sféře nacházejí nanočástice zřejmě nejširší uplatnění. Využívají se jako biologické značky díky své velikosti (která je obdobná jako velikost proteinů) a schopnosti fluorescence (zejména QD), dále jsou používány jako nosiče léčiv nebo při ultrasenzitivní elektrochemické detekci proteinů. Uplatňují se také při monitorování a detekci mikroorganismů. Další oblastí aplikace je životní prostředí. Zde se nanočástice uplatňují, díky vysoké adsorbční schopnosti, při biodegradčních procesech (například nanočástice amfifilního polyurethanu). Třetí oblastí jsou průmyslové aplikace, kde se v různých odvětvích využívají nanočástice již dvě desetiletí. Vzhledem k jejich vysoké tepelné vodivosti je možné jejich použití při procesech přenosu tepla. Využívají se také v potravinářství

nebo v oblasti kosmetiky v opalovacích přípravcích, deodorantech, mýdlech, atd. Uplatňují se také ve stavebních materiálech [1, s. 41–43].

1.5 Výroba nanočástic

Často používanými fyzikálními a chemickými metodami pro výrobu nanočástic jsou iontové naprašování, solvotermální syntéza, redukce nebo technika sol-gel. V podstatě existují dva způsoby výroby nanočástic – top down (odshora dolů) a bottom up (zespodu nahoru). Cílem obou způsobů je vytvářet nanočástice a nanostruktury stejné velikosti a tvaru [11, s. 4].



Obr. 1. Srovnání metod top down a bottom up [13].

1.5.1 Metoda top down

Metoda top down je založena na cíleném zmenšování rozměrů výchozího materiálu do řádu nanometrů. Při této metodě se uplatňuje řada kroků, kdy dochází k postupnému zmenšování výchozích struktur tak, aby v každém kroku miniaturizace vznikl produkt o něco menší, než byl ten předcházející až do vzniku struktury o požadované velikosti s novými jedinečnými

vlastnostmi nebo funkcemi. Zmenšování může probíhat například mechanickými, chemickými nebo elektrochemickými postupy, záleží na povaze substrátu a požadavcích na velikosti produktu. Dolní hranice rozměrů u metody top down se pohybuje v rozmezí 10–100 nm [11, s. 4–5], [14, s. 493].

1.5.2 Metoda bottom up

Při metodě bottom up jsou atomy a molekuly uspořádávány do nanostruktur, jejichž rozměry se pohybují v rozmezí 2–10 nm. V přírodě lze tuto metodu pozorovat při vzniku biologických struktur. Tento postup přípravy nanočástic využívá řízené chemické reakce a schopnosti samoorganizace a samosestavování jednotlivých složek. V průmyslových aplikacích se lze s touto metodou setkat například při výrobě uhlíkových nanotrubic nebo kvantových teček [11, s. 5], [14, s. 497].

1.5.3 Fyzikální a chemické metody syntézy nanočástic

Jak již bylo zmíněno, jednou z metod přípravy nanočástic je chemická reakce, při které dochází k redukci iontových solí ve vhodném médiu v přítomnosti surfaktantů s použitím redukčního činidla, kterým je například tetrahydridoboritan sodný, citrát sodný nebo hydrazin.

Další metodou je solvotermální syntéza. Tento proces zahrnuje použití polárního rozpouštědla za zvýšeného tlaku při teplotě nad jeho teplotou varu. Výrazně se tak zvýší rozpustnost reaktantů a reakce může probíhat při nižší teplotě.

Sol-gel metoda je používána k výrobě nanočástic oxidů kovů nebo polymerů. Principem je příprava koloidní suspenze, neboli solu, který je následně převeden na viskózní gel a poté na pevný produkt [11, s. 5–6], [15, s. 35–37].

2 LEGISLATIVA

Základním závazným legislativním předpisem pro kosmetické přípravky je Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích, které je přímo účinné od 11. července 2013.

Kromě tohoto nařízení se nanočásticemi zabývá také norma ISO/TS 27687:2008.

2.1 Vybrané části Nařízení č. 1223/2009 týkající se nanomateriálů

Tento dokument nově zavádí podmínky a pravidla pro používání nanomateriálů v kosmetických přípravcích. Barviva, konzervační přísady a filtry ultrafialového záření, včetně těch s obsahem nanomateriálů, musí být povoleny. Pokud budou v přípravcích obsaženy jiné nanomateriály, které nejsou tímto nařízením omezeny, budou podrobeny posouzení bezpečnosti na úrovni EU [16].

2.1.1 Kapitola 1 – Oblast působnosti a definice

V článku 1 písmene k) je definován nanomateriál, kterým se rozumí nerozpustný nebo biopersistentní a záměrně vyrobený materiál o jednom nebo více vnějších rozměrech nebo s vnitřní strukturou v řádu od 1 do 100 nm.

2.1.2 Kapitola III – Posouzení bezpečnosti, informační dokumentace k přípravku, oznamovací povinnost

Článek 13 ukládá odpovědné osobě povinnost před uvedením kosmetického přípravku na trh informovat elektronickou cestou o přítomnosti látek ve formě nanomateriálů. Udává se jejich identifikace včetně chemického názvu (IUPAC) a dalších deskriptorů:

- mezinárodní nechráněné názvy farmaceutických přípravků (Non-proprietary Names (INN) for pharmaceutical products), WHO, Ženeva, srpen 1975,
- čísla služby chemických abstrakt (CAS),
- číslo ES, jež odpovídá buď číslům EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances numbers) nebo číslům ELINCS (European List of Notified Chemical Substance numbers) nebo registračnímu číslu přidělenému podle nařízení (ES) č. 1907/2006,
- název XAN, čímž se rozumí název schválený určitou zemí (X); např. název USAN znamená název, který schválily Spojené státy americké,

- název uvedený v seznamu názvů přísad podle společné nomenklatury podle článku 33 tohoto nařízení.

Dále se uvádí rozumně předvídatelné podmínky expozice.

2.1.3 Kapitola IV – Omezení pro některé látky

Dle článku 16 je nutno u každého kosmetického přípravku, který obsahuje nanomateriály, zabezpečit vysokou úroveň ochrany lidského zdraví. Pokud není výslovně stanoveno, tento článek se nevztahuje na nanomateriály používané jako barviva, filtry ultrafialového záření nebo konzervační přísady. Je zde také uvedeno, že odpovědná osoba musí elektronickou cestou oznámit kosmetické přípravky obsahující nanomateriály šest měsíců před jejich uvedením na trh. Oznamované informace musí obsahovat:

- identifikaci nanomateriálu včetně jeho chemického názvu (IUPAC) a dalších deskriptorů (již uvedeny výše),
- přesné vymezení nanomateriálu, včetně velikosti částic a fyzikálních a chemických vlastností,
- odhadované množství nanomateriálů obsažených v kosmetických přípravcích, které mají být ročně uvedeny na trh,
- toxikologický profil nanomateriálu,
- údaje o bezpečnosti nanomateriálu týkající se kategorie kosmetického přípravku, ve kterém je použit,
- rozumně předvídatelné podmínky expozice.

V případě pochybností o bezpečnosti použití určitého nanomateriálu Komise okamžitě žádá Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele (VVBS) o stanovisko k bezpečnosti použití daného materiálu pro odpovídající kategorie kosmetických přípravků a rozumně předvídatelné podmínky expozice. VVBS vydává stanovisko do šesti měsíců od obdržení žádosti, tyto informace jsou poté Komisí zveřejněny. Pokud VVBS zjistí důležité chybějící údaje, odpovědná osoba je Komisí vyzvána k jejich doplnění ve stanovené lhůtě. Konečné stanovisko vydává šest měsíců od obdržení doplňujících údajů.

2.1.4 Kapitola VI – Informace pro spotřebitele

K nanomateriálům se vztahuje článek 19 týkající se označování kosmetických přípravků. Všechny přísady ve formě nanomateriálu musí být na obalu uvedeny v seznamu přísad uvedenému slovem „ingredients“. Označování se provádí uvedením slova „nano“ v závorkách za názvem přísady.

2.1.5 Příloha 1 – Zpráva o bezpečnosti kosmetického přípravku

Informace o nanomateriálech musí obsahovat také zpráva o bezpečnosti v části A v rámci toxikologického profilu látek [17].

2.2 Norma ISO/TS 27687:2008

Touto normou jsou nanočástice definovány jako nanoobjekty se všemi třemi vnějšími rozměry v řádu nanometrů, tzn., že jejich velikost se pohybuje v rozmezí 1–100 nm [18].

2.3 Pokyny pro posuzování bezpečnosti nanomateriálů v kosmetických přípravcích SCCS/1484/12

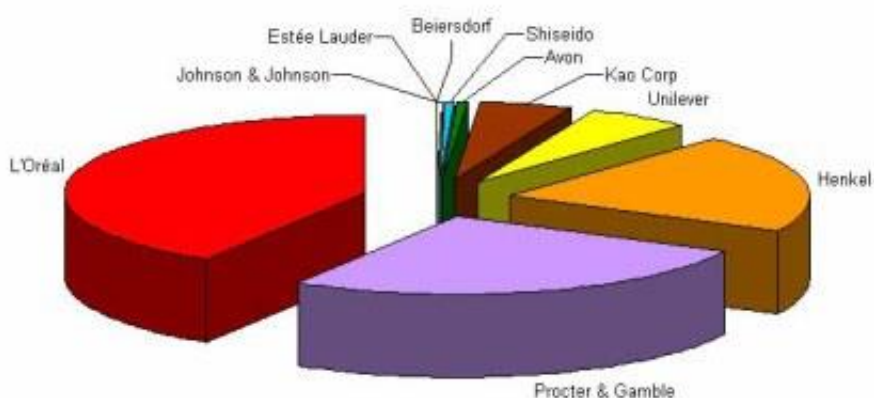
V roce 2012 vydal VVBS Pokyny pro posuzování bezpečnosti nanomateriálů v kosmetice SCCS/1484/12. Na základě oddílu 4 tohoto dokumentu by měla být provedena úplná fyzikálně-chemická charakterizace nanomateriálu. Jedním z důležitých parametrů pro identifikaci a charakterizaci nanomateriálů určených pro použití v KP je právě velikost částic. Je nutné poskytnout informace o primární a sekundární velikosti částic, o počtu částic, distribuci velikosti částic a distribuci velikosti hmoty. Pro každou šarži musí být dostupná její specifikace a variabilita jednotlivých šarží při jejich výrobě. Pro určení velikosti částic doporučují EFSA (2011) a OECD (2010) kombinaci více metod, z nichž jedna by měla být založena na elektronové mikroskopii. Mezi doporučené metody stanovení velikosti patří např. TEM, SEM, DLS nebo AFM [19, s. 15 – 17].

3 NANOČÁSTICE V KOSMETICE

Využití nanomateriálů v kosmetice není žádnou novinkou, byly využívány již ve starověkém Egyptě. V dnešní době jsou nanomateriály v oblasti zájmu kosmetického průmyslu z několika důvodů:

- jsou schopny penetrovat hlouběji do kůže než jiné látky,
- některé nanočástice mají antioxidační a antimikrobní vlastnosti,
- mají malé rozměry a specifické optické vlastnosti [20, s. 1407–1414].

Kosmetický průmysl patří mezi první oblasti, které zavedly nanotechnologie do oblasti vývoje nových produktů [21, s. 875]. Očekává se, že do roku 2015 dosáhne světový trh s výrobky obsahujícími nanomateriály hodnoty 2,6 bilionu amerických dolarů. Vliv nanotechnologie v kosmetickém průmyslu se rozšiřuje díky zlepšeným vlastnostem částic s nanorozměry, jako jsou barva, transparentnost, rozpustnost, atd. Výrobci kosmetických přípravků používají např. nano-verze standardních přísad, které poskytují lepší ochranu proti ultrafialovému záření, hlubší penetraci přípravků do kůže, déletrvající efekt, lepší barvy, nebo vyšší kvalitu finálních výrobků. Bylo zjištěno, že téměř všichni významní výrobci kosmetiky nanotechnologie ve svých produktech využívají. Například kosmetický gigant Estée Lauder vstoupil na trh s nanomateriály v roce 2006 kosmetickou řadou obsahující nanomateriál „NanoParticles“. L'Oréal, největší kosmetická společnost na světě, věnuje přibližně 600 milionů dolarů ročně na patenty týkající se nanočástic [22, s. 186].



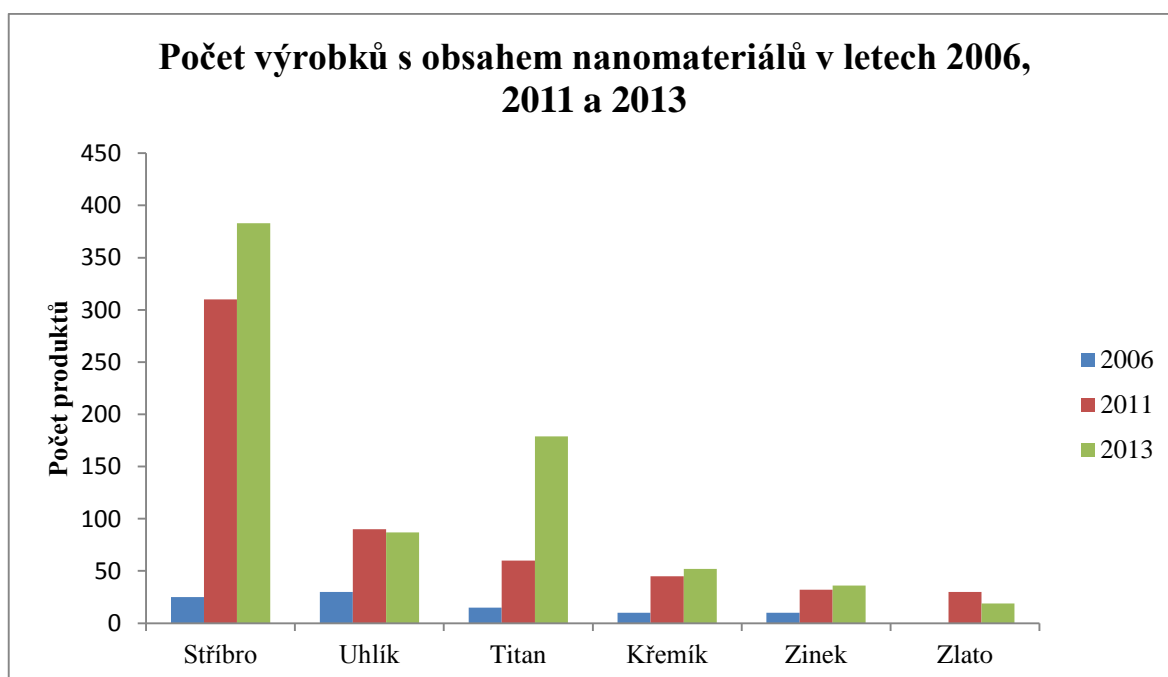
Obr. 2. Velikost kosmetických firem podle počtu patentů vztahujících se k nanomateriálům (rok 2009) [23].

Nanotechnologie ovlivňují proces výroby zejména ve třech oblastech, kterými jsou:

- složení kosmetických přípravků,
- obalové materiály,
- výrobní zařízení.

V obalové technice se nanomateriály využívají při antibakteriální úpravě obalů (uplatňuje se zde nanostříbro, oxid zinečnatý nebo oxid hořečnatý) nebo jako bariéra proti vzduchu a vlhkosti k prodloužení trvanlivosti výrobku (nanojíly). Zajímavé je také jejich využití v podobě radiofrekvenčních identifikačních štítků, které umožňují monitorování teploty a vlhkosti během skladování a sledování případných poškození během přepravy výrobku.

Ve výrobním zařízení nemusí být vždy pro spotřebitele přítomnost nanotechnologie zřejmá, ale ve výrobním procesu nabízí nesporné výhody. Nepřilnavé materiály v zařízeních, snadno čistitelné povrchy nebo lepší energetická účinnost jsou jen zlomkem výhod získaných použitím nanotechnologií při výrobě kosmetických přípravků [21, s. 882–883]. Projekt rozvíjejících se nanotechnologií (The Project of Emerging Nanotechnologies – PEN) měl v říjnu 2013 ve své evidenci produktů spotřebního zboží celkem 1628 produktů nebo produktových řad obsahujících nanomateriály. Mezi nejpoužívanějšími materiály bylo stříbro (383 produktů), titan i s oxidem titaničitým (179 produktů), dále uhlík s fulereny (87 produktů) následovaný křemíkem (52 produktů), zinkem s oxidem zinečnatým (36 produktů) a zlatem (19 produktů) [24].



Obr. 3. Počet výrobků obsahujících konkrétní nanomateriály [24].

V kosmetických přípravcích mohou být nanočástice využívány jako aktivní přísady, vehikula (nanonosiče), nebo jako pomocné přísady. Nanočástice jako aktivní přísady mohou poskytovat například fyzikální ochranu proti UV záření. Jako pomocné přísady mohou nanočástice plnit funkci nerozpustného zahušťovadla nebo zlepšovat optické vlastnosti. Kosmetické nanonosiče, které samy nemají žádnou biologickou aktivitu, jsou využívány k přenášení vitaminů, antioxidantů, chemických UV filtrů, antiaknózních látek do kůže, kde se rozpouští nebo rozkládají, čímž dochází k uvolnění aktivní látky. Nanonosiče poskytují řadu výhod, např. zlepšení účinnosti, nízkou toxicitu, lepší penetraci do kůže, chemickou stabilitu nebo kontrolu rychlosti doručení aktivních složek [21, s. 883–884].

3.1 Nekovové nanočástice jako aktivní látky v kosmetických přípravcích

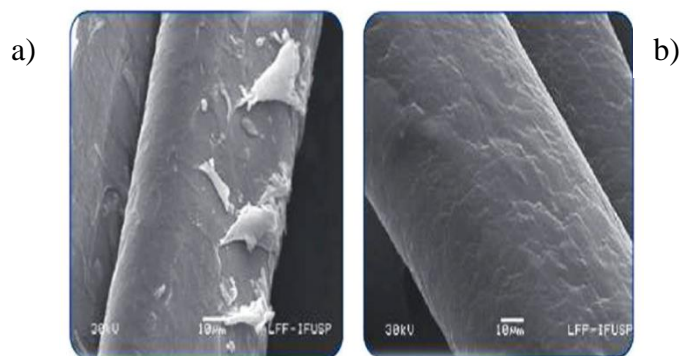
Používání aktivních látek ve formě nanočástic má smysl pouze v případě, že se tímlepší funkčnost kosmetického přípravku (např. lepší stabilita v porovnání se stejným materiálem s běžnými rozměry) [21, s. 886].

3.1.1 Přípravky pro vylepšení vzhledu

Jedním ze zástupců nanočástic, kterými lze dosáhnout zkrášlujícího účinku, jsou arbutinové nanočástice. Arbutin je přirozeně se vyskytující derivát hydrochinonu, který může inhibovat melanogenezi ovlivňováním aktivity enzymu tyrozinázy. Bělící přípravky obsahující arbutin mohou být využívány ke zmírnění kožních problémů, jako jsou stařecké skvrny, naředlá kůže nebo nežádoucí pigmentace. V patentu [25, s. 1] popisuje jeho autor, T. Nanbu, účinnost bělicích kosmetických přípravků, které obsahují arbutinové nanočástice o velikosti 10–150 nm ve vysoké koncentraci (1–15 hm. %) ve formě vodné disperze.

3.1.2 Přípravky pro péči o vlasy

Santana et al. ve své práci uvádějí použití sericinových nanočástic v přípravcích vlasové kosmetiky. Tyto nanočástice byly připraveny z extraktu sericinového proteinu získaného z kokonů bource morušového, síťovaného kvaternizovanou guarovou gumou. Sericinové nanočástice bývají součástí šamponů a kondicionérů díky své schopnosti zvyšovat lesk vlasů, působit proti ztrátě objemu vlasů nebo usnadňovat jejich rozčesávání [26, s. 4–6].



Obr. 4. Vliv nanočástic sericinu na povrch vlasu: a) vlas bez ošetření sericinem, b) po ošetření [27, s. 5].

3.1.3 Přípravky pro péči o pleť

Přípravky pro péči o pleť obvykle obsahují antioxidanty, vitaminy, proteiny či další aktivní látky s účinky proti stárnutí. K dodání těchto látek do kůže se využívají nanonosiče. Další možností jak zlepšit biologickou dostupnost těchto látek je jejich přímé využití ve formě nanočástic. Příkladem nanočástic s antioxidačním, protizánětlivým účinkem nebo účinkem proti stárnutí jsou nanočástice flavonoidu hesperetinu [28, s. 86], [29, s. 183]. Použití kosmetických přípravků s účinky proti stárnutí, které obsahují nanočástice izoflavonu, popsal ve své práci Beumer [30, s. 2]. Aktivní složky kosmetických přípravků ve formě nanočástic mohou být využívány, kromě zlepšení jejich biologické dostupnosti, také k prodloužení stability finálních přípravků [21, s. 888].

3.2 Kovové nanočástice jako součást kosmetických přípravků

V této práci se kovovými nanočásticemi rozumí čisté kovy nebo jejich sloučeniny (oxidy, hydroxidy, sulfidy, fosfáty, fluoridy nebo chloridy). Kovové nanočástice a nanočástice oxidů kovů patří mezi nejčastěji používané nanomateriály v kosmetice. Používají se ušlechtilé kovy (zlato, platina, stříbro) a oxidy titanu, zinku, ceru nebo železa. Některé z těchto nanočástic (hliník nebo oxidy železa) se využívají jako korektory v masťových základech, protože jsou schopny zachovat transparentnost, zatímco rozptylují světlo, čímž se vrásky stávají méně viditelnými. Další (např. stříbro) se používají pro své antibakteriální účinky nebo pro schopnost potlačovat akné. Nanočástice platiny, společně s nanočásticemi stříbra se používají v krémech k vylepšení vzhledu. Zlaté nanočástice jsou často součástí obličejových masek [21, s. 888].

3.2.1 Přípravky pro vylepšení vzhledu

Optické vlastnosti, které jsou funkcí velikosti kovových nanočástic, jsou využívány u různých korektorů a make-upů. Ha a kol. popisují kosmetické pigmenty na bázi nanočástic zlata poskytující červenou nebo modrou barvu, stříbrné nanočástice vykazující žlutou barvu a zlato-stříbrné nanočástice s barvou oranžovou. Zlaté (červená barva) a stříbrné nanočástice (žlutá barva) byly připraveny ve formě nanokuliček. Zlaté nanočástice modré barvy mohou být ve formě nanoskořápek, nanotyčinek, nanokostek nebo nanohranolů. Tyto nanočástice pak mohou být součástí rtěnek, emulzních základů, make-upů, očních stínů nebo pudrů na obličej [31, s. 1–3]. Maitra se spolupracovníky ve své práci [32, s. 1–4] uvádějí vodnou kosmetickou gelovou kompozici, obsahující fraktální síť nanočástic a průsvitných makroskopických částic, používanou v přípravcích o pleť nebo v make-upech. Použití fraktálních nanočástic s jedinečnými optickými vlastnostmi a specifickým povrchem v kombinaci s anorganickými částicemi o velikosti v rozmezí mikronů optimalizuje optický rozptyl světla, tj. vede k optickému rozostření, čímž následně dojde k vizuálnímu potlačení vrásek, jemných linek, pórů a dalších kožních nedokonalostí. Pokožka tak vypadá přirozeně a bezchybně. Použité nanočástice mohou být anorganického původu, zejména z oxidu křemičitého, hlinitého, zirkoničitého, zinečnatého nebo z oxidu ceru. Příkladem takového systému je gelová vodná disperze oxidu hlinitého a křemičitého. Velikost anorganických nanočástic byla 50–900 nm s indexem lomu 1,38–2,00.

Kovové nanočástice mohou být také využívány ke vzniku fotoluminiscenčních či fluorescenčních efektů. Kosmetické kompozice používané u make-upů, které obsahují pigmenty s fluorescenčními kovovými nanočásticemi, ve své práci diskutuje Dubertret [33, s. 2]. Barva emitovaná nanočásticemi se může měnit s velikostí částic. Nanočástice jsou v tomto případě zapouzdřeny do micel obsahujících fosfolipid a hydrofilní materiál.

3.2.2 Přípravky pro péči o vlasy

Použití nanočástic oxidu hlinitého, zejména bauxitu, nebo oxidu titaničitého v různých produktech vlasové kosmetiky, které vlasům propůjčují objem a umožňují úpravu bez fixace a přetěžování jednotlivých vlasů, publikovali Giroudi a kol. [34, s. 2]. Tyto přípravky jsou určeny pro vlasový styling a údržbu účesu. Autoři popisují formulace obsahující fixační polymer s obsahem nanočástic oxidu hlinitého o velikosti menší než 200 nm (zejména 5–50 nm) a obsahu nejméně 10 hm. %. Nanočástice na bázi kovů byly také popsány v přípravcích zabraňujících maštění vlasů a v přípravcích dodávajících vlasům lesk [35, s. 2]. Kovové

nanočástice mohou být užitečné i při léčbě vypadávání vlasů. Přípravky obsahující stříbrné nanočástice a extrakty z rostliny *Polygonum multiflorum Thunb* (rdesno mnohokvěté) je možno použít pro zvýšení růstu vlasů nebo při léčbě onemocnění *alopecia areata*, kdy dochází k ložiskovému vypadávání vlasů. Jednotlivé složky této kompozice mají synergický efekt a účinně podporují růst vlasů. Velikost stříbrných nanočástic je v průměru 1–100 nm a v přípravku jsou přítomny v koncentraci od 10 μM do 1 mM [36, s. 1].

3.2.3 Přípravky pro péči o pleť

Zachycování volných radikálů kovy a oxidy kovů je užitečné pro dosažení účinků zabráňujících stárnutí pleti. V této souvislosti byly popsány kosmetické přípravky s nanočásticemi oxidu ceru, které podporují životnost tkáně. O nanočásticích oxidu ceru se tvrdí, že snižují nebo eliminují poškození buněk způsobené endogenními a exogenními volnými radikály. V kosmetických přípravcích jsou tyto nanočástice dodávány do kůže pomocí lipozomů v krémech proti stárnutí [37, s. 2–4]. Bylo rovněž popsáno, že k zachycování superoxidů lze také využít nanočástice ušlechtilých kovů jako zlato nebo platina v poměru 1 : 1 s velikostí částic 0,1–10 nm [38, s. 1].

3.2.4 Přípravky pro péči o ústní dutinu

Fotokatalytické vlastnosti oxidů přechodných kovů jsou velmi užitečné v péči o zuby. Byly popsány přípravky k bělení zubů, které obsahují fotokatalytické nanočástice oxidu titaničitého s uhlíkem a oxidačním činidlem (peroxid vodíku). Toto složení také zlepšuje ochranu dutiny ústní před onemocněním tak, že působí proti přítomné mikrobiální flóře [21, s. 891]. V péči o chrup se tyto oxidy kovů uplatňují nejen díky svým fotokatalytickým vlastnostem, lze je také využít k úpravě reologických vlastností přípravků. Brueninghaus a Kropf [39, s. 1–4] popsali tixotropní činidlo v přípravcích dentální péče obsahující nanočástice oxidů přechodných kovů. Toto činidlo je v klidovém stavu ve formě gelu a pro použití se protřepáním nebo během aplikace injekční stříkačkou převádí na kapalinu, která se okamžitě nebo během několika sekund vrací do své původní gelové formy. Ke vzniku tixotropního efektu vyžaduje tato formulace pouze malé množství kovových nanočástic. To také umožňuje začlenění špatně rozpustných částic. Nedochozí tak k sedimentaci a nevyskytují se ani problémy se stabilitou během skladování. Mezi používané kovy patří alkalické kovy, vápník, hořčík, hliník, titan, zirkon nebo zinek. Kovové nanočástice jsou obvykle o velikosti 10 až 50 nm, jsou modifikovány činidlem upravujícím povrch a obsahují jednu nebo více remineralizačních aktivních látek, jako jsou ve vodě špatně rozpustný fosforečnan vápenatý nebo fluoridy.

3.2.5 Deodoranty

Banowski ve své práci [40, s. 1–3] zmiňuje použití nanočástic kovů a oxidů kovů v kosmetických přípravcích na bázi gelů alkalických mýdel. Tyto přípravky kombinují deodorační vlastnosti se snadnou aplikací, elegantním vzhledem (jsou průhledné) a ekonomicky nepřiliš náročnou výrobou. Částice, které tyto produkty obsahují, mají průměr 10–50 nm a používají se v koncentraci 0,01–10 hm. %. Jedná se převážně o oxidy nebo hydráty oxidů manganu, hliníku nebo zinku, které jsou povrchově modifikovány mono- nebo polykarboxylovými (hydroxykarboxylovými) kyselinami s 2–18 atomy uhlíku. Samotný deodorant je vyroben smícháním oxidů, hydrátů oxidů nebo hydroxidů s roztaveným mýdlovým gelem, který poté tuhne.

3.2.6 Přípravky s antibakteriálními účinky

Je známo, že kovy a oxidy kovů mohou vykazovat silné antibakteriální účinky. K tomuto účelu mohou být vhodné, díky své katalytické aktivitě, ionty kovů, např. stříbra, nebo nanočástice přechodných kovů. Nanočástice oxidů kovů, zejména titanu, zirkonu, křemíku, hliníku nebo cínu, potažené fosfonáty lze využít jako antimikrobika v přípravcích osobní hygieny, nebo pro aplikace vyžadující dlouhodobou povrchovou antimikrobní aktivitu. Tyto nanočástice vykazují antimikrobní účinky hlavně vůči patogenním grampozitivním a gramnegativním bakteriím, bakteriím kožní mikroflóry jako *Corynebacterium xerosis*, kvasinkám a plísním [41, s. 1–15].

3.2.7 Opalovací přípravky

Částice oxidů přechodných kovů (oxidů zinečnatého a titaničitého) jsou schopny absorbovat UV záření a jsou proto široce používány jako účinné složky opalovacích přípravků. U normálních pigmentů částice oxidu titaničitého o velikosti 150–300 nm a částice oxidu zinečnatého s velikostí 200–400 nm světlo odrážejí a rozptylují, takže se přípravky jeví jako bílé. Když však mají nanočástice velikost 20–150 nm (TiO_2) a 40–100 nm (ZnO), UV záření je absorbováno, rozptýleno a do značné míry jsou také propouštěny vlnové délky viditelného světla, takže se opalovací přípravky na kůži jeví jako transparentní, což je činí esteticky přijatelnějšími. Nanočástice rovněž poskytují lepší ochranu proti UV záření ve srovnání s jejich protějšky s mikrorozměry [42, s. 15–16]. Fotokatalytické vlastnosti nanočástic oxidu zinečnatého a oxidu titaničitého jsou využívány v mnoha kosmetických přípravcích. Současnými trendy je další zlepšování UV ochrany a snižování jejich potenciální toxicity, čehož může být dosaženo potažením nanočástic transparentním pláštěm z jiného materiálu (např.

oxid křemičitý nebo sklo). Foto-pasivované nanočástice oxidu titaničitého mají sníženou tendenci tvořit aglomeráty a lze je tak snadno rozptýlit v tekutém médiu [43, s. 1]. Jedním ze způsobů, jak zvýšit účinnost opalovacích přípravků, je zvýšení plochy povrchu nanočástic. Toho je dosaženo např. u nanočástice oxidu titaničitého s pravidelnými mnohostěnnými nanodutinami, které jsou izolované od povrchu nanočástice, a v opalovacích přípravcích absorbují více UV záření než obdobné přípravky bez nanodutin. Tyto dutinky mají průměr 5 až 50 nm a nanočástice jsou ve formě nanotyček o velikosti 20 až 150 nm [44, s. 1–2]. Za účelem zlepšení dispergovatelnosti a transparentnosti mohou být nanočástice potaženy různými polymery. Povrchově modifikovaný oxid zinečnatý poskytuje dobré UV absorpční a disperzní vlastnosti a také vykazuje zlepšenou antimikrobiální aktivitu [45, s. 1].

4 PENETRACE NANOČÁSTIC KOŽNÍ BARIÉROU

Vzhledem ke stále častějšímu využívání nanotechnologií v oblasti kosmetiky, farmacie nebo medicíny je chování nanočástic ve vztahu ke kůži, jako k důležité biologické bariéře, námětem řady studií. Jejich výsledky však nejsou jednoznačné, a proto je potenciální schopnost nanočástic penetrovat do hlubších vrstev živých tkání stále předmětem diskuzí [46, s. 39].

4.1 Možné mechanismy penetrace nanočástic do kůže

Podíl jednotlivých faktorů ovlivňujících průnik anorganických nanočástic kůží je stále neznámý. Možné vysvětlení průniku nanočástic kůží by mohlo poskytnout studium stavby a struktury kůže. Ve *stratum corneum* (SC) jsou mezibuněčné lipidy uspořádány do dvojvrstev. Hydrofobní nepolární řetězce jsou orientovány tak, že jejich hydrofilní polární části směřují do vodného prostředí. Lipofilní póry vzniknou při takovém uspořádání mezibuněčných lipidů, kdy jsou proti sobě umístěny hydrofobní řetězce, vodné póry vznikají při head to head¹ uspořádání a jsou tedy ohraničeny hydrofilními oblastmi lipidů. Přestože jsou póry možnou cestou pro průnik hydrofilních penetračních činidel, uvádí se, že pronikání vody a polárních molekul je obecně špatné. Na základě těchto zjištění lze pochybovat o závislosti penetrace anorganických nanočástic na vodních pórech. Nicméně, uvažujeme-li pouze rozměry, pokud jsou látky/částice menší než průměr lipidové mezibuněčné vrstvy nebo průměr pórů, mohou tato činidla proniknout přes SC do hlubších vrstev kůže. Dokonce i větší molekuly mohou prostoupit kožními adnexy (vlasovými folikuly nebo potními žlázami), ale stále pak musí proniknout do příslušné tkáně [47, s. 23–30].

Lee et al. ukázali, že při aplikaci nanočástic oxidů železa (o průměru 4,6–10 nm) na kůži s incizí o šířce 1 μm, byly tyto nanočástice pozorovány jak v intercelulárních a intracelulárních prostorech SC a v živé části epidermis v blízkosti řezu, tak také v intracelulárních oblastech živé epidermis ve větších vzdálenostech od incize [48, s. 1066]. Labouta se svým kolektivem zkoumali vlivy oslabující bariérovou funkci lidské kůže odstraňováním epidermálních lipidů nebo dokonce úplným odstraněním SC metodou stripování jednotlivých vrstev pomocí adhezivní pásky (tape stripping). Zjistili, že citrátem stabilizované nanočástice

¹ head to head – lipidová dvojvrstva, složená ze dvou vrstev lipidů, je uspořádána tak, že polární konce (hlavy) jsou obráceny proti sobě

zlata o velikosti 15 nm nemohou penetrovat neporušenou lidskou kůží. Odstraněním epidermálních lipidů byl naopak průnik testovaných nanočástic umožněn, což ukazuje, že intercelulární lipidy jsou hlavní překážkou při penetraci nanočástic do kůže. Úplné odstranění SC vedlo k 16násobnému zvýšení penetrace nanočástic do hlubších vrstev kůže. To tedy indikuje, že bariérová funkce SC ve vztahu k penetraci nanočástic nezáleží pouze na intercelulárních lipidech, ale souvisí s celou mikrostrukturou SC a s jeho systémem intercelulárních vodních a lipidových kanálů [49, s. 4991–4998]. Možným způsobem kožní penetrace anorganických nanočástic je také folikulární cesta. Nicméně kožní adnexa tvoří jenom malou část celého kožního povrchu (kolem 1/1000) [46, s. 49]. Jednou z teorií je, že chlupy a vlasové folikuly se mohou chovat jako pumpa, která tlačí nanočástice hlouběji do folikulu při pohybu chlupů (*in vivo*). Pohyby chlupů mohou být simulovány *in vitro* masírováním vyříznuté kůže. Tímto způsobem by mohly nanočástice střední velikosti (přibližně 400–700 nm) difundovat hlouběji do vlasových folikulů než malé nebo velké částice, takže by modifikací velikosti částic bylo umožněno jejich selektivní zaměření [50, s. 47]. Možnou roli folikulární cesty v perkutánním zavádění nanočástic oxidu titaničitého o velikosti 20 nm studovali Lekki et al. Přestože byly pozorovány částice uvnitř folikulu až v hloubce přibližně 400 nm, v okolní živé tkáni nebyla přítomnost nanočástic zjištěna [51, s. 174]. Celkově lze tedy říci, že penetrace nanočástic kožními adnexy není dostačující pro zvýšení celkové penetrace. Kromě toho je při studiu mechanismů kožní penetrace anorganických nanočástic třeba vědět, zda dochází k potenciální penetraci nanočástic jen díky tzv. „nano“ efektu (tj. pasivní penetrace), nebo vlivem dalších faktorů [46, s. 49].

4.1.1 Penetrace anorganických nanočástic lidskou kůží: rozbor nano efektu

Ať už je penetrace částic studována v souvislosti s posuzováním rizik, nebo pro účely dodávání léčivých látek, základní znalosti probíhajících mechanismů jsou zásadním aspektem porozumění této problematice. Nejvýznamnější charakteristickou vlastností nanočástic je jejich velikost. Proto byla předmětem řady studií [46, s. 49].

Protože *in vivo* studie na lidských dobrovolnících jsou obtížně proveditelné, za zlatý standard pro *in vitro* studie kožní penetrace je považována vyříznutá lidská kůže (zejména při posuzování dermálních rizik pro člověka). Údaje získané s využitím vzorků lidské kůže musí být pečlivě analyzovány tak, aby mohla být vyhodnocena penetrace nanočástic do kůže v reálných situacích [52, s. 1160]. V článku z roku 2013, jehož autory jsou Labouta a Schneider, je zmíněno několik různých studií zabývajících se pronikáním anorganických nanočástic do lidské kůže. V 10 z těchto studií při použití lidské kůže *in vitro* nebyla zjištěna penetrace

částic do hlubších vrstev kůže. V dalších studiích byla penetrace do kůže pozorována v důsledku ošetření kůže (tape stripping, s použitím chemických látek za účelem zlepšení průniku částic). Ve zbývajících studiích nebyla před nanesením ani současně s aplikací přípravků obsahujících nanočástice kůže ošetřena fyzikálními ani chemickými metodami. Nicméně pokud aplikované nanodisperze obsahují některé přísady použité při syntéze nanočástic s možným vlivem na celistvost kůže, lze jimi penetraci částic podpořit. Jedná se například o nanočástice potažené tetramethylamonium hydroxidem (leptavý účinek), nebo dokusátem sodným (anionický surfaktant), nebo o nanočástice rozpuštěné v absolutním alkoholu (99%). Byly také studovány účinky formulačních přísad jako dodekanthiolu, *t*-butylamin boranu a kyseliny thioglykolové (možné kožní iritanty) nebo lecitinu a cetrimidu (zlepšují penetraci). Přestože použitá množství těchto látek přímo neumožňují penetraci nanočástic, lze jejich přítomnost zařadit mezi podpůrné faktory. Labouta et al. také podrobně zkoumali vliv toluenu, který se používá jako nosič pro některé nanočástice zlata, a zjistili, že rovněž ovlivňuje pronikání nanočástic do kůže.

Je obtížné ukázat na jediný faktor ovlivňující chování anorganických nanočástic při kontaktu s kožní bariérou. Jde pravděpodobně o komplexní proces ovlivněný více proměnnými, které zahrnují fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic, složení přípravku a dále vliv prostředí a mechanických faktorů [46, s. 49–50].

4.2 Faktory ovlivňující penetraci nanočástic do kůže

Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic a povaha dispergačního činidla jsou klíčovými faktory, kterými se řídí jejich penetrace do kůže [46, s. 45]. Průnik nanočástic zlata kůží v závislosti na jejich velikosti ve své práci ukázali Sonavane a kol. (test na krysách). Bylo popsáno, že nanočástice zlata o velikosti 15 nm pronikaly kůží lépe ve srovnání nanočásticemi o velikosti 102 nm a 198 nm [53, s. 1]. Podobný jev, kdy penetrace do kůže závisí na velikosti částic, byl pozorován i při průniku menších nanočástic zlata lidskou kůží, kde částice o velikosti 6 nm pronikaly do kůže ve větší míře než nanočástice o velikosti 15 nm [49, s. 4998].

Vliv povrchového náboje tvaru částic na kožní penetraci zkoumali ve své studii Ryman-Rasmussen se svými kolegy. Studovali účinek různých povrchových modifikací s různým povrchovým nábojem (kationtové, aniontové, neutrální) na kožní penetraci dvou typů kvantových teček o různé velikosti a tvaru – kulovité QD o poloměru 4,6 nm a QD ve tvaru elipso-

idu o rozměrech 12 nm (hlavní poloosa) a 6 nm (vedlejší poloosa). Bylo stanoveno, že sférické nanočástice pronikaly do epidermis a dermis již po 8 hodinách bez ohledu na jejich povrchový náboj. Podobné chování bylo zaznamenáno i u kationtových a neutrálních elipsoidních nanočástic. U aniontových QD bylo pro jejich proniknutí do hlubších vrstev kůže potřeba 24 hodin [54, s. 159]. Bylo také zjištěno, že s penetrací nanočástic zlata lidskou kůží souvisí kromě povrchového náboje také hydrofobicita jejich povrchu. Jak bylo dříve zmíněno, citrátem stabilizované nanočástice zlata o velikosti 15 nm po 24hodinové expozici nepronikají lidskou kůží. Pokud však byla provedena povrchová úprava cetrimidem (tj. vznikl hydrofobní povrch), výsledkem bylo pronikání částic do hlubších vrstev kůže [49, s. 4993–4998].

Vliv koncentrace nanodisperze a doba expozice na kožní penetraci byla uvedena v již několikrát zmíněné studii, jejímž hlavním autorem je Labouta. Ten se svými spolupracovníky na kůži aplikoval nanočástice zlata modifikovaného alkylem ve dvou různých koncentracích (90 a 437 $\mu\text{g/ml}$) s expoziční dobou nejprve 0,5 hodiny, dále 2, 6 a 24 hodin. Hloubka průniku částic se zvyšovala s rostoucí koncentrací a delší dobou expozice [49, s. 4997–4998].

5 NANOTOXIKOLOGIE

Nanotoxikologie je obor, který vznikl teprve nedávno. Objevil se po prvním boomu nanotechnologií, kdy byly již různé nanomateriály zavedeny do řady průmyslových procesů a produktů. Mechanismy interakce mezi nanočásticemi a živými systémy dosud nejsou zcela pochopeny. Složitost těchto mechanismů souvisí se schopností částic vázat se a reagovat s biologickou hmotou a měnit její povrchové vlastnosti v závislosti na prostředí, ve kterém se nachází. V posledních letech však vědeckých poznatků o mechanismech interakce nanočástic a buněk přibývá. Zdá se, že buňky přijímají nanočástice prostřednictvím aktivních nebo pasivních mechanismů uvnitř buňky, které jsou však na pochopení složitější. Dokonce i částice stejného materiálu mohou vykazovat odlišné chování v důsledku například malých rozdílů v povrchových vlastnostech, náboji nebo velikosti. Tím je posouzení chování nanočástic při kontaktu s biologickými systémy složité a identifikace jejich možného nebezpečí není rovněž jednoduchá [55, s. 130].

5.1 Nanočástice a buňky

Při provádění *in vitro* nanotoxikologických studií musí být pečlivě zváženo, jaké množství nanočástic bude v testu použito. To se vztahuje na počáteční koncentraci nanočástic, které jsou buňky vystaveny, a také na skutečné množství nanočástic přijaté jednou buňkou. K dispozici jsou různé metody měření absorpce částic a jejich intracelulární distribuce [56, s. 1447]. Pouze pochopením dynamiky a cest příjmu částic lze vyvodit závěry týkající se nanotoxikologie.

Mechanismy působící na rozhraní nanomateriálu a biologického objektu mohou být buď chemické, nebo fyzikální. Chemické mechanismy zahrnují vznik reaktivních forem kyslíku, rozpouštění a uvolňování toxických iontů, narušení transportních činností buněčné membrány, oxidační poškození prostřednictvím katalyzátorů, peroxidaci lipidů nebo změnu povrchových vlastností. Fyzikální mechanismy jsou pak především důsledkem velikosti částic a jejich povrchových vlastností. Zahrnují např. narušení membrán, membránové činnosti, transportních procesů a narušení konformace, sbalování nebo agregace proteinů. Jak chemické, tak fyzikální interakce vedou v buňce k řadě navazujících procesů, které tvoří „biologickou odpověď“. Tyto buněčné odezvy mohou vzniknout před nebo po přijetí částice nebo jako odpověď na mechanismus probíhající při jejím přijetí [55, s. 132].

5.1.1 Interakce buněčných membrán s nanočásticemi

Stabilita membrány může být nanočásticemi ovlivněna buď přímo (např. fyzické poškození) nebo nepřímo (např. oxidace), což může vést až k odumření buňky. Je to právě schopnost membrány kontrolovat intracelulární homeostázu prostřednictvím selektivní permeability a transportních mechanismů, která ji činí zranitelným cílem pro možné škodlivé vlivy nanočástic. Interakce nanočástic s membránou do značné míry závisí na povrchových vlastnostech nanočástic. Výzkum ukázal, že různé nanomateriály mohou poškodit membrány různými způsoby, které vedou k narušení její celistvosti a stability [55, s. 132], [57, s. 3716].

5.1.2 Vliv nanočástic na proteiny a makromolekuly

Buněčný aparát je složen z velké části z proteinů a dalších makromolekul, které mohou být ve formě enzymů (př. gastrin), signálních molekul (př. hormony) nebo strukturních proteinů (př. tubulin). Jejich normální fungování je nezbytné pro všechny životně důležité buněčné činnosti. Správná konformace je zásadní pro správnou funkci bílkoviny a i nepatrné změny konformace mohou funkci proteinu změnit nebo dokonce zničit. Nanočástice, které mohou mít stejnou velikost jako molekuly proteinů, jsou schopny zasahovat do procesů buněčné signalizace, nebo mohou interagovat s proteiny a tak způsobit například změnu konformace bílkoviny [55, s. 133].

5.2 Vstupní cesty nanočástic do lidského těla

Nanočástice se do lidského těla nejčastěji dostávají dýchacími cestami, kůží nebo požitím [58, s. 5]. Po průniku do organismu jsou dále schopny přemístit se do dalších orgánů, nicméně tento jev byl prokázán jen ve výjimečných případech. Hlavní vstupní branou pro nanočástice ze vzduchu je dýchací soustava. Důležitou otázkou je, zda mohou částice přecházet ze vzduchu přes bariéru v plicích do krve, a tak získat přístup do zbytku těla. Tělo je vybaveno obrannými mechanismy proti přechodu částic mezi jednotlivými orgány (např. hlenem), ale zdá se, že nanočástice mají schopnost přemísťovat se z plic do jater, sleziny, srdce nebo případně do dalších orgánů [55, s. 133]. Další možnou expoziční cestou je kůže. Například nanočástice oxidu titaničitého, často používané v opalovacích přípravcích, mohou získat přístup do těla prostřednictvím vlasových folikulů, ran nebo kožních lézí [59, s. 150–151]. Vzhledem k tomu, že nanočástice jsou stále více využívány jako potravinářské přídatné látky, nebo při zpracování a balení potravin, existují obavy, že by se mohly dostat prostřednictvím gastrointestinálního traktu do krevního oběhu. Bylo prokázáno, že je možný i

příjem nanočástic střevem a zdá se, že závisí na jejich velikosti. Největší obavou je, že jakmile nanočástice jednou vstoupí do těla a krevního řečiště, získají přístup k dalším orgánům. Další obavou je bioakumulace nanočástic v orgánech. Zatím není jasné, do jaké míry je tělo schopno vylučovat je močí, nebo zda se zbytkové nanočástice skutečně v orgánech akumuluji [55, s. 133], [60, s. 821].

5.3 Toxicita vybraných anorganických nanočástic

V posledních letech se centrem zájmu vědců stávají možná rizika nanočástic (NP) pro lidské zdraví, která vyplývají z expozice v pracovním prostředí, po kontaktu se spotřebními výrobky nebo prostřednictvím znečištěného životního prostředí [61, s. 208]. Jelikož v praktické části práce byly nejvíce zastoupeny nanočástice stříbra a oxidu titaničitého, je další část práce věnována právě jejich toxicitě. Navíc jsou zmíněny i nanočástice zlata.

5.3.1 Nanočástice stříbra (AgNP)

Jak již bylo uvedeno dříve, nanočástice mohou do těla proniknout dýchací soustavou nebo kůží. Nejběžnějším způsobem plicní expozice nanočásticím stříbra je vdechnutí částic vzduchu při průmyslové výrobě. Oberdorster a kol. ukázali na krysách, že inhalované nanočástice se mohou z původního místa ukládání (např. plic) přesouvat do jiných tkání. Výsledky různých studií naznačují, že chronická expozice vysokým dávkám AgNP může být potenciálně škodlivá. Díky platným směrnici a omezením je však nadměrné vdechování částic téměř nereálné [62, s. 597–599], [63].

Dá se říct, že z hlediska toxicity patří stříbro mezi nejvíce prozkoumané nanočástice. To vyplývá ze skutečnosti, že AgNP mají antimikrobiální účinky, kterých se využívá v mnoha produktech od obvazů na rány až po oblečení. Aby však bylo možno vyloučit potenciálně nebezpečné účinky AgNP na různé typy buněk v těle, musí být objasněna specifická toxicita AgNP vůči mikroorganismům. Požití nebo topická aplikace stříbra může vyvolat benigní onemocnění známé jako argyrie, kdy vzniká šedomodré zbarvení kůže a jater způsobené ukládáním částic stříbra v těchto tkáních. Byly také provedeny četné studie zaměřené na toxicitu AgNP s využitím různých buněčných linií např. myších fibroblastů, buněk lidského hepatocelulárního karcinomu nebo karcinomu kůže. Ve všech případech byl pozorován nárůst tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) a vznik oxidativního stresu. Výsledkem byla buněčná smrt nebo apoptóza. Stupeň toxicity byl závislý na koncentraci AgNP a měnil se s různými úpravami povrchu. Mechanismus toxicity AgNP není přesně znám, ale jako

pravděpodobné způsoby se jeví již zmíněná tvorba ROS a vznik oxidativního stresu. Jakmile nadměrná produkce ROS převyšuje antioxidační kapacitu buňky, vzniká oxidační stres a následně může docházet k produkci zánětlivých mediátorů, poškození DNA a apoptóze [62, s. 599], [64, s. 122].

5.3.2 Nanočástice zlata (AuNP)

Sloučeniny zlata jsou obecně považovány za bezpečné a v praxi se používají již řadu let (např. při léčbě revmatoidní artritidy). V makroformě je zlato ušlechtilý kov, a tedy chemicky inertní. Dalo by se tedy očekávat, že nanočástice zlata také nebudou vyvolávat žádné cytotoxické účinky. Nicméně u nanočástic s velmi malými rozměry (4–5 nm) byla popsána schopnost potenciálně vyvolat toxicitu průnikem do jaderného prostoru buňky a následnou vazbou na DNA [62, s. 600], [65, s. 117].

5.3.3 Nanočástice oxidu titaničitého

Nanočástice oxidu titaničitého mají několik vlastností, které je činí oblíbenou přísadou komerčních kosmetických přípravků k ochraně před slunečním zářením, tj. blokují UV záření a jsou transparentní. *In vitro* studie ukázaly, že toxicita TiO_2 ovlivňuje buněčné funkce jako proliferace, diferenciaci, pohyblivost nebo apoptózu, což jsou účinky, které nemohou být ověřeny *in vivo* [66, s. 511–513]. Aby tedy bylo možno posoudit schopnost TiO_2 pronikat kůží, je třeba provést studie na lidských dobrovolnících. Kupříkladu Bennat a Müller-Goymann aplikovali na lidskou kůži TiO_2 buď ve formě vodné suspenze nebo O/V emulze a následně hodnotili kožní penetraci. Zjistili, že TiO_2 lépe pronikal kůží při použití O/V emulze. Také zjistili, že penetrace byla vyšší při aplikaci na ochlupenou kůži, což naznačuje pronikání prostřednictvím vlasových folikulů nebo kožních pórů [67, s. 271].

6 VYBRANÉ METODY PRO CHARAKTERIZACI NANOČÁSTIC

Chemické složení, struktura, velikost a tvar hrají významnou roli v jedinečných vlastnostech, které popisují nanočástice a jejich vliv na okolní prostředí. Obecně jsou nanočástice charakterizovány velikostí, tvarem a povrchovým nábojem. Právě distribuce velikostí částic a jejich morfologie jsou velmi důležitými parametry, kterými lze nanočástice charakterizovat. Morfologie a velikost se často zjišťují pomocí elektronové mikroskopie. Pro stanovení velikosti nanočástic je vhodnou metodou dynamický rozptyl světla [1, s. 43], [68, s. 231].

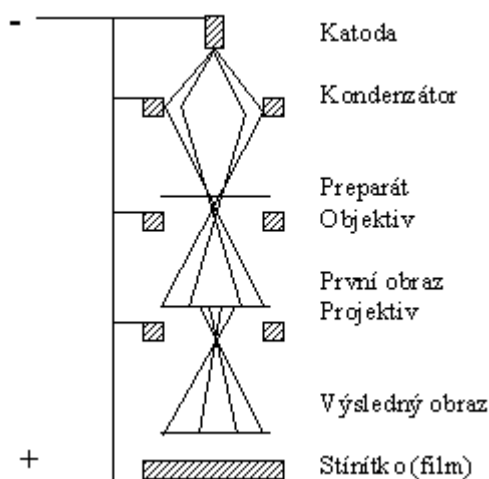
6.1 Mikroskopické metody

Mikroskopické metody patří mezi nejčastěji využívané způsoby charakterizace nanočástic [1, s. 43]. Mezi mikroskopické techniky lze zařadit transmisní a skenovací elektronovou mikroskopii nebo mikroskopii atomárních sil.

6.1.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní elektronová mikroskopie může poskytnout informace o velikosti, distribuci nebo morfologii nanočástic. Výhodou měření velikosti částic pomocí mikroskopie je skutečnost, že jednotlivé částice jsou přímo pozorovány a měřeny [69, s. 49].

Elektrony urychlované elektrickým polem o napětí 50–220 kV, jejichž zdrojem je kovová katoda, vytváří při průchodu vzorkem na fluorescenčním stínítku viditelný obraz. Při metodě TEM je celý vzorek prozařován najednou. Je také třeba, aby byl vzorek přiměřeně tenký, jinak by byly elektrony pohlceny vzorkem. Mezi základní části transmisního elektronového mikroskopu patří kondenzor, objektiv a projektiv. Kondenzor (obvykle dvoustupňový) soustřeďuje elektrony na pozorovaný preparát, jehož vrstva musí být tenká, aby nedošlo k pohlcení elektronů. Spolu s elektronovou tryskou tak kondenzor tvoří ozařovací část transmisního elektronového mikroskopu. Držák vzorku, objektiv, projektiv a luminescenční stínítko pak tvoří zobrazovací část. Objektiv, často tvořený jednou elektromagnetickou čočkou, slouží k tvorbě obrazu. Jeho faktor zvětšení je přibližně 100. Projektiv tvořený až čtyřmi elektromagnetickými čočkami je určen k promítnutí obrazu na stínítko pokryté vrstvou luminoforu (nejčastěji sulfid zinečnatý). Regulací proudu procházejícího čočkami projektivu lze měnit výsledné zvětšení elektronového mikroskopu. Maximální užitečné zvětšení v TEM je 10^6 . Aby nedocházelo k zeslabování proudu elektronů, jsou všechny části mikroskopu uloženy ve vzduchotěsné nádobě, ze které byl odčerpán vzduch.



Obr. 5. Schéma transmisního elektronového mikroskopu.

Pro TEM je možno připravit vzorek různými způsoby. Patří sem například metoda replik, kdy se povrch vzorku pokrývá replikou (často roztok celulózy, který se nechá rozprostřít po pozorovaném povrchu). Po zaschnutí se replika sejme a pozoruje. Další možností je příprava ultratenkých řezů s využitím zařízení ultramikrotonu. Využívá se i elektrochemické leptání, kdy je vzorek leptán nebo iontově poprašován. Vzorek lze také stínovat těžkými kovy (např. Pd, Pt, U) pro zvýraznění povrchových struktur anebo označit koloidním zlatem, čehož se využívá k pozorování buněčných struktur a tkání. Preparáty je možno vytvořit i fyzikálními postupy, např. kryofixací [70, s. 4–6], [71, s. 9–37].

6.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie umožňuje prozkoumání morfologie vzorku s přímou vizualizací. Techniky založené na skenovací elektronové mikroskopii nabízejí několik výhod v analýze morfologie a velikosti částic, nicméně poskytují pouze omezené informace o velikostní distribuci a průměrné velikosti částic ve vzorku. Pro charakterizaci nanočástic v disperzi pomocí SEM by měla být tato disperze nejprve převedena na suchý prášek, který je následně potažen vodivým kovem pomocí katodového rozprašování. Vzorek je poté skenován pomocí zaostřeného jemného paprsku elektronů. Charakteristiky povrchu vzorku se obvykle získávají ze sekundárních elektronů emitovaných z povrchu vzorku. Aby mohly být charakterizovány, musí být nanočástice schopny odolat vakuu. Střední velikost částic získaná pomocí SEM je v řadě případů srovnatelná s výsledky získanými pomocí dynamického

rozptylu světla. Mikroskopické techniky jsou časově náročné, nákladné a často vyžadují doplňující informace o distribuci velikostí částic [68, s. 231].

6.1.3 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Mikroskopie atomárních sil nabízí při měření velikosti částic ultravysoké rozlišení a je založena na skenování vzorků na submikronové úrovni za použití sondy (velmi ostrého hrotu) upevněného na ohebném nosníku. Přístroj poskytuje topografickou mapu vzorku na základě měření meziatomárních sil mezi hrotem sondy a povrchem vzorku. Vzorky jsou obvykle skenovány v kontaktním nebo bezkontaktním režimu v závislosti na svých vlastnostech. V kontaktním režimu je topografická mapa generována poklepem sondy na povrch vzorku, v bezkontaktním režimu se sonda pohybuje v určité vzdálenosti nad vodivým povrchem vzorku, kde působí přitažlivé síly. Během analýzy se sledují změny amplitudy oscilací při interakci hrot-povrch. Hlavní výhodou AFM je schopnost zobrazovat nevodivé vzorky bez speciálních úprav, což umožňuje analýzu jemných biologických a polymerních nano a mikrostruktur. AFM poskytuje nejpřesnější popis velikosti a distribuce velikosti částic a nevyžaduje žádné další matematické přepočty pro jejich stanovení. Velikost částic získaná pomocí AFM tedy poskytuje reálný obraz nanomateriálů, který pomáhá popsat vliv různých biologických podmínek na jejich velikost a morfologii [68, s. 231–232].

6.2 Metody rozptylu světla

Ke stanovení velikosti částic lze rovněž využít metody rozptylu světla. Běžnou metodou ke zjištění distribuce velikosti částic nano a submikronových kapalných disperzí je fotonová korelační spektroskopie (PCS), často označovaná i jako dynamický rozptyl světla (DLS). DLS je metoda založená na interakci světla s částicemi. Světlo rozptýlené nanočásticemi v suspenzi se mění s časem a tyto změny je možné vztáhnout k průměru částic. Využívá se k určení velikosti nanočástic, které v koloidních suspenzích podléhají Brownovu pohybu [68, s. 231], [69, s. 48]. Jelikož byla metoda DLS použita v této práci, je jí věnována větší pozornost v kapitole 7.

Často využívanou metodou měření velikosti částic je také laserová difrakce. Metoda spočívá v hromadném měření částic, čímž se získává výsledná hodnota pro celý vzorek. Při vlastním stanovení částice kontinuálně protékají měřicí celou. Na částicích poté dochází k difrakci laserového svazku. Získává se tak difrakční obraz, který obsahuje informace o velikosti a

tvaru částic. Ten se následně převádí do digitálního formátu a nakonec je tento formát převeden na distribuční a kumulativní křivku. Protože touto metodou nelze získat přímý obraz částice, bývá často doplňována mikroskopickými technikami [72, s. 52].

6.3 Další metody pro charakterizaci nanočástic

6.3.1 Zeta potenciál

Povaha a intenzita povrchového náboje nanočástice je velmi důležitá, protože určuje vzájemné interakce s biologickým prostředím a také elektrostatické interakce s bioaktivními látkami. Pomocí zeta potenciálu (elektrokinetického potenciálu) nanočástic je hodnocena jejich koloidní stabilita. Tento potenciál je nepřímým měřítkem povrchového náboje a odpovídá rozdílu potenciálů mezi objemem kapaliny a tenkou vrstvou protiiontů poutanou k povrchu částice, tedy na rozhraní mezi kompaktní a difúzní částí elektrické dvojvrstvy. Měření zeta potenciálu umožňuje předpovědět stabilitu koloidní suspenze během skladování. K zajištění stability a k zamezení agregace částic by mělo být dosaženo vysoké hodnoty zeta potenciálu (buď pozitivní, nebo negativní). V literatuře je uváděno, že pro zajištění stability disperzního systému by hodnota zeta potenciálu měla být alespoň $\pm 30\text{mV}$. Z hodnot zeta potenciálu lze také předpovídat míru hydrofobicity povrchu [68, s. 232].

6.3.2 Metody založené na rentgenovém záření

Metody založené na rentgenovém záření jako rentgenová absorpční spektroskopie (XAS), rentgenová fluorescence (XRF), rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS) nebo rentgenová difrakční analýza (XRD) mohou poskytovat informace o vlastnostech povrchu a jeho modifikacích, o krystalové struktuře nebo elementárním složení nanočástic. Rentgenová spektroskopie je často kombinována se SEM a TEM pro stanovení elementárního složení a kvantitativní analýzu [1, s. 44].

6.3.3 Hyperspektrální snímkování

Hyperspektrální snímkování funguje tak, že šikmo dopadající viditelné a blízké infračervené záření je rozptylováno na tmavém poli pozadí. Tato metoda se používá ke zkoumání jedinečné povrchové chemie a funkčních skupin přidaných do nanomateriálů. Často se také využívá k zobrazování nanočástic uvnitř buněk [1, s. 44].

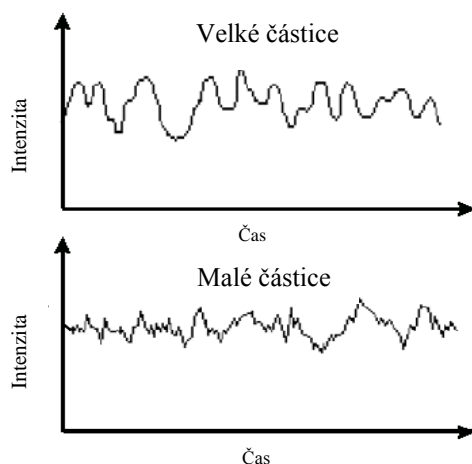
7 DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA

Dynamický rozptyl světla (DLS), neboli fotonová korelační spektroskopie či kvazielastický rozptyl světla (QELS), je metoda používaná k měření velikosti částic s velikostí menší než 4 – 5 mikrometrů. Tato metoda využívá rozptýlené světlo pro měření rychlosti difúze částic. Data jsou poté zpracována a poskytují distribuci velikostí nanočástic ve vzorku, kde je velikost částice daná Stokesovým nebo hydrodynamickým poloměrem. Hydrodynamická velikost částice závisí jak na hmotnosti, tak na tvaru (konformaci) částic. Technika DLS je vhodná pro stanovení velikosti částic v suspenzích. Lze ji využít pro charakterizaci proteinů, polymerů, micel, nanočástic či koloidních disperzí nebo emulzí. Mezi výhody metody patří vhodný měřicí rozsah a potřeba malého množství vzorku k analýze. Stanovení je rovněž rychlé a neinvazivní, není také potřebná žádná kalibrace přístroje [73, s. 1], [74, s. 7–16], [75, s. 19].

7.1 Princip metody

Základem metody je měření světla rozptýleného molekulami vzorku v průběhu času. Pomocí DLS se tedy měří fluktuace intenzity světla rozptýleného z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Jelikož v roztoku všechny molekuly difundují Brownovým pohybem vzhledem k detektoru, dochází zde interferencím, které mohou být pozitivní i negativní a jsou příčinou změn v intenzitě světla [76, s. 12], [77, s. 431].

Brownův pohyb je náhodný pohyb částic v důsledku srážek s molekulami rozpouštědla, které částice obklopují [75, s. 19]. S rostoucí rychlostí difúze částic roste i změna intenzity světla, takže rychlost těchto změn přímo závisí na pohybu molekuly. Difúze molekul je ovlivňována teplotou, viskozitou rozpouštědla a velikostí molekul. Se zvyšující se teplotou je pohyb molekul rychlejší. Naopak se zvyšující se viskozitou rozpouštědla a rostoucí velikostí molekul rychlost pohybu molekul klesá. Rychleji se tedy pohybují malé částice, a tak fluktuace vyvolané jejich pohybem rychleji zanikají [76, s. 12]. Na Obr. 6 je možno vidět znázorněné fluktuace velkých a malých částic.



Obr. 6. Grafické znázornění fluktuací malých a velkých částic [73, s. 4].

Pro popis okamžité hodnoty fluktuace intenzity v čase vzhledem k času τ pro monodisperzní systémy slouží tzv. autokorelační funkce $g(\tau)$, která je dána vztahem:

$$g(\tau) = \exp[-\tau/\tau_C], \quad (1)$$

kde τ_C představuje relaxační čas, který je dán jako doba návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. S hodnotou relaxačního času úzce souvisí difuzní koeficient D . Jejich vztah je definován rovnicí 2:

$$\tau_C = 1/DQ^2 \quad (2)$$

kde Q je vlnový vektor. Jeho hodnota je dána vlnovou délkou světelného paprsku λ a úhlem θ , pod kterým je intenzita rozptýleného světla měřena. Pro vlnový vektor platí:

$$Q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2) \quad (3)$$

Velikost částic je pak možno odvodit z translačního difuzního koeficientu D s využitím Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

$$d(H) = kT/3\pi\eta D \quad (4)$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, k je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η představuje viskozitu prostředí. Průměr částice, který se měří pomocí DLS, je hodnota, která se vztahuje k difuzi částic v kapalině, takže je označován jako hydrodynamický průměr.

Hydrodynamický průměr je tedy průměr koule, která má stejný difuzní koeficient jako měřená částice. Hydrodynamický průměr částic, jejichž tvar není kulovitý, je aproximován průměrem koule se stejnou translační difuzní rychlostí jako částice. Translační difuzní koeficient nezávisí pouze na velikosti vlastní částice, ale také na jakékoli povrchové struktuře, stejně tak na koncentraci a druhu iontů v médiu [73, s. 1], [77, s. 431].

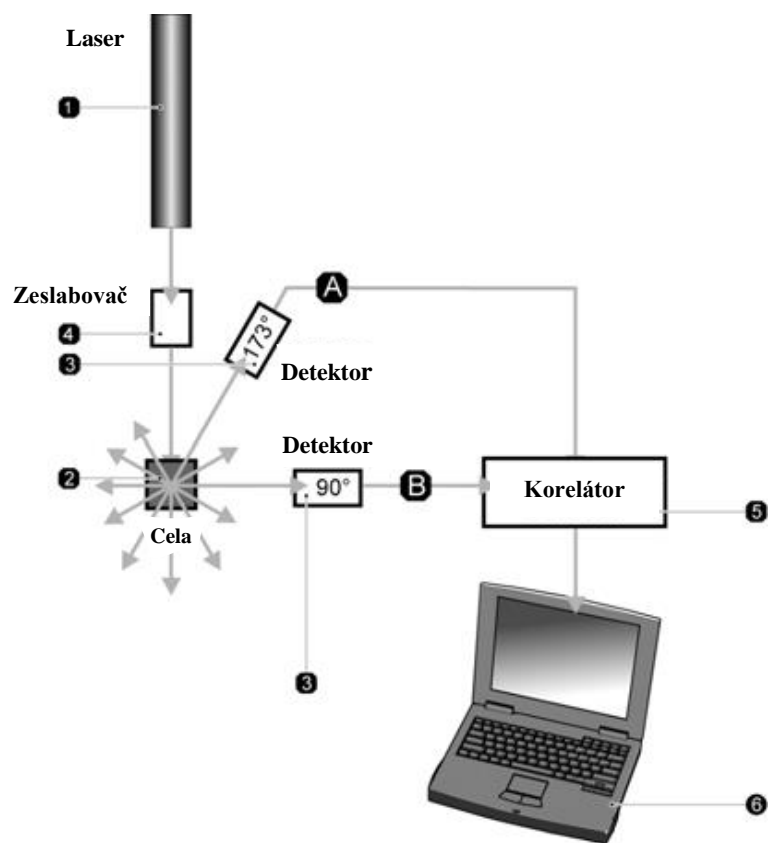
Tvar autokorelační funkce polydisperzních systémů je mnohem komplikovanější a představuje v podstatě kombinaci funkcí odpovídajících jednotlivým druhům částic. Směrem k větším částicím však dochází k jejímu značnému zkreslení, rozptyl se zvětšuje s velikostí molekuly [76, s. 12], [77, s. 431].

Přesnost měření pomocí DLS se obvykle kontroluje pomocí vhodného latexového standardu. Pokud je potřeba standard nejprve před měřením dispergovat, je důležité k tomuto účelu vybrat správné médium. Podle normy ISO 13321, vztahující se k metodě DLS, se pro dispergaci jakéhokoli polystyrenového standardu použije 10 mM NaCl [73, s. 1].

Důležitým krokem analýzy je také plnění a čištění kyvety, ve které je umístěn vzorek. Přítomné částičky prachu nebo bublinky by totiž mohly překrýt signál zkoumaných částic, a tak negativně ovlivnit výsledky stanovení [76, s. 13].

7.2 Přístroj pro měření dynamického rozptylu světla

Přístroj se obvykle skládá z šesti hlavních součástí. Je zde laser (1) sloužící jako zdroj světla k ozáření částic vzorku v kyvetě (2). V případě nízkých koncentrací částic prochází většina laserového paprsku vzorkem, část je však částicemi vzorku rozptýlena do všech úhlů. K měření rozptýleného světla slouží detektor (3). Hodnota intenzity rozptýleného světla musí být v určitém rozsahu, aby mohla být detektorem zaznamenána. Pokud je detektorem zjištěno příliš mnoho světla, dojde k jeho přetížení. Proto se ke snížení intenzity laserového zdroje, a tím i ke snížení intenzity rozptýleného záření, používá zeslabovač (4). U vzorků, které rozptylují málo světla (velmi malé částice, vzorky o nízké koncentraci), je třeba množství rozptýleného světla naopak zvýšit. V tomto případě zeslabovač umožní zvětšit množství světla procházejícího vzorkem. Příslušná poloha zeslabovače je automaticky určována softwarem. Signál intenzity rozptylu z detektoru přechází na digitální signál v korelátoru (5). Korelátor porovnává intenzitu rozptylu světla v po sobě následujících časových intervalech. Z korelátoru jsou informace předávány do počítače (6), kde jsou analyzovány a vypočítává se velikost částic. [73, s. 6–7]



Obr. 7. Schéma přístroje pro měření DLS [73, s. 6].

8 CÍL PRÁCE

Prvním cílem diplomové práce bylo vypracování literární rešerše se zaměřením na nanočástice, legislativu týkající se nanočástic v kosmetice a metody vhodné pro jejich charakterizaci, se zaměřením na dynamický rozptyl světla a transmisní elektronovou mikroskopii.

Cílem praktické části diplomové práce bylo vyvinout vhodný postup pro charakterizaci nanočástic, konkrétně vzorků koloidního nanostříbra a TiO_2 , pomocí dynamického rozptylu světla. V další části práce bylo cílem ověřit vliv úpravy vzorku před stanovením na velikost částic a vyhodnotit chování nanočástic stříbra po dispergaci v různých médiích. Tato média byla vybrána tak, aby simulovala tělní tekutiny, což je krok k pochopení chování nanočástic v organismu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

9 MATERIÁLY A METODY

9.1 Analyzované vzorky nanočástic

V experimentální části byly zkoumány vzorky anorganických nanočástic (zejména stříbra a oxidu titaničitého) dodané Oddělením alternativních toxikologických metod Státního zdravotního ústavu (SZÚ) v Praze. Číslování vzorků bylo zachováno dle SZÚ. Vzorky s označením Rulc byly připraveny elektrolyzou a jejich výrobcem je společnost Petr Rulc-KC (Děčín, Česká republika). Pro přehlednost byly vzorky nanostříbra označeny příslušným číslem (viz. Tab. 1 a 2) a symbolem AgNP.

Tab. 1. Komerční vzorky nanostříbra studované v experimentální části práce.

Vzorek	Označení	Obsah stříbra	Složení Ag	Datum výroby
S6	Ag koloidní Rulc	14 ppm	99,99%	10. 12. 2009
S7	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	15. 02. 2013
S8	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	15. 01. 2013
S9	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	10. 03. 2013
S10	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	10. 05. 2013
S11	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	23. 05. 2013
S12	Ag koloidní VINTR	40 ppm	–	–
S13	Ag koloidní Rulc	14 ppm	99,99%	10. 12. 2009
S14	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	15. 02. 2013
S27	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	27. 01. 2014
	<i>Pozn. k S27: použita demineralizovaná voda Rulc</i>			
S28	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	27. 01. 2014
	<i>Pozn. k S28: použita deionizovaná voda ze SZÚ, bez míchání</i>			
S29	Ag koloidní Rulc	20 ppm	99,99%	02. 2014
	<i>Pozn. k S29: použita deionizovaná voda se SZÚ, klasická metoda výroby</i>			
S30	Ag Nano-tech Polsko	100 ppm	–	–

Tab. 2. Vzorky nanostrříbra vyrobené v SZÚ studované v experimentální části práce.

S15	Ag 100 ppm A
S16	Ag 100 ppm B
S17	Ag 100 ppm C
S18	Ag 100 ppm D
S19	Ag 100 ppm E
S20	Ag 100 ppm F

Tab. 3. Vzorky obsahující TiO₂ studované v experimentální části práce.

Vzo- rek	Označení	Popis	Výrobce
S1	Sol TiO ₂ 180311/2	28 nm, obsah TiO ₂ 0,8 %	Precheza
S2	Nanorutil+kalc s PU 150311/1	126 nm, obsah TiO ₂ 16,4 %	Precheza
S3	Soltex TiO ₂ 1143/256	COC, 150 nm, disperze v isopropylmyristátu, obalené silikou, obsah TiO ₂ 37 %	–
S4	Rutil IPM 1149/39	COC, 150 nm, disperze v isopropylmyristátu, obsah TiO ₂ 37 %	–
S31	Solaveil CT-10W	–	Croda
S32	Solaveil CT-200	–	Croda
S33	Eusolex T-AVO 124135	–	Merck
S34	Disperze 141113/1	Disperze Precheza H ₂ O 141113/1	Precheza
S35	Rutil H ₂ O, 1149/90	–	–
S36	Soltex TiO ₂ /H ₂ O	–	–
S39	Eusolex T-AVO K2024735	šarže K2024735 zpracována do krému Sahara vzorek (S40)	Merck
S40	Sahara 22199/22236	mléko na opalování SPF 15, se zpracovanou šarží TiO ₂ K2024735 (S39)	–
S41	Sahara 140307/22236	mléko na opalování SPF 15 s beta karotenem, se zpracovanou jinou šarží TiO ₂	–

9.2 Použité chemikálie

Disperzní média použitá ke stanovení

- Demineralizovaná voda;
- Toluén (výrobce Penta, Česká republika);
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok – PBS (výrobce MatTek IVSL, Slovensko);
- DMEM bez séra s ATB (výrobce PAA Laboratories GmbH, Rakousko);
- DMEM s 10 % telecího séra a ATB (výrobce, PAA Laboratories GmbH, Rakousko).

Látky použité při simulaci chování nanočástic v gastrointestinálním traktu

- Simulovaná žaludeční tekutina (výrobce Sigma-Aldrich, Německo);
- Simulovaná střevní tekutina (výrobce Sigma-Aldrich, Německo);
- Pepsin (výrobce Sigma-Aldrich, Německo);
- Pankreatin (výrobce Sigma-Aldrich, Německo);
- Hydrogenuhlíčitán sodný (výrobce Sigma-Aldrich, Německo).

9.3 Použité přístroje, zařízení a pomůcky

- Analyzátor velikosti částic Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Ltd. Velká Británie);
- Digitální váhy Kern Ew (Kern&Sohn, Německo);
- Digitální váhy SI-234 (Denver Instrument);
- Ultrazvuková lázeň (SilverCrest, Německo);
- Třepačka Vortex V-1 plus (Biosan SIA, Lotyšsko);
- Stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,22 μm (Millipore, Velká Británie);
- pH metr inoLab pH7110 (WTW, Německo);
- Transmisní elektronový mikroskop Philips Morgagni 286 (FEI, USA);
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo);
 - Rozsah měření 2–20 μL ;
 - Rozsah měření 100–1000 μL ;
- Polystyrenové kyvety o objemu 4 mL (Sarstedt, Německo);
- Kyveta pro měření zeta potenciálu (typ DTS1070);
- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky);
- Laboratorní plasty (špičky pro automatické pipety, stříkačky).

9.4 Metodika

9.4.1 Příprava vzorků nanostříbra

Do kyvety byl pomocí automatické pipety nadávkován 1 mL neředěného vzorku. Kyveta byla zakryta víčkem pro zajištění teplotní stability a vložena do přístroje. Jelikož částice nanokovů mohou při skladování aglomerovat, byly testovány následující postupy homogenizace vzorků:

- a) manuální protřepání,
- b) homogenizace na třepačce Vortex po dobu 1 minuty,
- c) filtrace přes 0,22 μm filtr,
- d) sonikace v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.

9.4.2 Příprava vzorků koloidního stříbra pro stanovení velikosti částic v různých disperzních médiích

Vzorky koloidního stříbra byly před měřením homogenizovány sonikací v ultrazvukové lázni. Doba homogenizace činila 30 minut. Důvodem této úpravy byla skutečnost, že nesonikované vzorky byly systémem kontroly kvality, který je zabudován v přístroji Zetasizer, vyhodnoceny jako nevhodné pro měření. Měření velikosti částic sonikovaných vzorků pak bylo provedeno několika postupy:

- a) do kyvety byl pomocí automatické pipety nadávkován 1 mL vzorku neředěného koloidního roztoku,
- b) do kyvety byl nadávkován vzorek a demineralizovaná voda v poměru 1 : 1,
- c) do kyvety byl nadávkován vzorek a PBS v poměru 1 : 1,
- d) do kyvety byl nadávkován vzorek a DMEM bez séra s ATB v poměru 1 : 1,
- e) do kyvety byl nadávkován vzorek a DMEM s 10 % telecího séra v poměru 1 : 1.

Postupem a) byly charakterizovány všechny vzorky, postupy b), c), d), e) byly použity při měření vybraných vzorků.

9.4.3 Příprava vzorku koloidního stříbra pro měření v simulovaných gastrických tekutinách.

Ke stanovení byl použit vzorek koloidního stříbra č. 29 (AgNP S29), který byl nejprve homogenizován sonikací v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Dále bylo připraveno šest vzorků, jejichž složení je uvedeno v Tab. 4.

Tab. 4. Složení roztoků pro simulaci kapalin gastrointestinálního traktu.

Roztok č.	Složení roztoku	Množství složky
1	Simulovaná žaludeční šťáva (SGF) o pH 1,2	4 mL
	AgNP S29	8 mL
2	SGF o pH 1,2	4 mL
	AgNP S29	8 mL
	Pepsin	0,0385 g
3	SGF o pH 1,2	4 mL
	AgNP S29	8 mL
	5% NaHCO ₃ (zvýšení pH na 6,8)	1,45 mL
4	SGF o pH 1,2	4 mL
	AgNP S29	8 mL
	Pepsin	0,0384 g
	5% NaHCO ₃ (zvýšení pH na 6,8)	2 mL
5	Simulovaná střevní tekutina (SIF) o pH 6,8	4 mL
	AgNP S29	8 mL
6	Simulovaná střevní tekutina (SIF) o pH 6,8	4 mL
	AgNP S29	8 mL
	Pankreatin	0,1206 g

Poté byl pomocí automatické pipety do kyvety nadávkován 1 mL připraveného roztoku. Kyveta byla zakryta víčkem pro zajištění teplotní stability a vložena do přístroje.

9.4.4 Příprava vzorků UV filtrů s obsahem TiO₂

Vzorky byly pro analýzu připraveny tak, že bylo naváženo přibližně 0,05 g vzorku a toto množství bylo suspendováno v 5 mL demineralizované vody. Suspenze byla homogenizována sonikací v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.

Do kyvety byl pomocí automatické pipety nadávkován 1 mL dvakrát přefiltrované demineralizované vody (stříkačkový filtr Milipore 0,22 μm), do které bylo přidáno 5 μL připravené suspenze. Kyveta byla zakryta víčkem pro zajištění teplotní stability a vložena do přístroje.

Pro vzorky S3, S4 a S32 byl disperzním médiem místo demineralizované vody toluen.

9.4.5 Stanovení velikosti nanočástic metodou DLS

Velikost částic ve studovaných vzorcích byla stanovena dynamickým rozptylem světla na přístroji Zetasizer Nano ZS90 při teplotě 25 °C a rozptylovém úhlu 90°. Pro měření velikosti částic byly zvoleny, v závislosti na charakteru vzorku, výše popsané postupy. Přístroj byl nastaven tak, aby v rámci jednoho měření proběhly tři měřicí cykly. Výsledky byly vyjádřeny ve formě „z-průměru“ velikosti částic, což je intenzitně vážený průměr velikostí všech částic přítomných v analyzovaném vzorku.

9.4.5.1 Kontrola měření (opakovatelnost)

Pro kontrolu správnosti měření bylo provedeno stanovení opakovatelnosti měření. Měření bylo provedeno s vzorkem AgNP S29 tak, že nejprve byl vzorek 30 minut sonikován a poté byl do kyvety nadávkován 1 mL vzorku. Po ukončení prvního měření byl vzorek převeden do čisté kyvety a opět změřen. Celkem bylo provedeno 6 měření.

9.4.6 Stanovení zeta potenciálu.

Zeta potenciál byl u vybraných vzorků nanočástic stanoven na přístroji Zetasizer Nano ZS. Pro měření byla použita speciální kyveta (typ DTS1070). Vzorek byl nejprve homogenizován sonikací v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Po ukončení homogenizace byla kyveta pomocí injekční stříkačky naplněna vzorkem a vložena do přístroje.

9.4.7 Příprava vzorků pro TEM

Vzorky nanočástic stříbra byly nejprve před měřením manuálně protřepány. Pro vlastní TEM analýzu byly vzorky připraveny následujícími způsoby:

- a) měření neředěného vzorku AgNP,
- b) AgNP byly smíchány s PBS v poměru 1 : 1.
- c) AgNP byly smíchány s DMEM bez séra v poměru 1 : 1,
- d) AgNP byly smíchány s DMEM s 10 % telecím sérem v poměru 1 : 1,

9.4.8 Transmisní elektronová mikroskopie

Vzorky nanočástic stříbra byly rovněž charakterizovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu Philips Morgagni 286. Formvar/uhlíkem potažené měděné mřížky o průměru 400 mesh byly po dobu 20 minut ponořeny do každého ze vzorků AgNP. Vzorky pak byly

po vyschnutí analyzovány TEM při zvětšení 52 000X. Tvar a velikost AgNP byly zaznamenány pomocí elektronové mikrofotografie pomocí boční CCD kamery MegaView II (Olympus, Německo). Průměr částic byl stanoven obrazovou analýzou (Olympus, Německo).

Příprava vzorků i samotné stanovení TEM bylo provedeno ve Státním zdravotním ústavu.

10 VÝSLEDKY A DISKUZE

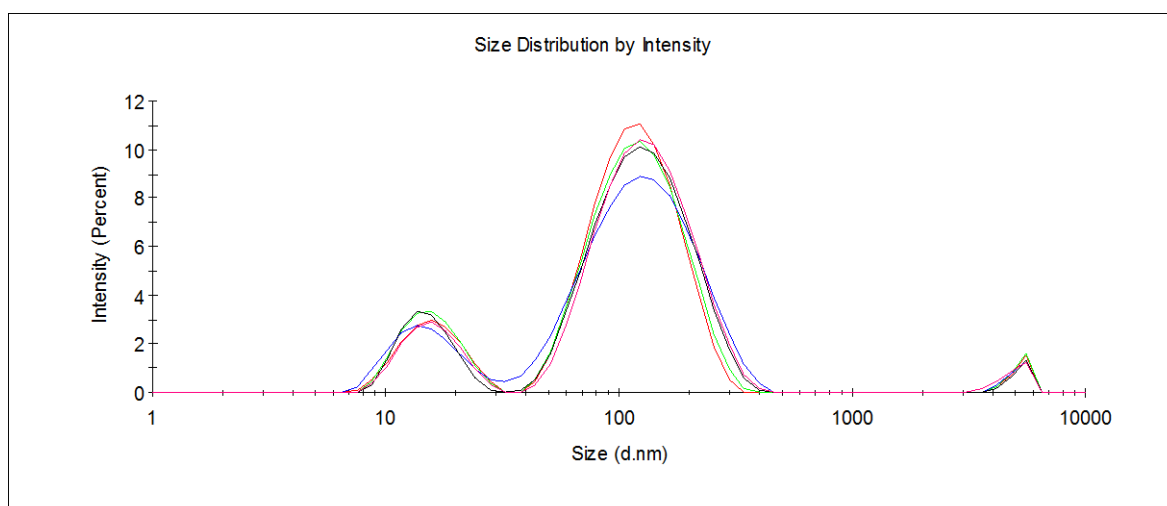
10.1 Vliv úpravy vzorku na velikost nanočástic stříbra

Pro kontrolu správnosti měření byla testována opakovatelnost stanovení velikosti částic u vzorku AgNP S29. Celkem bylo provedeno šest měření za sebou. Z tabulky je zřejmé, že velikost nanočástic se během stanovení významně neměnila, čímž byla potvrzena správnost měření přístroje Zetasizer Nano ZS90.

Tab. 5. Výsledky opakovatelnosti měření.

Měření	z-průměr [nm]	PDI
I	73,5	0,51
II	68,9	0,64
III	73,3	0,54
IV	76,2	0,53
V	74,8	0,53
VI	76,3	0,55
\bar{x}	73,9	0,55
SD	2,7	0,05

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 8. Distribuční křivky AgNP získané při stanovení opakovatelnosti měření.

Během skladování může docházet k agregaci částic, proto je důležité zjistit, jaký vliv mají možné úpravy vzorku na velikost částic. Nejprve byla stanovena velikost stříbrných nanočástic ve vzorcích bez dalších úprav. V dalších krocích byly vzorky upraveny filtrací přes stříkačkový filtr Millipore s velikostí pórů 0,22 μm , homogenizací na třepačce vortex (1 min) a sonikací (30 min). Výsledky těchto analýz jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6. Vliv úpravy vzorku před měřením na velikost koloidních nanočástic. Obsah Ag: AgNP S7-S10 20 ppm, AgNP S6 14 ppm.

Vzorek AgNP	Bez úprav		Filtrace		Vortex		Sonikace	
	z-průměr [nm]	PDI	z-průměr [nm]	PDI	z-průměr [nm]	PDI	z-průměr [nm]	PDI
S6 \bar{x}	14,1	0,97	28,0	0,65	14,9	0,98	42,0	0,68
SD	0,1	0,09	5,2	0,06	0,0	0,01	6,9	0,21
S7 \bar{x}	131,2	0,43	101,6	0,24	111,1	0,35	115,8	0,44
SD	3,5	0,25	2,2	0,00	12,5	0,1	–	–
S9 \bar{x}	73,1	0,25	52,1	0,21	59,8	0,52	135,9	0,32
SD	4,3	0,04	–	–	0,44	0,00	–	–
S10 \bar{x}	198,5	0,42	116,9	0,24	260,4	0,46	128,6	0,37

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Z Tab. 6 je zřejmé, že hodnoty velikostí částic jednoho vzorku stanovené metodou DLS poté, co byl vzorek homogenizován/upraven různým způsobem, nejsou identické. Na základě výsledků bylo rozhodnuto, že nebude použita úprava filtrací, jelikož by mohlo dojít k odstranění přítomných aglomerátů, což by vedlo ke zkreslení informací o velikosti částic v testovaných vzorcích. Z výsledků bylo zjištěno, že sonikace je nejvhodnější úpravou vzorku před měřením. Dále tedy byly vzorky měřeny bez úprav a převážně po úpravě sonikací.

10.2 Stanovení velikosti částic nanostříbra

Dle informací ze SZÚ je složení vzorků AgNP S7–11 a S14 (Ag koloidní Rulc 20 ppm) obdobné, přesto se jejich velikost značně liší. Jak bylo zjištěno, nejvhodnější úpravou vzorků před měřením je sonikace, proto budou porovnány hodnoty z-průměru získané po homogenizaci sonikací. Z Tab. 6 a 7 lze vidět, že největší velikost částic 233,0 nm byla zjištěna

u vzorku AgNP S8. Naopak nejmenší velikost stříbrných částic $116,3 \pm 1,0$ nm byla stanovena u vzorku AgNP S12. U většiny vzorků v této sérii byla distribuce částic bimodální, pouze vzorek AgNP S11 vykazoval distribuci monomodální. Koloid AgNP S10 s multimodální distribucí navíc obsahoval velké částice (řádově μm), které byly mimo rozsah měření použitého přístroje (max. $6 \mu\text{m}$). Vzorky AgNP S6 a S13, opět obdobného složení (obsah Ag 14 ppm), se svou velikostí a distribucí částic také lišily. U AgNP S6 byla stanovena velikost částic $42,0 \pm 6,9$ nm a multimodální distribuce, průměrná velikost částic AgNP S13 pak byla $76,4 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$ s bimodální distribucí.

Tab. 7. Naměřené hodnoty velikosti částic koloidního stříbra Rulc. Obsah Ag: AgNP S8-S12, S14 20 ppm, AgNP S13 14 ppm.

Vzorek AgNP	z-průměr [nm]		PDI	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
S8	233,0	–	0,47	–
S11	198,0	2,6	0,35	0,00
S12	116,3	1,0	0,27	0,01
S13	76,4	0,3	0,48	0,01
S14	117,3	2,6	0,27	0,01

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Další sada vzorků obsahovala AgNP S15–S20. Na rozdíl od ostatních stanovovaných nanočástic stříbra, byly tyto vzorky vyrobeny v SZÚ. Opět byly stanoveny hodnoty velikostí částic, které byly pro jednotlivé vzorky rozdílné. Největší velikost $136,2 \pm 6,5$ nm byla zjištěna u AgNP S15 a nejmenší $10,4 \pm 0,1$ nm u AgNP S19. Měření ukázalo na přítomnost více populací částic, z nichž jedna je představována velmi malými částicemi. Tyto vzorky však nebyly homogenní a vnitřní kontrola kvality přístroje vždy oznámila, že kvalita stanovení je nízká a měření je rušeno přítomností velkých, sedimentujících částic. Z této informace lze učinit závěr, že proces přípravy stříbrných nanočástic používaný na SZÚ není zcela optimální na to, aby poskytoval homogenní, reprodukovatelné šarže AgNP. To bylo potvrzeno o tři týdny později vizuálním pozorováním, kdy byla ve všech těchto vzorcích zaznamenána přítomnost sedimentu svědčící o aglomeraci a následné sedimentaci koloidních nanočástic.

Tab. 8. Hodnoty velikosti částic Ag pro vzorky připravené na SZÚ (AgNP S15–AgNP S20).

Vzorek AgNP	z-průměr [nm]		PDI	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
S15	136,2	6,5	0,29	0,05
S16	51,6	–	0,22	–
S17	13,8	0,3	1,00	0,01
S18	10,7	0,2	0,83	0,01
S19	10,4	0,1	0,78	0,01
S20	11,6	0,1	0,82	0,01

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Pomocí DLS byly dále charakterizovány vzorky koloidního stříbra AgNP S27–S29, představující novější šarže výrobního procesu firmy Rulc. Při výrobě těchto šarží byl ověřen vliv změn v procesu výroby na velikost AgNP. Byly použity různé typy vody (voda ze SZÚ nebo z běžné výroby) a byl rovněž ověřen vliv míchání na velikost koloidních nanočástic.

Přestože byly vzorky AgNP S27–S29 obdobného složení, odlišovaly se velikostí částic i distribucí v závislosti na způsobu jejich přípravy. Největší velikost částic stříbra $295,1 \pm 33,1$ nm (monomodální distribuce) byla naměřena u vzorku AgNP S27, kde byla použita demineralizovaná voda. Velikost částic AgNP S28, který byl vyroben modifikovaným postupem bez míchání, byla $137,8 \pm 22,1$ nm (multimodální distribuce) a nejmenší velikost částic $48,0 \pm 1,4$ nm s bimodální distribucí byla stanovena u vzorku AgNP S29 vyrobeného klasickou metodou s deionizovanou vodou dodanou výrobcem ze SZÚ. Z tohoto souhrnu je zřejmé, že příprava koloidních nanočástic stříbra je velmi citlivá na změny v postupu výroby.

Tab. 9. Získané hodnoty velikosti částic pro vzorky AgNP S27 – S30. Obsah Ag 20 ppm.

Vzorek AgNP	z-průměr [nm]	PDI
S27	276,4	0,526
	313,8	0,488
\bar{x}	295,1	0,51
SD	33,1	0,03
S28	125,3	0,512
	150,2	0,461
\bar{x}	137,8	0,49
SD	22,1	0,05

Tab. 9. Získané hodnoty velikosti částic pro vzorky AgNP S27 – S30 (pokračování).

S29	49,66	0,481
	47,01	0,521
	47,39	0,521
\bar{x}	48,0	0,51
SD	1,4	0,02
S30	93,93	0,217
	79,51	0,236
\bar{x}	86,7	0,45
SD	12,8	0,02

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

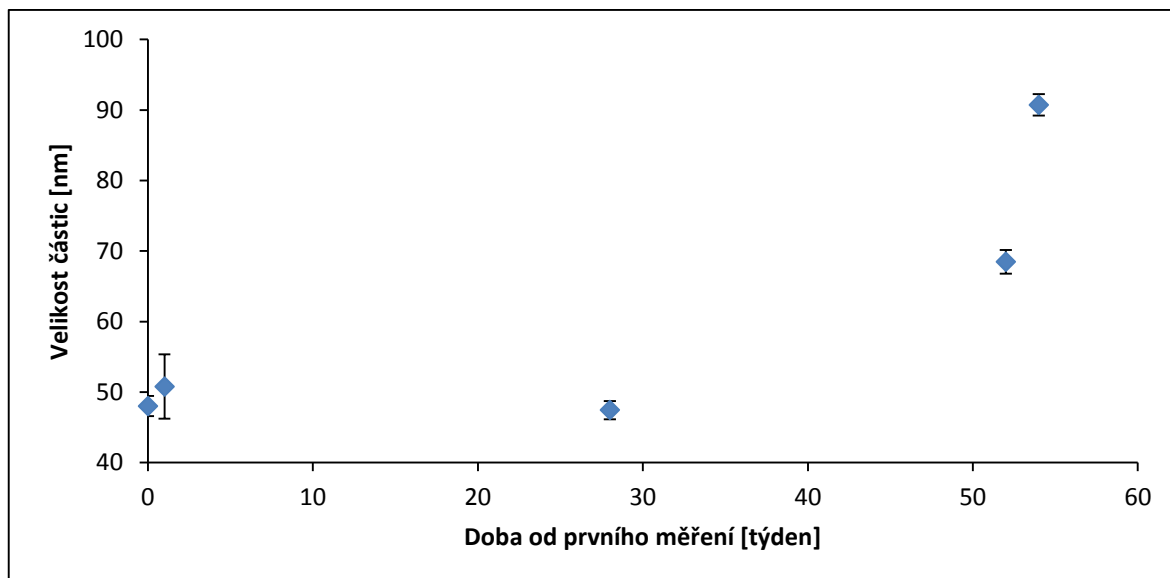
10.3 Stabilita AgNP

Vybrané vzorky byly měřeny opakovaně v průběhu času s cílem zjistit, jak se mění velikost částic během skladování. Vzorky byly uchovávány při 4 °C ve tmě. Nejvíce studovaným vzorkem v tomto směru byl vzorek AgNP S29. Jak lze vidět z Tab. 10 a Obr. 9, během jednoho roku od prvního měření se velikost částic příliš neměnila, její hodnota ležela stále v blízkosti 50 nm. Po 52 týdnech však došlo ke změně a velikost částic vzrostla na hodnotu $68,5 \pm 1,7$ nm a po dalších dvou týdnech na $90,7 \pm 1,5$ nm. Tyto výsledky naznačují, že doba expirace takových to vzorků by neměla přesahovat jeden rok.

Tab. 10. Dlouhodobá stabilita vzorku AgNP S29 skladovaného při 4 °C.

Doba skladování [týden]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	48,0	1,4	0,51	0,02
1	50,8	4,6	0,45	0,16
28	47,4	1,3	0,53	0,01
52	68,5	1,7	0,52	0,06
54	90,7	1,5	0,43	0,01

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 9. Grafické znázornění stability částic vzorku AgNP S29 během skladování.

Kromě výše popsaného vzorku AgNP S29 byla sledována i stabilita dalších koloidů. Vzorky AgNP S9 a AgNP S14 nevykazovaly po 40 týdnech skladování významnou změnu ve velikosti nanočástic. Změna byla naopak pozorována u AgNP S12, kdy došlo k poklesu z-průměru z počáteční hodnoty $116,3 \pm 1,0$ nm na hodnotu $79,9 \pm 1,1$ nm, a u AgNP S13, kdy se původní velikost částic $76,4 \pm 0,4$ nm zmenšila na $46,5 \pm 7,3$ nm. U obou těchto koloidů zároveň došlo ke změně v šířce distribuce, což rovněž svědčí o probíhajících změnách.

Tab. 11. Stabilita vybraných vzorků během skladování (po 40 týdnech).

Vzo- rek AgNP	Počáteční měření				Po 40 týdnech			
	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
S9	135,9	–	0,32	–	140,2	23,7	0,37	0,06
S12	116,3	1,0	0,27	0,01	79,9	1,1	0,46	0,06
S13	76,4	0,4	0,48	0,01	46,5	7,3	0,93	0,12
S14	117,3	2,6	0,27	0,01	114,2	1,9	0,29	0,03

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Po kratší dobu (28 týdnů) byla testována rovněž stabilita vzorků AgNP S27, AgNP S28 a AgNP S30. Změna velikosti částic byla zaznamenána u vzorku AgNP S27, kdy se počáteční hodnota z-průměru $295,1,8 \pm 33,1$ nm zmenšila na hodnotu $239,7 \pm 8,2$ nm. U vzorku AgNP

S28 došlo k nárůstu původní velikosti $137,8 \pm 22,1$ nm na hodnotu $166,6 \pm 2,8$ nm. Ve vzorku AgNP S30 došlo ke zmenšení velikosti částic z hodnoty $86,7 \pm 12,8$ nm na hodnotu $78,3 \pm 4,0$ nm.

Tab. 12. Stabilita vybraných vzorků během skladování (28 týdnů).

Vzo- rek AgNP	Počáteční měření				Po 28 týdnech			
	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
S27	295,1	33,1	0,51	0,03	239,7	8,2	0,51	0,03
S28	137,8	22,1	0,49	0,05	166,6	2,8	0,43	0,04
S30	86,7	12,8	0,23	0,02	78,3	4,0	0,51	0,02

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

10.4 Chování AgNP ve fyziologických tekutinách

Další část práce se soustředila na studium nanočástic stříbra v PBS, DMEM bez séra a DMEM se sérem. Tyto analýzy byly provedeny s cílem zjistit, jak se AgNP chovají v tekutinách, které napodobují podmínky *in vivo*. Výsledky takové práce pak mohou pomoci odhadnout chování nanočástic v organismu, a tím přispět k posouzení jejich toxicity. Uvedené tekutiny jsou rovněž používány při *in vitro* testech biokompatibility, např. při stanovení cytotoxicity, kdy jsou vzorky těmito médii ředěny na požadovanou koncentraci a aplikovány na buňky.

Pro měření byl vždy vzorek AgNP připraven zředěním jednou z testovaných kapalin v poměru 1:1. Vzhledem ke skutečnosti, že v rámci analýzy každého vzorku proběhly 3 po sobě následující měřicí cykly, byl pozorován zajímavý efekt. V průběhu tohoto krátkého intervalu (konkrétně se jednalo o vzorek AgNP S29), velikost částic postupně rostla. To je patrné z výsledků v Tab. 13, kde je uvedeno, že během jednoho měření (tj. 3 měřicí cykly, cca 10 min), byl pozorován růst velikosti částic. Z tohoto důvodu bylo chování vzorku AgNP S29 ve všech jmenovaných médiích studováno v delším časovém intervalu.

Tab. 13. Velikost částic vzorku AgNP S29 ve studovaných fyziologických tekutinách.

Podmínky měření/ředění	z-průměr [nm]	PDI
AgNP:H ₂ O (1:1)	46,3	0,54
	46,6	0,53
	48,5	0,53
AgNP:PBS (1:1)	121,7	0,36
	160,4	0,25
	201,8	0,25
AgNP:DMEM bez séra (1:1)	176,4	0,34
	224,5	0,32
	264,5	0,34
AgNP:DMEM se sérem (1:1)	144,1	0,45
	148,9	0,46
	152,6	0,48

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

10.4.1 PBS

Nejprve byla provedena studie chování nanočástic stříbra u AgNP29 v PBS. Jak je vidět z Tab. 14, po zředění vzorku koloidního stříbra PBS v poměru 1:1 hodnota z-průměru velikosti částic postupně rostla. Zatímco ihned po smíchání byl naměřen z-průměr $108,7 \pm 29,7$ nm, po ukončení testu, tedy po 180 minutách vzrostla jeho hodnota na $859,3 \pm 34,6$ nm. To svědčí o časově závislé aglomeraci AgNP v důsledku přítomných solí.

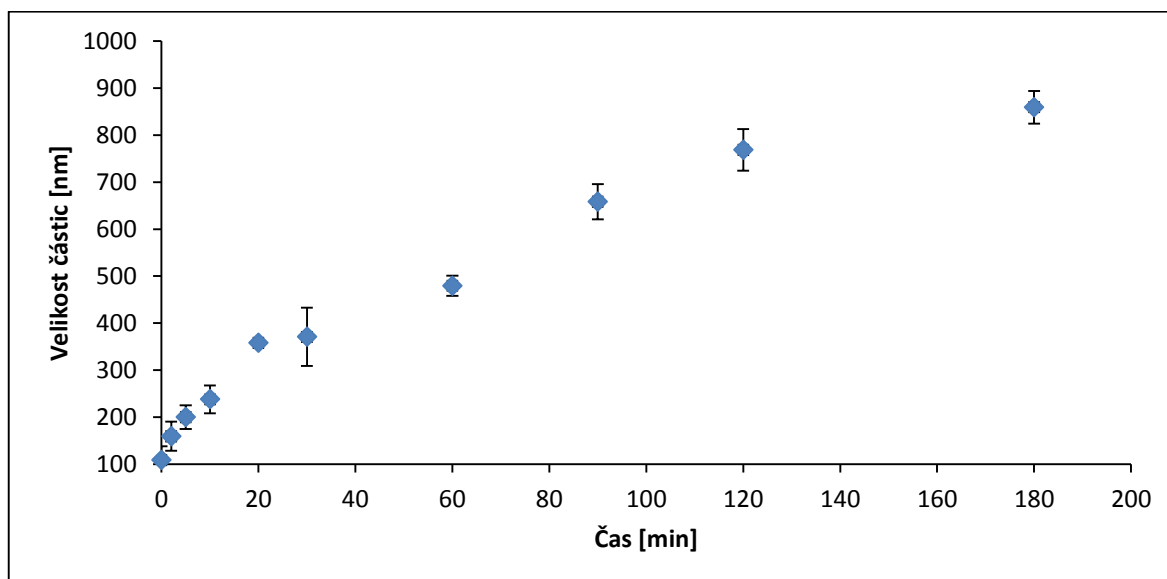
Tématem chování nanočástic v roztocích solí se zabývali Opršal a kol., kteří studovali aglomeraci stříbrných nanočástic v souvislosti s ekotoxicitou na vodních organismech [78, s. 386–388]. Ve své práci použili Médium 203, připravené podle směrnice OECD 203, které obsahovalo 2 mM CaCl₂, 0,5 mM MgSO₄, 0,77 mM NaHCO₃ a 0,075 mM KCl. Změny velikosti částic nanostříbra v Médium 203 byly sledovány pro dvě různé koncentrace AgNP (10 a 100 μM). Měřením velikosti částic autoři zjistili, že původní velikost nanočástic stříbra se pohybovala v blízkosti hodnoty 40 nm. U obou zkoumaných koncentrací AgNP docházelo k aglomeraci a velikost částic se zvětšovala. Dále bylo zjištěno, že proces aglomerace probíhal rychleji u koloidních roztoků s vyšší koncentrací stříbrných částic. I u méně koncentrovaného roztoku však došlo k překročení hranice 100 nm a autoři předpokládají, že většina přítomného Ag tak ztratila vlastnosti nanomateriálu.

Další práce, která se rovněž věnuje chování AgNP v environmentálně relevantních podmínkách je publikace Cumberland a kol., [79, s. 9099], která popisuje vztah mezi iontovou silou živného média, přítomností huminových kyselin, mocenstvím solvatujících iontů a rychlostí aglomerace. Obecně však této problematice nebyla v literatuře věnována velká pozornost.

Tab. 14. Velikost částic AgNP S29 v PBS v průběhu 180 min.

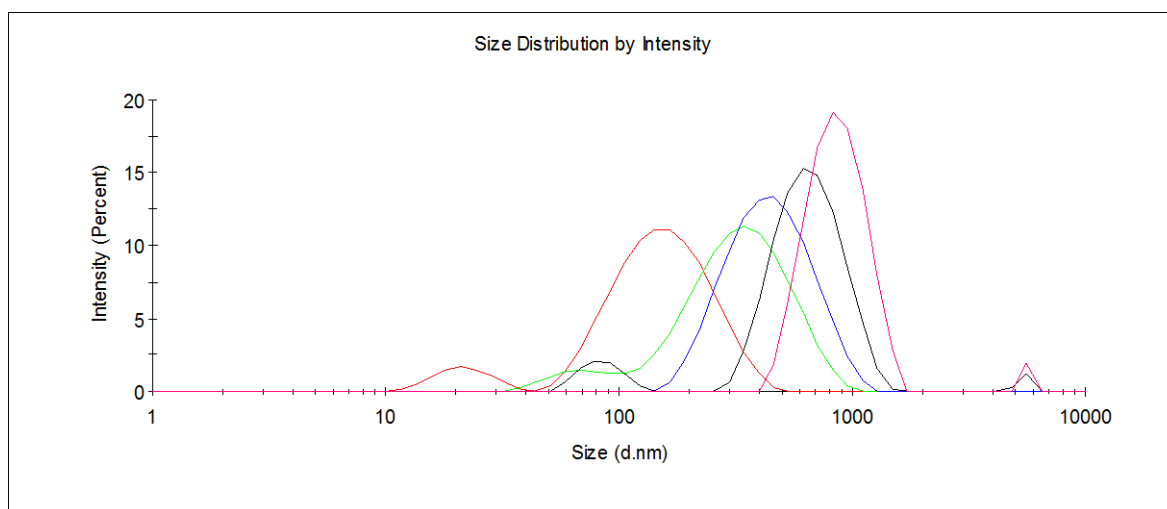
Čas od smíchání [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	108,7	29,7	0,41	0,03
2	159,4	31,1	0,41	0,03
5	200,1	25,2	0,45	0,03
10	238,0	29,5	0,40	0,06
20	358,1	5,1	0,33	0,03
30	370,8	62,0	0,38	0,04
60	479,5	21,5	0,49	0,08
90	658,2	37,6	0,60	0,05
120	768,6	44,2	0,59	0,13
180	859,3	34,6	0,62	0,08

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 10. Závislost velikosti částic AgNP S29 v PBS na čase.

Změna ve velikosti částic a jejich distribuci je ilustrována i na Obr. 11, kde jsou uvedeny distribuční křivky pro AgNP S29 v PBS v časech 0 min, 5 min, 20 min, 60 min a 180 min od smíchání AgNP s tímto médiem. Z obrázku je vidět, že velikost částic s prodlužujícím se časem neustále roste a křivky se posouvají k větším velikostem částic. Je také zajímavé, že populace menších částic, viditelná v kratších časech po smíchání AgNP s PBS, postupně mizí a naopak se objevuje populace větších částic s velikostí za hranicí detekčního limitu použitého přístroje.



Obr. 11. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v PBS v čase (červená – 0 min, zelená – 5 min, modrá – 20 min, černá – 60 min, růžová – 180 min).

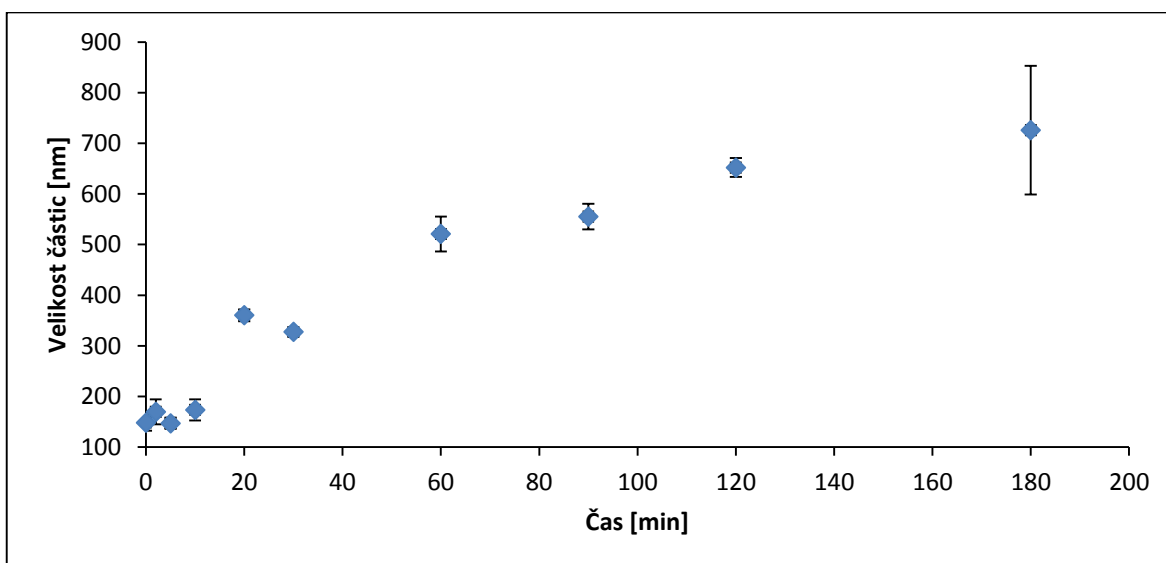
10.4.2 DMEM bez séra

V další části studie bylo zkoumáno chování částic vzorku AgNP S29 v médiu DMEM bez séra s ATB. Opět bylo použito ředění vzorku s médiem v poměru 1:1. Stejně jako při měření v PBS byl i v tomto případě zaznamenán růst velikosti částic v čase. V porovnání s PBS byl ale tento nárůst o něco pozvolnější, po 180 minutách od smíchání obou komponent byla zjištěna průměrná velikost částic $726,1 \pm 127,0$ nm (Tab. 15, Obr. 12). Kromě z-průměru velikosti částic se i v tomto případě mění tvar distribučních křivek. Křivky se posouvají směrem k větším velikostem a původně monomodální distribuce částic zaznamenaná u čerstvého vzorku se během testu mění na bimodální. Je patrný rovněž nárůst množství největších částic v mikronové oblasti, které jsou však detekovány jen částečně, protože leží na hranici detekčního limitu přístroje (Obr. 13).

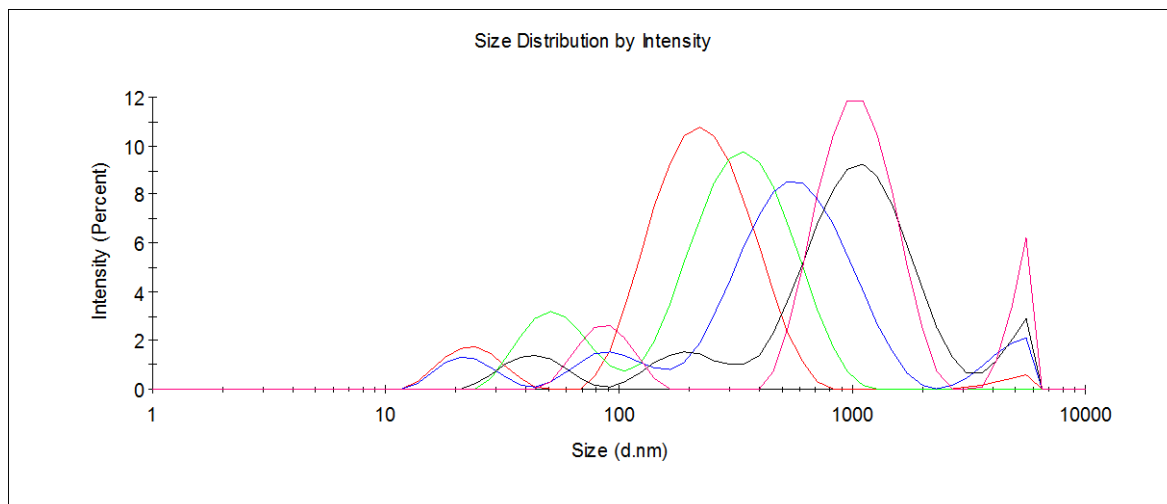
Tab. 15. Velikost částic AgNP S29 v DMEM bez séra v průběhu 180 min.

Čas od smíchání [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	148,5	16,2	0,51	0,04
2	169,7	24,8	0,52	0,06
5	147,2	11,0	0,58	0,02
10	173,8	20,9	0,55	0,01
20	360,5	11,8	0,62	0,10
30	327,5	8,8	0,63	0,08
60	520,9	34,3	0,83	0,15
90	555,3	25,3	0,90	0,08
120	652,1	18,7	0,95	0,04
180	726,1	127,0	0,85	0,04

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 12. Závislost velikosti částic AgNP S29 v DMEM bez séra na čase.



Obr. 13. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v DMEM bez séra v čase (červená – 0 min, zelená – 5 min, modrá – 20 min, černá – 60 min, růžová – 120 min).

Proces aglomerace, zaznamenaný u disperzí AgNP zředěných v PBS a DMEM, který vede k růstu velikosti částic, je vyvolán zvýšením iontové síly v disperzi. Tuto formu nestability disperze lze vysvětlit pomocí teorie DLVO (Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek) [80, s. 525–526]. Ta je založena na předpokladu, že pro zachování stability je nutná mírná převaha odpudivých elektrických sil nad silami přitažlivými. U disperzí nanočástic by tedy měla nastat rovnováha mezi přitažlivými Van der Walsovými silami a odpudivými elektrickými silami. Aglomeraci AgNP je tedy možno vysvětlit tím, že růst iontové síly potlačuje odpudivé síly a tím se snižuje tloušťka difúzní vrstvy okolo každé z částic. V důsledku toho se mohou částice přiblížit dostatečně blízko a začít agregovat.

10.4.3 DMEM s 10% telecím sérem

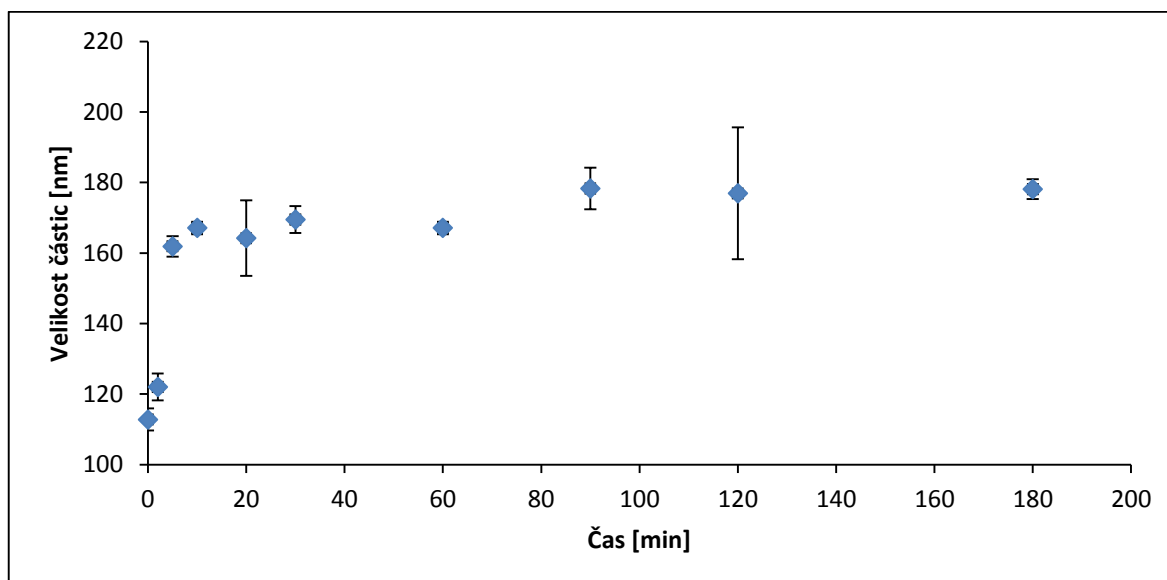
Posledním studovaným případem bylo chování částic vzorku AgNP S29 v médiu DMEM s 10% telecím sérem. Postup testu byl stejný jako v předchozích dvou případech, získané výsledky však byly odlišné. Největší nárůst velikosti částic byl pozorován po 5 minutách od smíchání AgNP s DMEM obsahujícím sérum, kdy byl zjištěn z-průměr $169,1 \pm 2,9$ nm. Od této doby se již velikost nanočástic příliš neměnila a po 180 minutách byla naměřena velikost částic $178,1 \pm 2,8$ nm (Tab. 16, Obr. 14). Důvodem této skutečnosti je zřejmě přítomnost séra v DMEM. Zatímco v přítomnosti DMEM složeného z aminokyselin, glukózy jako zdroje energie, vitaminů a solí je chování stříbrných nanočástic podobné jako v PBS, přítomnost séra/proteinu má stabilizující efekt a růst částic není tak markantní. Z TEM (část 10.6 práce)

je zřejmé, že se v tomto případě mohou tvořit komplexy AgNP s proteiny, což vede k lepší odolnosti nanočástic vůči aglomeraci.

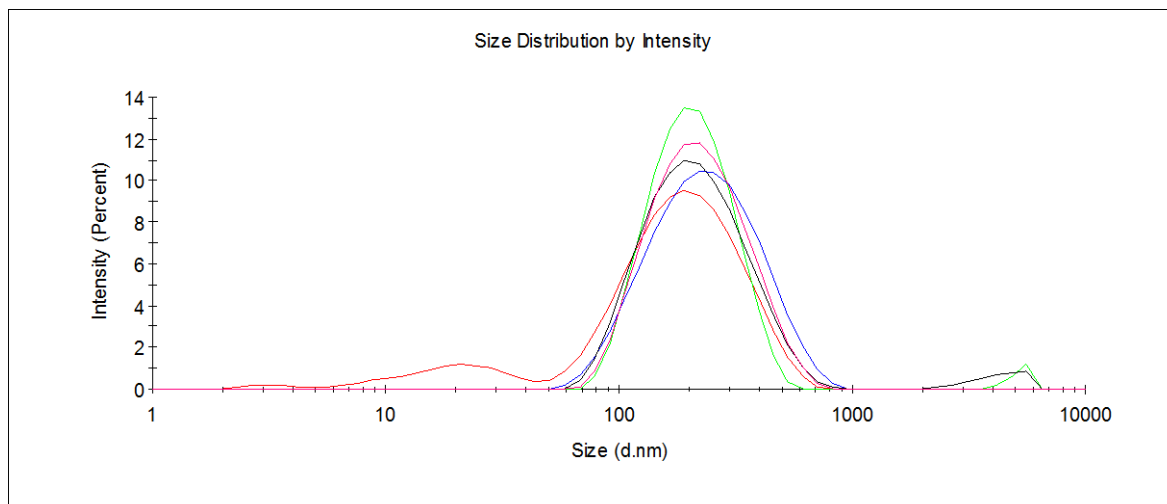
Tab. 16. Velikost částic AgNP S29 v DMEM se sérem v průběhu 180 min.

Čas od smíchání [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	112,8	3,1	0,53	0,01
2	122,0	3,8	0,54	0,03
5	161,9	2,9	0,40	0,03
10	167,1	1,8	0,40	0,01
20	164,2	10,7	0,36	0,08
30	169,5	3,8	0,37	0,03
60	167,1	1,8	0,35	0,05
90	178,3	5,9	0,34	0,04
120	176,9	18,7	0,35	0,06
180	178,1	2,8	0,37	0,02

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 14. Závislost velikosti částic AgNP S29 v DMEM se sérem na čase.



Obr. 15. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v DMEM se sérem v čase (červená – 0 min, modrá – 5 min, zelená – 20 min, černá – 60 min, růžová – 120 min).

10.5 Chování AgNP v simulovaných gastrických tekutinách

Kromě chování nanočástic stříbra ve fyziologických tekutinách byly vzorky AgNP zkoumány také v simulovaných gastrických tekutinách (SGF). Celkem bylo připraveno 6 vzorků a obdobně jako v předchozích studiích, byly sledovány změny velikosti částic po jejich smíchání s jednou ze SGF. Test byl proveden na vzorku AgNP S29, velikost jehož částic byla ověřena bezprostředně před testem, a činila $57,1 \pm 1,7$ nm.

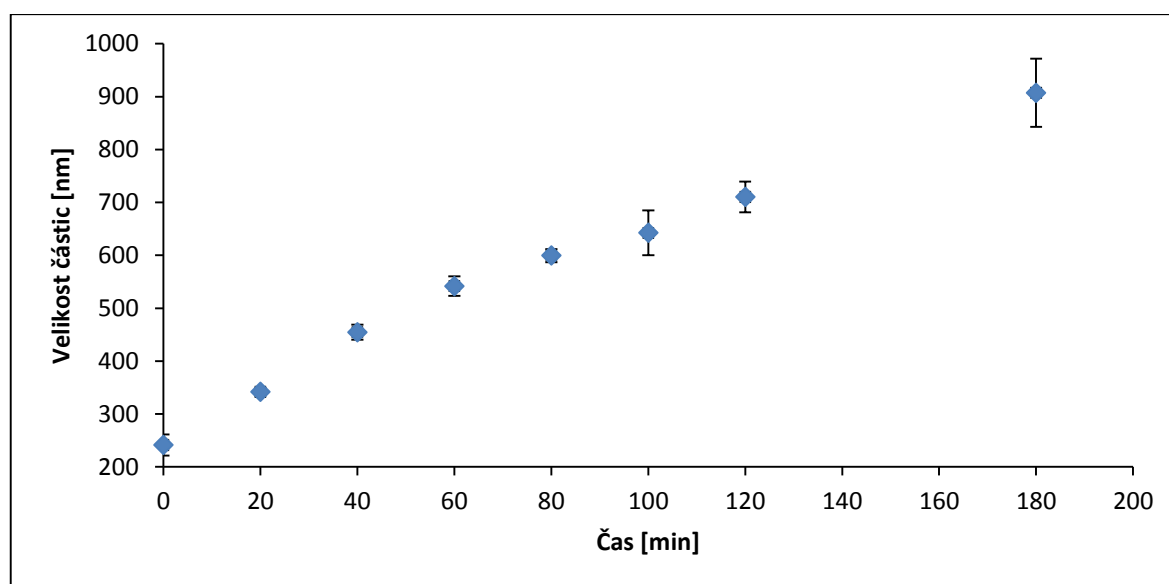
10.5.1 SGF (pH 1,2)

Prvním vzorkem testu byly AgNP v simulované žaludeční tekutině o pH 1,2. Stejně jako u fyziologických tekutin, byl i v tomto případě sledován růst velikosti částic během celé doby stanovení. Z počáteční hodnoty zaznamenané po smíchání SGF s AgNP S29, která činila $241,4 \pm 20,0$ nm, vzrostla po 180 minutách velikost částic až na hodnotu $907,2 \pm 104,0$ nm (Tab. 17, Obr. 16).

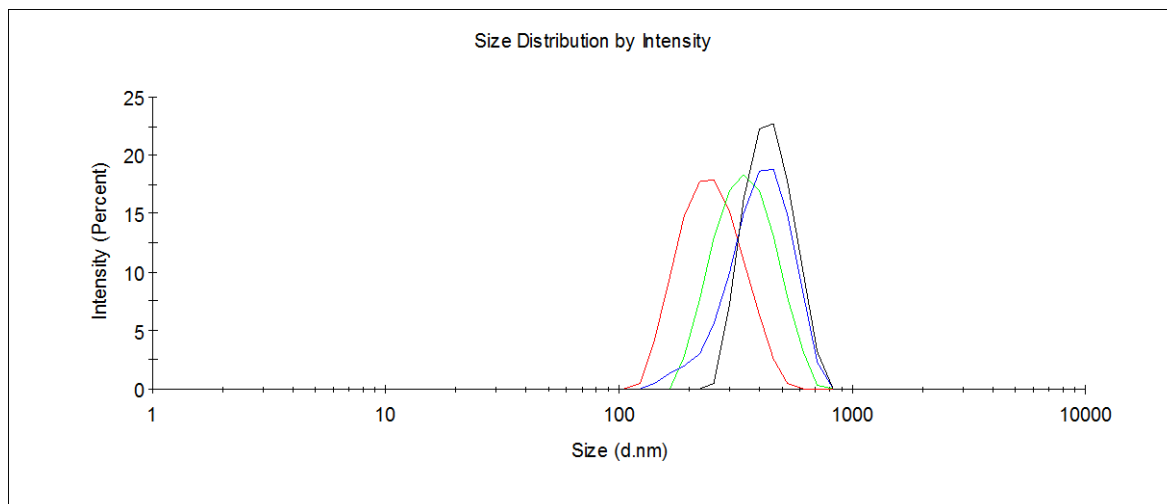
Tab. 17. Velikost částic AgNP S29 v SGF o pH 1,2 v průběhu 180 min.

Čas [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	241,4	20,0	0,19	0,03
20	341,9	7,0	0,28	0,05
40	454,6	14,4	0,40	0,01
60	541,7	18,5	0,48	0,01
80	599,4	12,4	0,52	0,04
100	642,4	42,5	0,59	0,04
120	710,3	28,8	0,63	0,07
180	907,2	104,0	0,78	0,07

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 16. Změny ve velikosti částic (z-průměr) AgNP S29 v SGF o pH 1,2 v čase.



Obr. 17. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF (pH 1,2) v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).

Studiem chování nanočástic v SGF se zabývá práce, jejímiž autory jsou Jones a kol. Místo AgNP zde byly zkoumány nanočástice TiO_2 , získané výsledky ovšem byly obdobné. Stejně jako v případě AgNP, i u nanočástic TiO_2 byla pozorována jejich aglomerace [81, s. 1–3]. Autoři studovali aglomeraci částic o velikostech 15 nm, 100 nm a částic menších než 5 μm prostřednictvím diskové centrifugy a TEM. Metoda TEM jednoznačně potvrdila aglomeraci částic u všech zkoumaných formulací. Z diskové centrifugy bylo zjištěno, že u všech použitých formulací docházelo k rozšiřování velikostní distribuce. U formulace s nejmenšími částicemi (15 nm) analýza hmotnosti částic ukázala, že dvě třetiny z celkové hmoty jsou tvořeny částicemi o velikosti přibližně 500 nm a zbývající třetinu představují částice o velikosti menší než 50 nm.

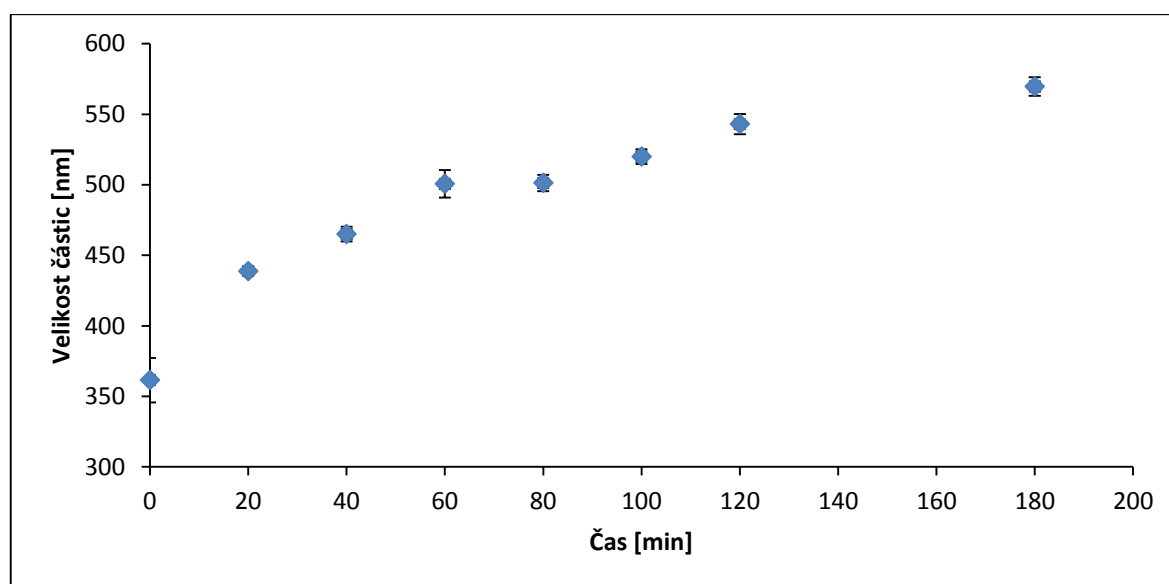
10.5.2 SGF (pH 1,2) s pepsinem

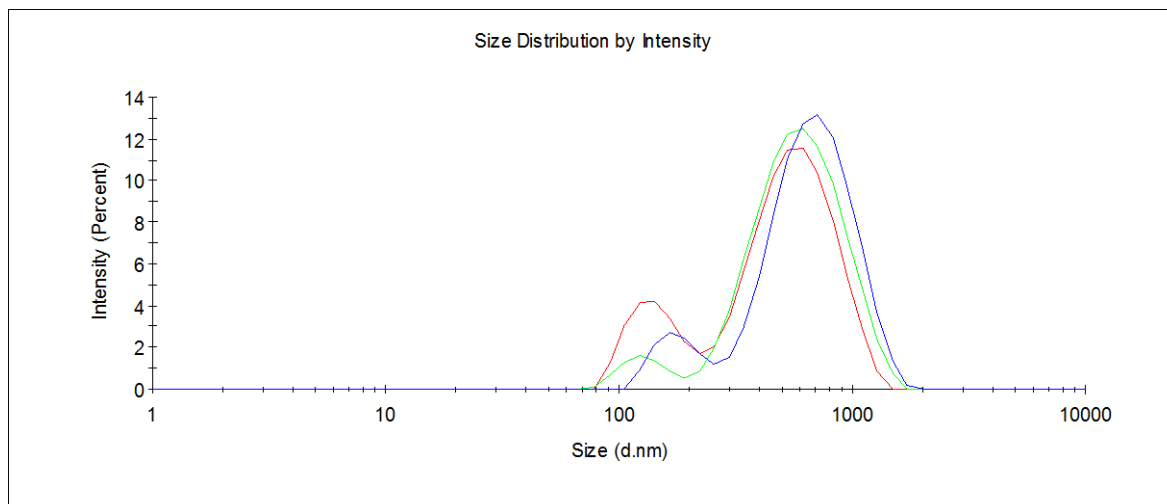
Součástí druhého vzorku byl kromě SGF i trávicí enzym pepsin. Změna složení roztoku, ve kterém byly AgNP dispergovány, měla vliv již na počáteční hodnotu z-průměru velikosti částic. Velikost částic po smíchání byla $361,6 \pm 2,0$ nm. Stejně jako v předchozím případě došlo k aglomeraci částic, ovšem nárůst velikosti byl oproti systému bez pepsinu znatelně pozvolnější. Po 180 minutách dosáhla velikost částic hodnoty $569,6 \pm 6,6$ nm (Tab. 18, Obr. 18).

Tab. 18. Velikost částic AgNP 29 v SGF s pepsinem ($pH = 1,2$) v průběhu 180 min.

Čas [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	361,6	23,0	0,30	0,05
20	438,8	3,1	0,26	0,02
40	465,0	5,2	0,29	0,07
60	500,6	18,1	0,28	0,03
80	501,3	15,4	0,33	0,04
100	512,8	12,9	0,29	0,03
120	543,0	7,2	0,27	0,01
180	569,6	6,6	0,34	0,02

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

Obr. 18. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem ($pH = 1,2$) na čase.



Obr. 19. Časové změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem ($pH = 1,2$), (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 120 min).

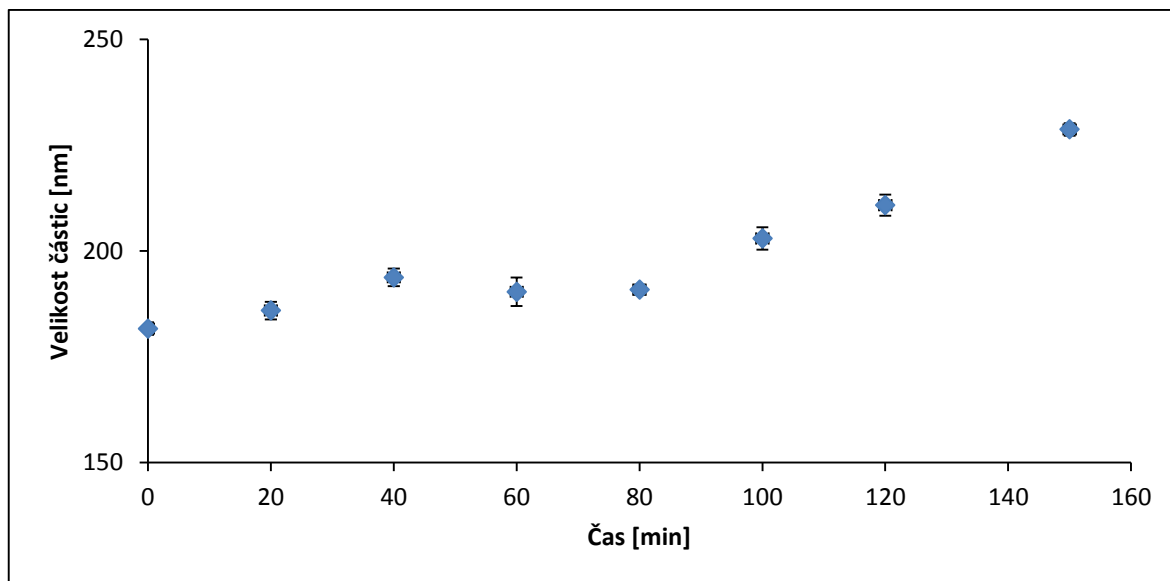
10.5.3 SGF (úprava pH na 6,8)

U třetího vzorku obsahujícího SGF a AgNP S29 bylo pomocí NaHCO_3 upraveno pH na hodnotu 6,8. Tato úprava měla jasný vliv na chování částic. V případě vzorků bez úpravy pH byla hodnota z-průměru velikosti částic ihned po smíchání $241,4 \pm 20,0$ nm. Systém s upraveným pH pak obsahoval AgNP s velikostí $181,7 \pm 1,5$ nm, která během 180 minut vzrostla na $228,7 \pm 1,5$ nm. V porovnání s hodnotami získanými pro AgNP v SGF o pH 1,2 byl tedy nárůst velikosti částic, během sledované doby velmi malý (Tab. 19, Obr. 20).

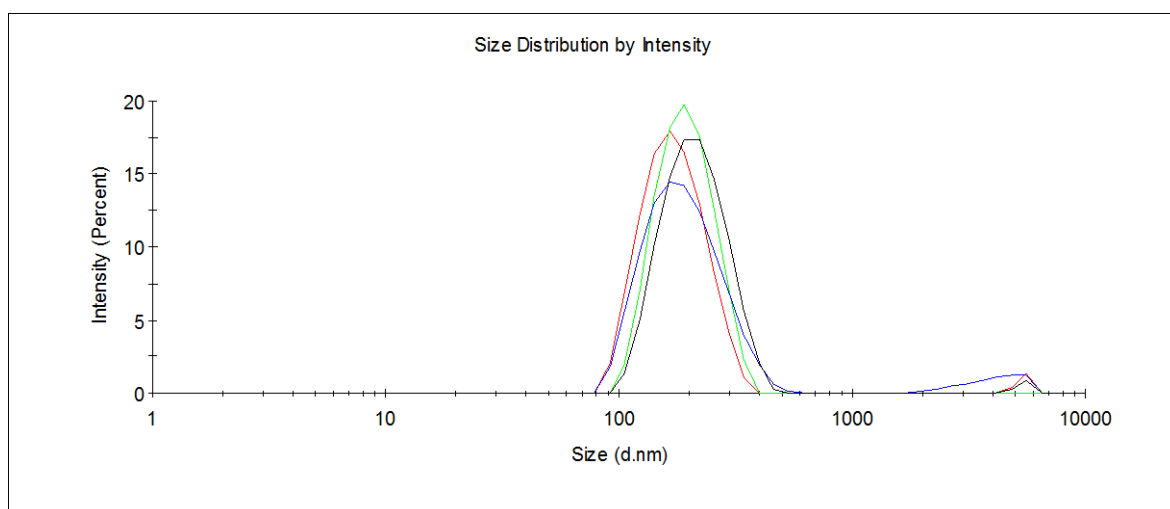
Tab. 19. Velikost částic AgNP S29 v SGF po úpravě na pH 6,8 v průběhu 180 min.

Čas [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	181,7	1,5	0,23	0,02
20	185,9	2,1	0,19	0,02
40	193,8	2,1	0,18	0,02
60	190,4	3,4	0,23	0,03
80	190,9	1,2	0,25	0,02
100	203,0	2,6	0,21	0,02
120	210,8	2,5	0,20	0,01
180	228,7	1,5	0,25	0,02

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 20. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SGF po úpravě na pH 6,8 na čase.



Obr. 21. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF po úpravě na pH 6,8 v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).

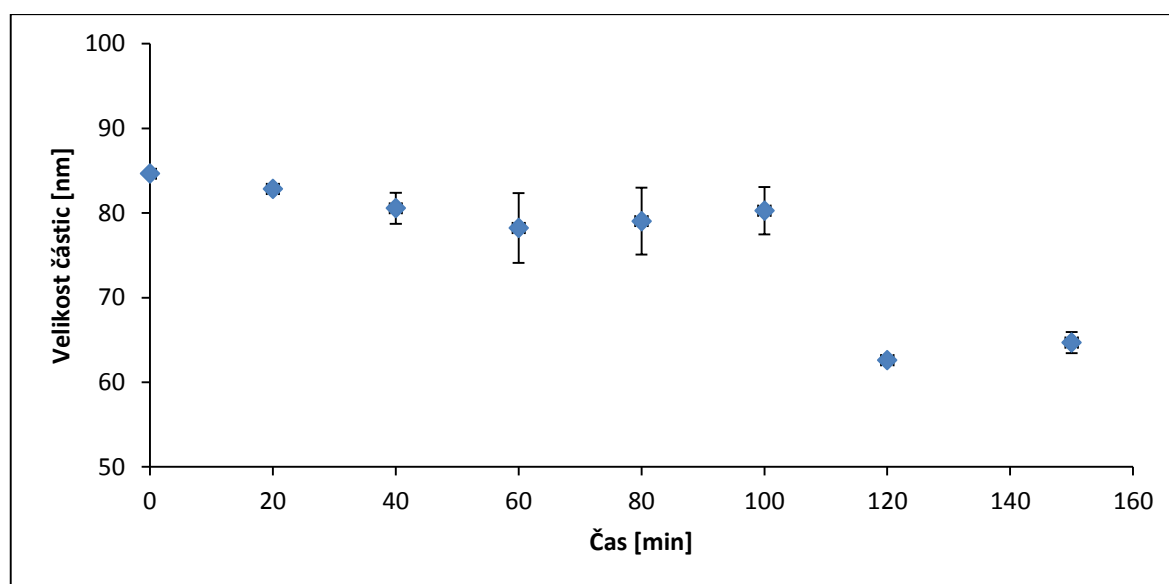
10.5.4 SGF s pepsinem (úprava pH na 6,8)

V pořadí čtvrtým vzorkem byl roztok SGF s pepsinem a AgNP S29, jehož pH bylo pomocí NaHCO_3 rovněž upraveno na hodnotu 6,8. I v tomto případě se úprava pH projevila na velikosti částic. Po sledovaný čas 180 minut se průměrná hodnota velikosti částic pohybovala v rozmezí 63 až 85 nm. V porovnání s ostatními sledovanými systémy se nanočástice v tomto vzorku chovaly odlišně a výrazná aglomerace zde nebyla pozorována. Po 120 minutách se velikost částic dokonce mírně snížila (Tab. 20, Obr. 22).

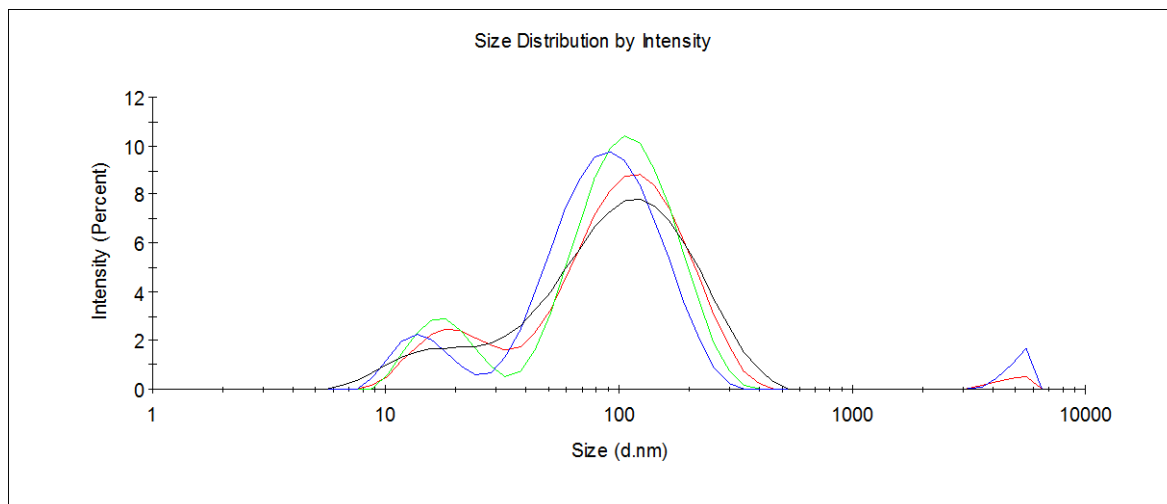
Tab. 20. Velikost částic AgNP 29 v SGF s pepsinem (pH 6,8) v průběhu 180 min.

Čas [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	84,6	0,4	0,22	0,01
20	82,9	9,8	0,39	0,15
40	80,6	9,4	0,21	0,18
60	78,2	7,6	0,23	0,14
80	79,0	8,0	0,23	0,14
100	80,3	8,8	0,23	0,14
120	62,6	0,3	0,49	0,03
180	64,7	1,2	0,46	0,01

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 22. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem (pH 6,8) na čase.



Obr. 23. Změna distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem (pH 6,8) v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).

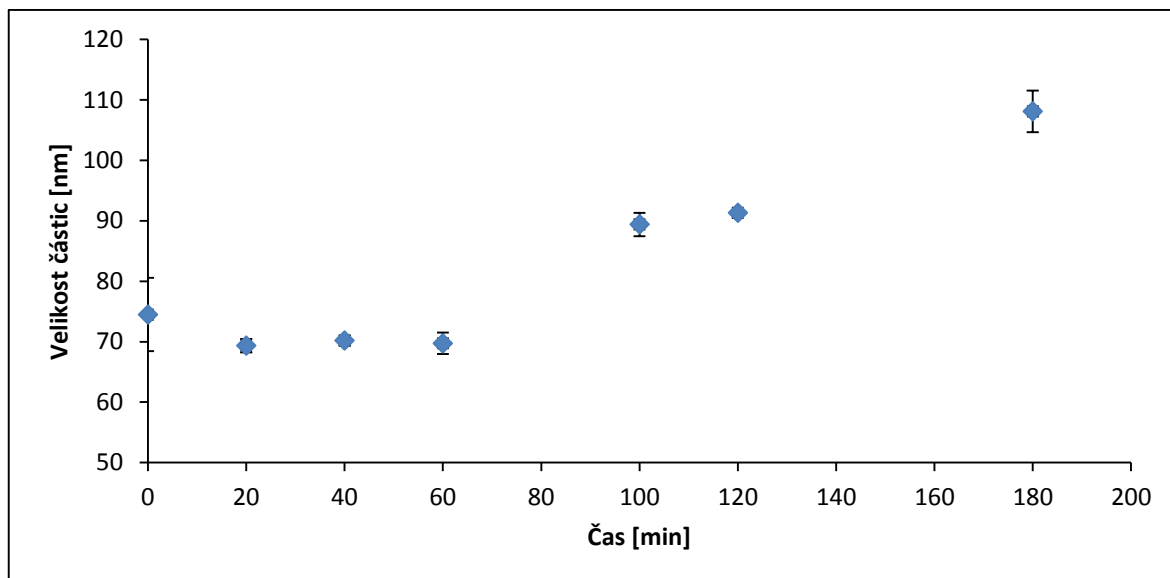
10.5.5 SIF (pH 6,8)

Další studovanou gastrickou tekutinou byla simulovaná střevní tekutina (SIF) s pH 6,8. Rovněž v tomto případě nebyla pozorována aglomerace částic. Během první hodiny měření se průměrná velikost částic stále pohybovala v blízkosti hodnoty 70 nm. Po 120 minutách se velikost částic zvětšila na $91,3 \pm 0,2$ nm a po 180 minutách dosáhla hodnoty $108,1 \pm 3,4$ nm (Tab. 21, Obr. 24).

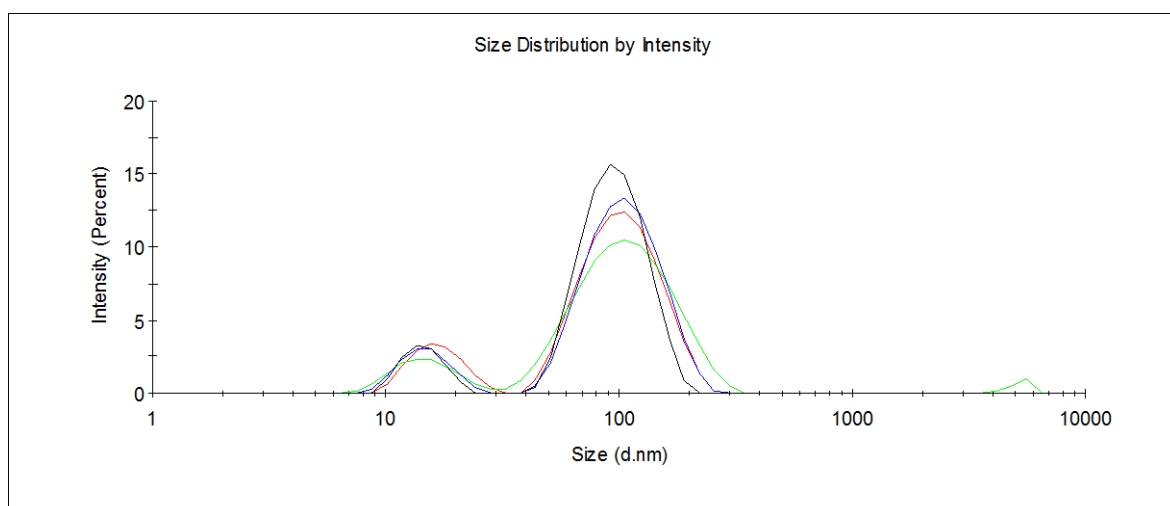
Tab. 21. Velikost částic AgNP S29 v SIF v průběhu 180 min.

Čas [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	74,5	6,1	0,34	0,11
20	69,3	1,1	0,49	0,01
40	70,2	0,8	0,45	0,01
60	69,7	1,8	0,53	0,10
100	89,4	1,9	0,23	0,01
120	91,3	0,2	0,24	0,01
180	108,1	3,4	0,27	0,02

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 24. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SIF (pH 6,8) na čase.



Obr. 25. Změna distribuce velikosti částic AgNP S29 v SIF (pH 6,8) v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).

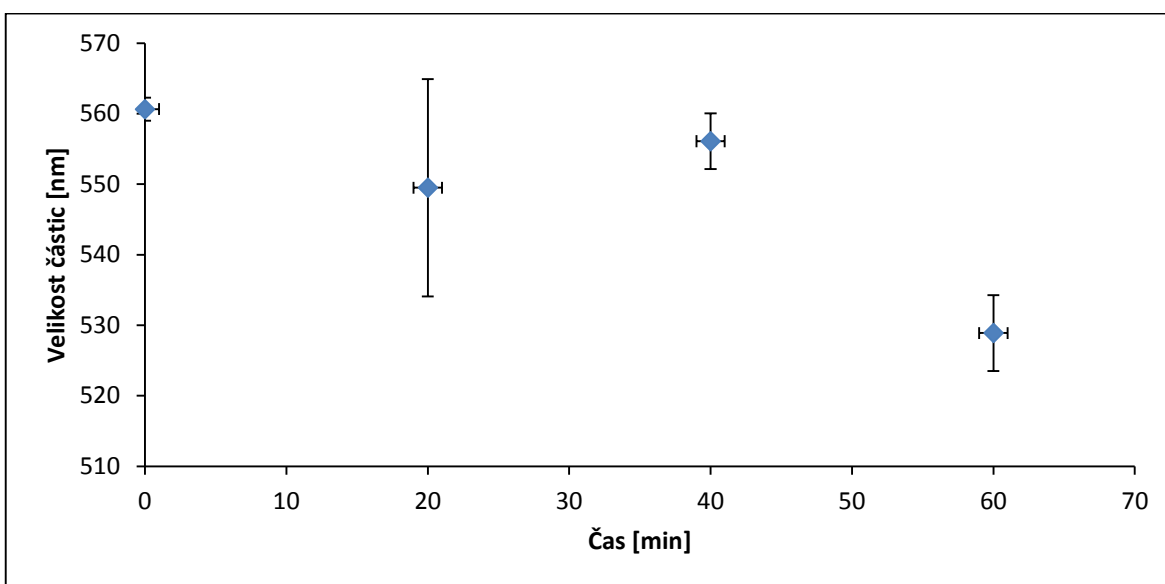
10.5.6 SIF (pH 6,8) s pankreatinem

Posledním studovaným systémem byl roztok SIF s pankreatinem a AgNP S29. Příprava tohoto vzorku byla komplikována skutečností, že přítomný pankreatin nebylo možno úplně rozpustit, což následně ovlivnilo vlastní analýzu. V měřeném roztoku byly viditelné sraženiny, které postupem času sedimentovaly a znemožnily měření. Stanovení bylo proto ukončeno již po 60 minutách. Vzhledem k popsané situaci není tento vzorek vhodný pro charakterizaci pomocí DLS.

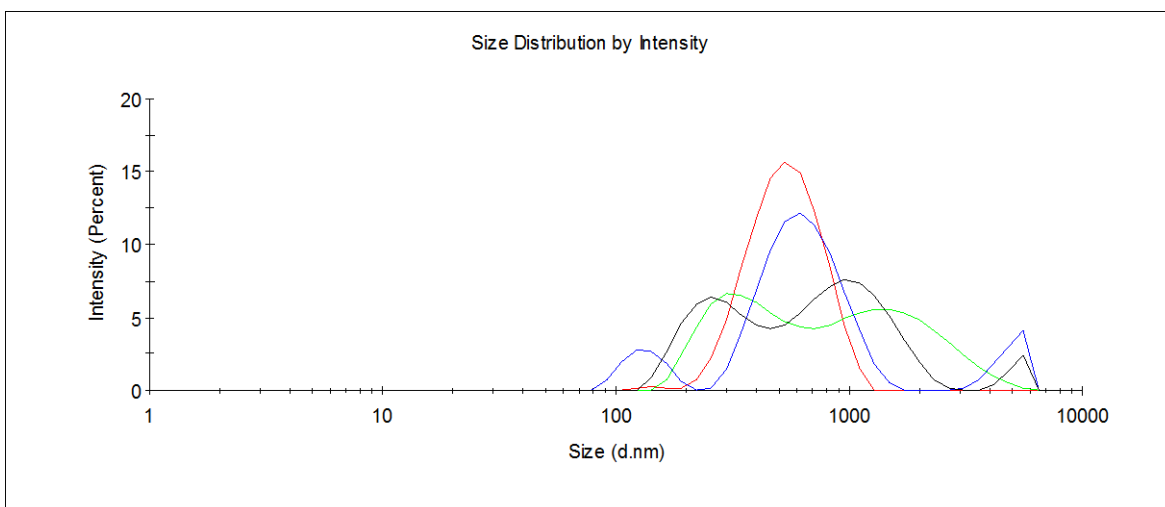
Tab. 22. Velikost částic AgNP 29 v SIF s pankreatinem v průběhu 60 min.

Čas [min]	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
0	560,7	1,6	0,42	0,02
20	549,5	15,4	0,45	0,06
40	556,1	4,0	0,45	0,03
60	528,9	5,4	0,42	0,03

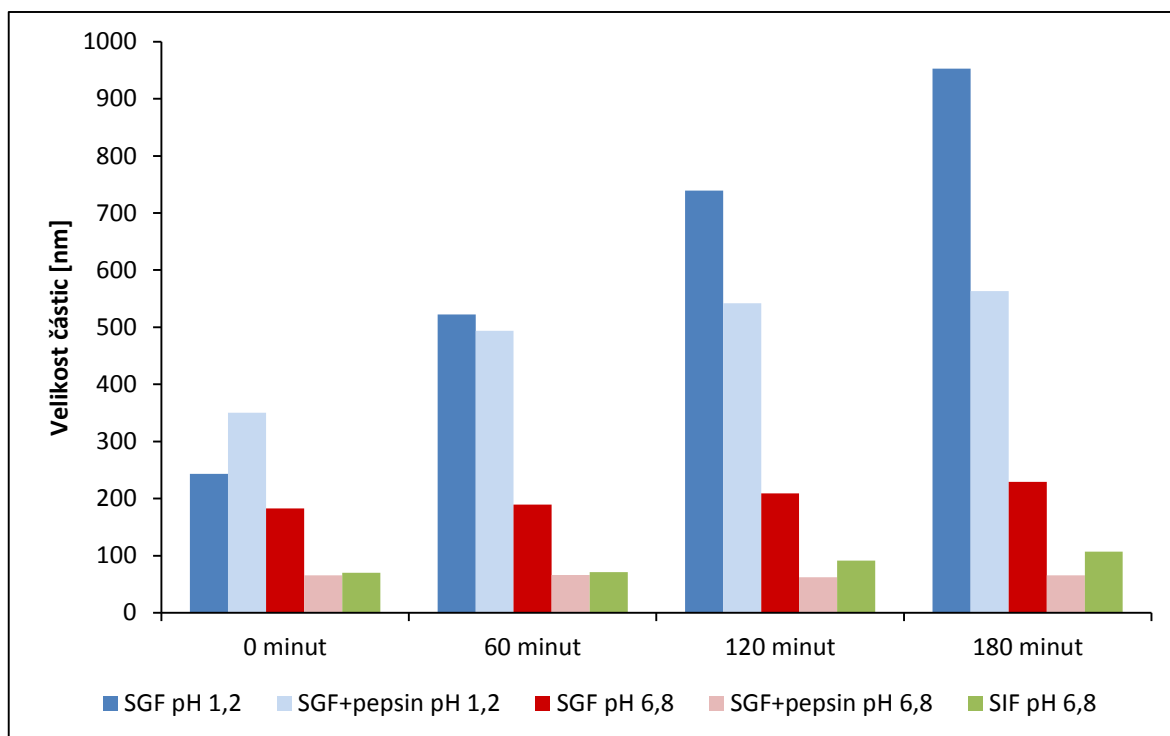
Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 26. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SIF s pankreatinem na čase.



Obr. 27. Distribuce velikosti částic AgNP S29 v SIF s pankreatinem během 60 min (červená – 0 min, zelená – 20 min, modrá – 40 min, černá – 60 min).



Obr. 28. Porovnání velikostí částic AgNP S29 v simulovaných gastrických tekutinách po 180 min.

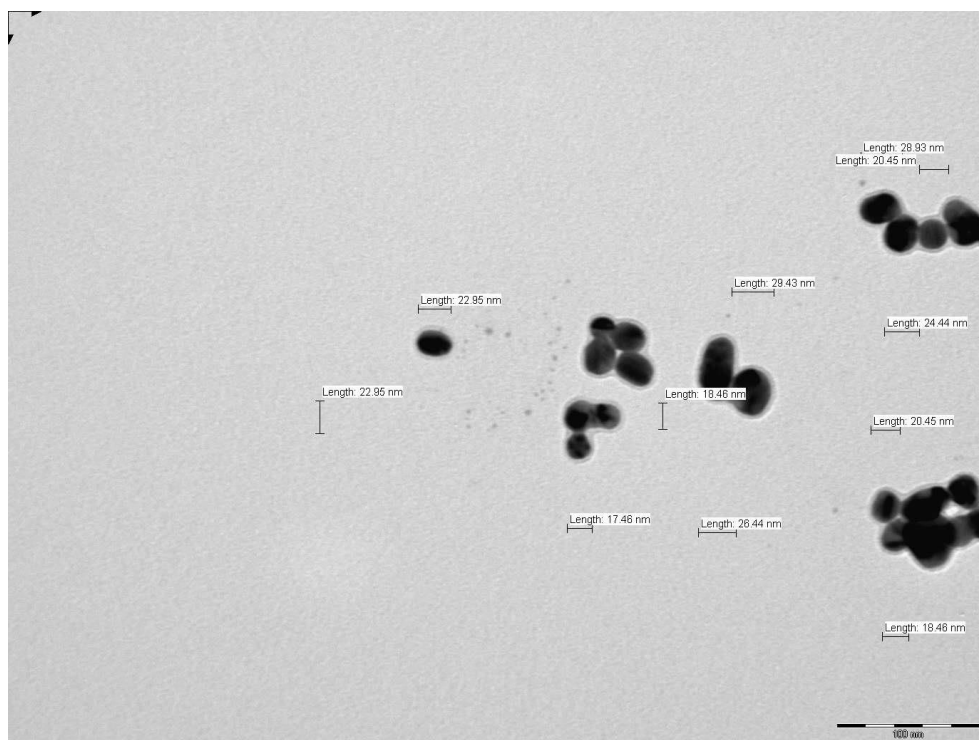
Srovnání velikostí nanočástic stanovených ve studovaných gastrických tekutinách je uvedeno na Obr. 28. Z tohoto souhrnu je možné usuzovat, že chování stříbrných nanočástic a jejich aglomerace jsou významně ovlivněny složením média. Vzorek 1 byl složen z SGF o pH 1,2 a AgNP S29, vzorek 2 navíc obsahoval pepsin. Složení vzorků 3 a 4 bylo obdobné jako vzorků 1 a 2, ale bylo zde upraveno pH pomocí NaHCO_3 na hodnotu 6,8. Vzorek 5 pak obsahoval SIF o pH 6,8 a AgNP S29, a vzorek 6 navíc ještě pankreatin. Jak je vidět z Obr. 28, na chování AgNP S29 v gastrických tekutinách má rozhodující vliv hodnota pH. Zatímco v systémech, kde pH leželo v silně kyselé oblasti ($\text{pH} = 1,2$), se velikost částic během času neustále zvyšovala, úprava pH na hodnotu 6,8 růst velikosti částic značně omezí. Úprava pH směrem do neutrální oblasti má tedy stabilizující účinek, který potlačuje aglomeraci AgNP.

10.6 TEM

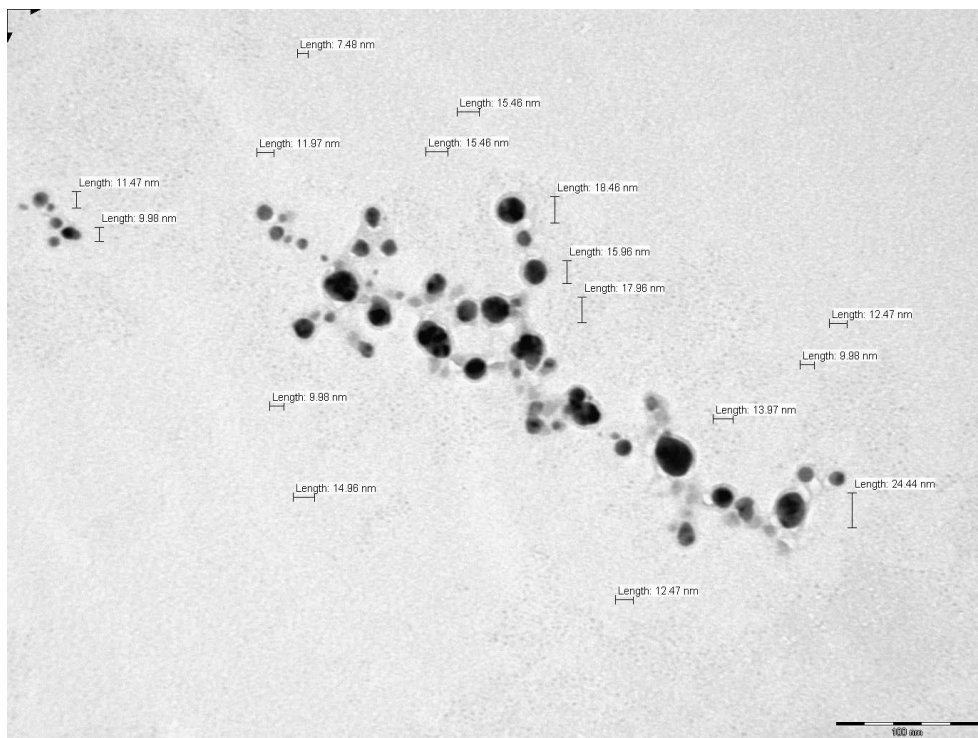
Mikroskopické obrázky z TEM doplňují informace získané měřením rozptylu světla. Snímky vzorků S9, S11 a S29 ukazují individuální AgNP s velikostí v nano oblasti (Obr. 29, 30 a 31). Např. velikost AgNP S29 leží v rozmezí 6,5 až 23,0 nm. Na obrázcích není viditelná

přítomnost větších částic, či aglomerátů. Pokud je však vzorek nanočástic S29 smíchán s PBS, je na Obr. 32, v souladu s výsledky z rozptylových měření, patrná jejich aglomerace. Podobné je i chování AgNP po smíchání s DMEM, i zde jsou viditelné aglomeráty s velikostí nad 270 nm (Obr. 33). Na Obr. 34, tedy AgNP S29 v sérum, lze pak pozorovat tvorbu komplexů AgNP s proteinem.

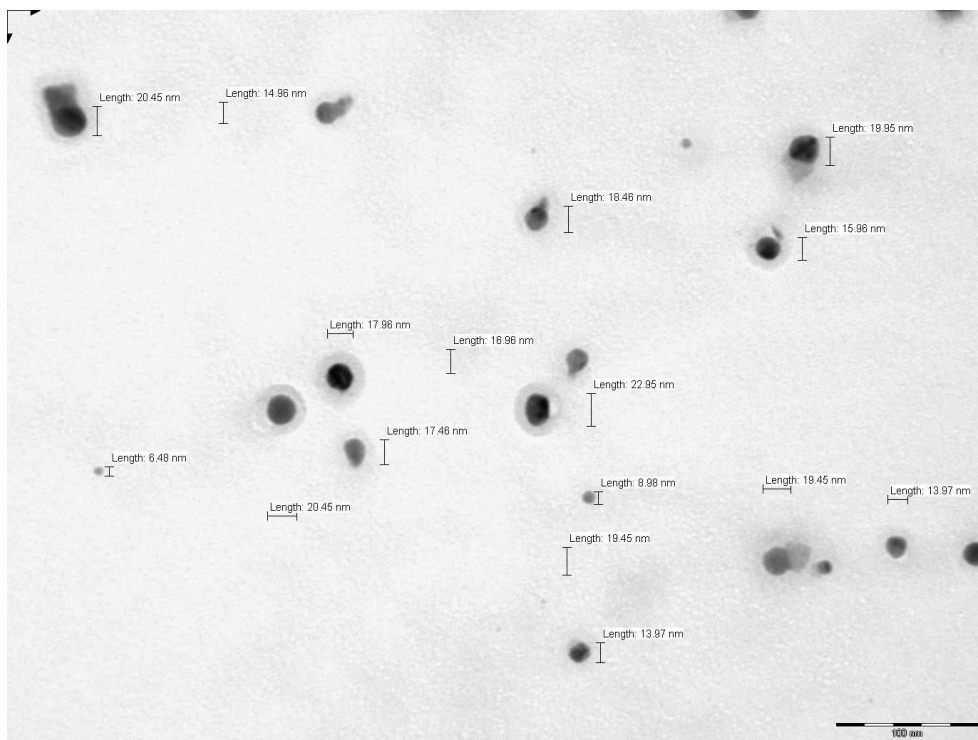
I když rozptyl světla a mikroskopie poskytují velikosti částic, které nejsou úplně shodné, je zřejmé, že obě metody informují o změnách ve vzorcích obdobným způsobem. Výsledky rovněž ukazují, že velikosti částic měřené DLS jsou ve srovnání s výsledky získanými TEM větší. Vyplývá to z teoretického základu metody rozptylu, která měří z-střední průměr vážený přes intenzitu světla rozptýleného částicemi. V souladu s tím jsou distribuce velikostí stanovené DLS distribucemi intenzity. Vzhledem k tomu, intenzita rozptýleného světla je úměrná šesté mocnině průměru částic (D^6), tato technika nadhodnocuje větší částice přítomné ve vzorku v poměru k částicím malým.



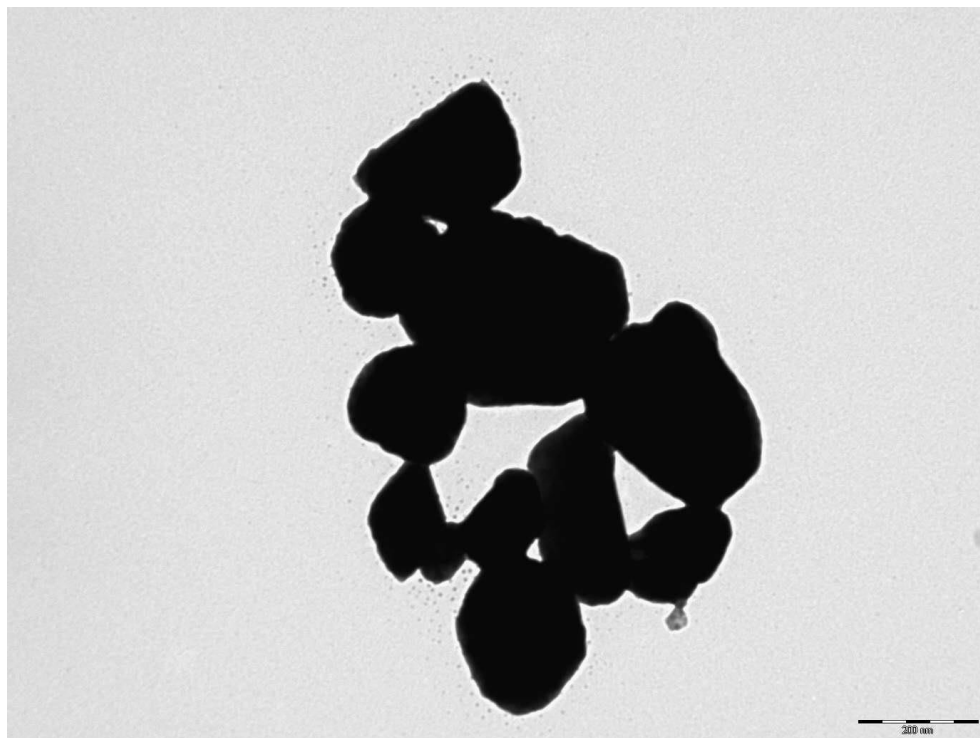
Obr. 29. TEM snímek vzorku AgNP S9.



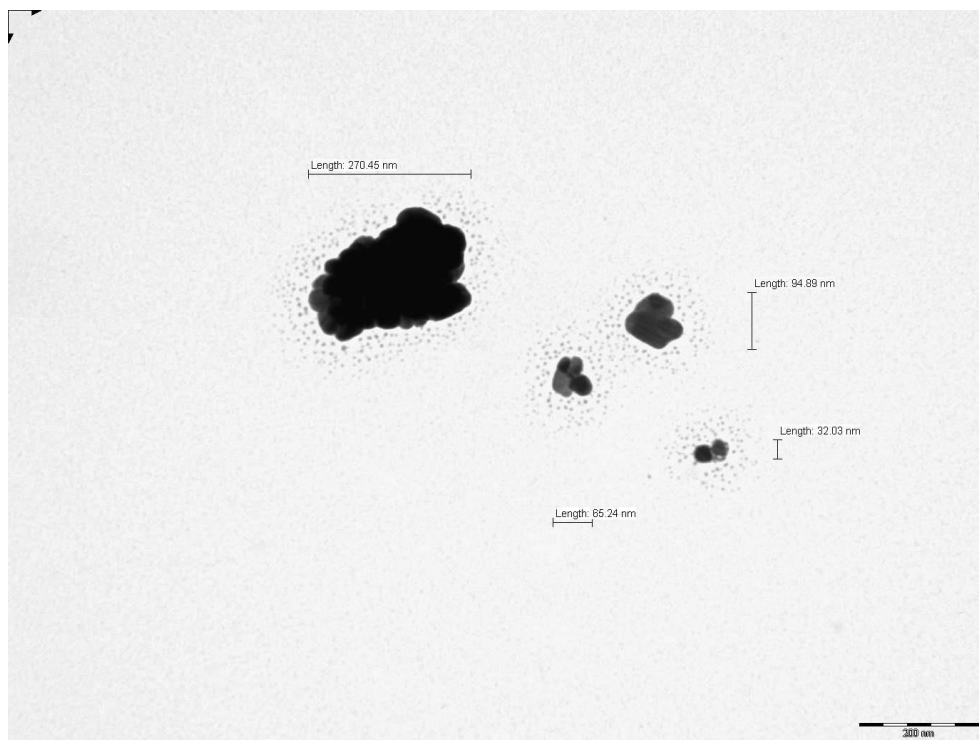
Obr. 30. TEM snímek vzorku AgNP S11.



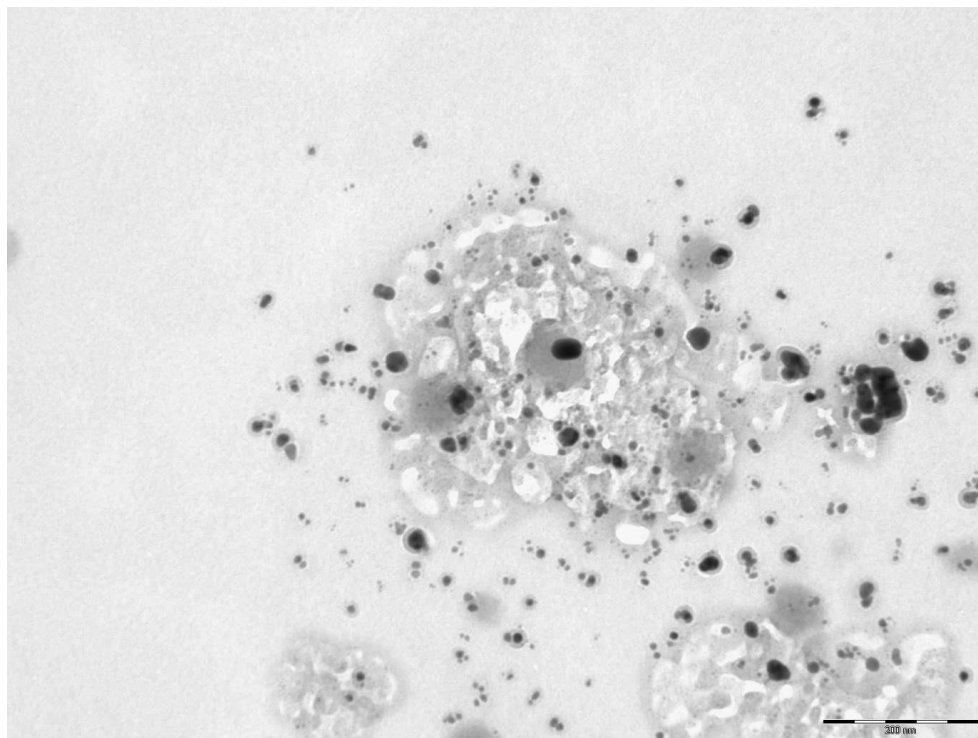
Obr. 31. TEM snímek vzorku AgNP S29.



Obr. 32. TEM snímek vzorku AgNP S29 v PBS.



Obr. 33. TEM snímek vzorku AgNP S29 v DMEM.



Obr. 34. TEM snímek vzorku AgNP S29 v DMEM se sérem.

10.7 Stanovení velikosti částic ve vzorcích obsahujících TiO₂

Kosmetické přípravky jsou komplexní systémy, které kromě aktivní složky (např. nanočástic) obsahují i další přísady, jako jsou látky lipoidní povahy, polymery či povrchově aktivní látky, které jsou schopny tvořit micely detekovatelné pomocí DLS. Svoji roli hraje i fakt, že kosmetické přípravky jsou obvykle formulovány jako emulze, ať už typu voda v oleji či olej ve vodě. Obě tyto skutečnosti (tvorba micel i emulzní charakter přípravků) komplikují měření velikostí nanočástic v kosmetických přípravcích. Důvodem je skutečnost, že DLS stanoví velikost částic v celém systému (tedy i velikost micel surfaktantů, případně emulzních kapek) a je problematické oddělit signál nanočástic a ostatních složek. Přesto bylo v rámci diplomové práce testováno stanovení velikosti nanočástic v přípravcích emulzního charakteru i stanovení velikosti částic TiO₂, jako často využívané aktivní složky v prostředcích na slunění.

Vzorky zahrnuté v Tab. 23 byly připraveny pro použití jak v hydrofilních tak i v hydrofobních přípravcích. V závislosti na jejich charakteru byla tedy stanovována velikost částic TiO₂ po dispergaci buď ve vodě anebo v toluenu.

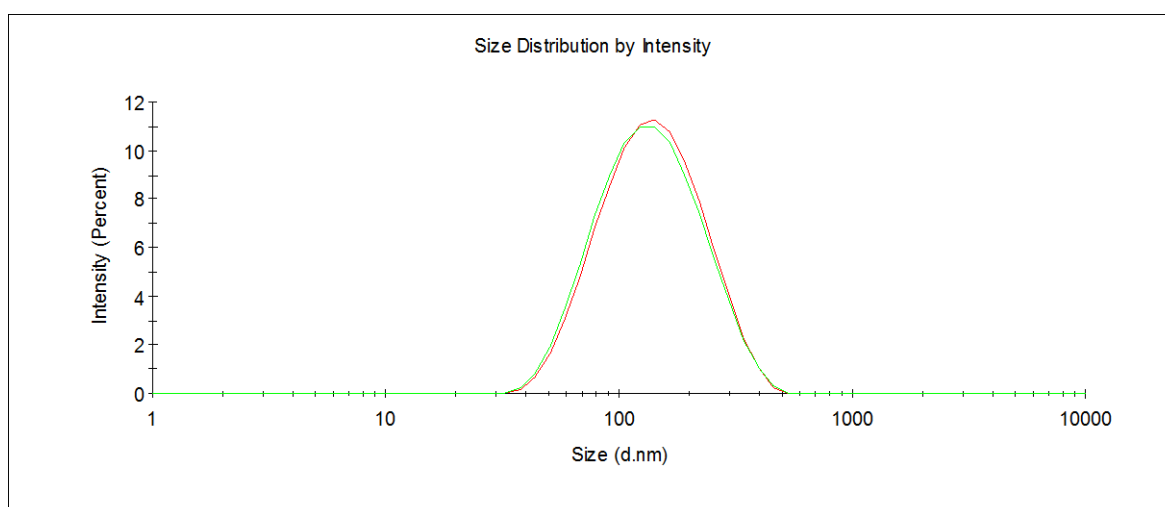
Stanovení velikosti částic TiO₂ ve vzorcích je podstatné z hlediska znalosti, zda se výrobce musí řídit vybranými částmi Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009

o kosmetických přípravcích, které stanovují požadavky na přípravky s obsahem nanomateriálů. V souladu s tímto Nařízením se rozměry nanomateriálu pohybují v rozmezí 1–100 nm. Podle definice (2011/696/EU) pak 50 % nebo více částic materiálu musí mít jeden nebo více vnějších rozměrů ve velikostním rozmezí 1 až 100 nm. Do této kategorie tedy podle získaných výsledků spadá pouze vzorek Sol TiO₂ (Obr. 35, 36, a 37). Při jeho využívání v kosmetice se tedy musí výrobce řídit podmínkami výše zmíněného nařízení a pro přípravek zpracovat potřebnou dokumentaci.

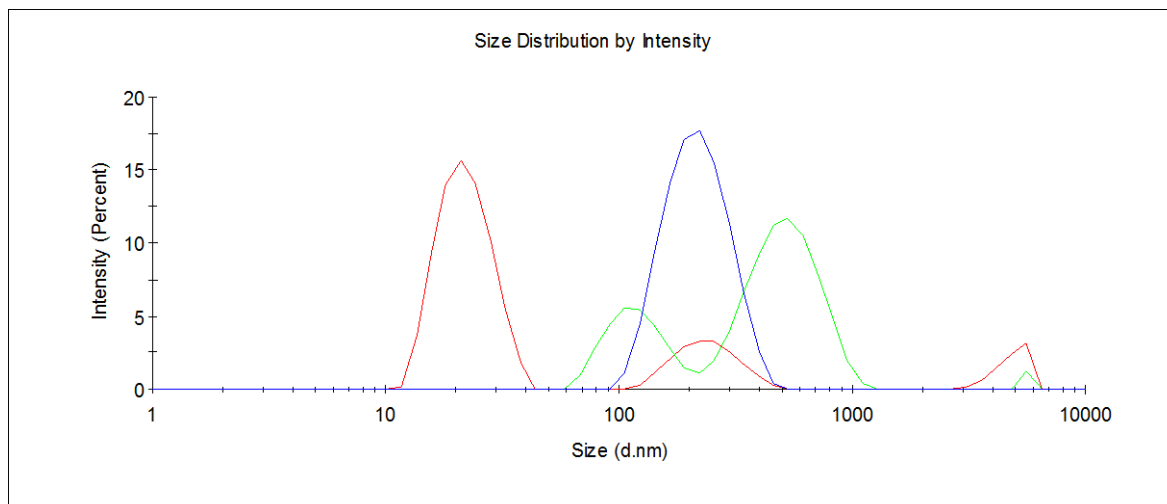
Tab. 23. Velikost částic v dalších vzorcích s obsahem TiO₂.

Vzorek TiO ₂	Disperzní médium	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
Solaveil CT-10W	voda	123,5	1,8	0,21	0,02
Solaveil CT-200	toluen	119,8	1,3	0,21	0,01
Soltex TiO ₂ /H ₂ O	voda	231,3	2,5	0,24	0,02
Soltex TiO ₂ 1143/256	toluen	341,8	0,1	0,60	0,10
Sol TiO ₂ 180311/2	voda	31,8	–	0,41	–
Rutil IPM 1149/39	toluen	135,9	0,9	0,16	0,01
Rutil H ₂ O 1149/90	voda	237,9	2,1	0,10	0,04
Nanorutil+kalc s PU 150311/1	voda	233,5	2,1	0,19	0,05
Disperze 141113/1	voda	153,6	1,5	0,16	0,01

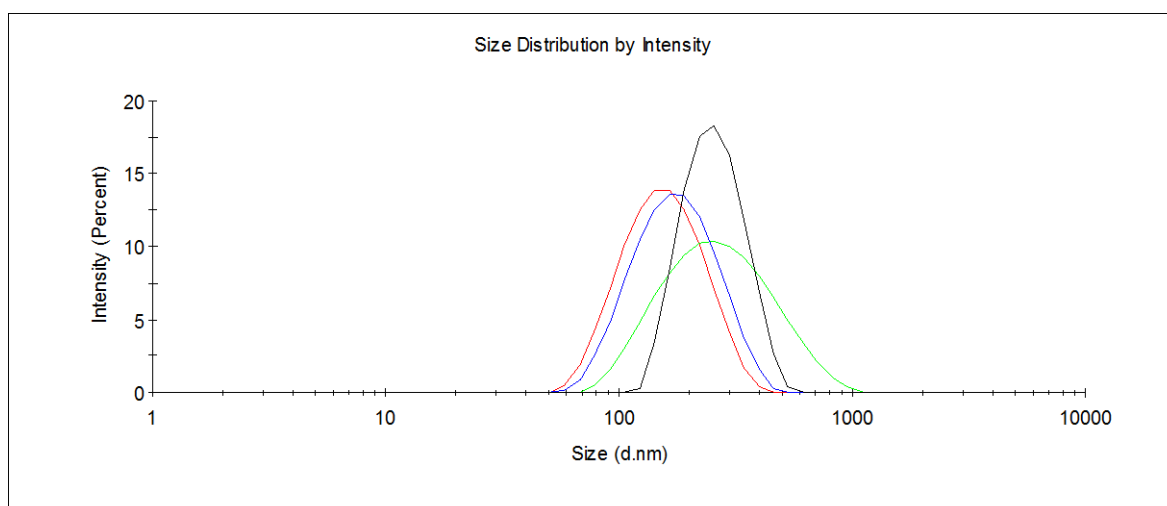
Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 35. Distribuční křivky vzorků TiO₂ Solaveil CT-10W (červená) a Solaveil CT-200 (zelená).



Obr. 36. Distribuční křivky vzorků TiO_2 Soltex TiO_2 180311/2 (modrá), Soltex TiO_2 1143/256 (zelená) a Sol TiO_2 180311/2 (červená).



Obr. 37. Distribuční křivky vzorků TiO_2 Rutil IPM 1149/39 (červená), Rutil H_2O 1149/90 (černá), Nanorutil 150311/1 (zelená) a Disperze 141113/1 (modrá).

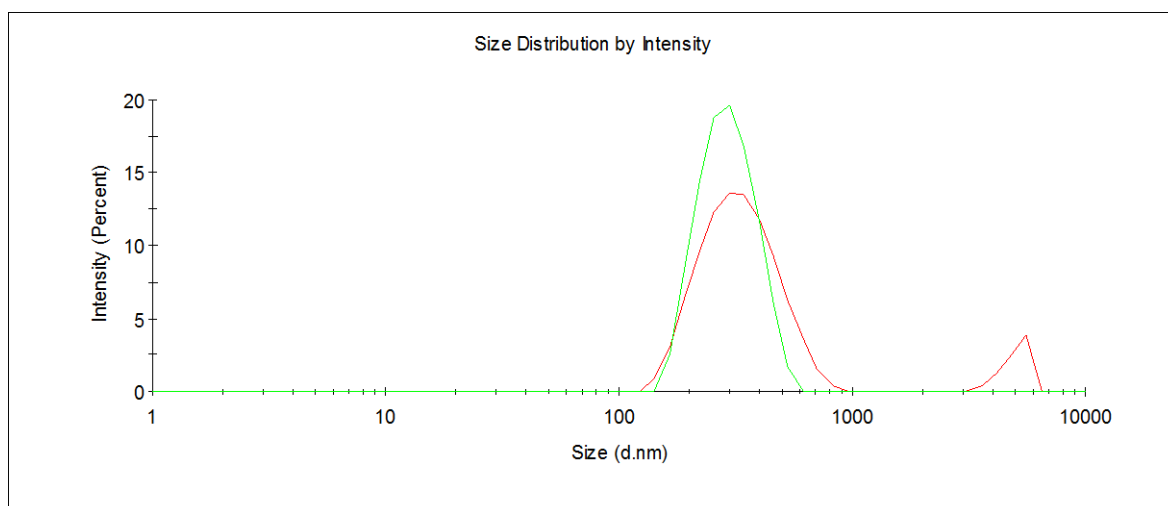
Jedním z dílčích cílů diplomové práce bylo zjistit, zda je možno vysledovat konkrétní šarži TiO_2 ve vzorku opalovacího mléka. Jedná se o mléko na opalování SAHARA š. 22199/22236, do kterého byla zapracovaná šarže TiO_2 Eusolex T-AVO (K2024735). Ve druhém vzorku opalovacího mléka SAHARA š. 140307/22236 byla zapracovaná jiná šarže TiO_2 a zajímavé bylo srovnání obou vzorků. Jak plyne z Tab. 24, konkrétní šarži TiO_2 nelze v daném vzorku jasně identifikovat. Zatímco stanovená velikost částic TiO_2 u Eusolex T-AVO, š. K2024735 byla 307 ± 7 nm, z-průměr velikosti částic u vzorku SAHARA š.

22199/22236 byl 371 ± 3 nm. Je tedy zřejmé, že velikosti částic i distribuce sledovaných vzorků jsou obdobné (Obr. 38).

Tab. 24. Velikost částic ve vzorcích TiO_2 Eusolex a mlék na opalování SAHARA po dispergaci ve vodě.

Vzorek	Šarže TiO_2	z-průměr [nm]	SD [nm]	PDI	SD
TiO_2 Eusolex T-AVO, 124135	–	333	6	0,35	0,03
TiO_2 Eusolex T-AVO, K2024735	–	307	7	0,19	0,03
SAHARA 22199/22236	K2024735	371	3	0,38	0,03
SAHARA 140307/22236	neuvedena	396	7	0,47	0,03

Pozn.: SD – směrodatná odchylka



Obr. 38. Srovnání distribučních křivek vzorku SAHARA š. 22199/22236 (červená) a vzorku Eusolex T-AVO, š. K2024735 (zelená).

10.8 Stanovení zeta potenciálu

Kromě velikosti částic byl u vybraných vzorků AgNP stanoven také zeta potenciál, jehož hodnota vypovídá o stabilitě sledovaných disperzí. V případě, že nanočástice mají velký záporný (nebo i kladný) zeta potenciál, budou se navzájem odpuzovat, což zabrání aglomeraci. Pokud jsou však hodnoty zeta potenciálu nízké, aglomerace nastane. Za hraniční hodnoty zeta potenciálu stabilní/nestabilní disperze se považuje +30 mV nebo -30 mV.

Jak je vidět z Tab. 25, ve všech případech byla hodnota zeta potenciálu -30 mV a nižší. Vzorky nanočástic tedy vykazovaly zeta potenciál, který by měl zaručit jejich koloidní stabilitu. V praxi, však bylo prokázáno (viz část. 10.3), že dlouhodobá stabilita vzorků má svá omezení.

Tab. 25. Výsledky stanovení zeta potenciálu.

Vzorek AgNP	Zeta potenciál [mV]	SD [mV]
S6	-33,4	0,3
S9	-32,1	0,4
S11	-30,2	1,8
S28	-42,3	0,3
S29	-44,2	1,2

Pozn.: SD – směrodatná odchylka

ZÁVĚR

Úkolem diplomové práce bylo stanovit velikost anorganických nanočástic pomocí metody dynamického rozptylu světla s využitím přístroje Zetasizer Nano ZS90. Výsledky získané při vypracovávání diplomové práce lze rozdělit na několik částí.

V první části práce byla stanovena velikost stříbrných nanočástic v závislosti na jejich úpravě před měřením. Po nalezení optimálního postupu přípravy, kterým se ukázala být sonikace, byla charakterizována série komerčních AgNP. Bylo zjištěno, že vzorky o stejném složení se liší co do velikosti i distribuce nanočástic a že velikost částic je ovlivněna i procesem jejich přípravy.

U vybraných vzorků byla také zjišťována jejich dlouhodobá stabilita v čase. V tomto směru byl nejvíce studovaným vzorkem AgNP S29, u kterého analýzy prokázaly jeho stabilitu po dobu jednoho roku. Během tohoto časového intervalu se velikost jeho částic významně neměnila. Po roce skladování pak došlo k růstu velikosti stříbrných částic. Z těchto výsledků lze učinit závěr, že doba expirace by u AgNP neměla překročit jeden rok.

V rámci diplomové práce bylo také provedeno měření velikosti AgNP ve fyziologických tekutinách (PBS, DMEM a DMEM s telecím sérem). Bylo zjištěno, že jak v PBS tak i v DMEM dochází k aglomeraci AgNP, a tím k nárůstu jejich velikosti. V případě zředění AgNP DMEM s obsahem séra k aglomeraci docházelo rovněž, nicméně nebyla tak výrazná jako v předchozích dvou případech. Zdá se, že přítomnost séra má na AgNP stabilizující efekt a dochází k tvorbě komplexu protein-nanočástice. Výsledky získané z DLS pak byly také potvrzeny TEM analýzou.

V další části práce bylo studováno chování stříbrných nanočástic v simulovaných gastrických tekutinách. Bylo zjištěno, že důležitou roli zde hraje hodnota pH simulované gastrické tekutiny. Zatímco při pH 1,2 (vzorek obsahující SGF a SGF s pepsinem) byl pozorován značný růst velikosti AgNP, úpravou pH gastrických tekutin na hodnotu 6,8 byl tento růst znatelně omezen.

Kromě nanočástic stříbra byly pomocí DLS také charakterizovány částice oxidu titaničitého. Tyto nanočástice bývají častou součástí kosmetických přípravků, a proto je jejich velikost důležitá, zejména z pohledu bezpečnosti a splnění legislativních požadavků. Pokud jsou částice menší než 100 nm, vztahují se na ně části Nařízení Evropského parlamentu a rady 1223/2009, týkající se nanočástic. Ze zkoumaných vzorků se požadavky Nařízení týkají pouze vzorku Sol TiO₂, s částicemi o velikost 32 nm. Ostatní vzorky TiO₂ obsahovaly částice

větší, než 100 nm. Práce se rovněž pokusila odpovědět na otázku, zda se nanočástice obsažené v šarži TiO₂ Eusolex T-AVO (K2024735), zapracované ve vzorku opalovacího mléka SAHARA (22199/22236), projeví na tvaru distribuční křivky disperze připravené z tohoto opalovacího přípravku. Ze získaných výsledků však bylo zjištěno, že konkrétní šarži TiO₂ není možno v přípravku jasně identifikovat, protože kosmetický přípravek je komplexní systém obsahující řadu složek, které činí toto stanovení pomocí DLS obtížným.

I přes velké množství studií a výzkumných prací zabývajících se problematikou nanočástic, nejsou informace o jejich vlastnostech, ve vztahu k chování v biologických systémech, stále dostačující. V současnosti je třeba více se zaměřit na toxicitu nanočástic a důležité je rovněž prozkoumat jejich vliv na organismus a chování v prostředí lidského těla.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LÓPEZ-SERRANO, A., R. M. OLIVAS, J. S. LANDALUZE a C. CÁMARA. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Analytical Methods* [online]. 2013, roč. 6, č. 1, s. 38-56 [cit. 2014-11-19]. DOI: 10.1039/c3ay40517f. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay40517f>
- [2] RIEDIKER, M. *Compendium of Projects in the European NanoSafety Cluster* [online]. Lausanne, 2013, 274 s. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.nanosafetycluster.eu/uploads/files/pdf/2013_NSC_Compendium.pdf
- [3] KRUG, H. F. Empa - Nanotoxikologie - vieles läuft schief. *Empa - Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology* [online]. 2014 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: <http://www.empa.ch/plugin/template/empa/3/152403/---/l=2>
- [4] MORGANTI, P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 2010, č. 3, s. 5-13 [cit. 2014-11-19]. DOI: 10.2147/CCID.S4506. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/use-and-potential-of-nanotechnology-in-cosmetic-dermatology-peer-reviewed-article-CCID>
- [5] MYTYCH, J. a M. WNUK. Nanoparticle Technology as a Double-Edged Sword: Cytotoxic, Genotoxic and Epigenetic Effects on Living Cells. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* [online]. 2013, roč. 4, č. 1, s. 53-63 [cit. 2014-11-19]. DOI: 10.4236/jbnb.2013.41008. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jbnb.2013.41008>
- [6] PATEL, A., P. PRAJAPATI a R. BOGHRA. Overview on application of nanoparticles in cosmetics. *Asian Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research* [online]. 2011, roč. 1, č. 2, s. 40-55 [cit. 2014-11-19]. Dostupné z: http://pharmaboon.org/img_pharma/A-203.pdf
- [7] HORIKOSHI, S. a N. SERPONE. *Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications*. 1. vydání. Weinheim: Wiley-VCH, 2013, 332 s. ISBN 978-3-527-33197-0.
- [8] HEILIGTAG, F. J. a M. NIEDERBERGER. The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today* [online]. 2013, roč. 16, č. 7/8, s. 262-271 [cit. 2014-11-

- 20]. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.07.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702113002253>
- [9] PETŘÍK, M.. Tajemství barvy zlata a antických pohárů. In: *BigBlogger.cz* [online]. 2009 [cit. 2014-11-20]. Dostupné z: <http://petrik.bigblogger.lidovky.cz/c/107693/Tajemstvi-barvy-zlata-a-antickych-poharu.html>
- [10] KLUSOŇ, P., M. DROBEK, H. BARTKOVÁ a I. BUDIL. Vítejte v "nanosvětě". *Chemické listy* [online]. 2007, č. 101, s. 262-272 [cit. 2014-11-20]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_04_262-272.pdf
- [11] SINGH, M., S. MANIKANDAN a A. K. KUMARAGURU. Nanoparticles: A New Technology with Wide Applications. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2011, roč. 1, č. 1, s. 1-11 [cit. 2014-11-20]. DOI: 10.3923/rjnn.2011.1.11. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjnn.2011.1.11>
- [12] HLAVÁČEK, A. a P. SKLÁDAL. Kvantové tečky: Příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Chemické listy* [online]. 2011, č. 105, s. 611-615 [cit. 2014-11-20]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_611-615.pdf
- [13] Role of Bottom-up and Top-Down approaches in Nano technology. *Welcome to GITAM University* [online]. [cit. 2014-12-10]. Dostupné z: http://www.gitam.edu/eresource/nano/nanotechnology/role_of_bottomup_and_topdown_a.htm
- [14] MIJATOVIC, D., J. C. T. EIJKEL a A. VAN DEN BERG. Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up - a review. *Lab on a Chip* [online]. 2005, č. 5, s. 492-500 [cit. 2014-11-20]. DOI: 10.1039/b416951d. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b416951d>
- [15] HENCH, L. L. a J. K. WEST. The sol-gel process. *Chemical Reviews* [online]. 1990, roč. 90, č. 1, s. 33-72 [cit. 2014-11-20]. DOI: 10.1021/cr00099a003. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00099a003>
- [16] Dnes začínají platit nová pravidla, která zvyšují bezpečnost kosmetických výrobků prodávaných v EU. *Evropská komise* [online]. 2013, 15/07/2013 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/ceskarepublika/press/press_releases/13_677_cs.htm

- [17] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích (Text s významem pro EHP). In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2009. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&qid=1418576251564&from=CS>
- [18] ISO/TS 27687:2008. *Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*. Ženeva, 2008.
- [19] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER SAFETY. *Guidance on the Safety Assessment of Nanomaterials in Cosmetics* [online]. 2012 [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf
- [20] PATWEKAR, S., S. GATTANI, R. GIRI, A. BADE, B. SANGEWAR a V. RAUT. Review on nanoparticles used in cosmetics and dermal products. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2014, roč. 3, č. 8, s. 1407-1421 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://www.wjpps.com/download/article/1406886226.pdf>
- [21] MIHRANYAN, A., N. FERRAZ a M. STRØMME. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science* [online]. 2012, roč. 57, č. 5, s. 875-910 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2011.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642511001046>
- [22] SILPA, R., U. S. SUMOD, J. SHOMA a M. SABITHA. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. 2012, roč. 4, č. 3, s. 186-193 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.4103/0975-7406.99016. Dostupné z: <http://www.jpbonline.org/text.asp?2012/4/3/186/99016>
- [23] Nano & the top 10 big cosmetics companies: L'Oréal, Procter & Gamble and Henkel on the podium for patents. *Nanocolors - the nanotech 2.0 hub | Nanotechnologies* [online]. 2009 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://nanocolors.wordpress.com/2009/10/29/nano-the-top-10-big-cosmetics-companies-loreal-procter-gamble-and-henkel/>
- [24] Analysis. *Nanotechnology - Project on Emerging Nanotechnologies* [online]. © 2014 [cit. 2014-12-14]. Dostupné z: <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>

- [25] NANBU, T. Whitening cosmetic composition containing arbutin nanoparticles [patent]. US20090069253 A1. Uděleno 12. března 2009.
- [26] VELAZQUEZ PEREDA, M. Del C., C. DIEAMANT, A. NOGUEIRA, G. MARCELINO, ROSSAN a M. H. ANDRADE SANTANA. Sericin cationic nanoparticles for application in products for hair and dyed hair [patent]. US20120164196 A1. Uděleno 28. června 2012.
- [27] LOHANI, A., A. VERMA, H. JOSHI, N. YADAV a N. KARKI. Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. *ISRN Dermatology* [online]. 2014, č. 2014, s. 1-14 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1155/2014/843687. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/isrn.dermatology/2014/843687/>
- [28] SHAAL, L. A., R. H. MÜLLER a C. M. KECK. Preserving hesperetin nanosuspensions for dermal application. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, roč. 2, č. 65, s. 86-92 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1691/ph.2010.9214. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2010/00000065/00000002/art00003?crawler=true>
- [29] MISHRA, P. R., L. AL SHAAL, R. H. MÜLLER a Co. M. KECK. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, č. 371, s. 182-189 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.12.030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517308008685>
- [30] BEUMER, R., Ch. CHEN, H. GUTZWILLER, P. E. MAILLAN, M. NOWOTNY, B. SCHLEGEL a VOLLHARDT. Topical compositions comprising nanoparticles of an isoflavone [patent]. WO 2007000192 A1. Uděleno 4. ledna 2007.
- [31] HA, T. H., JEONG, JUNG, KIM a Y. T. LIM. Cosmetic pigment composition containing gold or silver nano-particles [patent]. WO 2007011103 A1. Uděleno 25. leden 2007.
- [32] MAITRA, P., J. C. BRAHMS, S. E. BROWN, M. J. FAIR, J. R. GLYNN JR. a J. ROTHOUSE. Gel technology suitable for use in cosmetic compositions [patent]. WO 2009085444 A1. Uděleno 9. červenec 2009.
- [33] DUBERTRET, B. a L. DUBERTRET. Composition cosmetique comprenant des nanoparticules fluorescentes comme pigments [patent]. FR 2847812-A1. Uděleno 4. června 2004.

- [34] GIROUD, F., H. SAMAIN a I. ROLLAT. Cosmetic composition based on nanoparticles and water-soluble organic silicon compounds [patent]. EP1267801. Uděleno 31. prosince 2008.
- [35] DAUGA, Ch., H. SAMAIN a F. GIROUD. Procédé cosmétique capillaire contenant des particules métalliques pour améliorer la brillance des cheveux [patent]. EP 1064918 B1. Uděleno 25. září 2002.
- [36] TSAI, M. A composition comprising silver nanoparticles and extracts of polygonum multiflorum thunb and the use thereof [patent]. WO 2010091529 A1. Uděleno 19. srpna 2010.
- [37] CLARK, A. M. a B. A. RZIGALINSKI. Anti-inflammatory, radioprotective, and longevity enhancing capabilities of cerium oxide nanoparticles [patent]. WO 2007002662 A3. Uděleno 22. listopadu 2007.
- [38] OKAYAMA, M. Precious metal nanocolloid solution [patent]. WO 2006101106 A1. Uděleno 28. září 2006.
- [39] KROPF, Christian., U. BRUENINGHAUS a H. KGAA. Thixotropic oral and dental care agents [patent]. WO 2001095864 A1. Uděleno 20. prosince 2001.
- [40] BANOWSKI, B., M. HELLER, T. FOERSTER a Ch. KROPF. Deodorants based on alkali soap gels contain metal oxide, oxide hydrate or hydroxide nanoparticles to combine good properties with ease of manufacture [patent]. DE 10028207 A1. Uděleno 3. ledna 2002.
- [41] OEHRLEIN a Ga. BAISCH. Metal oxide nanoparticles coated with specific n-acylamino-methylene phosphonates [patent]. WO 2006094915 A2. Uděleno 14. září 2006.
- [42] OSMOND, M. J. a M. J. MCCALL. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology* [online]. 2010, roč. 4, č. 1, s. 15-41 [cit. 2014-15-12]. DOI: 10.3109/17435390903502028. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/17435390903502028>
- [43] MORRISON, W. H. a S. R. FRERICHS. Passivated nano-titanium dioxide particles and methods of making the same [patent]. 20050129634-A1. Uděleno 16. června 2005.
- [44] HAN, W. Titania Nanocavities and Method of Making [patent]. US 20090117384 A1. Uděleno 7. května 2009.

- [45] ANDRE, V., J. RIEGER a N. BOUILLO. Surface-modified metal oxides, method for producing them, and their use in cosmetic preparations [patent]. WO 2005105930 A1. Uděleno 10. listopadu 2005.
- [46] LABOUTA, H. I. a M. SCHNEIDER. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2013, roč. 9, č. 1, s. 39-54 [cit. 2014-02-11]. DOI: 10.1016/j.nano.2012.04.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963412001773>
- [47] BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality?. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, roč. 99, č. 1, s. 21-50 [cit. 2015-02-11]. DOI: 10.1002/jps.21817. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.21817>
- [48] LEE, S. E., K. J. CHOI, G. K. MENON, H. J. KIM, E. H. CHOI, S. K. AHN a S. H. LEE. Penetration Pathways Induced by Low-Frequency Sonophoresis with Physical and Chemical Enhancers: Iron Oxide Nanoparticles versus Lanthanum Nitrates. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2009, roč. 130, č. 4, s. 1063-1072 [cit. 2015-02-11]. DOI: 10.1038/jid.2009.361. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jid.2009.361>
- [49] LABOUTA, H. I., L. K. EL-KHORDAGUI, T. KRAUS a M. SCHNEIDER. Mechanism and determinants of nanoparticle penetration through human skin. *Nanoscale* [online]. 2011, roč. 3, č. 12, s. 4989-4999 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1039/c1nr11109d. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1nr11109d>
- [50] PATZELT, A., H. RICHTER, F. KNORR, U. SCHÄFER, T. LEHR, L. DÄHNE, W. STERRY a J. LADEMANN. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, roč. 150, č. 1, s. 45-48 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.11.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365910009193>
- [51] LEKKI, J., Z. STACHURA, W. DĄBROŚ, J. STACHURA, F. MENZEL, T. REINERT, T. BUTZ, J. PALLON, E. GONTIER, M. D. YNSA, P. MORETTO, Z. KERTESZ, Z. SZIKSZAI a A. Z. KISS. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* [online]. 2007, roč. 260, č. 1, s. 174-

- 177 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1016/j.nimb.2007.02.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X0700362X>
- [52] GODIN, B a E. TOUITOU. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007, roč. 59, č. 11, s. 1152-1161 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1016/j.addr.2007.07.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X07001718>
- [53] SONAVANE, G., K. TOMODA, A. SANO, H. OHSHIMA, H. TERADA a K. MAKINO. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2008, roč. 65, č. 1, s. 1-10 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776508000854>
- [54] RYMAN-RASMUSSEN, J. P. Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties. *Toxicological Sciences* [online]. 2006, roč. 91, č. 1, s. 159-165 [cit. 2015-02-12]. DOI: 10.1093/toxsci/kfj122. Dostupné z: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfj122>
- [55] ELSAESSER, A. a C. V. HOWARD. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, roč. 64, č. 2, s. 129-137 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11002328>
- [56] ELSAESSER, A., A. TAYLOR, G. S. DE YANÉS, G. MCKERR, E. KIM, E. O'HARE a C. V. HOWARD. Quantification of nanoparticle uptake by cells using microscopical and analytical techniques. *Nanomedicine* [online]. 2010, roč. 5, č. 9, s. 1447-1457 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.2217/nmm.10.118. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/nmm.10.118>
- [57] GINZBURG, V. V. a S. BALIJEPALLI. Modeling the Thermodynamics of the Interaction of Nanoparticles with Cell Membranes. *Nano Letters* [online]. 2007, roč. 7, č. 12, s. 3716-3722 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1021/nl072053l. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl072053l>
- [58] STERN, S. T. a S. E. MCNEIL. Nanotechnology Safety Concerns Revisited. *Toxicological Sciences* [online]. 2007, roč. 101, č. 1, s. 4-21 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1093/toxsci/kfm169. Dostupné z: <http://www.toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfm169>

- [59] CROSERA, M., M. BOVENZI, G. MAINA, G. ADAMI, C. ZANETTE, Ch. FLORIO a F. FILON LARESE. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *International Archives of Occupational and Environmental Health* [online]. 2009, roč. 82, č. 9, s. 1043-1055 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1007/s00420-009-0458-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00420-009-0458-x>
- [60] JANI, P., G. W. HALBERT, J. LANGRIDGE a. T. FLORENCE. Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 1990, roč. 42, č. 12, s. 821-826 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1990.tb07033.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-7158.1990.tb07033.x>
- [61] VLACHOGIANNI, T. a. VALAVANIDIS. Nanomaterials: Environmental pollution, ecological risks and adverse health effects. *Nano Science and Nano Technology, An Indian Journal* [online]. 2014, roč. 6, č. 8, s. 208-226 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/261121214_Nanomaterials_Environmental_Pollution_Ecological_Risks_and_Adverse_Health_Effects
- [62] YILDIRIMER, L., N. T. K. THANH, M. LOIZIDOU a. M. SEIFALIAN. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today* [online]. 2011, roč. 6, č. 6, s. 585-607 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1016/j.nantod.2011.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013211001137>
- [63] OBERDÖRSTER, G., Z. SHARP, V. ATUDOREI, A. ELDER, R. GELEIN, A. LUNTS, W. KREYLING a Ch. COX. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* [online]. 2002, roč. 65, č. 20, s. 1531-1543 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1080/00984100290071658. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00984100290071658>
- [64] FUNG, M. C. a D. L. BOWEN. Silver Products for Medical Indications: Risk-Benefit Assessment. *Clinical Toxicology* [online]. 1996, roč. 34, č. 1, s. 119-126 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.3109/15563659609020246. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15563659609020246>
- [65] RIVERA GIL, P., D. HÜHN, L. L. DEL MERCATO, D. SASSE a W. J. PARAK. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological Research* [online]. 2010, roč. 62, č. 2, s. 115-125 [cit. 2015-

- 02.16]. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.01.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104366181000023X>
- [66] PAN, Z., W. LEE, L. SLUTSKY, R. A. F. CLARK, N. PERNODET a M. H. RAFAILOVICH. Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells. *Small* [online]. 2009, roč. 5, č. 4, s. 511-520 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1002/sml.200800798. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200800798>
- [67] BENNAT, C. a C. C. MÜLLER-GOYMANN. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2000, roč. 22, č. 4, s. 271-283 [cit. 2015-02-16]. DOI: 10.1046/j.1467-2494.2000.00009.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1467-2494.2000.00009.x>
- [68] LAL PAL, S., U. JANA, P. K. MANNA, G. P. MOHANTA a R. MANAVALAN. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of applied pharmaceutical science* [online]. 2011, č. 6, s. 228-234 [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/159_pdf.pdf
- [69] AKBARI, B., M. PIRHADI TAVANDASHTI a M. ZANDRAHIMI. Particle size characterization of nanoparticles - A practical approach. *Iranian Journal of Materials Science & Engineering* [online]. 2011, roč. 8, č. 2, s. 48-56 [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: http://ijmse.iust.ac.ir/files/site1/user_files_4qu804/ijmse-A-10-3-149-c629680.pdf
- [70] CHVÁTALOVÁ, L.. *Elektronové mikroskopy* [online]. [cit. 2015-04-2]. Dostupné z: http://www.fch.vutbr.cz/~zmeskal/obring/presentace_2003/20_elektronove_mikroskopy.pdf
- [71] KUBÍNEK, R., K. ŠAFÁŘOVÁ a M. VŮJTEK. *Elektronová mikroskopie* [online]. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011 [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: <http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/elmikro.pdf>
- [72] ŠIMEK, M., V. GRÜNVALDOVÁ a B. KRATOCHVÍL. Současné metody měření velikosti částic farmaceutických látek a jejich omezení. *Chemické listy* [online]. 2014, č. 108, s. 50-55 [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_01_50-55.pdf
- [73] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 minutes*. 8 s. Dostupné z: www.malvern.co.uk

- [74] BRAR, S. K. a M. VERMA. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, roč. 30, č. 1, s. 4-17 [cit. 2015-03-03]. DOI: 10.1016/j.trac.2010.08.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993610002700>
- [75] MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. *A Basic Guide to Particle Characterization*. 2012. Dostupné z: www.malvern.com
- [76] JACKSON, K. a Ch. JOHANN. Dynamický rozptyl světla - Co, jak, proč?. *CHEMAGAZÍN*. 2007, roč. 17, č. 1.
- [77] KVÍTEK, L., R. NOVOTNÝ a P. PIKAL. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické listy*. 1998, č. 92, s. 431-433.
- [78] OPRŠAL, J., P. KNOTEK, POUZAR, J. PALARČÍK a L. NOVOTNÝ. Vliv aglomerace stříbrných nanočástic na výsledky testů ekotoxicity na vodních organismech. *Chemické listy* [online]. 2013, č. 107, s. 386-392 [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_05_386-392.pdf
- [79] CUMBERLAND, S. A. a J. R. LEAD. Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, roč. 1216, č. 52, s. 9099-9105 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.07.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309010772>
- [80] HIEMENZ, P. C. a R. RAJAGOPALAN. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. 3rd rev. and exp. Ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, s. 525-526. ISBN 0-8247-9397-8.
- [81] JONES, K., J. MORTON, I. SMITH, K. JURKSCHAT, A. HARDING a G. EVANS. 2015. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters* [online]. 2015, roč. 233, č. 2, s. 95-101 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.12.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427414015124>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFM	Mikroskopie atomárních sil
AgNP	Nanočástice stříbra
ATB	Antibiotikum
AuNP	Nanočástice zlata
CaCl ₂	Chlorid vápenatý
CAS	Číslo služby chemických abstrakt
CeO ₂	Oxid ceričitý
CuO	Oxid měďnatý
<i>D</i>	Difuzní koeficient
<i>d(H)</i>	Hydrodynamický průměr
DLS	Dynamický rozptyl světla
DLVO	Derjagin-Landau-Verwey-Overbeek
DMEM	Dubelcco's modified eagle medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EINECS	Evropský seznam existujících obchodovaných chemických látek
ELINCS	Evropský seznam oznámených chemických látek
EU	Evropská unie
Fe ₂ O ₃	Oxid železitý
<i>g(τ)</i>	Autokorelační funkce
H ₂ O	Voda
Hm. %	Hmotnostní procenta
INN	Mezinárodní nechráněné názvy farmaceutických přípravků
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
<i>k</i>	Boltzmannova konstanta

KCl	Chlorid draselný
KP	Kosmetický přípravek
λ	Vlnová délka
MgSO ₄	Síran hořečnatý
η	Viskozita
NaHCO ₃	Hydrogenuhličitan sodný
NaCl	Chlorid sodný
NM	Nanomateriál
NP	Nanočástice
O/V	Emulze typu olej ve vodě
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PBS	Fosfátový pufr
PCS	Fotonová korelační spektroskopie
Pd	Paladium
PDI	Index polydisperzity
PEN	Projekt rozvíjejících se nanotechnologií
Pt	Platina
Q	Vlnový vektor
QD	Quantum dots (kvantové tečky)
QELS	Kvazielastický rozptyl světla
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SC	<i>Stratum corneum</i>
SD	Směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SGF	Simulovaná žaludeční tekutina
SIF	Simulovaná střevní tekutina

SiO ₂	Oxid křemičitý
SZÚ	Státní zdravotní ústav
<i>T</i>	Absolutní teplota
τ	Čas
τ_c	Relaxační čas
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TiO ₂	Oxid titaničitý
U	Uran
UV	Ultrafialový
VVBS	Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele
WHO	Světová zdravotnická organizace
XAS	Rentgenová absorpční spektroskopie
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie
XRD	Rentgenová difrakční analýza
XRF	Rentgenová fluorescence
ZnO	Oxid zinečnatý

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Srovnání metod top down a bottom up [13].</i>	16
<i>Obr. 2. Velikost kosmetických firem podle počtu patentů vztahujících se k nanomateriálům (rok 2009) [23].</i>	21
<i>Obr. 3. Počet výrobků obsahujících konkrétní nanomateriály [24].</i>	22
<i>Obr. 4. Vliv nanočástic sericinu na povrch vlasu: a) vlas bez ošetření sericinem, b) po ošetření [27, s. 5].</i>	24
<i>Obr. 5. Schéma transmisního elektronového mikroskopu.</i>	38
<i>Obr. 6. Grafické znázornění fluktuací malých a velkých částic [73, s. 4].</i>	42
<i>Obr. 7. Schéma přístroje pro měření DLS [73, s. 6].</i>	44
<i>Obr. 8. Distribuční křivky AgNP získané při stanovení opakovatelnosti měření.</i>	54
<i>Obr. 9. Grafické znázornění stability částic vzorku AgNP S29 během skladování.</i>	59
<i>Obr. 10. Závislost velikosti částic AgNP S29 v PBS na čase.</i>	62
<i>Obr. 11. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v PBS v čase (červená – 0 min, zelená – 5 min, modrá – 20 min, černá – 60 min, růžová – 180 min).</i>	63
<i>Obr. 12. Závislost velikosti částic AgNP S29 v DMEM bez séra na čase.</i>	64
<i>Obr. 13. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v DMEM bez séra v čase (červená – 0 min, zelená – 5 min, modrá – 20 min, černá – 60 min, růžová – 120 min).</i>	65
<i>Obr. 14. Závislost velikosti částic AgNP S29 v DMEM se sérem na čase.</i>	66
<i>Obr. 15. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v DMEM se sérem v čase (červená – 0 min, modrá – 5 min, zelená – 20 min, černá – 60 min, růžová – 120 min).</i>	67
<i>Obr. 16. Změny ve velikosti částic (z-průměr) AgNP S29 v SGF o pH 1,2 v čase.</i>	68
<i>Obr. 17. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF (pH 1,2) v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).</i>	69
<i>Obr. 18. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem (pH = 1,2) na čase.</i>	70
<i>Obr. 19. Časové změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem (pH = 1,2), (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 120 min).</i>	71
<i>Obr. 20. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SGF po úpravě na pH 6,8 na čase.</i>	72
<i>Obr. 21. Změny distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF po úpravě na pH 6,8 v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).</i>	72
<i>Obr. 22. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem (pH 6,8) na čase.</i>	73

<i>Obr. 23. Změna distribuce velikosti částic AgNP S29 v SGF s pepsinem (pH 6,8) v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).</i>	74
<i>Obr. 24. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SIF (pH 6,8) na čase.</i>	75
<i>Obr. 25. Změna distribuce velikosti částic AgNP S29 v SIF (pH 6,8) v čase (červená – 0 min, zelená – 40 min, modrá – 60 min, černá – 120 min).</i>	75
<i>Obr. 26. Závislost velikosti částic AgNP S29 v SIF s pankreatinem na čase.</i>	76
<i>Obr. 27. Distribuce velikosti částic AgNP S29 v SIF s pankreatinem během 60 min (červená – 0 min, zelená – 20 min, modrá – 40 min, černá – 60 min).</i>	76
<i>Obr. 28. Porovnání velikostí částic AgNP S29 v simulovaných gastrických tekutinách po 180 min.</i>	77
<i>Obr. 29. TEM snímek vzorku AgNP S9.</i>	78
<i>Obr. 30. TEM snímek vzorku AgNP S11.</i>	79
<i>Obr. 31. TEM snímek vzorku AgNP S29.</i>	79
<i>Obr. 32. TEM snímek vzorku AgNP S29 v PBS.</i>	80
<i>Obr. 33. TEM snímek vzorku AgNP S29 v DMEM.</i>	80
<i>Obr. 34. TEM snímek vzorku AgNP S29 v DMEM se sérem.</i>	81
<i>Obr. 35. Distribuční křivky vzorků TiO₂ Solaveil CT-10W (červená) a Solaveil CT-200 (zelená).</i>	82
<i>Obr. 36. Distribuční křivky vzorků TiO₂ Soltex TiO₂ 180311/2 (modrá), Soltex TiO₂ 1143/256 (zelená) a Sol TiO₂ 180311/2 (červená).</i>	83
<i>Obr. 37. Distribuční křivky vzorků TiO₂ Rutil IPM 1149/39 (červená), Rutil H₂O 1149/90 (černá), Nanorutil 150311/1 (zelená) a Disperze 141113/1 (modrá).</i>	83
<i>Obr. 38. Srovnání distribučních křivek vzorku SAHARA š. 22199/22236 (červená) a vzorku Eusolex T-AVO, š. K2024735 (zelená).</i>	84

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Komerční vzorky nanostříbra studované v experimentální části práce.</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 2. Vzorky nanostříbra vyrobené v SZÚ studované v experimentální části práce.</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 3. Vzorky obsahující TiO₂ studované v experimentální části práce.</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 4. Složení roztoků pro simulaci kapalin gastrointestinálního traktu.</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 5. Výsledky opakovatelnosti měření.</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 6. Vliv úpravy vzorku před měřením na velikost koloidních nanočástic. Obsah Ag: AgNP S7-S10 20 ppm, AgNP S6 14 ppm.</i>	<i>55</i>
<i>Tab. 7. Naměřené hodnoty velikosti částic koloidního stříbra Rulc. Obsah Ag: AgNP S8-S12, S14 20 ppm, AgNP S13 14 ppm).</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 8. Hodnoty velikosti částic Ag pro vzorky připravené na SZÚ (AgNP S15–AgNP S20).</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 9. Získané hodnoty velikosti částic pro vzorky AgNP S27 – S30. Obsah Ag 20 ppm.</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 10. Dlouhodobá stabilita vzorku AgNP S29 skladovaného při 4 °C.</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 11. Stabilita vybraných vzorků během skladování (po 40 týdnech).</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 12. Stabilita vybraných vzorků během skladování (28 týdnů).</i>	<i>60</i>
<i>Tab. 13. Velikost částic vzorku AgNP S29 ve studovaných fyziologických tekutinách.</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 14. Velikost částic AgNP S29 v PBS v průběhu 180 min.</i>	<i>62</i>
<i>Tab. 15. Velikost částic AgNP S29 v DMEM bez séra v průběhu 180 min.</i>	<i>64</i>
<i>Tab. 16. Velikost částic AgNP S29 v DMEM se sérem v průběhu 180 min.</i>	<i>66</i>
<i>Tab. 17. Velikost částic AgNP S29 v SGF o pH 1,2 v průběhu 180 min.</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 18. Velikost částic AgNP 29 v SGF s pepsinem (pH = 1,2) v průběhu 180 min.</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 19. Velikost částic AgNP S29 v SGF po úpravě na pH 6,8 v průběhu 180 min.</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 20. Velikost částic AgNP 29 v SGF s pepsinem (pH 6,8) v průběhu 180 min. ..</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 21. Velikost částic AgNP S29 v SIF v průběhu 180 min.</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 22. Velikost částic AgNP 29 v SIF s pankreatinem v průběhu 60 min.</i>	<i>76</i>
<i>Tab. 23. Velikost částic v dalších vzorcích s obsahem TiO₂.</i>	<i>82</i>

<i>Tab. 24. Velikost částic ve vzorcích TiO₂ Eusolex a mlék na opalování SAHARA po dispergaci ve vodě.</i>	<i>84</i>
<i>Tab. 25. Výsledky stanovení zeta potenciálu.</i>	<i>85</i>