

Analýza Nanokrystalů Léčiv - [ANL]

(Denisa Lizoňová)

1. Úvod

Tato úloha navazuje na předchozí laboratorní práci Příprava nanokrystalů léčiv (PNL) a provádí se následující den po přípravě vlastních vzorků nanokrystalů. Studenti budou charakterizovat nanokrystaly, které si sami připravili metodou mokrého mletí, a to z hlediska velikosti částic (hydrodynamický průměr), distribuce velikosti a koloidní stability ve vodném prostředí s obsahem solí. Analýza bude probíhat pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS, dynamic light scattering).

2. Teorie

2.1 Dynamický rozptyl světla

V této laboratorní úloze bude použit přístroj Zetasizer Nano ZS, který funguje na principu dynamického rozptylu světla (Dynamic Light Scattering, DLS) [1]. DLS je fyzikální metoda určená ke stanovení hydrodynamického průměru nanočástic v roztoku. Princip je založen na sledování Brownova pohybu, což je neustálý, náhodný pohyb částic způsobený srážkami s molekulami rozpouštědla [2]. Menší částice se pohybují rychleji než větší, což vede k rozdílům v kolísání intenzity světla, které se rozptyluje po ozáření laserem. Tyto fluktuace intenzity jsou detekovány a analyzovány, což umožňuje výpočet translačního difuzního koeficientu, D . Z něj se pomocí Stokesovy–Einsteinovy rovnice stanoví hydrodynamický průměr částic, $d(H)$, tedy efektivní velikost včetně okolního solvačního obalu:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

kde:

$d(H)$ – hydrodynamický průměr částice

k – Boltzmannova konstanta

T – absolutní teplota

η – dynamická viskozita

D – difuzní koeficient

Hydrodynamický průměr podle DLS je definován jako průměr ideální koule, která se v daném prostředí pohybuje difuzí stejně rychle jako měřená částice. Tato hodnota nezahrnuje pouze pevné jádro částice, ale i její povrchové vrstvy – například adsorbované molekuly nebo solvatační obaly – které ovlivňují její pohyb. Výsledný průměr je citlivý na podmínky měření,

především teplotu, viskozitu média a interakce mezi částicemi nebo s okolním prostředím. Proto je nezbytné provádět měření ve standardizovaných a dobře kontrolovaných podmínkách.

Přídavek solí do disperzního média snižuje tloušťku elektrické dvojvrstvy (tzv. Debyeovu délku) a omezuje účinek elektrostatického odpuzování mezi částicemi. U systémů stabilizovaných právě elektrostaticky tak dochází k narušení hlavního stabilizačního mechanismu, což vede k přiblížování částic, jejich kontaktu a následné agregaci. Tyto vzniklé shluky se při DLS měření projeví jako znatelný nárůst hydrodynamického průměru.

V některých případech, pokud systém zůstává stabilní, může zvýšená iontová síla prostředí ovlivnit pouze rychlost difuze jednotlivých částic – například mírným zúžením elektrické dvojvrstvy bez agregace. Tento jev se může projevit jako drobné snížení naměřeného hydrodynamického průměru, ve srovnání s vlivem agregace je však obvykle zanedbatelný.

Pro lepší pochopení problematiky DLS si můžete také pustit edukační video na youtube [3]: https://www.youtube.com/watch?v=ET6S03GeMKE&ab_channel=MalvernPanalytical.

2.2 Typy velikostních distribucí částic a polydisperzita

Reálné vzorky obvykle obsahují částice různých velikostí. Pokud jsou velikosti částic velmi podobné, mluvíme o *monodisperzním systému*. Pokud se velikosti částic výrazně liší, jde o *polydisperzní systém*. Stupeň disperzity vzorku lze kvantifikovat pomocí tzv. indexu polydisperzity (PDI, polydispersity index), který je bezrozměrný a vychází z analýzy šířky distribuce velikostí.

Hodnota PDI se pohybuje od 0 (zcela monodisperzní vzorek) do 1 (výjimečně i více). Hodnoty pod 0,1 označují skutečně monodisperzní systém. U běžných nanomateriálů se za akceptovatelné považují hodnoty PDI do 0,3; takové vzorky jsou však již mírně polydisperzní. Tyto hodnoty jsou běžné u reálných nanoformulací, které často obsahují částice s mírně odlišnou primární velikostí, ale mohou také naznačovat přítomnost menšího množství agregátů nebo jinou formu heterogenity systému. Při hodnotách nad 0,5 je vzorek považován za výrazně polydisperzní a výsledky měření metodou DLS mohou být méně spolehlivé.

2.2.1 Distribuce vážená podle intenzity (Intensity weighted)

Je založena na intenzitě rozptylu světla – každá velikostní frakce přispívá podle toho, jak silně rozptyluje laserový paprsek. Intenzita rozptylu prudce roste s velikostí částic (přibližně šestou mocninou průměru), takže i malé množství větších agregátů může v této distribuci výrazně dominovat.

Z této distribuce se počítá **Z-average** (také označovaná jako *cumulants mean*) – intenzitně vážený průměr hydrodynamických velikostí částic vypočítaný pomocí kumulantové analýzy (není to prostý průměr ani medián).

- Vhodná pro detekci agregace nebo přítomnosti velkých částic.
- Kvůli silné závislosti na velikosti může výrazně podhodnocovat přítomnost malých částic.

2.2.2 Distribuce vážená podle počtu (Number weighted)

Výpočet je založený na modelu rozptylu světla, typicky pomocí Mieovy teorie*, která umožňuje převést intenzitu rozptýleného světla na odhadované počty částic různých velikostí. Výsledná distribuce ukazuje, jaké velikosti částic ve vzorku početně dominují.

- Užitečné pro hodnocení homogenních systémů složených z malých částic (např. proteiny).
- Výsledky jsou citlivé na správné nastavení optických parametrů (refrakční index částic a prostředí).

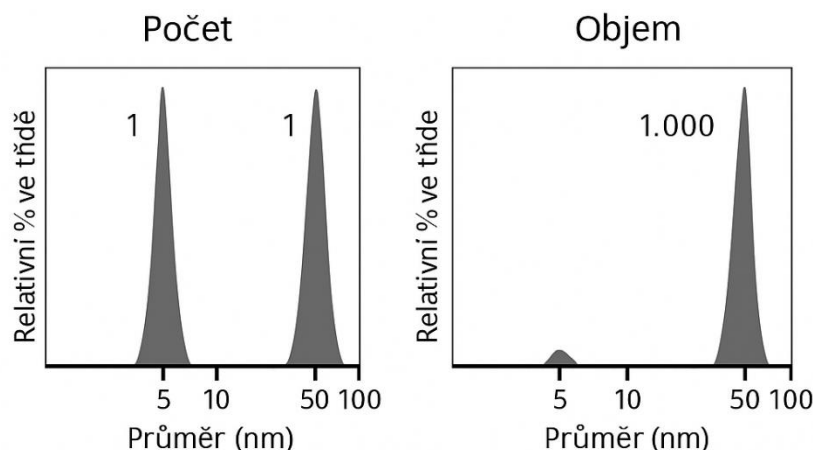
Mieova teorie je fyzikální model, který popisuje rozptyl světla na sférických částicích, přičemž bere v úvahu jejich velikost, tvar, a rozdíl refrakčních indexů mezi částicí a okolním médiem. Na rozdíl od jednodušších aproximací (např. Rayleighův rozptyl) umožňuje výpočty i pro větší nebo opticky složitější částice. Používá se k převodu intenzity na objemovou a početní distribuci – proto musí být optické parametry zadané co nejpřesněji.

2.2.3 Distribuce vážená podle objemu (Volume weighted)

Vzniká přepočtem intenzitní distribuce tak, aby vyjadřovala podíl jednotlivých frakcí na celkovém objemu částic.

- Může lépe odpovídat reálnému složení vzorku.
- Užitečná v případech, kdy je důležité znát, jaký objem zabírají jednotlivé frakce.
- Nejčastěji se používá v publikacích.

Obrázek 1 ukazuje rozdíl mezi početní a objemovou distribucí velikosti částic ve vzorku se stejným počtem dvou typů částic. V tomto příkladu se ve vzorku nachází stejný počet (například 100 kusů) dvou typů částic: o průměru 5 nm a 50 nm. V početní distribuci vidíme dva stejně vysoké píky – každá velikostní frakce je zastoupena 100 částicemi. V objemové distribuci dominuje pík odpovídající 50nm částicím. Důvodem je to, že souhrnný objem těchto větších částic je výrazně vyšší než objem stejně početné frakce menších (5nm) částic. Tento rozdíl dobře ilustruje, proč se v různých typech distribucí (početní, objemové, intenzitní) mohou stejné vzorky jevit velmi odlišně.



Obrázek 1. Srovnání početní a objemové distribuce velikosti částic. Početní distribuce ukazuje rovnoměrné zastoupení obou typů částic podle počtu, zatímco v objemové distribuci výrazně převažují větší částice díky svému většímu objemu.

3. Cíl práce

V této úloze budou studenti hodnotit stabilitu připravených nanokrystalů v prostředí s různým obsahem solí. Každý vzorek bude naředěn do několika solných roztoků a změny ve vzhledu systému (například sedimentace nebo agregace) budou sledovány v čase. Pozorované změny budou zaznamenány fotograficky a současně bude ve stanovených časových intervalech (po jedné, dvou a třech hodinách) provedeno měření velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla (DLS). Získané výsledky budou porovnány s kontrolními vzorky, které byly naředěny v deionizované vodě. Na základě naměřených dat studenti zpracují laboratorní protokol obsahující vyhodnocení velikosti částic a diskusi zaměřenou na vliv koncentrace solí a typu použitého stabilizátoru na celkovou koloidní stabilitu systému.

4. Materiál

3.1 Chemikálie

- NanokrystalY připraveny v rámci úlohy PNL
- Deionizovaná voda
- Zásobní roztoky chloridu sodného (5 M; 0,5 M; 0,005 M)

3.2 Pomůcky a vybavení

- Pipety a špičky
- Kádinky
- Jednorázové plastové kyvety pro měření DLS
- Mikrozkuřavky 2 mL („eppendorfkY“)
- Stojany na zkuřavky a kyvety
- Mobilní telefon s fotoaparátem
- USB disk (prosím, přineste si vlastní) s předpřipraveným wordovým dokumentem

5. Přístroje – Analyzátor velikosti částic

V této laboratorní úloze bude použit přístroj Zetasizer Nano ZS (Obrázek 2), který funguje na principu dynamického rozptylu světla (DLS)[1].

Přístroj Zetasizer Nano ZS umožňuje kromě hydrodynamického průměru měřit také zeta potenciál, což je elektrický potenciál na rozhraní mezi částicí a jejím okolím. Tento parametr je klíčový pro hodnocení koloidní stability – čím vyšší (kladnější nebo zápornější) je zeta potenciál, tím silnější jsou odpudivé síly mezi částicemi, a tím menší je pravděpodobnost jejich shlukování. Měření se provádí metodou elektroforetického rozptylu světla (ELS), při které je

sledován pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Měření zeta potenciálu není součástí této úlohy.



Obrázek 2. Vlevo: Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Vpravo: Kyveta se vzorkem nad otevřenou měřicí celou.

6. Postup práce

6.1 Ukončení mokrého mletí

Sejměte vzorky z magnetické míchačky a zařízení vypněte. Opatrně odpipetujte vzniklou vodní disperzi nanokrystalů kurkuminu do čisté mikrozkušavky. Dávejte pozor, abyste neodebrali mlecí kuličky.

Mlecí kuličky se recyklují, proto je potřeba je důkladně omýt etanolem a deionizovanou vodou – tuto činnost si ale nechte na později, až bude probíhat testování stability. Omýt je třeba také míchadlo a skleněnou vialku, ve které mletí probíhalo, a uklidit po sobě celou pracovní stanici a všechno použité laboratorní sklo.

6.2 Příprava vzorků pro měření hydrodynamického průměru nanokrystalů

Než začnete připravovat vzorky, přečtěte si následující pokyny celé až do konce!

Stabilitu jednotlivých vzorků budete hodnotit po 0 minutách (hned po naředění), a 60 minutách od jejich přípravy. Jedno měření trvá přibližně 5 minut, a protože budete mít 8 vzorků (nanokrystal stabilizované jak SDS tak poloxamerem, každé v 4 různých koncentracích soli – deionizovaná voda, 5 mM NaCl, 0,5 M NaCl a 5 M NaCl), je důležité vzorky připravovat postupně. Pokud byste všechny vzorky připravili naráz, nemuseli byste je stihnout měřit ve správném čase.

- **Příprava vzorku pro měření DLS a sledování sedimentace**

Nejprve si připravte vzorek jednoho typu nanokrystalů v deionizované vodě. Tento vzorek použijete k seznámení se s měřením a interpretací dat. Připravte 2 mL disperze o koncentraci 0,1 mg/mL (uvažujte, že vaše zásobní disperze má koncentraci 30 mg/mL). 1 mL přepipetujte do kyvety pro DLS a zkumavku se zbylou disperzí pak umístěte do stojanu na zkumavky. Zde budou uloženy všechny vzorky pro sledování sedimentace (se stojanem pak už zbytečně nehýbejte). V případě potřeby může asistent po provedení prvního měření navrhnout jiné ředění – do protokolu prosím uveďte to ředění, které jste nakonec použili pro všechna měření.

- **Příprava vzorků v solných roztocích**

Tuto část dělejte až po nastavení měřicího přístroje Zetasizer (sekce 6.3) a změření jednoho typu nanokrystalů ve vodě v přítomnosti asistenta! Připravte 2 mL vodní disperze druhého typu nanokrystalů s koncentrací 0,1 mg/mL (nebo jinou, pokud tak zvolí asistent), 1 mL změřte a zbytek umístěte do stojanu na zkumavky pro sledování sedimentace. Analogicky postupujete s přípravou a měřením disperzí nanokrystalů v solných roztocích. Nepřipravujte všechny vzorky najednou, protože byste je nestihli změřit včas (měření jednoho vzorku trvá přibližně 5 minut), zaznamenávejte si čas přípravy vzorků.

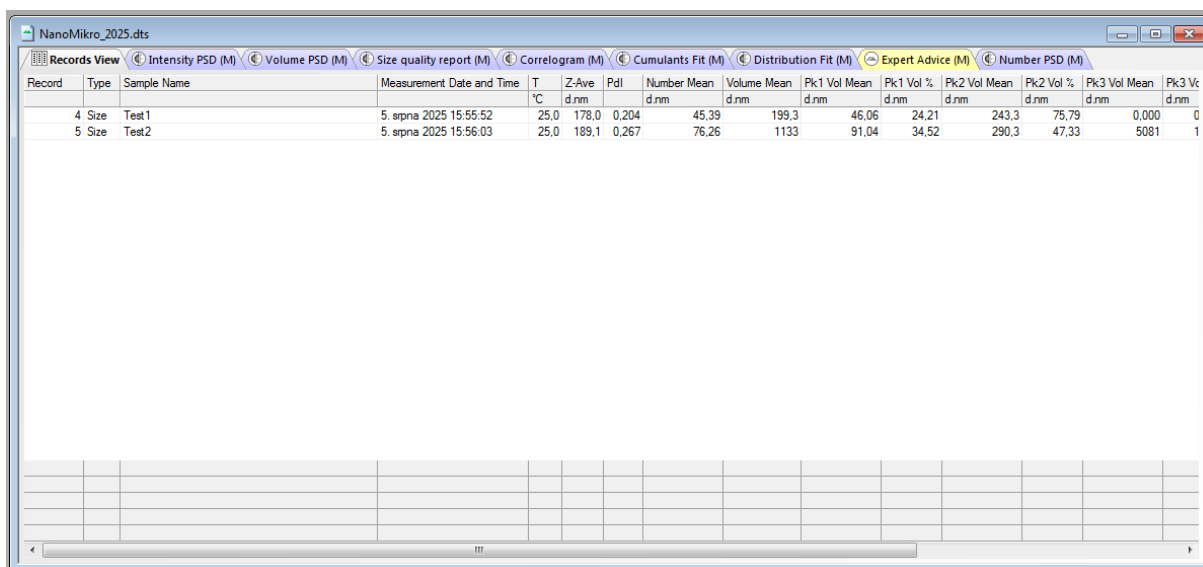
6.3 Nastavení měření velikosti částic pomocí Zetasizeru

Kyvetu se vzorkem vložte do měřicího prostoru (Obrázek 2) a správně nastavte parametry měření podle pokynů. První měření nastavte krok za krokem podle níže uvedeného návodu a před spuštěním si jej nechte zkontrolovat asistentem.

1. V softwaru **Zetasizer** (Ikona na ploše počítače vedle přístroje) **otevřete soubor NanoMikro_2025**, do kterého se automaticky ukládají všechna naměřená data:

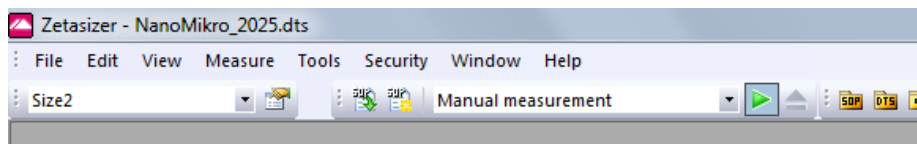
- File – Open – Measurement File - NanoMikro_2025

Otevře se tabulka se vzorovými daty, do které budou následně přibývat i vaše výsledky:



Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	Z-Ave d.nm	PdI	Number Mean d.nm	Volume Mean d.nm	Pk1 Vol Mean d.nm	Pk1 Vol % d.nm	Pk2 Vol Mean d.nm	Pk2 Vol % d.nm	Pk3 Vol Mean d.nm	Pk3 Vol % d.nm	Pk3 Vc d.nm
4	Size	Test1	5. srpna 2025 15:55:52	25,0	178,0	0,204	45,39	199,3	46,06	24,21	243,3	75,79	0,000	0	
5	Size	Test2	5. srpna 2025 15:56:03	25,0	189,1	0,267	76,26	1133	91,04	34,52	290,3	47,33	5081	1	

2. Na horní liště hlavního okna softwaru Zetasizer klikněte na malou zelenou ikonu **Play** (ve druhém rozbalovacím okně je zvolen typ měření *Manual Measurement*).

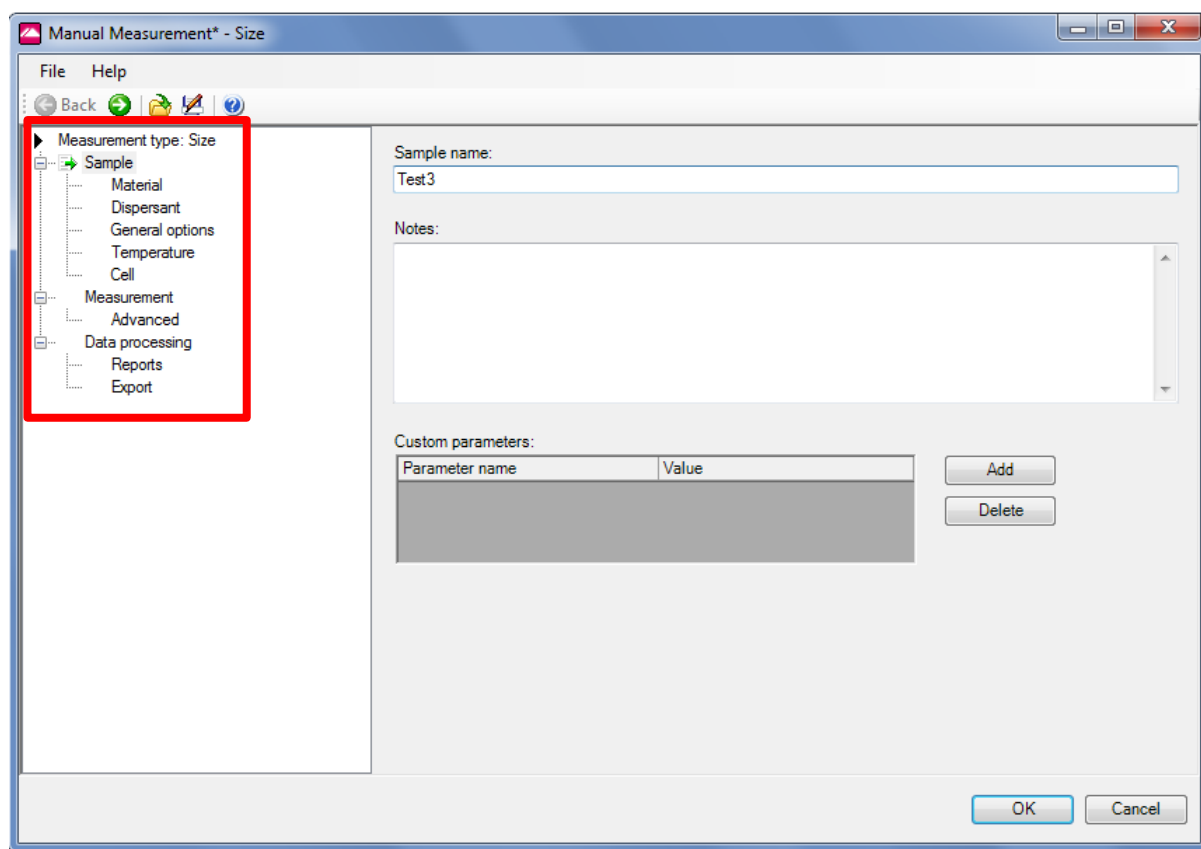


Otevře se nové (měřicí) okno, ve kterém je nutné nastavit nejdůležitější parametry měření, jako je materiál nanočástic (kvůli indexu lomu) a disperzní prostředí (kvůli viskozitě).

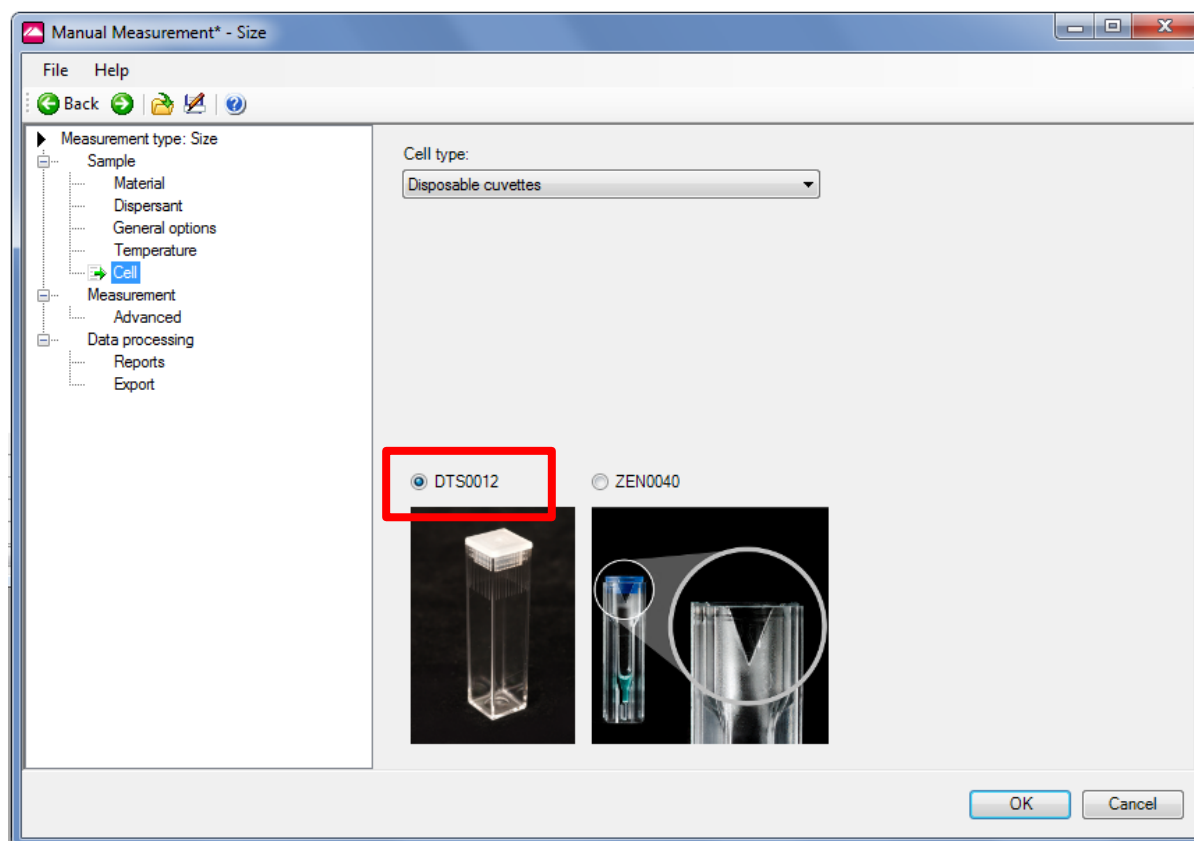
3. Zvolte typ měření: Size

4. Postupně nastavte následující parametry v záložkách SAMPLE, MEASUREMENT a DATA PROCESSING:

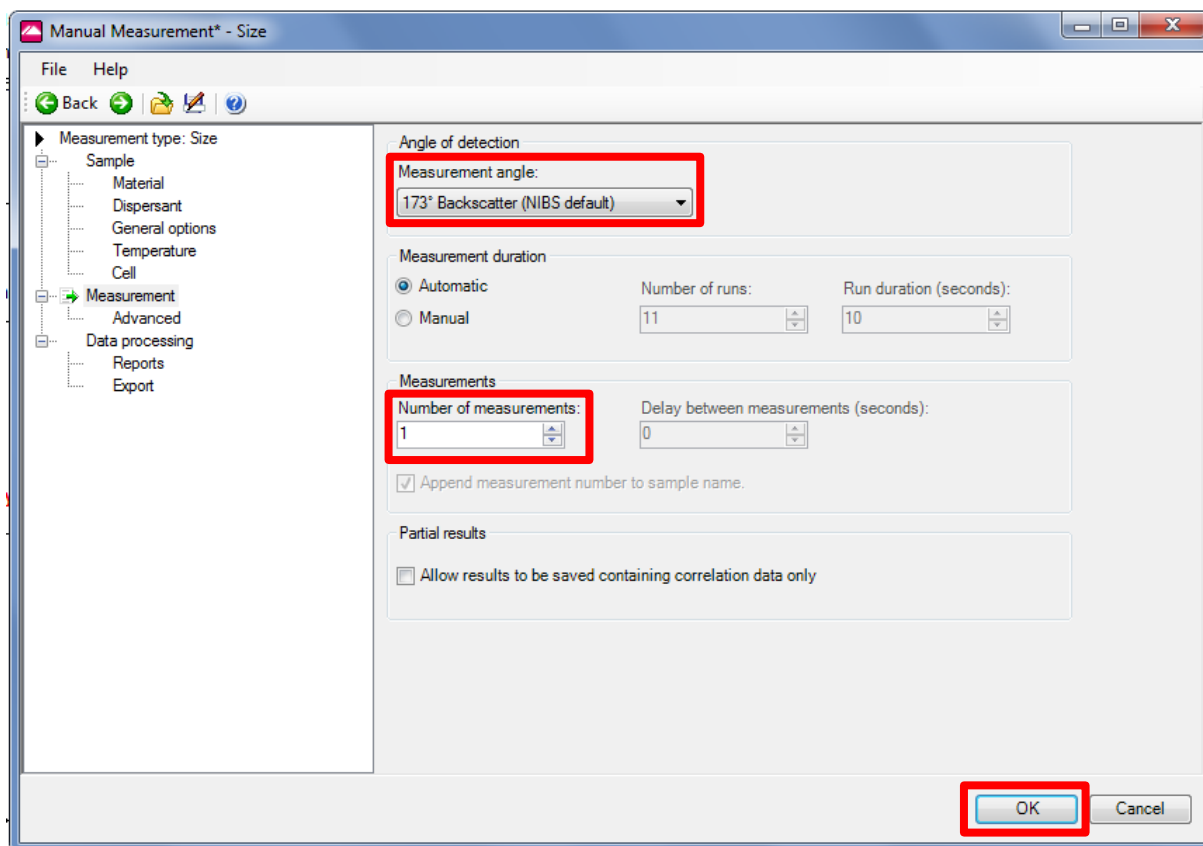
- Sample name (pojmenujte svůj vzorek; můžete přidat i poznámku, ale není nutné)
- Material: Curcumin
- Dispersant: Water
- Temperature: 25°C, equilibration time 0 s (vaše vzorky již mají pokojovou teplotu a tedy není nutno dlouho temperovat)



- Zvolte typ měřicí cely (Cell type): Disposable cuvettes, DTS0012

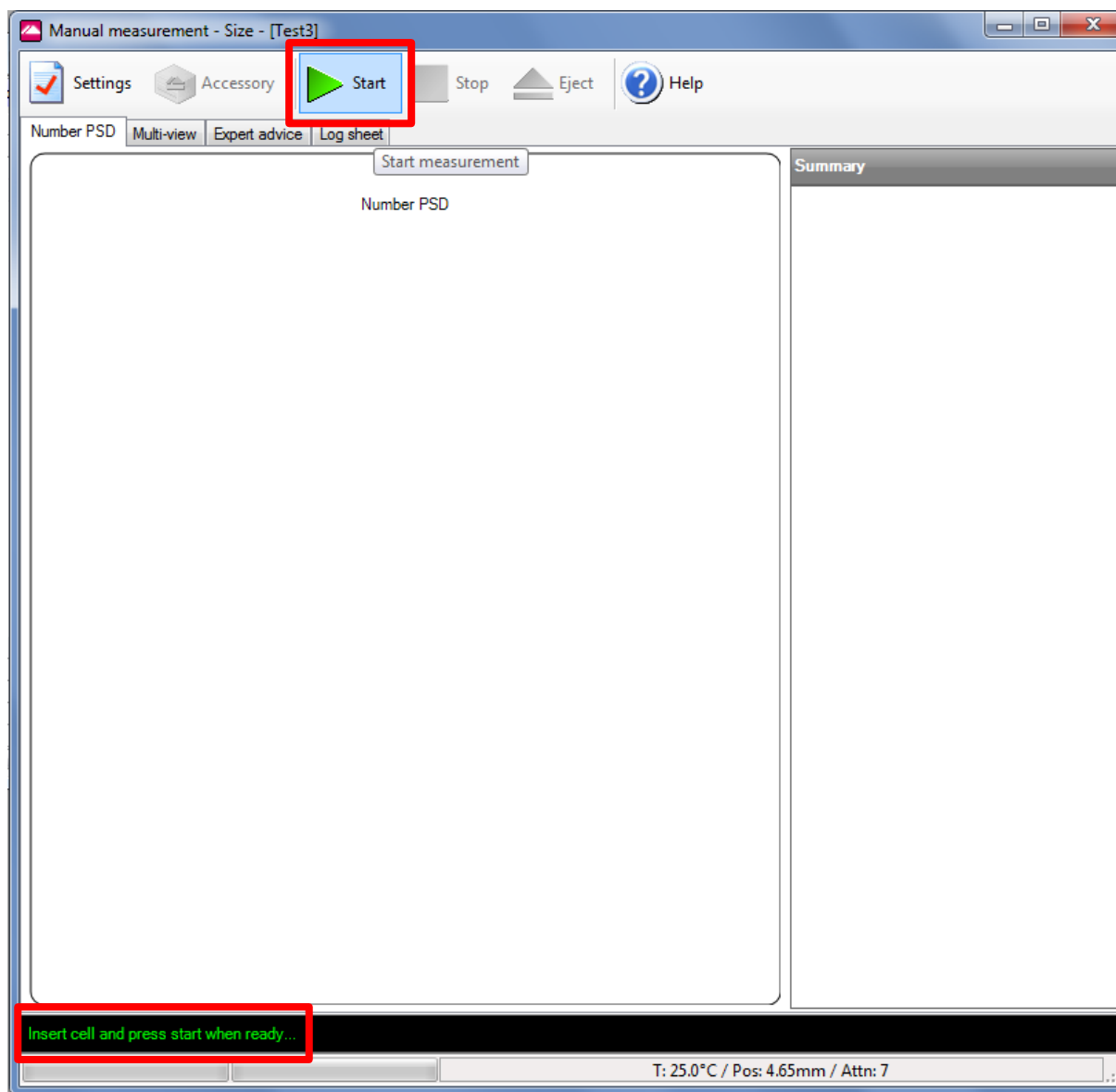


- Nastavte úhel měření: 173° Backscatter; počet měření: 1



- V poslední záložce DATA PROCESSING je přednastavena metoda General Purpose, tu neměňte.
- **Potvrďte vaše nastavení vpravo dolu tlačítkem OK** - toto okno se zavře a otevře se nové, měřící okno.

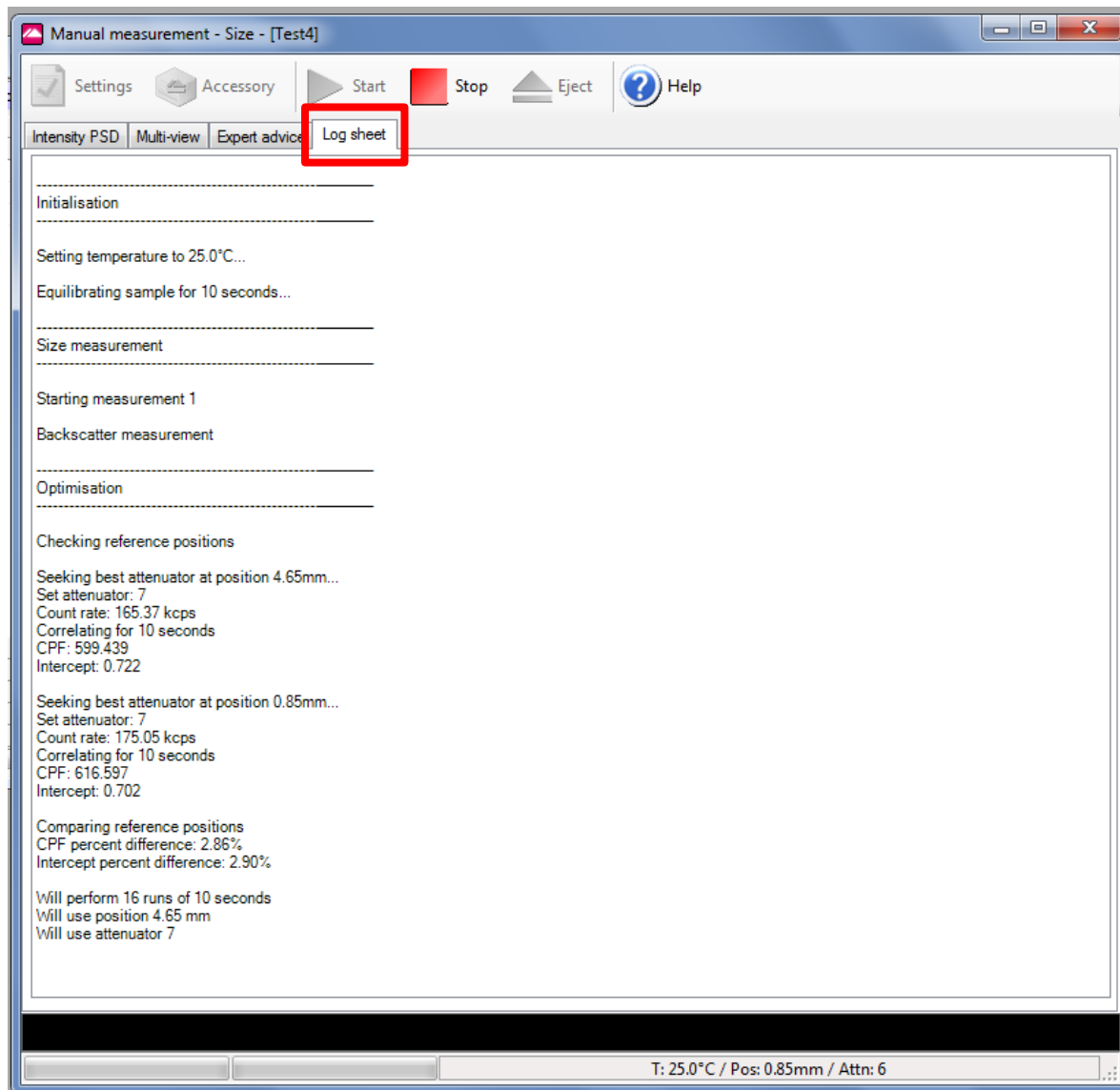
- Ujistěte se, že je kyveta s 1 mL vzorku správně vložena do přístroje (až na dno cely). Pro zahájení měření **klikněte na ikonu Start** v horní části okna. Úspěšné spuštění měření poznáte podle změněné hlášky vlevo dole.



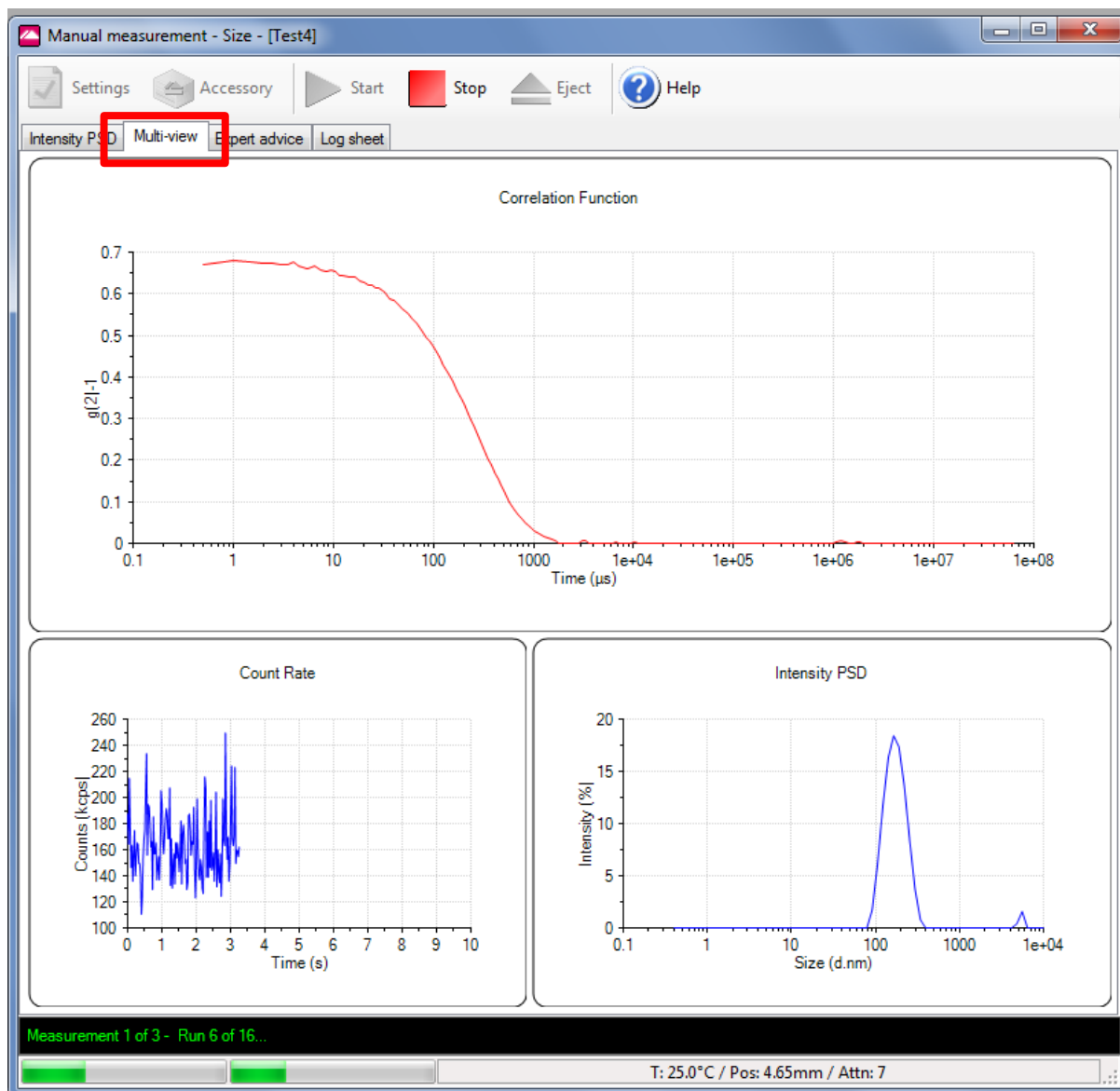
Po dokončení měření zavřete měřicí okno křížkem a celý postup (kroky 2 – 5) opakujte pro každé další měření.

6.4 Průběh měření a zobrazení výsledků

Po spuštění měření přístroj nejprve automaticky optimalizuje podmínky pro daný vzorek – například nastavení intenzity laseru. Průběh této optimalizace můžete sledovat v záložce Log sheet.

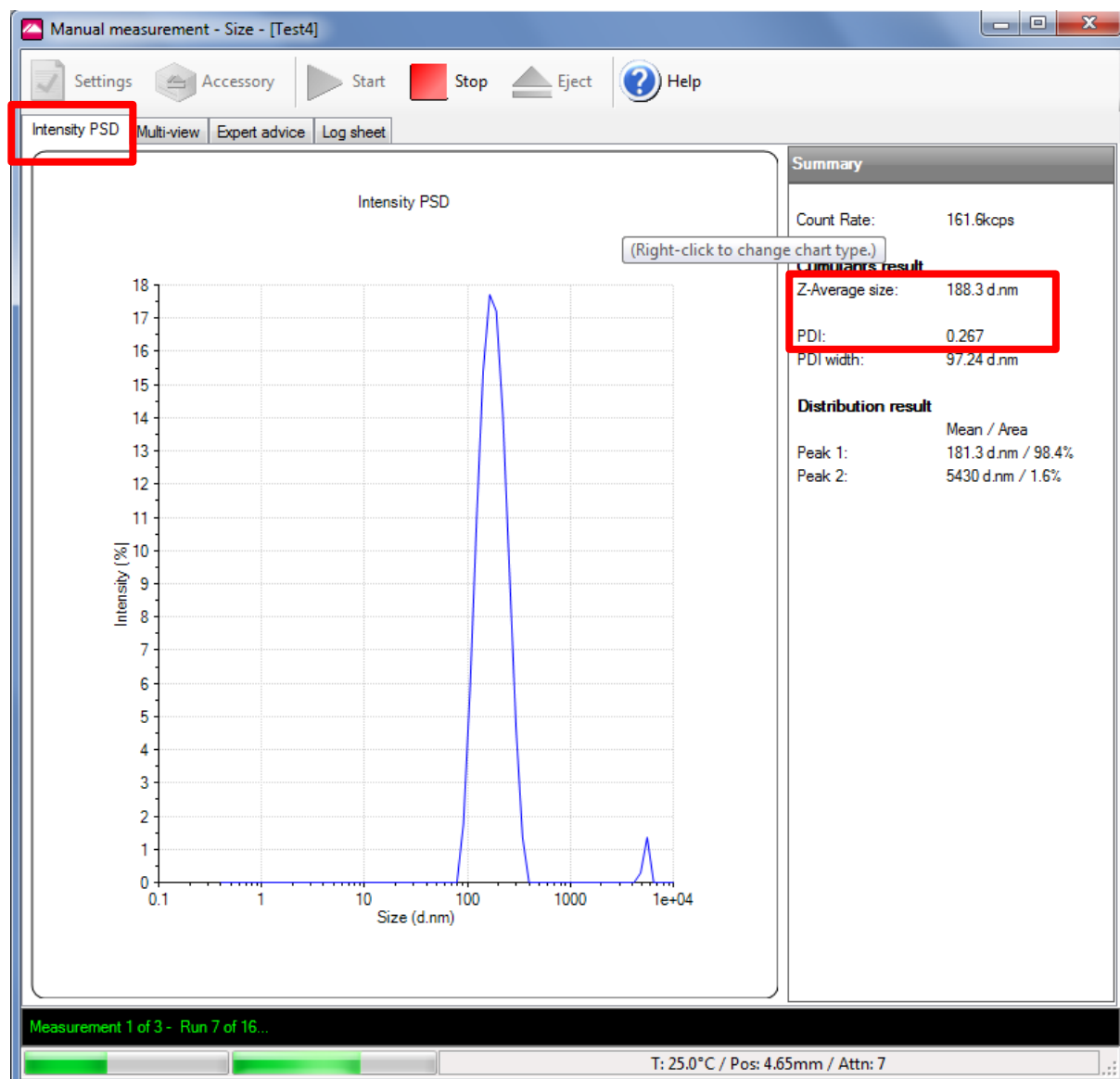


Jakmile je optimalizace dokončena, začne samotné měření. V záložce Multi-view lze sledovat vývoj korelační funkce, ze které software následně počítá velikost částic a index polydisperzity vzorku. Pro účely tohoto cvičení není nutné tyto grafy detailně vyhodnocovat, ale pokud vás zajímá, jak funguje jejich interpretace, podrobnější vysvětlení najdete v manuálu k přístroji Zetasizer[1] nebo ve výukových videích na YouTube[3].

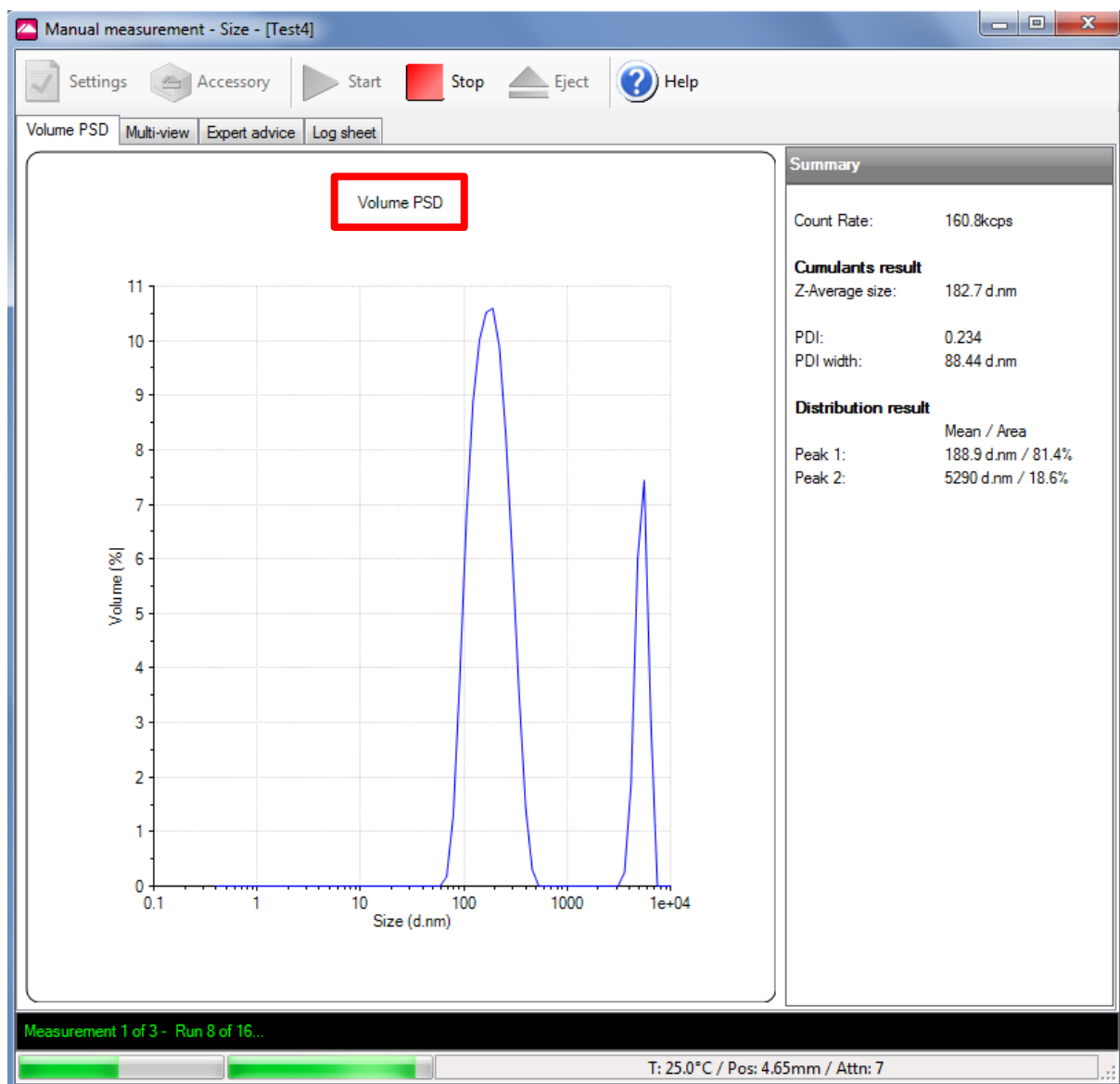


Ve výchozím nastavení se v přehledu výsledků zobrazuje distribuce vážená podle intenzity (Intensity weighted), a to v první záložce „Intensity PSD“. Pravým klikem jí můžete změnit na náhled distribuce objemové, nebo početní.

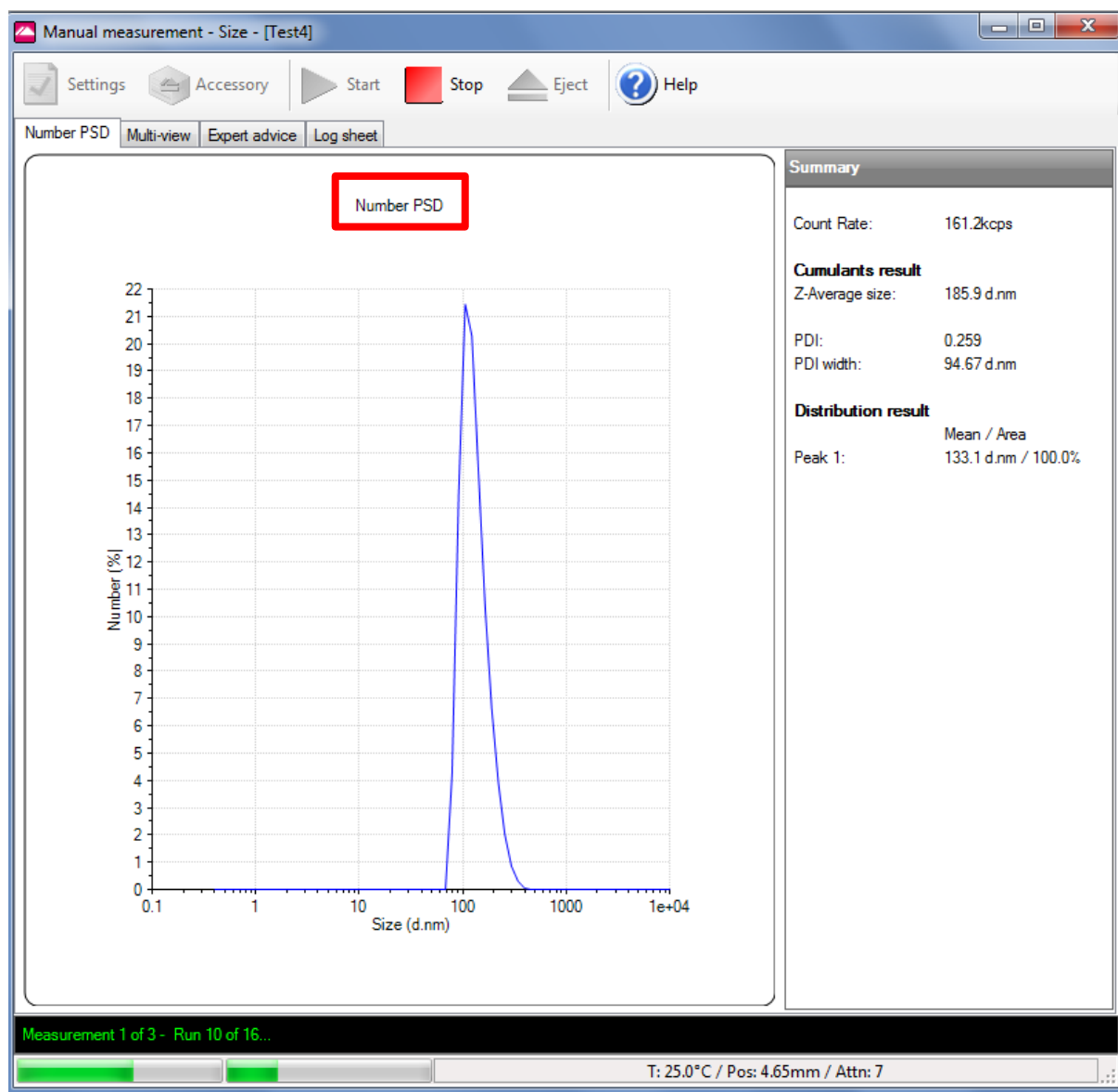
Napravo v okně se zobrazují hodnoty Z-average a PDI, které budete potřebovat do protokolu. Tyto hodnoty se během měření průběžně mění, proto počítejte až s těmi, které se uloží po dokončení měření – najdete je ve výpisu všech měření v tabulce souboru NanoMikro_2025.



Objemová distribuce:



Početní distribuce:



6. Zpracování dat

Výsledky každého měření se automaticky ukládají do databáze NanoMikro_25, takže si je během měření nemusíte zapisovat – o data nepřijdete. Na konci experimentu z tohoto souboru získáte hodnoty Z-average a indexu polydisperzity (PDI) pro všechny vzorky a přepište je do protokolu.

Ve výsledkové tabulce softwaru Zetasizer vyberte data odpovídající stejnému typu nanokrystalů a časovému bodu 60 minut. Označte je (pomocí Ctrl + kliknutí myši) a v horní liště okna zvolte jednotlivé typy distribucí. Pořídte snímky obrazovky (screenshoty) grafů intenzitní, objemové a početní distribuce právě z tohoto časového bodu.

Předem si připravte Wordový dokument a uložte jej na přenosný USB disk – počítač připojený k Zetasizeru nemá nainstalovaný Microsoft Office, a nový dokument v něm proto nelze vytvořit. Stávající dokumenty však lze otevřít a upravovat (např. vkládat screenshoty).

Do protokolu vkládejte grafy pořízené z měření po 60 minutách. Pro každý vzorek nanokrystalů do jednoho grafu proložte všechna měření v různých typech roztoků, aby byly vizuálně patrné rozdíly mezi jednotlivými podmínkami.

Po skončení experimentu vyfotografujte pomocí mobilního telefonu vzorek v deionizované vodě a dále ty vzorky, u kterých je pouhým okem patrná změna (např. zakalení nebo sedimentace). Fotografie přiložte do protokolu a jasně označte, který vzorek je který. Pro lepší viditelnost doporučujeme fotit proti světlu nebo na kontrastním pozadí.

7. Protokol

Protokol musí obsahovat vyplněné tabulky velikostí (Z-Ave, PDI, 0 min a 60 min pro oba typy krystalů) a grafy intenzitních, objemových a početních distribucí po 60 minutách u obou typů vzorků (screenshoty ze softwaru Zetasizer). Do protokolu dále přiložte fotografie vybraných vzorků po skončení experimentu (může jít o jednu fotografii doplněnou popisky).

V diskuzi se věnujte tomu, jakou koloidní stabilitu vzorky vykazovaly v jednotlivých typech roztoků, zda jste pozorovali rozdíly mezi různými stabilizátory nebo nikoliv, a dalším jevům, které jste během práce zaznamenali. Pokud vzorky během měření vykazují stabilitu, můžete v diskuzi uvést, že během 60 minut nedošlo k viditelné změně velikosti ani sedimentaci. Dlouhodobější sledování by však bylo nutné pro spolehlivé potvrzení koloidní stability, zejména s ohledem na možné pomalé agregace nebo změny v přítomnosti iontů. Zároveň uveďte případné změny oproti zadání, ke kterým došlo např. na doporučení asistenta.

V závěru stručně zhodnoťte, který vzorek vykazoval lepší stabilitu, zda a kdy docházelo k agregaci a sedimentaci, a proč. Diskutujte, jak se agregace projevila v měřeních DLS (vliv na velikost částic a PDI) a zda byla patrná i pouhým okem.

8. Kontrolní otázky

1. Co je to dynamický rozptyl světla (DLS) a k čemu se používá?
2. Co je to hydrodynamický průměr částic?
3. Proč je důležitá znalost iontové síly při hodnocení stability nanočástic?
4. Jaký je rozdíl mezi početní a objemovou distribucí velikosti částic?
5. Co znamená pojem monodisperzní a polydisperzní vzorek?
6. Jaký index polydisperzity (PDI) má vzorek obsahující pouze částice jedné (identické) velikosti?

Literatura

1. Malvern Instruments Ltd. 2003. *Zetasizer Nano Series User Manual*. [cited 2025; Available from: <https://physics.nyu.edu/grierlab/manuals/ZetasizerNanoUserManual.pdf>].
2. Malvern Panalytical. *Dynamic Light Scattering for size characterization of proteins, nanoparticles, polymers and colloidal dispersions*. [cited 2025; Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>].
3. Malvern Panalytical. *Introduction to Dynamic Light Scattering Analysis*. 2019; Available from: https://www.youtube.com/watch?v=ET6S03GeMKE&ab_channel=MalvernPanalytical].