



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE V SYSTÉMU IONOGENNÍ
TENZID/NEIONOGENNÍ
TENZID/POLYELEKTROLYT
Interaction in ionic surfactant/non-ionic
surfactant/polyelectrolyte system

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

DOMINIKA PIHÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0524/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Dominika Pihíková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová	

Název bakalářské práce:

Interakce v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid/polyelektrolyt

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o kombinaci ionogenních a neionogenních tenzidů a jejich interakcemi s opačně nabitými polyelektrolyty.
2. Seznámit se se stanovením agregačních vlastností tenzidů pomocí fluorescenční spektroskopie a navrhnout vhodnou metodu pro sledování vlastností agregujícího systému z hlediska formovaných nepolárních domén.
3. Provést základní experimenty studia agregace těchto nových tenzidů v různých prostředích a vliv koncentrace a molekulové hmotnosti hyaluronanu.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití systému v kosmetice a farmacii.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Dominika Pihíková
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byly zkoumány interakce v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid/polyelektrolyt. Pomocí fluorescenční spektroskopie byla stanovena hodnota CMC kationaktivního didecyldimethylamonium chloridu (DDAC) ve třech různých prostředích s použitím fluorescenčních sond (pyren, perylen, nilská červeň). Dále byla stanovena hodnota CMC neionogenního oktylphenol ethoxylátu (Triton X-100) pomocí pyrenu a perylenu jako fluorescenčních sond. Bylo zkoumáno agregační chování neionogenního a ionogenního tenzidu s přidavkem polyelektrolytu poly(4-styren sulfonátu) sodného (PSS) a nativního hyaluronanu ve vodném prostředí s použitím pyrenu jako fluorescenční sondy. Pomocí zhášení fluorescence bylo stanoveno agregační číslo v systému ionogenní/neionogenní tenzid. Jako zhášec byl použit cetylpyridium chlorid (CPC) a jako zhášená molekula pyren.

Bylo zjištěno, že v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid/polyelektrolyt docházelo k interakcím, což dokazuje i dvouzlomová sigmoidní křivka Boltzmannova typu. Přídavek nízkomolekulárního i vysokomolekulárního hyaluronanu neměl na hodnotu CMC v systému ionogenní/neionogenní tenzid významný vliv.

ABSTRACT

The interactions in an ionic surfactant/non-ionic surfactant/polyelectrolyte system have been studied in this bachelor thesis. The value of critical micelle concentration of cationic didecyldimethylammonium chloride (DDAC) has been determined in three different mediums by fluorescence spectroscopy using Pyrene, Perylene and Nile red as probes. The CMC value of non-ionic octylphenol ethoxylate (Triton X-100) has been determined using Pyrene and Perylene as probes. The aggregation behavior of non-ionic and ionic surfactant with addition of polyelectrolyte Poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) and native hyaluronan in aqueous solution has been investigated using Pyrene as a probe. Aggregation number in system of ionic/non-ionic surfactant has been determined by a fluorescence quenching with cetylpyridium (CPC) as a quencher and Pyrene as a fluorescence probe.

Interactions in ionic surfactant/non-ionic surfactant/polyelectrolyte system were observed. This result was proved by double sigmoid Boltzmann's type curve. The addition of low molecular as well as high molecular hyaluronan had no significant effect on CMC value of the system.

KLÍČOVÁ SLOVA

poly(4-styren sulfonát) sodný, hyaluronan, tenzidy, fluorescenční spektroskopie, pyren

KEY WORDS

poly(sodium 4-styrenesulfonate), hyaluronan, surfactants, fluorescence spectroscopy, pyrene

PIHÍKOVÁ, D. *Interakce v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid/polyelektrolyt*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 49 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využívána ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Tereze Halasové za odborný dohled, trpělivost a vstřícnost při řešení problémů. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině za podporu při studiu.

OBSAH:

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Luminiscenční spektrofotometrie	9
2.1.1	Historie luminiscence	9
2.1.2	Fotoluminiscence	9
2.1.3	Fluorescence	10
2.1.4	Fosforescence	11
2.1.5	Emisní a excitační spektrum	11
2.1.6	Kvantový výtěžek	11
2.1.7	Zhášení	12
2.1.8	Tvorba excimeru	12
2.1.9	Vnitřní filtrační efekt	12
2.2	Fluorescenční sondy	13
2.2.1	Pyren	13
2.2.2	Perylen	13
2.2.3	Nilská červeň	14
2.3	Asociativní micelární koloidy	14
2.3.1	Struktura a vlastnosti tenzidů	15
2.3.2	Klasifikace tenzidů	15
2.3.3	Micely a kritická micelární koncentrace	16
2.3.4	Velikost a tvar micel	17
2.4	Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek	18
2.5	Kyselina hyaluronová	18
2.5.1	Chemická struktura	18
2.5.2	Metabolismus hyaluronanu	19
2.5.3	Aplikace a vlastnosti kyseliny hyaluronové	19
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	20
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	Použité chemikálie	22
4.1.1	Polyelektrolyty	22
4.1.2	Fluorescenční sondy	22
4.1.3	Tenzidy	23
4.1.4	Zhášedce	23
4.1.5	Ostatní	23
4.2	Postup přípravy vzorků	24
4.2.1	Zásobní roztoky fluorescenčních sond	24
4.2.2	Zásobní roztoky fosfátového pufru a 0,15 M NaCl	24
4.2.3	Zásobní roztoky DDAC	24
4.2.4	Stanovení CMC DDAC	24
4.2.5	Zásobní roztoky Tritonu X-100	24
4.2.6	Příprava vzorků pro stanovení CMC Tritonu X-100	25
4.2.7	Agregační chování systému Tritonu X-100 a DDAC	25
4.2.8	Agregační číslo systému Tritonu X-100 a DDAC	25
4.2.9	Zásobní roztok PSS	25

4.2.10	Agregačního chování DDAC s přídavkem PSS ve vodě	25
4.2.11	Agregační chování Tritonu X-100 s přídavkem PSS ve vodě	26
4.2.12	Agregační chování systému Tritonu X-100 a DDAC s přídavkem PSS.....	26
4.2.13	Zásobní roztok 0,3 MDa HyA a 1,46 MDa HyA	26
4.2.14	Agregační chování systému Tritonu X-100 a DDAC s přídavkem HyA.....	26
4.3	Metody měření	26
4.3.1	Měření fluorescenčních spekter	26
4.4	Vyhodnocení dat	27
4.4.1	Stanovení CMC u vzorků obsahujících pyren.....	27
4.4.2	Stanovení CMC u vzorků obsahujících perylen a nilskou červeň	28
4.4.3	Stanovení agregacího čísla	28
4.4.4	Stanovení chyby měření	29
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	30
5.1	Stanovení CMC DDAC.....	30
5.1.1	CMC DDAC v prostředí vody, soli a pufru s pyrenem.....	30
5.1.2	CMC DDAC v prostředí vody, soli a pufru s perylenem.....	32
5.2	Stanovení CMC Tritonu X-100.....	34
5.3	Agregační chování systému Triton X-100 – DDAC	35
5.3.1	Zjišťování změny CMC Tritonu X-100 s přídavkem DDAC	35
5.3.2	Zjišťování agregacího čísla systému Triton X-100 – DDAC.....	36
5.4	Studium agregace systému s přídavkem PSS.....	37
5.5	Studium agregace systému s přídavkem hyaluronanu ve vodě.....	40
5.5.1	S přídavkem 0,3 MDa HyA.....	40
5.5.2	S přídavkem 1,46 MDa HyA.....	41
6	ZÁVĚR.....	42
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	46
8.1	Seznam zkratk	46
8.2	Seznam symbolů	46
9	PŘÍLOHY.....	48
9.1	Příloha 1	48
9.2	Příloha 2	48
9.3	Příloha 3	49

1 ÚVOD

Léčba rakovinného bujení je v dnešní době velmi zkoumané a diskutované téma. Pozornost vědců se vlivem potřeby získat vhodný cílený nosič léčiv obrací i ke kyselině hyaluronové, která, jakožto látka tělu vlastní, by tomuto účelu mohla do budoucna sloužit. Nástup koloidových nosičových systémů jde ruku v ruce s jejich vhodným cíleným transportem v lidském organismu, jenž by omezil plošný devastující dopad užitých chemoterapeutik na pacienta, která sice dokáže rakovinnou buňku zničit, ale ničí také ostatní buňky těla, čímž se zhoršuje celkový zdravotní stav pacienta.

Další výhoda nového nosičového systému je fakt, že kyselina hyaluronová je ve vodě rozpustná, což je žádoucí, jelikož lidské tělo je přibližně ze 70% tvořeno vodou. Nevýhodou vlastností většiny současných léčiv je nerozpustnost ve vodě. U soudobé onkologické léčby pomocí chemoterapeutik hrozí nebezpečí, že se tělo stane k léčivu rezistentní. Současná farmaka jsou z těla rychle vylučována, a proto se musí opakovaně dodávat, aby byla udržena účinná koncentrace.

Idea nového nosičového systému je založena na tom, že se na kyselinu hyaluronovou naváže látka, která je schopna léčivo nést. Kyselina hyaluronová se totiž ve značné koncentraci vyskytuje právě v rakovinné buňce a díky ní je umožněna i metastáza rakovinných buněk. Vhodnou alternativou by mohly být tenzidy, které by se měly být schopny navázat na karboxylové skupiny kyseliny hyaluronové. Díky amfifilnímu charakteru tenzidů by mohlo být v hydrofobní části rozpuštěno léčivo a v hydrofilní části navázán hyaluronan. Tento komplex hyaluronanu a vhodného tenzidu by byl schopen dopravit léčivo k postiženému místu a zajistil by cílené léčení rakovinného bujení.

K plné funkčnosti nového nosičového systému je potřeba mnoha vlastností, jako biokompatibilita, biodegradabilita, schopnost interagovat se specifickým místem, schopnost nést látku požadované povahy a další. Cílem současného zkoumání je tedy nalézt vhodný komplex hyaluronanu a tenzidu, který by tyto požadavky splňoval a způsobil značný rozvoj v léčbě rakovinného onemocnění.

Kyselina hyaluronová, jakožto jedinečný biopolymer lidského těla, zajišťuje také hydrataci pokožky, hojení ran apod. Je ve značné míře obsažena v očním sklivci, kůži, svalech či synoviální tekutině. Je využívána v pestré škále oborů, např. oftalmologie, ortopedie, revmatologie či v kosmetickém průmyslu. V kosmetické oblasti je využívána hlavně díky své specifické funkci vázat na sebe vodu, a proto se používá k vyhlazování vrásek či v jiných kosmeticko-chirurgických zákrocích [20].

Tato bakalářská práce je zaměřena na výzkum interakcí v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid/polyelektrolyt pomocí fluorescenční spektrofotometrie. Ionogenní tenzid zastupuje didecyldimethylamonium chlorid (DDAC) (kationaktivní), jako neionogenní tenzid byl použit oktylphenol ethoxylát (Triton X-100) a jako polyelektrolyt byl použit poly(4-styrensulfonyl) sodný (PSS). Nejdříve byla určována kritická micelární koncentrace jednotlivých tenzidů v prostředí vody, 0,15 M roztoku NaCl a fosfátovém pufru (PBS) s použitím fluorescenčních sond (pyren, perylen, nilská červec). Následně bylo zkoumáno agregační chování směsi neionogenního - ionogenního tenzidu bez a s přídavkem PSS v prostředí vody. V systému Triton X-100 – DDAC bylo zjišťováno agregační číslo pomocí metody zhášení fluorescence. V poslední části této práce byl zkoumán systém neionogenního - ionogenního tenzidu s přídavkem nativního hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech. Systém neionogenní - ionogenní tenzid byl navrhnout tak, aby

neionogenní Triton X-100 byl přidáván ve vzrůstajícím množství dle koncentrační řady a kationaktivní DDAC byl do systému dodáván v konstantním množství. Cílem této práce bylo získat poznatky o uvedených systémech s ohledem na jejich možné využití jako cílených nosičů léčiv.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Luminiscenční spektrofotometrie

2.1.1 Historie luminiscence

V přírodě se s luminiscencí lidstvo setkává již od samého počátku. Jako příklady jejích projevů v přírodě můžeme uvést např. polární záři, schopnost některých živočichů ve tmě světélkovat či některé fosforeskující dřeviny. Jako první použil termín „luminescenz“ německý fyzik Eilhard Wiedemann v roce 1888 [1]. Co se týče fluorescence, za zakladatele fluorescenční vědy mnozí považují Athanasia Kirche, který napsal knihu 'Ars Magna Lucis et Umbrae' [2]. V roce 1852 aplikoval sir George Stokes vědeckou metodu fluorescence a definoval Stokesův zákon fluorescence, který říká, že vlnová délka emise fluorescence musí být větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla. Fluorescencí atomů se také začali zabývat fyzici na konci 19. a na začátku 20. století. První poznatky shrnuli Mitchell, Zemansky a Pringsheim [2] [3].

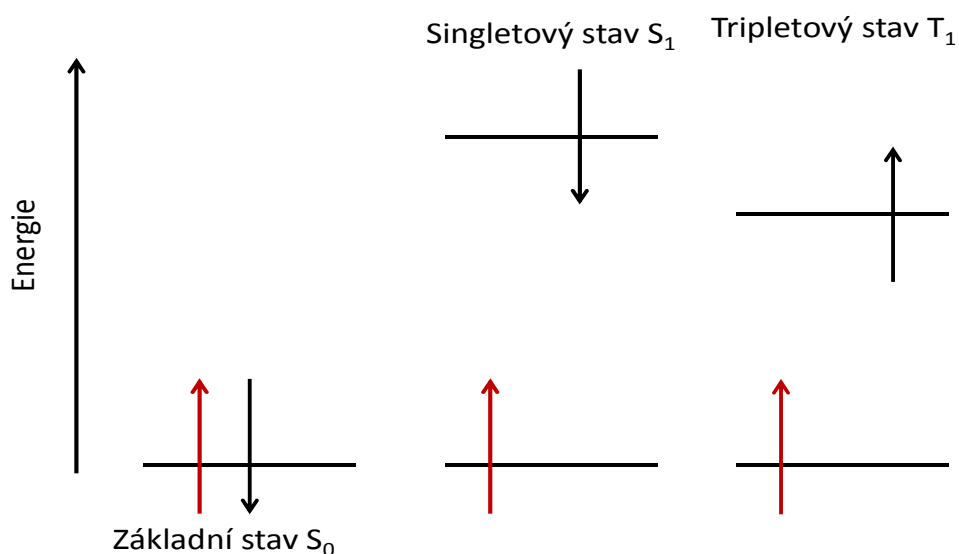
2.1.2 Fotoluminiscence

Po absorpci určitého kvanta energie (světla) se dostává organická molekula ze základního stavu (S_0) do stavu excitovaného, přičemž vzbuzený elektron přechází do nejbližšího volného orbitalu s vyšší energií. Emise fotonů doprovázející deexcitaci se nazývá fotoluminiscence.

Obecně elektronové stavy dělíme dle multiplicity na stavy singletové a tripletové. V případě singletových stavů (S_1 , S_2 , S_3 , atd.) jsou spiny elektronů orientovány antiparalelně, v tripletových stavech (T_1 , T_2 , T_3 , atd.) jsou spiny elektronů v poloze paralelní (**Obr. 1**). Z kvantově-mechanického hlediska jsou pravděpodobnější i energeticky výhodnější singletové stavy.

Fotoluminiscenci dělíme na:

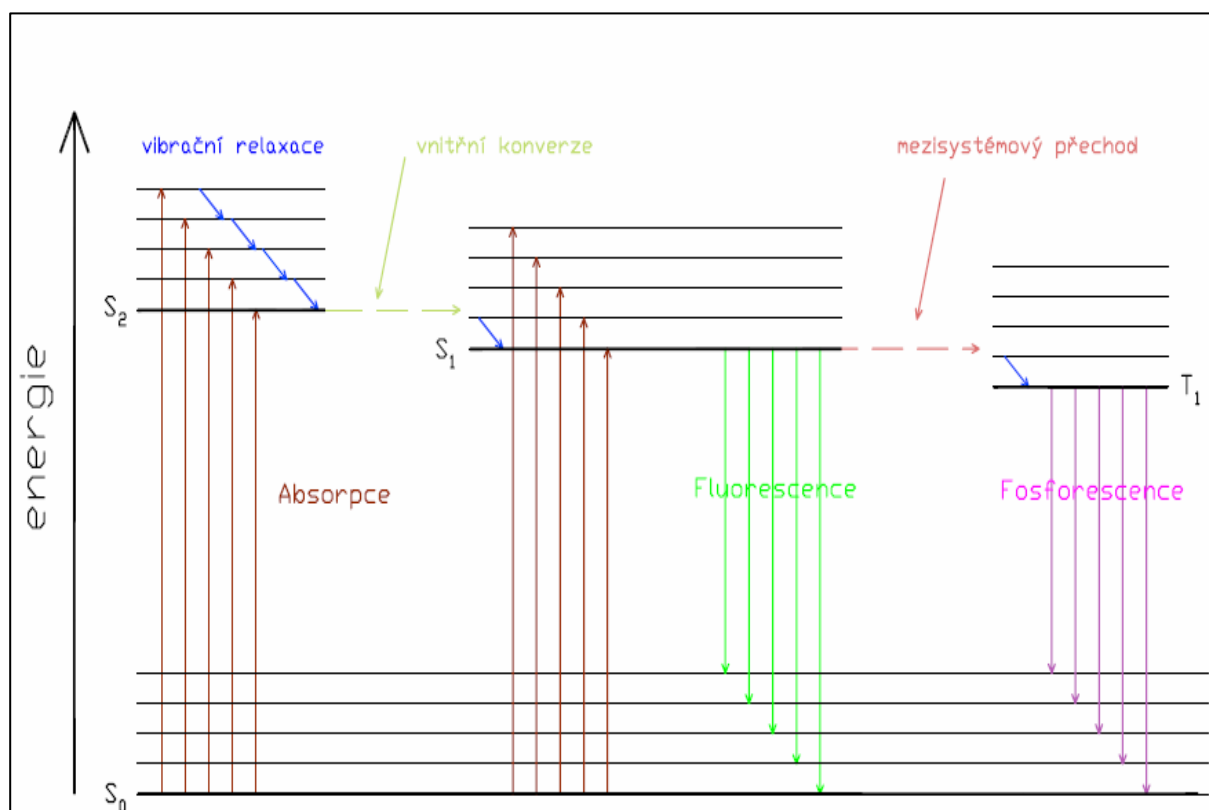
- Fluorescenci
- Fosforencenci



Obr. 1 – Schéma základních excitovaných stavů

Jabloňského diagram (**Obr. 2**) ilustruje zářivé i nezářivé přechody mezi elektronově vibračními hladinami molekuly. Molekula obvykle přejde z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (fotoluminiscence) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, vibrační relaxace, mezisystémový přechod). Doba trvání τ jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro vibrační relaxaci $10^{-12} - 10^{-13}$ s, pro vnitřní konverzi $10^{-6} - 10^{-12}$ s, pro mezisystémový přechod $10^{-4} - 10^{-12}$ s [4].

Zářivý přechod je děj, při kterém se excitovaná molekula vrací do základního stavu za současného vyzáření světelného kvanta energie (fotonu). Během zářivých přechodů se může elektron vrátit do základního stavu pouze z nejnižší vibrační hladiny stavu excitovaného. Je-li elektron ve vyšší vibrační hladině excitovaného stavu, dochází k *vibrační relaxaci*, což je proces přechodu z vyšších vibračních hladin do nižších vibračních úrovní. *Vnitřní konverze* je nezářivý přechod mezi dvěma elektronovými hladinami se stejnou multiplicitou. V případě přechodu z excitačního stavu S_1 do excitačního stavu T_1 , hovoříme o *mezisystémovém přechodu*. Tento jev je přechodem mezi dvěma izoenergetickými úrovněmi, kterým náleží elektronové stavy s odlišnou multiplicitou [5].



Obr. 2 – Jabloňského diagram

2.1.3 Fluorescence

U fluorescenčních jevů dochází po excitaci atomu k přechodu elektronu z excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 (deexcitace) za současného vyzáření fotonu (**Obr. 2**). Fluorescence je přechod spinově povolený a oproti fosforescenci rychlejší ($10^{-7} - 10^{-10}$ s). Singletové stavy mají vyšší energii než stavy tripletové, což má za důsledek emisi záření o kratší vlnové délce, než při fosforescenci.

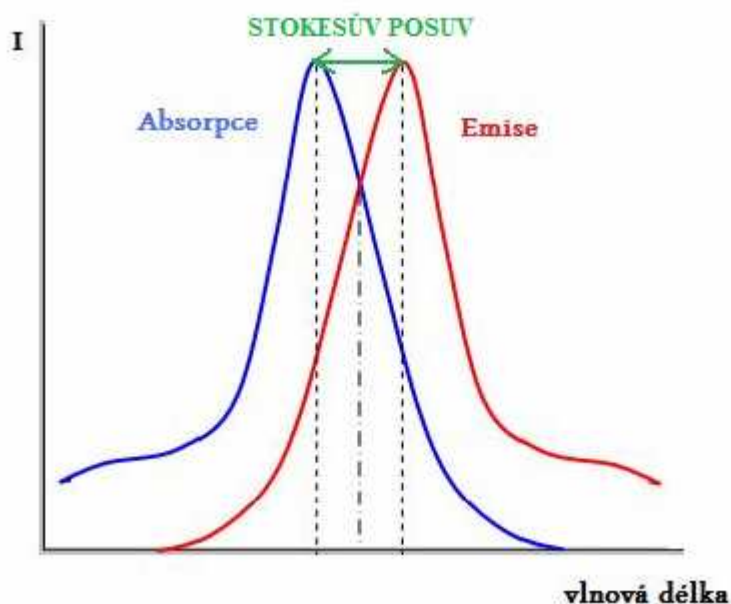
2.1.4 Fosforescence

Fosforescenci řadíme spolu s fluorescencí k zářivým přechodům. U fosforescence přechází elektrony z hladiny T_1 do základního stavu S_0 (**Obr. 2**), přičemž přechod je spinově zakázaný a pomalejší ($10^{-6} - 10^{-2}$ s). Delší doba života oproti fluorescenci je přímý důsledek kvantově zakázaného zářivého přechodu $T_1 \rightarrow S_0$, ve kterém dochází ke změně multiplicity.

2.1.5 Emisní a excitační spektrum

Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce budícího záření a excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Mezi absorpčním a fluorescenčním pásem má platnost zrcadlová symetrie, která se vyskytuje u mnoha organických molekul a je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost [4]. S tímto souvisí Stokesův posuv, což je rozdíl vlnových délek emisního a absorpčního maxima (**Obr. 3**).



Obr.3 – Stokesův posuv

2.1.6 Kvantový výtěžek

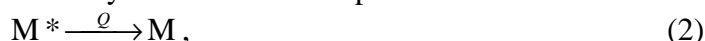
Kvantový výtěžek či kvantovou účinnost luminiscence definujeme pomocí následujícího vztahu:

$$\eta = \frac{1 + \tau_r}{1/\tau_r + 1/\tau_{nr}} \leq 1, \quad (1)$$

tj. poměr pravděpodobností zářivé kombinace ku pravděpodobnosti celkové rekombinace. U silně luminiskujících látek je $\tau_r \ll \tau_{nr}$ (τ_r = doba zářivé rekombinace, τ_{nr} = doba nezářivé rekombinace), to tedy znamená, že dané vzbuzené centrum s mnohem vyšší pravděpodobností přejde do základního stavu s vyzářením fotonu, nežli přechodem nezářivým [6].

2.1.7 Zhášení

Zhášení fluorescence je jakýkoliv proces, který vede k snížení fluorescence, tedy ke snížení kvantového výtěžku fluorescence beze změny fluorescenčního spektra.



kde M^* = excitovaný stav,

M = základní stav,

Q = zhášec

Ve fluorescenční spektrofotometrii rozlišujeme zhášení dynamické a statické. *Dynamické* (srážkové) zhášení probíhá v případě deaktivace fluoroforu v excitovaném stavu srážkou s molekulou zhášeče [4]. Při srážkovém zhášení tedy dochází ke kolizním střetům mezi fluoroforem v excitovaném stavu a molekulou zhášeče, přičemž fluorofor se následně navrácí do základního stavu. Během kolizního zhášení nedochází u molekul k chemickým změnám. Snížení intenzity fluorescence srážkovým zhášením popisuje Stern-Volmerova rovnice:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q], \quad (3)$$

kde Φ_0 je kvantový výtěžek bez přítomnosti zhášeče, Φ je kvantový výtěžek v přítomnosti zhášeče, K je Stern-Volmerova konstanta, k_q je bimolekulární zhášecí konstanta, τ_0 je doba života excitovaného stavu bez přítomnosti zhášeče a $[Q]$ je koncentrace zhášeče. Jako kolizní zhášec funguje velká řada molekul, mezi něž také patří např. molekulární kyslík, akrylamid, halogeny, amidy, aj [7] [8].

U *statického* zhášení dochází k navázání molekul fluoroforu na molekuly zhášeče a vytváří se komplex, který nefluoreskuje [4].

Během fluorescence může nastat i samozhášení. Tento typ zhášení je způsoben fluoroforem samotným a nastává při vysokých koncentracích.

2.1.8 Tvorba excimeru

Excimer neboli excitovaný dimer vzniká v důsledku srážky mezi excitovanou molekulou a identickou neexcitovanou molekulou, čili molekulou v základním stavu. Tvorbu excimeru popisuje následující schéma:



kde M^* je excitovaná molekula, M představuje molekulu v základním stavu a D^* je excitovaný dimer.

Tvorbě excimerů podléhá mnoho aromatických uhlovodíků, např. pyren či naftalen, přičemž emise excimeru se nachází ve vyšších vlnových délkách než emise monomeru a excimerový pás nevykazuje vibrační strukturu [5]. Doba života excimeru je velmi krátká, obvykle v řádech nanosekund.

2.1.9 Vnitřní filtrační efekt

Vnitřní filtrační efekt je jev snižující intenzitu fluorescence. Rozlišujeme dva druhy vnitřního filtračního efektu:

- Vnitřní filtrační efekt prvního druhu – detekční systém fluorescenčního spektra detekuje emisi záření pouze ze střední části kyvety. Při dopadu záření se vlivem absorpce části fotonů dostane do centrální části kyvety mnohem menší počet fotonů. Tento jev se nazývá vnitřní filtrační efekt prvního druhu, při kterém dochází ke snížení intenzity fluorescence.

- Vnitřní filtrační efekt druhého druhu – dochází k reabsorpci fotonů fluorofory, přičemž dochází k excitaci molekul a následné emisi fotonů do různých směrů.

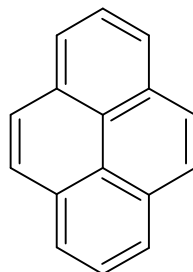
2.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou chemické sloučeniny, přesněji fluorofory, které jsou schopny fluoreskovat. Většina experimentů je prováděna s nekovalentně asociujícími sondami. Je známo velké množství sond, jejichž fotofyzikální vlastnosti jsou závislé na různých vlastnostech prostředí (polarita, pH, viskozita, aj.). Využití fluorescenčních sond je široké, používají se převážně v molekulárně biologických, biochemických či biomedicínkách disciplínách [8].

2.2.1 Pyren

Pyren je jednou z nejpoužívanějších fluorescenčních sond. Je to polycyklická aromatická látka s vysokou symetrií. Při zpracování měření s pyrenem využíváme emisního polaritního indexu (EmPI), který zobrazuje polaritní vlastnosti v okolí pyrenu. EmPI je polaritní index získaný z poměru intenzit fluorescence z emisního spektra při vlnových délkách prvního I_1 a třetího I_3 maxima. $I_1(I_M)$ je hodnota prvního vibračního pásu emisního spektra vyskytující se u vlnové délky 373 nm. Hodnota třetího vibračního pásu I_3 je lokalizována u vlnové délky 383 nm. Vyšší hodnota EmPI se vyskytuje v polárním prostředí, v nepolárním prostředí se hodnota snižuje. Při vyhodnocování měření se také používá hodnota excitačního polaritního indexu (ExPI), tedy polaritního indexu získaného z poměru intenzit fluorescence z excitačního spektra při vlnových délkách 333 nm a 338 nm., přičemž reakce na polaritu je totožná jako u EmPI.

Dále se zjišťuje intenzita fluorescence při vlnové délce 470 nm (I_E), což je maximum typické pro excimer. Tvorba excimeru při měření s pyrenem nastává v okamžiku zakoncentrování molekul pyrenu v micelách. Během tvorby micel, tedy v okolí kritické micelární koncentrace, má hodnota intenzity fluorescence emisního spektra při vlnové délce 470 nm nejvyšší hodnotu. Po překročení CMC hodnota I_E klesá z důvodu dalšího nárůstu micel. V systému dochází k vícenásobnému obsazení micel pyrenem, což má za následek i snížení pravděpodobnosti vzniku excimeru. Poměr intenzity fluorescence excimeru ku intenzitě fluorescence monomeru (I_1) z emisního spektra (Ex:Mo) se proto taktéž využívá při zpracování.

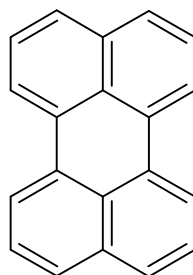


Obr. 5 – Strukturní vzorec pyrenu

2.2.2 Perylen

Perylen je polycyklický aromatický uhlovodík s velmi nízkou rozpustností ve vodě. Je hojně využíván jako fluorescenční sonda lipidů a vykazuje modrou fluorescenci. Co se týče

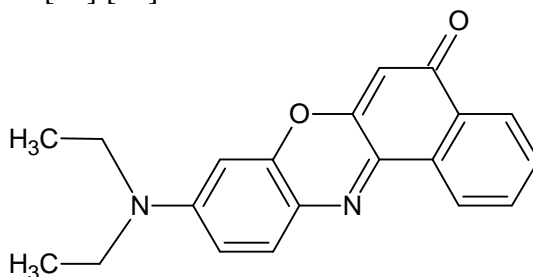
struktury, je podobný pyrenu a 1,12-benzperylenu [9]. Jeho absorpční maximum se pohybuje okolo 434 nm a emituje při 440 nm.



Obr. 6 – Strukturní vzorec perylenu

2.2.3 Nilská červeň

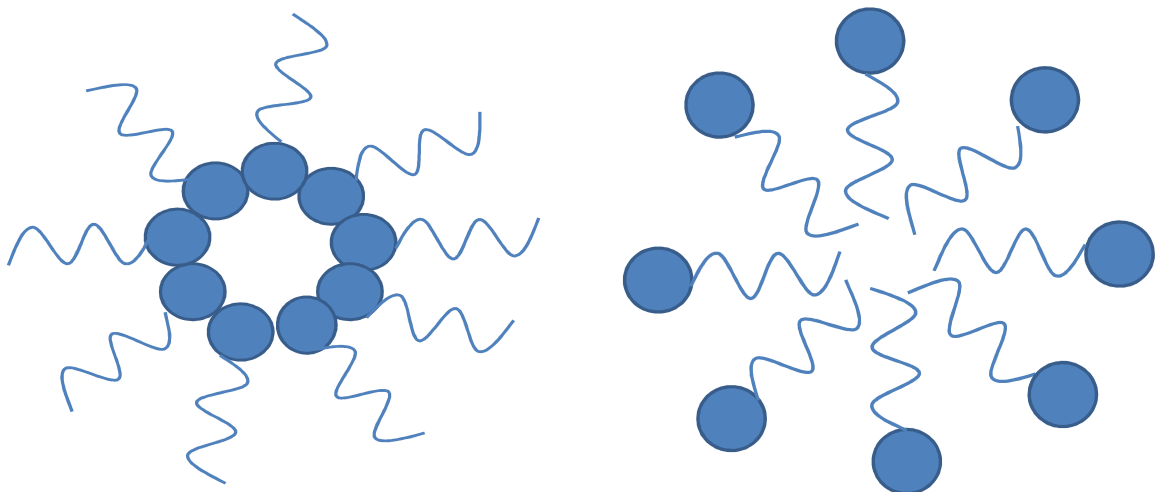
Nilská červeň je fluorescenční sonda reagující na zvyšující se polaritu prostředí posunem emisního maxima k vyšším vlnovým délkám. Emisní maximum se v polárním prostředí pohybuje okolo 640 - 650 nm. Bylo zjištěno, že nilská červeň je dobře rozpustná a silně fluoreskující v organických rozpouštědlech, nicméně ve vodném prostředí je zhasena. Díky své rozpustnosti v lipidech může nilská červeň sloužit jako výborná fluorescenční sonda lipidů a používá se pro detekci intracelulárních lipidů pomocí fluorescenční spektrofotometrie a průtokové cytofluorometrie [10] [11] .



Obr. 7 – Strukturní vzorec nilské červeně

2.3 Asociativní micelární koloidy

Asociativní micelární koloidy jsou povrchově aktivní látky (PAL), jsou tedy schopny se adsorbovat na mezifázová rozhraní a řadí se k lyofilním soustavám. PAL neboli tenzidy mohou vytvářet koloidní systémy – micely, které vznikají vratnou asociací z pravých roztoků některých nízkomolekulárních látek [12]. Od lyofobních micel se liší tím, že nepotřebují umělou stabilizaci, jejich velikost, koncentrace i fyzikální vlastnosti jsou určeny okamžitými stavovými veličinami, nikoliv minulostí systému [13]. Tenzidy mají široké využití hlavně díky své čistící a smáčecí funkci. Setkáváme se s nimi každý den, ať už v podobě šampónů, mýdel, zubních past nebo pracích a čistících prostředků.



Obr. 8 – Struktura micely (inverzní micela, normální micela – zleva)

2.3.1 Struktura a vlastnosti tenzidů

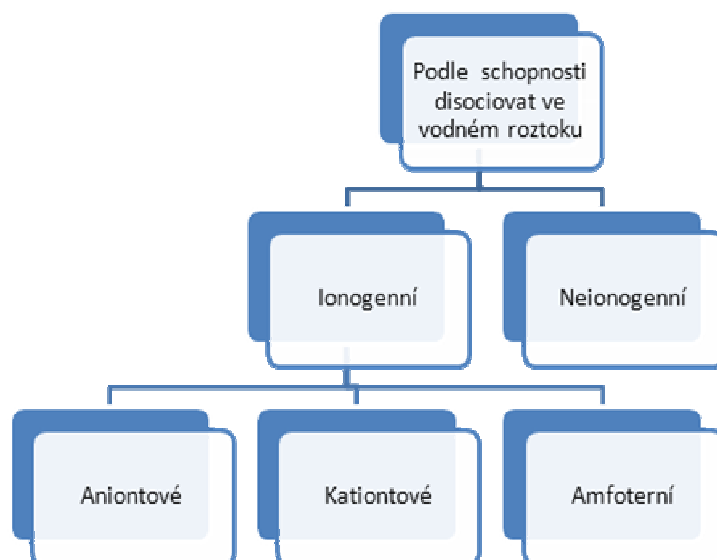
Tenzidy mají amfifilní (amfipatickou) strukturu, to znamená, že musí obsahovat část lyofilní, která má tendenci se v daném prostředí rozpouštět, a část lyofobní, která se v daném prostředí nerozpouští. Budeme-li uvažovat micely vznikající asociací nízomolekulárních látek ve vodném prostředí, hovoříme o části hydrofilní (polární) a části hydrofobní (nepolární) (**Obr. 9**). Polární část (hlava) musí obsahovat silně polární hydrofilní skupiny, které zajišťují rozpustnost ve vodě a nepolární část (chvost) musí mít dostatečně dlouhý uhlíkový řetězec, aby docházelo k asociaci. Hydrofobní konec je obvykle tvořen z 8-18 uhlíků a může být aromatický, alifatický nebo směs obou typů. Zdrojem hydrofobních částí jsou obvykle přírodní tuky a oleje, ropné frakce, relativně krátké syntetické polymery nebo syntetické alkoholy s relativně vysokou molekulovou hmotností [14].



Obr. 9 – Struktura micely – hydrofobní část + hydrofilní část (zleva)

2.3.2 Klasifikace tenzidů

Tenzidy dělíme podle schopnosti disociovat ve vodném roztoku na ionogenní a neionogenní (neutrální) tenzidy



Obr.10 – Klasifikace tenzidů

Anionaktivní tenzidy nesou po disociaci záporný náboj a disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Nejvýznamnějším představitelem je skupina COO^- , která je příčinou rozpustnosti ve vodě. Také silně kyselá skupina – SO_3H je ve vodě dostatečně disociována, takže nejen soli alkylsulfonových kyselin, ale i tyto kyseliny samotné tvoří micely. Např. stearan sodný $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COO}^- \text{Na}^+$ [13] [15].

Kationaktivní tenzidy tvoří při disociaci ve vodě povrchově aktivní kationy, které nesou kladný náboj. Tvoří zhruba 10 % celosvětové produkce tenzidů. Např. triethylhexydecylamoniumbromid. $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+ \text{Br}^-$ [16].

Amfoterní tenzidy mají podle pH prostředí kladný nebo záporný náboj.

Neionogenní tenzidy jsou neschopné elektrolytické disociace a obvykle se skládají z dlouhého uhlovodíkového řetězce s několika polárními, ale neionogenními skupinami na konci, které zajišťují rozpustnost těchto sloučenin [13] [17].

2.3.3 Micely a kritická micelární koncentrace

Micely jsou supramolekulární agregáty vznikající z pravých roztoků nízkomolekulárních látek. Ve vodném prostředí jsou vznikající micely formovány tak, aby polární část byla na vnějším povrchu micely a nepolární hydrofobní část byla uvnitř agregátu. Toto má za následek, že celá micela se jeví jako rozpustná, ale uvnitř micely v hydrofobní oblasti jsou schopny se rozpouštět molekuly ve vodě nerozpustné. Při určité koncentraci nastávají na křivkách koncentračních závislostí různých fyzikálně-chemických vlastností více či méně ostré zlomy. Hovoříme o kritické micelární koncentraci (CMC), což je nejvyšší možná koncentrace, při níž je PAL v roztoku v převážně molekulové formě. Při překročení CMC se v roztoku začínají samovolně tvořit micely.

Hodnota kritické micelární koncentrace je ovlivnitelná mnoha faktory. Jedním z nich je struktura uhlovodíkového řetězce a sice tak, že CMC s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá. Dále CMC závisí na teplotě a tlaku, na vlastnostech hydrofobní a hydrofilní skupiny i opačně nabitých iontů [13] [15].

Za základní příčinu vzniku agregátů z uhlovodíkových řetězců ve vodných roztocích jsou považovány velké kohezní síly mezi molekulami vody, které jsou daleko vyšší než vzájemná přitažlivost uhlovodíkových řetězců i přitažlivost mezi molekulami vody a uhlovodíkovými řetězci. Molekuly vody jakoby vytěsňují molekuly uhlovodíkových řetězců, což je spojeno

s poklesem Gibbsovy energie soustavy. Jedná-li se o ionogenní PAL, polární skupiny disociují. Vznikají nabité micely obklopené elektrickou dvojrůstvou tvořenou vzniklými protiionty [13].

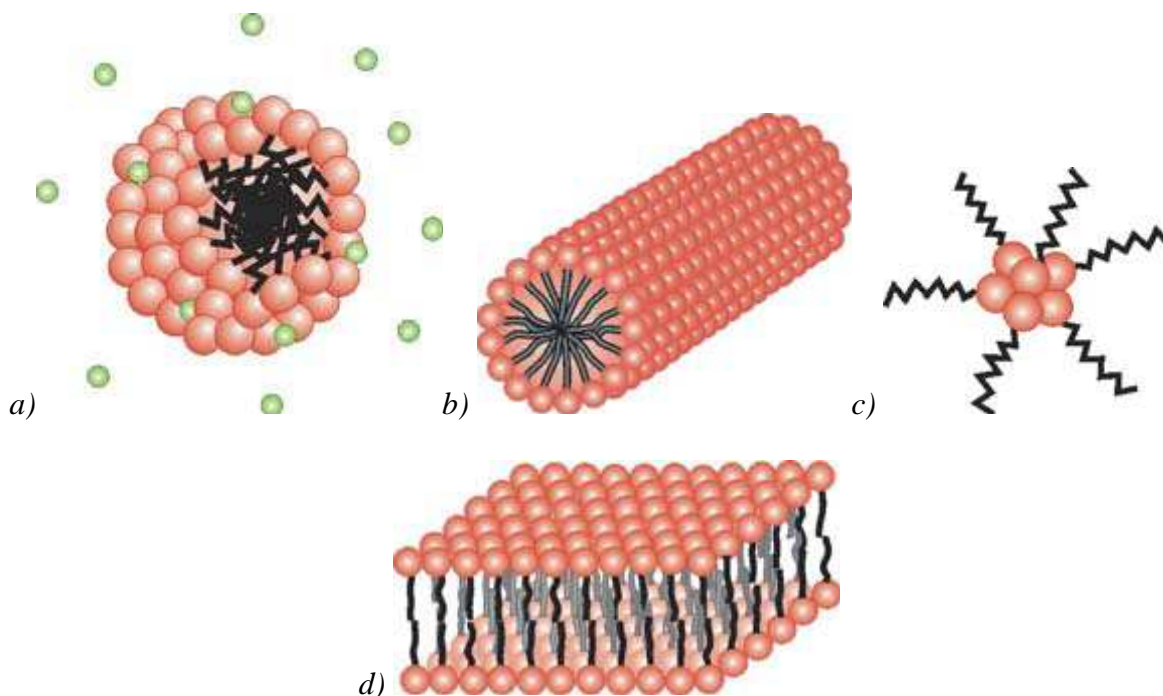
Jsou známy i případy micel tvořících se v nevodném prostředí – vznikají tzv. obrácené micely, jejichž jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí [13].

Agregační neboli asociační číslo udává kolik molekul PAL vytvoří micelu. Hodnota agregačního čísla je rozdílná u běžných micel a u obrácených micel, přičemž u běžných micel se pohybuje kolem 100 i více, kdežto u obrácených micel zpravidla nebývá větší než 10.

2.3.4 Velikost a tvar micel

Velikost a tvar micel závisí na koncentraci, teplotě, molekulární struktuře PAL aj. a existuje několik typů micel.

- Hartleyovy micely – malé, kulovité agregáty molekul PAL vznikající ve zředěných roztocích. Uhlovodíkové řetězce tvoří jádro micely a polární skupiny směřují ven.
- Válcové micely – v koncentrovanějších roztocích se zvětšuje rozměr micel a kulovité micely se přeměňují ve válcovité útvary (jejich vznik byl prokázán měřením rozptylu světla).
- McBainovy micely – laminární McBainovy micely jsou přítomny v koncentrovanějších roztocích. Jsou složeny ze dvou vrstev PAL, přičemž micely jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci
- Inverzní (obrácené micely) – jádro inverzních micel tvoří polární skupiny, uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí [13].



Obr. 11 – Tvary micel: a) Hartleyova (kulovitá micela), b) válcovitá micela, c) inverzní micela, d) McBainova micela [18]

2.4 Koloidní roztoky vysokomolekulárních látek

Roztoky vysokomolekulárních látek jsou koloidní roztoky, termodynamicky stálé. Částice vysokomolekulárních látek jsou oproti lyofobním micelám jednotlivé molekuly velkých rozměrů, jsou to tedy útvary vázané chemickými valenčními silami.

U roztoků vysokomolekulárních elektrolytů jsou molekuly řady vysokomolekulárních látek obsahující ionogenní skupiny schopné vytvářet v roztoku ionty. Polyelektrolyt je makromolekulární elektrolyt s ionizovatelnými kyselými či bazickými postranními skupinami.

Lineární makromolekula existuje ve zředěných roztocích spíše ve formě nataženého řetězce a jen velmi málo se svinuje v klubko. Tento fakt je způsoben velkými odpuzivými silami mezi souhlasně nabitými skupinami, jejichž vliv do značné míry překonává kinetickou elasticitu makromolekulární látky. Je-li do roztoku přidán nízkomolekulární elektrolyt, stoupá iontová síla roztoku a iontová atmosféra kolem nabitých skupin se stlačuje, takže již malými přísadkami elektrolytu se původně natažený řetězec svinuje. Obdobný vliv jako přísadka nízkomolekulárního elektrolytu má i zvýšení koncentrace polyelektrolytu.

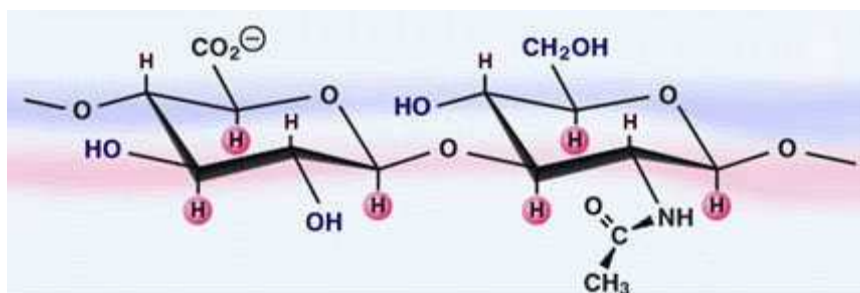
Oproti tomu u molekul, kde se pravidelně střídají kladné a záporné náboje, které na sebe působí přitažlivými silami, tedy u amfoterních molekul, se řetězec svinuje do cívkovitého nebo spirálovitého útvaru [13].

2.5 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární, přirozeně se vyskytující biopolymer. Byla objevena v roce 1934 Karlem Meyerem a jeho kolegou Johnem Palmerem, kteří ji izolovali ze sklivce očí skotu [19]. Dnes hojně používaný název *hyaluronan* odráží skutečnost, že *in vivo* existuje jako polyanion, ne v protonované formě kyseliny [26]. Hyaluronan tvoří jednu z hlavních složek mezibuněčné hmoty, dále se nachází v očním sklivci, synoviální tekutině (tj. tekutina obklopující klouby) a v kůži. Dále výrazně přispívá k buněčné proliferaci a bývá také zapojen do progresu zhoubných nádorů. V těle průměrného 70 kg muže se nachází přibližně 15 g hyaluronanu, přičemž 1/3 je každý den degradována a znova syntetizována [20]. Tento biopolymer má velmi široké uplatnění, v lékařství se už před delší dobou začala kyselina hyaluronová využívat v léčbě popálenin a kožních vředů. Velmi se využívá v kosmetickém průmyslu, zejména k omlazování pokožky obličeje, krku a dekoltu.

2.5.1 Chemická struktura

Po 20 letech od objevení Karl Meyer finálně popsal i chemickou strukturu hyaluronanu [19]. Skládá se z opakujících se disacharidových jednotek, z molekul kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Disacharidové jednotky jsou spojeny střídáním glykosidické vazby β -1,4 a β -1,3. Stericky výhodnější ekvatoriální pozici všem objemným skupinám umožňuje glukóza v β konfiguraci, zatímco všechny malé atomy vodíku zabírají méně stericky příznivé axiální polohy. To znamená, že struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní. [19].



Obr. 12 – Chemická struktura hyaluronanu [19]

2.5.2 Metabolismus hyaluronanu

Metabolismus kyseliny hyaluronové je velmi dynamický. Například chondrocyty v chrupavce aktivně syntetizují a katabolizují hyaluronan po celou dobu života tkáně. Syntéza je obvykle vyvážena katabolismem, čímž se udržuje konstantní koncentrace v tkáni. Studie ukázaly, že poločas rozpadu hyaluronanu v chrupavce je obvykle 2-3 týdny [19].

Buňky někdy buď převážně syntetizují nebo naopak převážně katabolizují hyaluronan, například kožní buňky hyaluronan převážně aktivně syntetizují. Poločas rozpadu molekuly hyaluronanu v krvi je velmi krátký, jen několik minut. Odhaduje se, že téměř jedna třetina z celkového množství kyseliny hyaluronové v lidském těle je metabolicky odstraněna a nahrazena průměrně během jednoho dne [19].

2.5.3 Aplikace a vlastnosti kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová má celou řadu významných biologických funkcí. Váže na sebe vodu a pomáhá zabraňovat prostupu virů a bakterií k buňce. Jedna z předních vlastností je vysoká viskoelastická, díky které vodné roztoky hyaluronanu v kloubech snižují tření a absorbují tlakové nárazy, čímž funguje vlastně jako lubrikant a tlumič nárazů.

Kyselina hyaluronová je široce využívána v medicíně. V oční chirurgii je dodnes využíván preparát z kohoutích hřebínků, který byl izolován v druhé polovině padesátých let 20. století. Další produkt hyaluronanu byl vyvinut jako doplněk do synoviální tekutiny kloubů u pacientů trpících osteoartritidou [19].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Cílem bádání v oblasti nádorových onemocnění je již několik let najít vhodný cílený nosič léčiv, který bude schopen působit cíleně na specifické místo a zároveň nemít vedlejší účinky v rozsahu současných chemoterapeutik (vypadávání vlasů, pokles počtu bílých krvinek, nevolnost aj.). Je potřeba takové specifické vazby mezi nosičem a léčivem, aby tento systém byl schopen léčivo dopravit na dané místo a aby byl schopen léčivo v tomto místě i uvolnit. Další podmínkou je biokompatibilita a biodegradabilita systému. Najít vhodný cílený nosič léčiv je tedy díky mnohým požadavkům nelehký úkol.

Interakce mezi kopolymerem polystyrensulfonyl-a-butylvinylether (PSS-co-BVE) a iontovými povrchově aktivními látkami ve vodném roztoku zkoumali brazilští vědci v čele s *M.G. Neumannem* [21]. Pomocí pyrenu jako fluorescenční sondy byly studovány tvorby indukovaných premicel kationaktivních a anionativních tenzidů. Jako katioaktivní tenzidy byly použity: dodecyltrimethylamonium bromid (DTAB), dodecyltrimethylamonium chlorid (DTAC), cetyltrimethylamonium chlorid (CTAC). Anionaktivní tenzid zastupoval dodecylsulfát sodný (SDS). U kationaktivních tenzidů bylo zjištěno, že se začínají tvořit premicelární agregáty při koncentraci nižší než je CMC. Tento proces označujeme jako indukovaná agregace (CAC – kritická agregační koncentrace). Předpokládá se, že indukovaná agregace je následkem elektrostatických interakcí. Boltzmannova sigmoidní křivka, kde je v závislosti $EmPI$ na koncentraci tenzidu, vykazuje v tomto případě dvouzlomový charakter. Závislost $Ex:Mo$ na koncentraci tenzidu také vykazuje dva píky. Hodnoty CAC kationaktivních tenzidů mají podobný trend jako hodnoty CMC, tzn. $DTAC > DTAB > CTAC$. Naopak anionaktivní tenzidy toto dvouzlomové chování, čili tvorbu premicelárních agregátů, nevykazují.

Tabulka č. 1 – Kritická micelární koncentrace (CMC) a kritická agregační koncentrace (CAC) kationaktivních tenzidů (DTAB, DTAC, CTAC) a anionaktivního tenzidu (SDS) v přítomnosti kopolymerů [20]

Kopolymery	Složení kopolymerů PSS/BVE [mol.%]	SDS CMC [mM]	DTAB		DTAC		CTAC	
			CMC [mM]	CAC [mM]	CMC [mM]	CAC [mM]	CMC [mM]	CAC [mM]
PSS	-	7,4	-	-	22,5	1,0	1,3	0,25
coBVE1	98/2	6,9	15,9	1,0	23,4	1,0	1,4	0,28
°coBVE17	82/18	7,9	17,7	1,0	19,6	1,6	1,5	0,25
coBVE45	55/45	7,4	16,6	2,6	16,5	1,7	1,5	0,28
coBVE53	47/53	7,8	17,7	1,2	17,5	3,3	1,5	0,26

Interakce mezi polyelektrolytem a povrchově aktivní látkou zkoumali *P.S.Kuhn, Y. Levin a M.C. Barbosa* v roce 2008 v Brazílii [22]. Vědci z brazilské univerzity experimentálně pozorovali kooperační přeměnu, ve které jsou kondenzované protioionty nahrazeny ionogenními tenzidy. U ionogenních tenzidů nastává tento přechod ve velmi nízkých koncentracích, asi 20x nižší než CMC tenzidu. V případě neionogenních tenzidů dochází k tvorbě komplexů v koncentracích blízkých CMC. Tento jev vysvětlují silné elektrostatické interakce, které vedou v systému polyelektrolyt-tenzid k vytvoření komplexů. Dále bylo

pozorováno, že v případě navázání ionogenních tenzidů na polyelektrolyt, vykazují adsorpční izotermy kooperační charakter. Tento překvapující jev naznačuje, že ionogenní tenzidy nebo ionogenní lipidy by mohly být použity do živých buněk jako polynukleotidy. Některé další studie ukazují, že katioaktivní lipidová činidla by mohly velmi dobře sloužit jako nosičové systémy pro genovou terapii

V roce 2002 **F. Marques a spol.** [23] studovali změny v agregačním chování dvouřetězcových tenzidů v důsledku geometrie nebo přidání protiiontu. Tato studie byla provedena s kvartérní amoniiovou solí DDAB (didodecyldimethylamonium bromid) pomocí různých technik (NMR, mikroskopie, rozptylové metody). U dvouřetězcových tenzidů bylo zjištěno, že přidavek anionaktivního tenzidu může způsobit změnu tvaru agregátů. Přidáním soli do systému polymer-tenzid se mění fázové chování z asociativního chování k chování segregativnímu. Geometrie tenzidů má rozhodující roli ve fázovém chování a morfologii agregátů. V systému polymer-tenzid se nejčastěji tvoří agregáty micelárního typu. U dvouřetězcových tenzidů bylo shledáno, že přidáním protiiontu dochází k přechodu z laminární fáze do krychlové. To také může přispět k větší stabilizaci micel ve zředěných roztocích.

K. Thalberg a B. Lindman [24] studovali interakci mezi sodnou solí hyaluronanu a alkyltrimethylamonium bromidy s různými délkami řetězce pomocí fázové separace, NMR, vodivosti nebo solubilizace barviv. Dle výsledků bylo zjištěno, že této interakci podléhají tenzidy s více než 10 uhlíky v alkylovém řetězci a již při velmi nízké koncentraci tenzidu. U kratších alkylových řetězců tenzidu je energeticky výhodnější tvorba volných micel, než samotná vazba na hyaluronan. Dále vědci zjistili, že vazba hyaluronanu a tenzidu je několikrát slabší (až 10krát) než interakce jiných polyelektrolytů (alginát, pektát) s tenzidy. Toto je nejspíše způsobenou nízkou lineární hustotou náboje hyaluronanu. Dalším poznatkem je fakt, že při určitém hraničním stupni navázání tenzidu na hyaluronan už nedochází k rozpouštění komplexu a nastává oddělení fází a tvorba precipitátů. Rozpuštění precipitátu může být dosaženo přidáním velkého přebytku tenzidu.

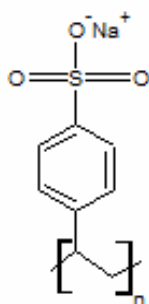
Dian-shu Yin a spol. [25] zkoumali interakce mezi hyaluronanem sodným a tenzidy ve vodném prostředí za použití fluorescenční spektrofotometrie, kde jako fluorescenční sonda byl použit pyren. Díky předchozím studiím bylo dokázáno, že hyaluronan má specifickou vazbu na CD44 a RHAM receptory, které jsou přítomny v nádorových buňkách, a nejen proto by mohla být kyselina hyaluronová použita jako vhodný vektor pro léčiva. Vědci z čínské univerzity shledali, že v případě anionaktivního tenzidu (SDS) byl přidavkem hyaluronanu již v nízkých koncentracích SDS snížen emisní polaritní index. Tento jev vysvětluje solubilizace hydrofilních hlav SDS do domén formovaných hydroxylovými skupinami hyaluronanu. Mezi neionogenními tenzidy (Tween-80, Cremophor EL) a hyaluronanem nebyla pozorována žádná agregace. Ve vyšších koncentracích tenzidu byl emisní polaritní index zvýšen přidavkem sacharidů (glukósa, laktósa), ovšem účinek sacharidů je snížen přidáním soli.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

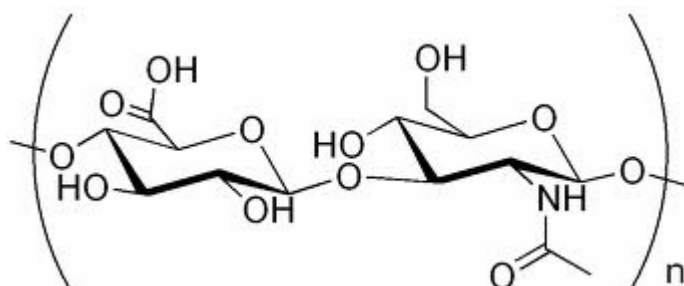
4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Polyelektrolyty

- poly(4-styren sulfonát) sodný – Sigma Aldrich Chemie GmbH, č.š.: MKAA1218V, CAS: 25704-18-1

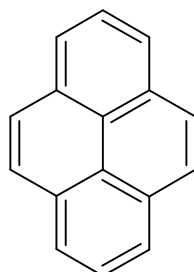


- Hyaluronan sodný, nativní ;
HySilk – CPN spol. s.r.o., $M_w=300$ kDa, č.š.: 160708 E1
Hyaluronic acid – CPN spol. s.r.o., $M_w=1,46$ MDa, č.š.: 141008-E1

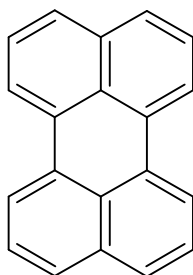


4.1.2 Fluorescenční sondy

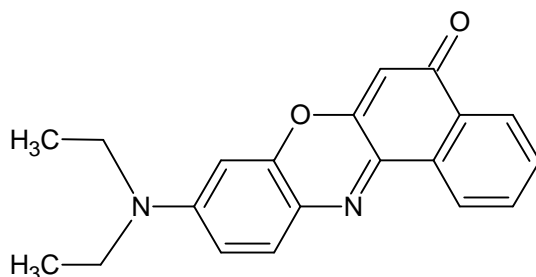
- Pyren – Fluka, puriss p.a. for fluorescence $\geq 99,0$ %, č.š.: 430166/1, 4230487, CAS: 129-00-0



- Perylen – Fluka, puriss for fluorescence $\geq 99,0\%$, č.š.: 1293053, 42306417, CAS: 195-55-0

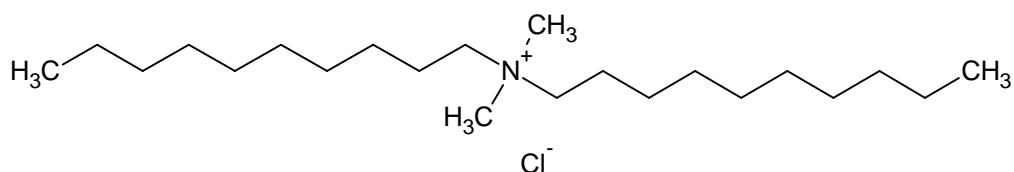


- Nilská červeň – BioChemika, for fluorescence $\geq 98,0\%$, č.š.: 1381469, 21408064, CAS: 7385-67-3

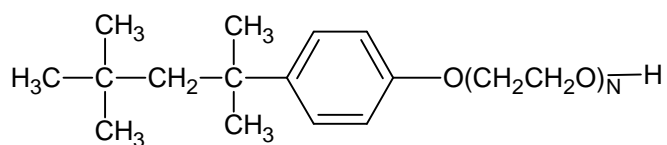


4.1.3 Tenzidy

- DDAC (didecyldimethylamonium chlorid) – Alfa Aesar, č.š.: 10147338, CAS: 107-64-2

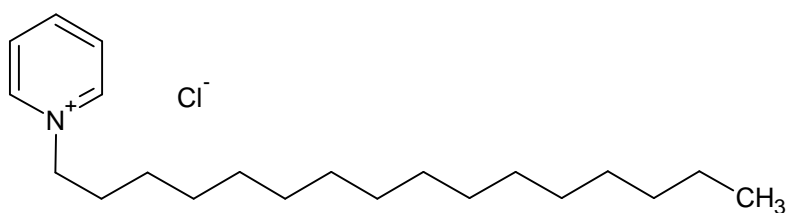


- Triton X-100 (oktylphenol ethoxylát) – Fluka, č.š.: 1249005, CAS: 9002-93-1



4.1.4 Zhášeeče

- CPC (cetylpyridium chlorid), Sigma $\geq 99,0\%$, č.š. – 115K0073, CAS – 6004-24-6



4.1.5 Ostatní

- NaCl (chlorid sodný p.a.) – Lachner s.r.o., č.š.: 06278, CAS : 7647-145

- Voda, Milli-Q voda (Millipore academic)
- Aceton – Lachner s.r.o., p.a., Ultra $\geq 99,5$ %
- KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.) – Lachner s.r.o., č.š.: 00261, CAS: 778-77-0
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a.) – Lachner s.r.o., č.š.: 06156, CAS: 10039-32-4

4.2 Postup přípravy vzorků

4.2.1 Zásobní roztoky fluorescenčních sond

Byly připraveny zásobní roztoky pyrenu, perylenu a nilské červeně v acetonu. Koncentrace zásobního roztoku pyrenu byla $1,5 \cdot 10^{-4}$ M a $2 \cdot 10^{-4}$ M. Koncentrace nilské červeně a perylenu byla $1 \cdot 10^{-4}$ M. Zásobní roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 4°C . U všech vzorků bylo pipetováno takové množství pyrenu a perylenu, aby výsledná koncentrace ve vzorku byla $1 \cdot 10^{-6}$ M.

4.2.2 Zásobní roztoky fosfátového pufru a 0,15 M NaCl

Fosfátový pufr PBS byl připraven v 1000 ml odměrné baňce rozpuštěním 2,83 g hydrogen fosforečnanu disodného, dále 0,19 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 8 g NaCl. Roztok byl doplněn vodou na přesný objem. Standardně byla používána při všech přípravách Milli-Q voda.

Zásobní roztok NaCl byl připraven do 500 ml odměrné baňky. Přesná navážka NaCl byla 4,3839 g a roztok byl doplněn vodou na přesný objem. Tímto způsobem byl získán zásobní roztok NaCl o přesné koncentraci $0,15003 \cdot 10^{-4}$ M. Oba dva zásobní roztoky byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě.

4.2.3 Zásobní roztoky DDAC

Byl připraven zásobní roztok DDAC o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ M ve vodě, v 0,15 M NaCl a ve fosfátovém pufru. Ředěním zásobního roztoku DDAC byly připraveny zásobní roztoky DDAC o koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-6}$ M. Zásobní roztoky byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě.

4.2.4 Stanovení CMC DDAC

Nejprve byla navrhována koncentrační řada DDAC v prostředí vody, v 0,15 M NaCl a ve fosfátovém pufru tak, aby se v jejím rozsahu vyskytovala předpokládaná hodnota CMC. Koncentrační řady byly proměřeny s pyrenem, perylenem a s nilskou červení. Do všech vialek bylo napipetováno příslušné množství fluorescenční sondy. Následně byl ze všech vialek odpařen v digestoři aceton.

Dalším krokem přípravy bylo přidání přesného množství DDAC v daném prostředí. Z důvodu širokého koncentračního rozmezí DDAC ve vzorcích byly k ředění použity tři zásobní roztoky o koncentracích $5 \cdot 10^{-3}$ M, $5 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-6}$ M. Posléze byly vzorky doplněny vodou, roztokem soli nebo pufrům na požadovaný objem. Před samotným měřením byly takto připravené vzorky míchány po dobu 24 hod. při laboratorní teplotě.

4.2.5 Zásobní roztoky Tritonu X-100

Byl připraven zásobní roztok Tritonu X-100 o koncentraci $8 \cdot 10^{-3}$ M v prostředí vody, v 0,15 M NaCl a ve fosfátovém pufru PBS. Naředěním zásobního roztoku byl připraven další

zásobní roztok Tritonu X-100 o koncentraci $8 \cdot 10^{-5}$ M. Tyto zásobní roztoky byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě.

4.2.6 Příprava vzorků pro stanovení CMC Tritonu X-100

Byla navržena koncentrační řada tak, aby v rozmezí této řady byla předpokládána CMC Tritonu X-100. Měření bylo provedeno v prostředí vody s pyrenem a ve všech třech prostředích s perylenem. Do všech vzorků bylo napipetováno příslušné množství sondy. Poté byl ze všech vialek v digestoři odpařen aceton.

Následně bylo přidáváno přesné množství Tritonu X-100 v daném prostředí. Z důvodu širokého koncentračního rozmezí Tritonu X-100 ve vzorcích byly k ředění použity dva zásobní roztoky o koncentracích $8 \cdot 10^{-3}$ M a $8 \cdot 10^{-5}$ M. Dalším krokem bylo doplnění vzorků vodou, roztokem soli nebo pufrem na požadovaný objem. Před samotným měřením byly takto připravené vzorky míchány po dobu 24 hod. při laboratorní teplotě.

4.2.7 Agregační chování systému Tritonu X-100 a DDAC

Do vialek bylo napipetováno příslušné množství pyrenu a poté bylo ze všech vzorků odpařeno v digestoři rozpouštědlo. Pro zjišťování agregačního chování ionogenního a neionogenního tenzidu byla navržena koncentrační řada s konstantním množstvím DDAC a se vzrůstajícím množstvím Tritonu X-100 (0,0025 – 5 mM). Do všech vialek bylo napipetováno 1000 μ l DDAC, přičemž výsledná koncentrace DDAC byla $4,2 \cdot 10^{-5}$ M a následně bylo přidáno přesné množství Tritonu X-100. Nakonec byl vzorek doplněn na přesný objem vodou. Vzorky byly po dobu 24 hod. míchány při laboratorní teplotě a posléze byly změřeny.

4.2.8 Agregační číslo systému Tritonu X-100 a DDAC

Nejprve bylo do všech vialek napipetováno příslušné množství pyrenu. Po odpaření rozpouštědla bylo přidáno konstantní množství DDAC (1000 μ l) a konstantní množství Tritonu X-100 (2500 μ l). Poté byl přidán zhasič CPC v rozmezí koncentrací 0 - 09 mM CPC, kde zásobní roztok CPC měl koncentraci $2 \cdot 10^{-3}$ M. Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou na přesný objem a byly třepány přes noc při laboratorní teplotě.

4.2.9 Zásobní roztok PSS

Na analytických váhách bylo naváženo přesné množství PSS tak, aby koncentrace zásobního roztoku byla $4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kvůli lepšímu rozpuštění a následnému snadnějšímu doplnění na přesný objem bylo navážené množství PSS nejdříve rozpouštěno asi ve 180 ml vody a následně byl roztok doplněn vodou na 250 ml. Zásobní roztok byl uchováván ve tmě a při laboratorní teplotě.

4.2.10 Agregačního chování DDAC s přídatkem PSS ve vodě

Do všech vialek bylo napipetováno příslušné množství pyrenu a v digestoři byl odpařen aceton. Bylo přidáno přesné množství DDAC dle koncentrační řady a následně konstantní množství PSS, tak aby jeho koncentrace ve vzorcích byla $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou na přesný objem. Takto připravené vzorky byly míchány po dobu 24 hod. a následně byly proměřeny.

4.2.11 AgregáčnÍ chování Tritonu X-100 s přidavkem PSS ve vodě

Nejprve bylo do všech vialek napipetováno příslušné množství pyrenu a za sníženého tlaku bylo odpařeno rozpouštědlo. Bylo přidáno přesné množství Tritonu X-100 v rozmezí koncentrací (0,0025 – 3 mM) a následně konstantní množství PSS, tak aby jeho koncentrace ve vzorcích byla $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Zbytek viz předchozí odstavce.

4.2.12 AgregáčnÍ chování systému Tritonu X-100 a DDAC s přidavkem PSS

Nejdříve bylo do vialek napipetováno příslušné množství pyrenu a poté bylo za sníženého tlaku ze všech vzorků odpařeno rozpouštědlo. Po odpaření rozpouštědla bylo přidáno přesné množství Tritonu X-100 v rozmezí koncentrací (0,0025 – 3 mM) a následně bylo přidáno konstantní množství DDAC tak, aby výsledná koncentrace byla $4,2\cdot 10^{-5} \text{ M}$. Jako poslední složka bylo přidáváno konstantní množství PSS (1000 μl o výsledné koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$). Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou na přesný objem. Takto připravené vzorky byly míchány po dobu 24 hod. při laboratorní teplotě.

4.2.13 Zásobní roztok 0,3 MDa HyA a 1,46 MDa HyA

Na analytických váhách bylo naváženo přesné množství 0,3 MDa HyA a 1,46 MDa HyA tak, aby koncentrace zásobního roztoku byla $4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Navážené množství hyaluronanu bylo doplněno na 100 ml vodou. Zásobní roztoky byly uchovávány v lednici.

4.2.14 AgregáčnÍ chování systému Tritonu X-100 a DDAC s přidavkem HyA

Příprava vzorků pro měření agregáčnÍho chování systému Tritonu X-100 a DDAC s přidavkem hyaluronanu byla prováděna obdobně jako při přidavku PSS do systému Triton X-100 a DDAC. (viz 4.2.12.) Do vialek obsahujících pyren, Triton X-100 a DDAC bylo napipetováno 1000 μl nativního hyaluronanu (0,3 MDa a 1,46 MD) o výsledné koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou na přesný objem. Připravené vzorky byly míchány po dobu 24 hod. při laboratorní teplotě.

4.3 Metody měření

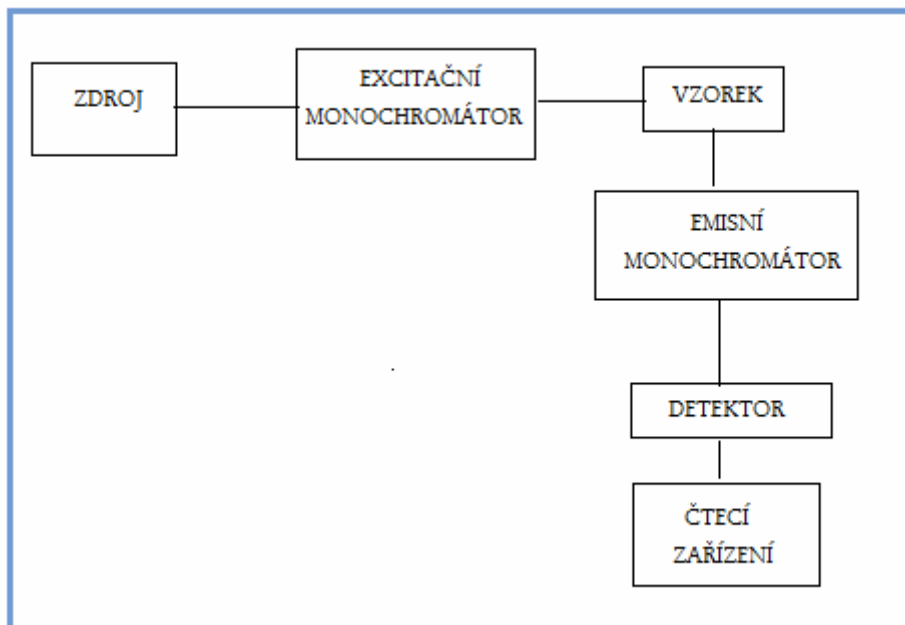
4.3.1 Měření fluorescenčních spekter

Měření fluorescenčních spekter bylo provedeno na luminiscenčním spektrofotometru Aminco-Bowman Series 2 s xenonovou (150W) a zábleskovou (7W) lampou. Pro všechna měření byla pomocí termostatu nastavena teplota na $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. U veškerých měření byl signál ze vzorku vztažen k referenčnímu signálu.

U všech vzorků s pyrenem bylo zaznamenáváno emisní i excitační spektrum. Emisní sken pyrenu byl měřen v rozmezí 360 – 530 nm při excitační vlnové délce 335 nm. Excitační sken pyrenu byl snímán v rozsahu 320 – 340 nm při emisní vlnové délce 392 nm. U každého vzorku byly u emisního skenu zaznamenávány hodnoty fluorescence prvního a třetího píku $I_1 \approx 383 \text{ nm}$, $I_3 \approx 383 \text{ nm}$ a hodnota fluorescence excimeru $I_E \approx 470 \text{ nm}$. U excitačního skenu byly zapisovány hodnoty detekčních vlnových délek 333 nm a 338 nm.

U vzorků obsahujících perylen bylo měřeno pouze emisní spektrum. Excitační maximum bylo nastaveno na 410 nm. Emisní sken byl měřen v rozsahu 430 – 600 nm. Sledovaným parametrem byla hodnota vlnové délky polohy maxima s příslušející intenzitou fluorescence a také hodnota totálního integrálu.

V případě měření vzorků s nilskou červení bylo obdobně jako u perylenu měřeno pouze emisní spektrum. Excitace byla na monochromátorech nastavena na 540 nm. Rozmezí vlnových délek emisního skenu bylo 580 – 700 nm. Sledovaným parametrem byla hodnota vlnové délky polohy maxima s příslušející intenzitou fluorescence a také hodnota totálního integrálu.



Obr. 13 – Schéma měření fluorescenční spektrofotometrie

4.4 Vyhodnocení dat

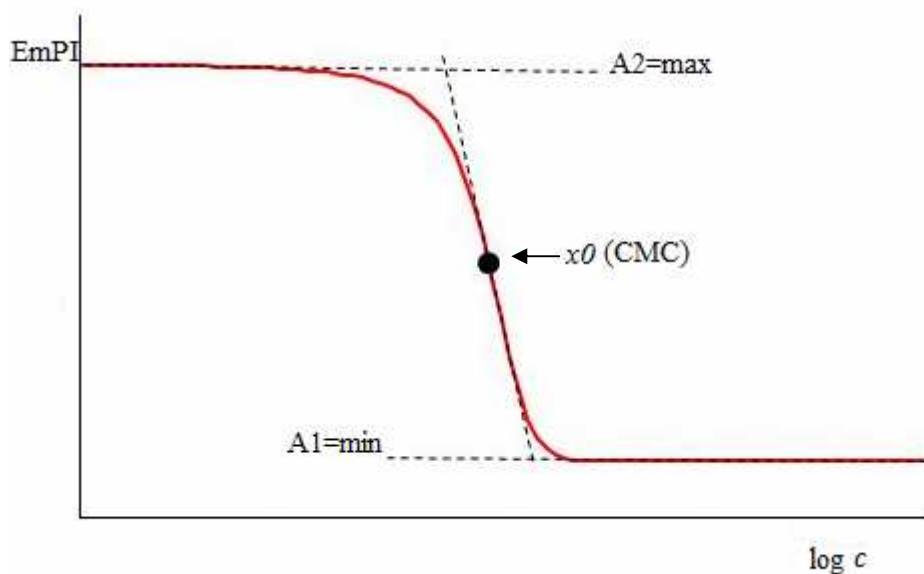
4.4.1 Stanovení CMC u vzorků obsahujících pyren

Při stanovení CMC u vzorků obsahujících pyren se využívá poměr prvního a třetího píku emisního spektra (=EmPI, emisní polaritní index) v závislosti na logaritmu koncentrace. Výsledná závislost má sigmoidní tvar a lze ji popsat Boltzmanovou S-křivkou se 4 parametry:

$$y(1:3) = \frac{A_1(\min) - A_2(\max)}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2(\max), \quad (5)$$

kde závisle proměnná y odpovídá EmPI, A_1 je minimum, A_2 maximum, x_0 je inflexní bod křivky Δx je gradient. Na **Obr. 14** je vyobrazena závislost křivky Boltzmannova typu s charakteristickými parametry.

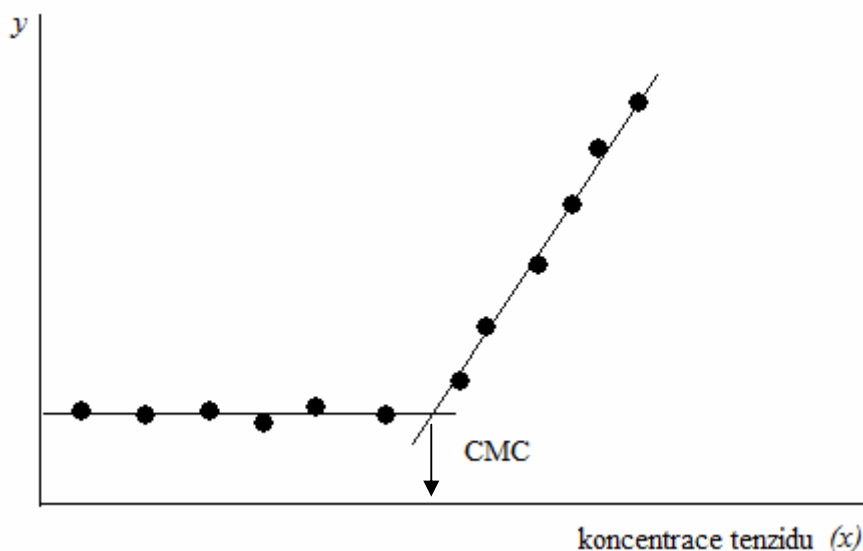
Obdobně lze zjistit kritickou micelární koncentraci díky poměru 333:338 nm z excitačního skenu pyrenu, neboli ExPI. Závislost excitačního polaritního indexu (ExPI) na logaritmu koncentrace taktéž vykazuje sigmoidní křivku, to znamená, že můžeme použít Boltzmanovu rovnici pro vyhodnocení dat a zjištění CMC.



Obr. 14 – Sigmoidní křivka Boltzmanova typu s charakteristickými parametry

4.4.2 Stanovení CMC u vzorků obsahujících perylen a nilskou červeně

U vzorků obsahujících perylen a nilskou červeně bylo využito závislosti totálního integrálu na logaritmu koncentrace. Tato závislost v nižších koncentracích než CMC vykazuje konstantní průběh, po dosažení CMC má lineárně vzrůstající charakter (Obr. 15). Jako hodnota CMC byla brána koncentrace v bodě průsečíku dvou přímk, z nichž jedna odpovídá průměru hodnot v konstantní části a druhá je dána lineární regresí charakterizující vzrůstající část přímky.



Obr. 15 – Standardní vyhodnocení dat získaných pomocí perylenu nebo nilské červeně

4.4.3 Stanovení agregačního čísla

Hodnota agregačního čísla byla zjištěna pomocí zhášení fluorescence pyrenu, kde jako zhášec byl použit CPC. Po přidání konstantního množství neionogenního a ionogenního tenzidu bylo do vzorků pipetováno vzrůstající množství zhášeče CPC. Naměřená data byla

v programu MS Excel proložena lineární regresí. Agregační číslo bylo spočítáno dle následujícího vztahu:

$$N_{agg} = \frac{1}{k} \frac{1}{[S] - CMC}, \quad (6)$$

kde k je směrnice přímky, $[S]$ představuje koncentraci tenzidu, N_{agg} je agregační číslo.

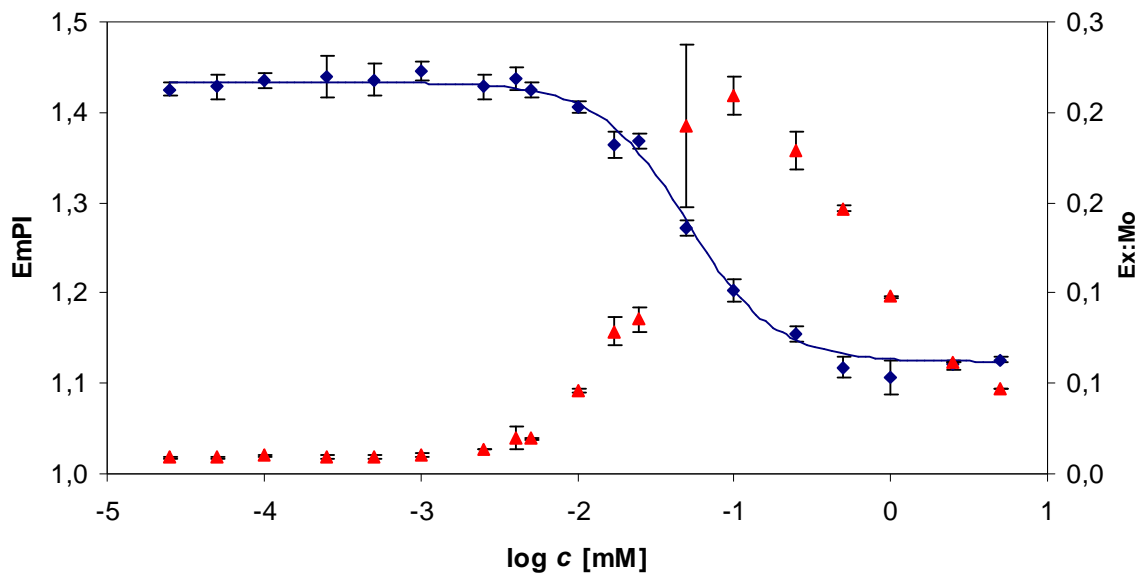
4.4.4 Stanovení chyby měření

Všechna měření byla prováděna třikrát. Z těchto hodnot byla do grafů vynesena průměrná hodnota a pomocí programu MS Excel byla k jednotlivým bodům spočítána směrodatná odchylka. V grafech odpovídají jednotlivé směrodatné odchylky chybovým úsečkám.

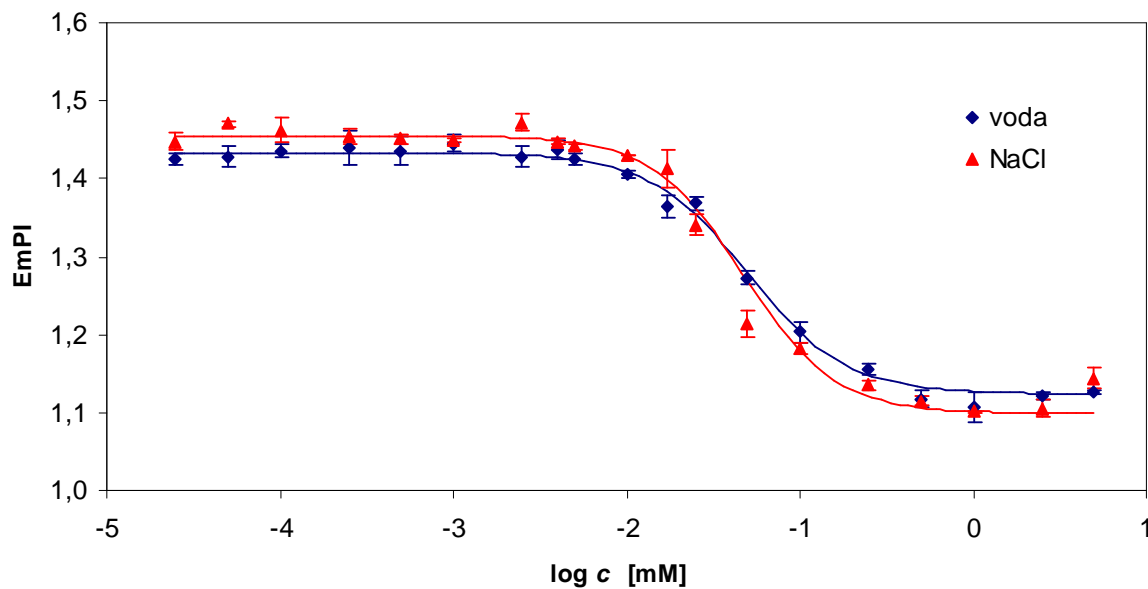
5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Stanovení CMC DDAC

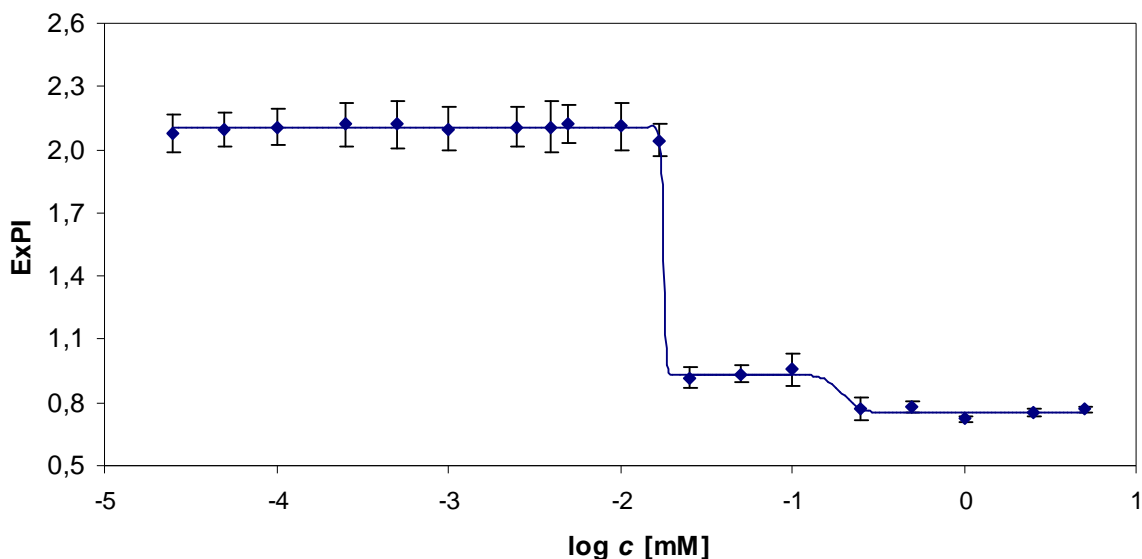
5.1.1 CMC DDAC v prostředí vody, soli a pufru s pyrenem



Graf 1 – Závislost E_{mPI} a poměru $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace DDAC v prostředí vody s pyrenem



Graf 2 - Závislost E_{mPI} na logaritmu koncentrace DDAC v prostředí vody a 0,15 M NaCl s pyrenem



Graf 3 – Závislost ExPI na logaritmu koncentrace DDAC v prostředí pufru PBS s pyrenem

Graf 1 popisuje průběh závislosti emisního polaritního indexu a poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace DDAC ve vodném prostředí. Křivka závislosti EmPI na logaritmu koncentrace vykazuje sigmoidní křivku Boltzmannova typu. U závislosti poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace má nejdřív křivka konstantní povahu, poté následuje prudký vzrůst. Stojí za povšimnutí, že se zlomy na obou křivkách objevují přibližně při stejné koncentraci, která odpovídá začínající tvorbě micel. Křivka závislosti EmPI na logaritmu koncentrace DDAC se v tomto okamžiku začíná lámat a křivka závislosti Ex:Mo na logaritmu koncentrace DDAC začíná růst.

Graf 2 porovnává závislosti EmPI na logaritmu koncentrace DDAC ve vodném prostředí a v prostředí soli. Obě dvě křivky vykazují sigmoidní charakter. Před prvním zlomem odpovídají konstantní hodnoty signálu vodného prostředí, po zlomu značí konstantní hodnoty solubilizaci sondy v hydrofobním prostředí. Inflexní bod sigmoidní křivky odpovídá kritické micelární koncentraci.

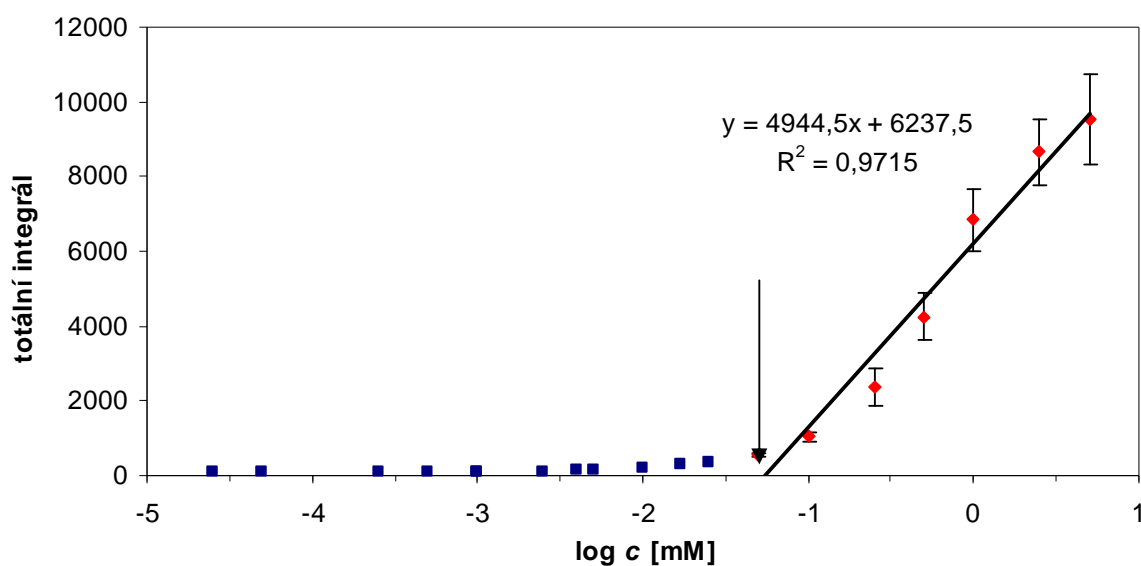
V pufovém prostředí má sigmoidní křivka dvouzlomový charakter (**Graf 3**). První zlom značí nárůst tvorby micel a inflexní bod prvního zlomu koresponduje s CMC DDAC ve vodném prostředí. Jedním z možných vysvětlení druhého zlomu je, že mohlo dojít ke změně konformace agregátů. Hydrofobní jádro má v oblasti druhého zlomu ještě hydrofobnější charakter, což je dost pravděpodobně způsobeno přechodem kulovitých agregátů na agregáty podobné fosfolipidové dvojvrstvě s ohledem na strukturu DDAC. Výsledky CMC DDAC v různých prostředích jsou uvedeny v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 – Hodnoty CMC DDAC v různých prostředích stanovené pomocí pyrenu při 25°C

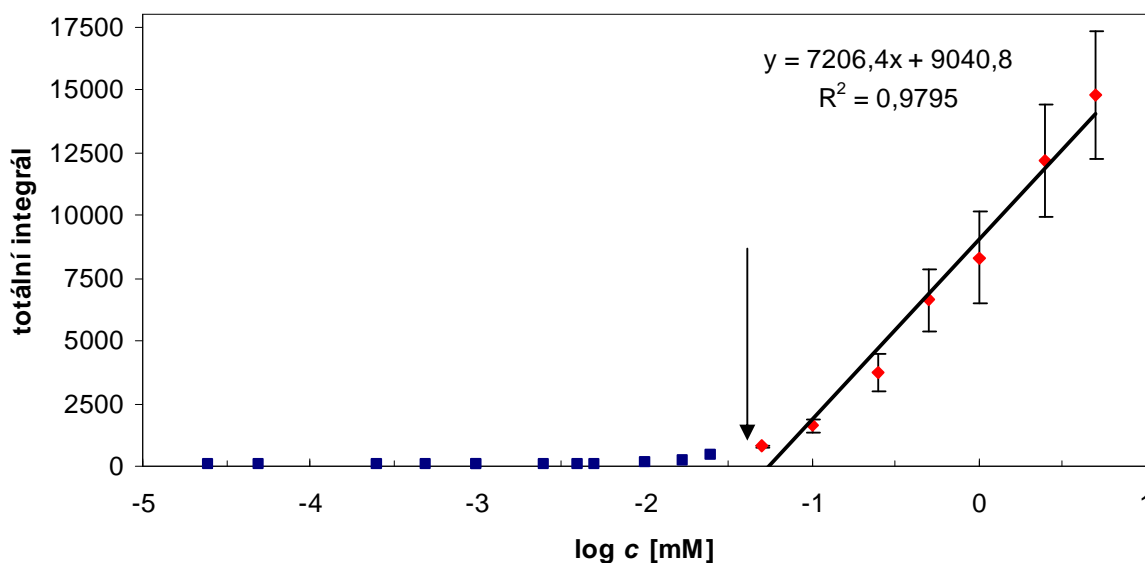
Prostředí	CMC [mM]	c DDAC [mM]; druhý zlom
voda	0,050 ± 0,002	–
0,15 M NaCl	0,047 ± 0,001	–
pufr PBS	0,018 ± 0,002	0,197 ± 0,014

Z této tabulky je patrné, že prostředí, ve kterých byly experimenty prováděny, výrazně neovlivňují hodnotu kritické micelární koncentrace DDAC. Nedochozí ani k řádovým změnám CMC, tak jak tomu bývá u přidavku soli do běžných roztoků ionogenních tenzidů. Ovšem v puřovém prostředí docházelo v systému nejspíše ke změnám konformace agregátů DDAC, což značí dvouzlomová sigmoidní křivka. Lze tedy tvrdit, že puř chování DDAC ovlivňuje. Hodnoty CMC DDAC ve vodném prostředí a v prostředí soli jsou téměř totožné, zatímco v puřovém prostředí dochází k nepatrnému poklesu hodnoty CMC. S ohledem na to, že kationaktivní DDAC má dva řetězce, lze tento tenzid srovnávat spíše s fosfolipidy.

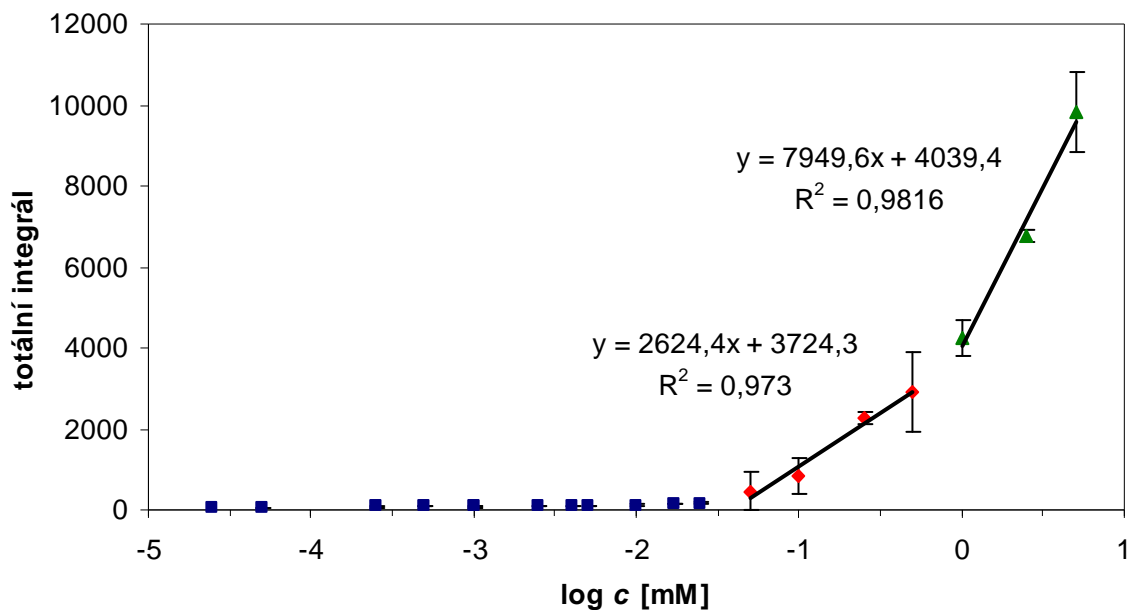
5.1.2 CMC DDAC v prostředí vody, soli a puřu s perylenem



Graf 3 – Závislost totálního integrálu na logaritmu koncentrace DDAC v prostředí vody s perylenem



Graf 4 – Závislost totálního integrálu na logaritmu koncentrace DDAC v prostředí 0,15 M NaCl s perylenem



Graf 5 – Závislost totálního integrálu na logaritmu koncentrace DDAC v prostředí pufru PBS s perylenem

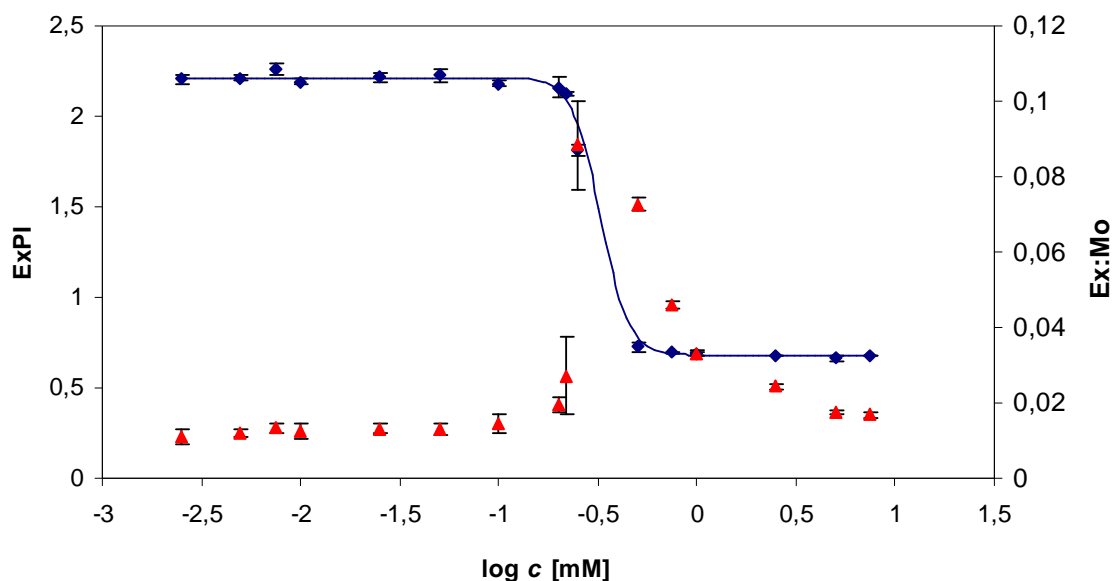
Grafy závislosti (**Graf 3**, **Graf 4**) totálního integrálu emisních spekter na logaritmu koncentrace DDAC v prostředí vody a soli vykazují zprvu konstantní průběh. Poté následuje strmý lineární růst, přičemž průsečík konstantní části a lineárně vzrůstající části odpovídá kritické micelární koncentraci systému. Hodnoty CMC DDAC stanovené pomocí perylenu ve vodě a v soli jsou téměř stejné.

Hodnota CMC DDAC stanovená pomocí perylenu v puřrovém prostředí se mírně liší. Jak hodnota CMC, tak průběh závislosti totálního integrálu na logaritmu koncentrace DDAC (**Graf 5**), nám potvrzuje odlišné chování DDAC v prostředí pufru. Dvouzlomová vzrůstající lineární křivka v grafu 5 ukazuje změny v systému, které jsou nejspíše způsobeny změnou tvaru agregátů DDAC. Obdobné chování DDAC v pufru bylo zaznamenáno taktéž při stanovení hodnoty CMC DDAC pomocí pyrenu. Hodnoty CMC s perylenem jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

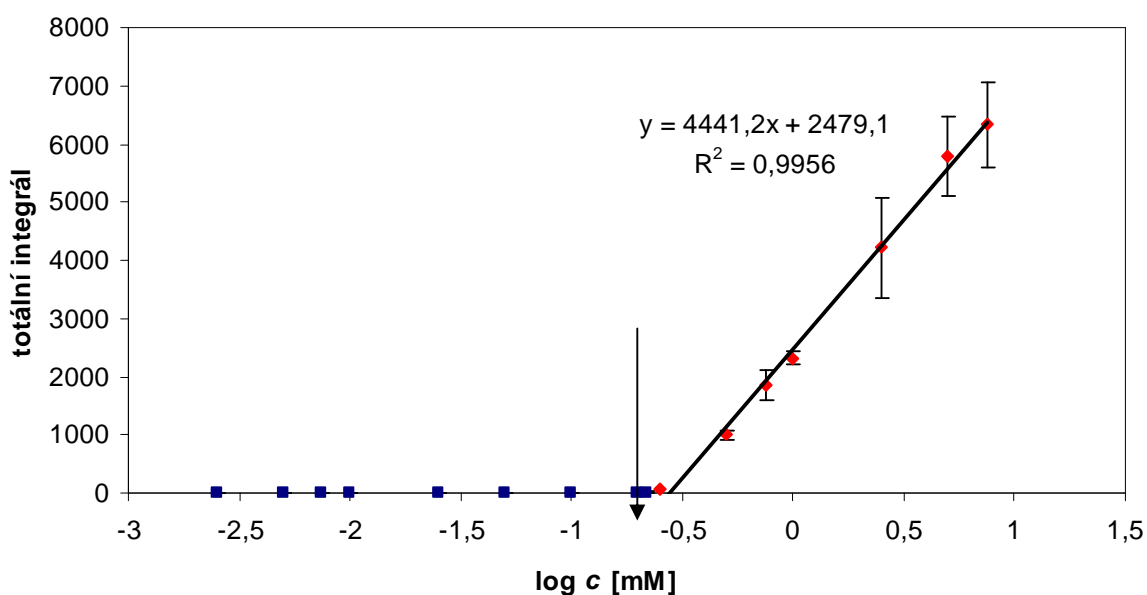
Tabulka 2 – Hodnoty CMC DDAC v různých prostředích stanovené pomocí perylenu při 25 °C

Prostředí	CMC [mM]	c DDAC [mM]; druhý zlom
voda	0,059 ± 0,005	–
0,15 M NaCl	0,058 ± 0,003	–
puřr PBS	0,041 ± 0,003	0,873 ± 0,008

5.2 Stanovení CMC Tritonu X-100



Graf 6 – Závislost ExPI a poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace Tritonu X-100 v prostředí vody s pyrenem



Graf 7 - Závislost totálního integrálu na logaritmu koncentrace Tritonu X-100 v prostředí vody s perylenem

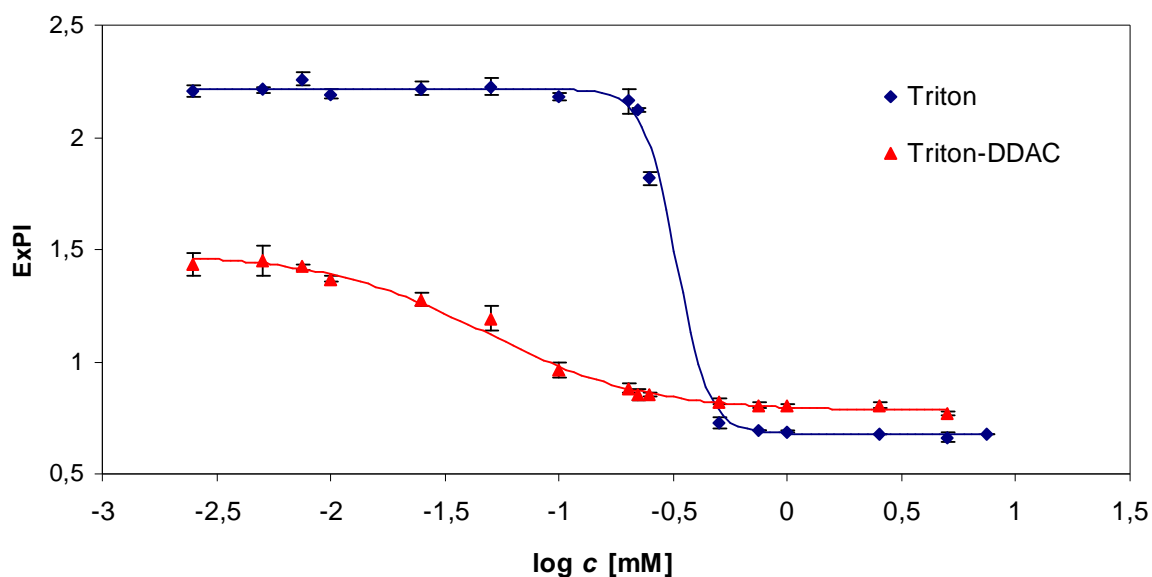
Kritická micelární koncentrace Tritonu X-100 v prostředí vody byla stanovena pomocí pyrenu a perylenu. **Graf 6** znázorňuje závislost excitačního polaritního indexu a poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace Tritonu X-100 s pyrenem, kde stanovení CMC bylo provedeno standardním postupem. Dále byla kritická micelární koncentrace stanovena v prostředí 0,15 M NaCl a pufru PBS, kde jako fluorescenční sonda byl použit perylen. U neionogenního Tritonu X-100 byla hodnota CMC ve vodném prostředí nepatrně vyšší, než hodnoty CMC stanovené v soli a pufru. (**Tabulka 3**).

Tabulka 3 – Hodnoty CMC Tritonu X-100 pomocí pyrenu a perylenu při 25°C

Fluorescenční sonda	Prostředí	CMC [mM]
pyren	voda	$0,327 \pm 0,003$
perylene	voda	$0,278 \pm 0,004$
perylene	0,15 M NaCl	$0,201 \pm 0,009$
perylene	puftr PBS	$0,190 \pm 0,002$

5.3 Agregáčnı chování systému Triton X-100 – DDAC

5.3.1 Zjišťování změny CMC Tritonu X-100 s přídavkem DDAC



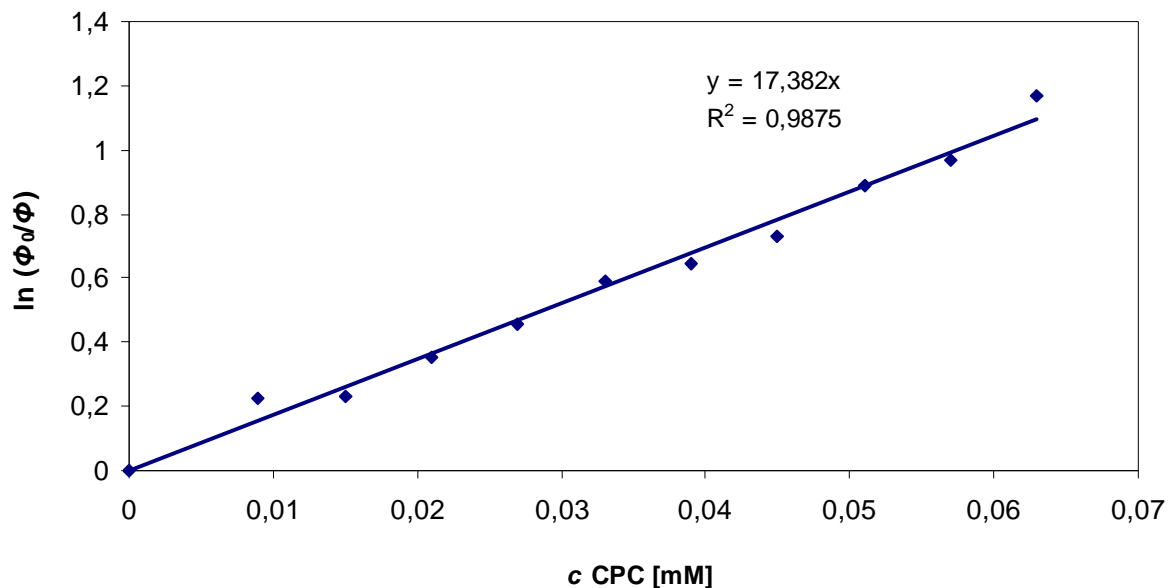
Graf 8 – Závislost ExPI systému na logaritmu koncentrace v prostředí vody s pyrenem

Graf 8 poukazuje na porovnání systému Tritonu X-100 bez/s přídavkem DDAC. Křivka systému ionogennı-neionogennı tenzid vykazuje sigmoidnı tvar, ale oproti samostatnému Tritonu X-100 má pozvolnějšı průběh. V případě samotného Tritonu X-100 ve vodném prostředí je zlom sigmoidnı křivky o mnoho strmějšı, nežli Triton X-100 s přídavkem DDAC. To znamená, že v případě Tritonu X-100 bez DDAC dochází k tvorbě micel v užším koncentračním rozsahu. Oproti tomu v systému ionogennıho a neionogennıho tenzidu ve vodném prostředí probíhá micelizace v širším koncentračním rozmezı. Hodnotu nižšıho excitačnıho polaritnıho indexu nejspıše způsobuje přídavek kationativnıho DDAC k neionogennımu Tritonu X-100, kde má nejspıše vliv i struktura kationaktivnıho DDAC. Dost pravděpodobně dochází k tvorbě směsných micel ionogennıho a neionogennıho tenzidu, což vysvětluje i rozdílná hodnota kritické micelární koncentrace (**Tabulka 4**). Hodnoty CMC bez/s přídavkem ionogennıho DDAC jsou od sebe vzdáleny přibližně o jeden koncentrační řád. Fakt, že přídavek DDAC způsobil snížení CMC, znamená, že DDAC indukuje tvorbu agregátů už při nižšıch hodnotách koncentrace Tritonu X-100.

Tabulka 4 – Hodnoty CMC Tritonu X-100 a systému Triton X-100 – DDAC v prostředí vody stanovené pomocí pyrenu při 25 °C

Systém	CMC [mM]
Triton X-100	0,327 ± 0,003
Triton X-100 – DDAC	0,047 ± 0,007

5.3.2 Zjišťování agregačního čísla systému Triton X-100 – DDAC



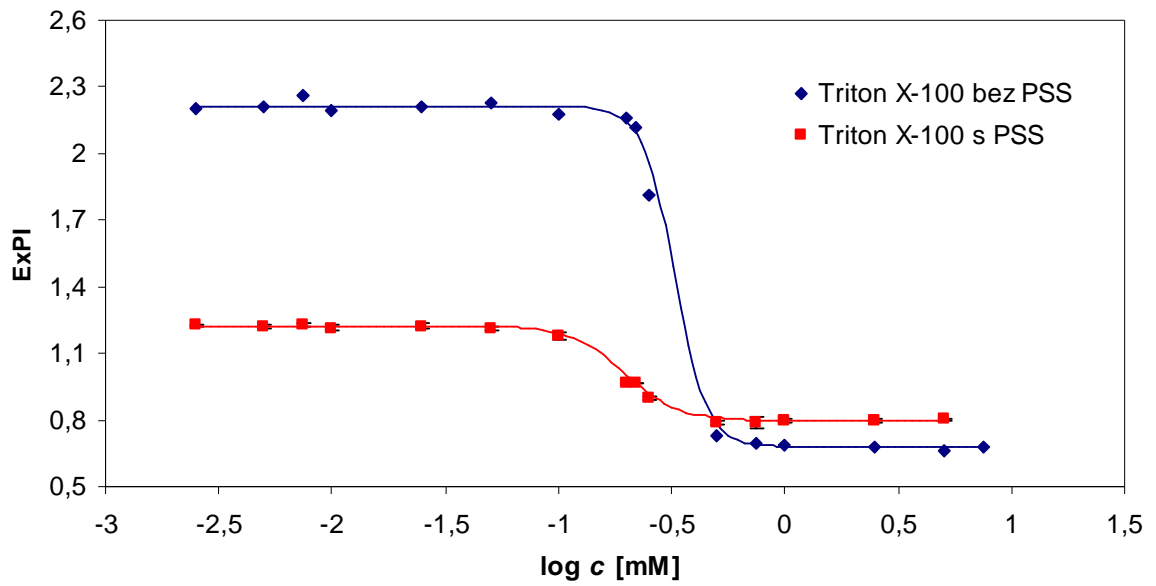
Graf 9 – Závislost logaritmu poměru intenzit fluorescence pyrenu bez/s přidavkem zhášedče na koncentraci zhášedče CPC pro systém Triton X-100 – DDAC

Agregační číslo systému Triton X-100 – DDAC bylo určeno pomocí zhášení fluorescenční sondy s amfifilním zhášedčem. **Graf 9** znázorňuje závislost přirozeného logaritmu Φ_0/Φ na koncentraci zhášedče CPC. Křivka prochází bodem 0, je proložena lineární regresí a v grafu jsou vyobrazeny i příslušející rovnice a hodnoty spolehlivosti. Pomocí zhášení bylo agregační číslo stanoveno na hodnotu 40. N_{agg} samotného Tritonu X-100 je 120, takže lze tvrdit, že s přidavkem kationaktivního DDAC se počet molekul PAL na jednu micelu sníží víc než o polovinu.

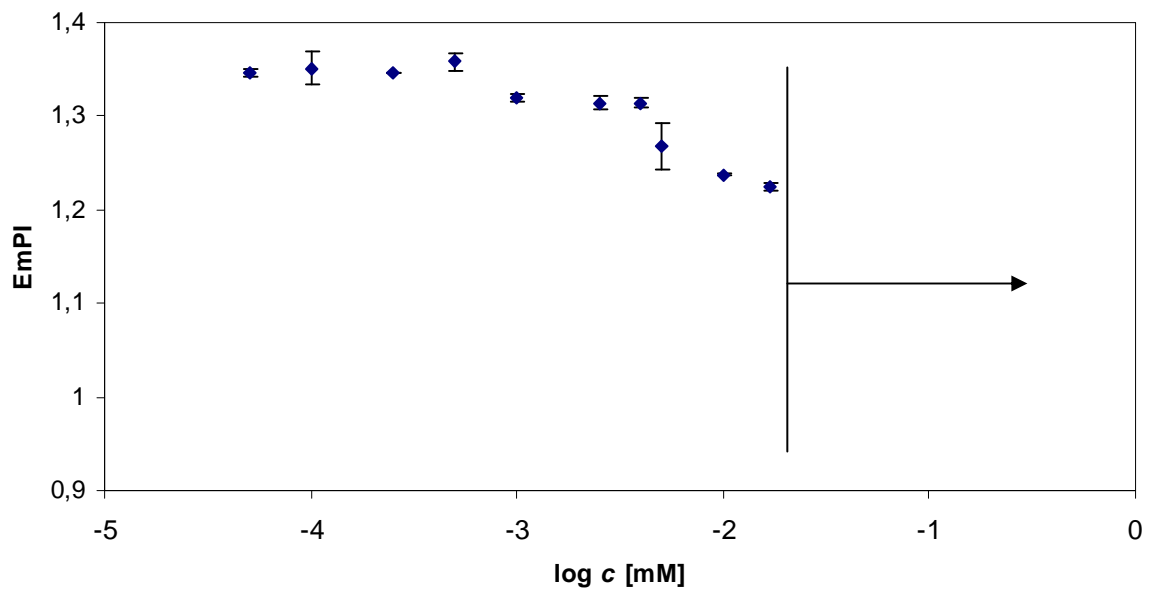
Tabulka 5 – Stanovení agregačního čísla

Systém	Prostředí	Agregační číslo
DDAC – Triton X-100	voda	40
Triton X-100	voda	120 [28]

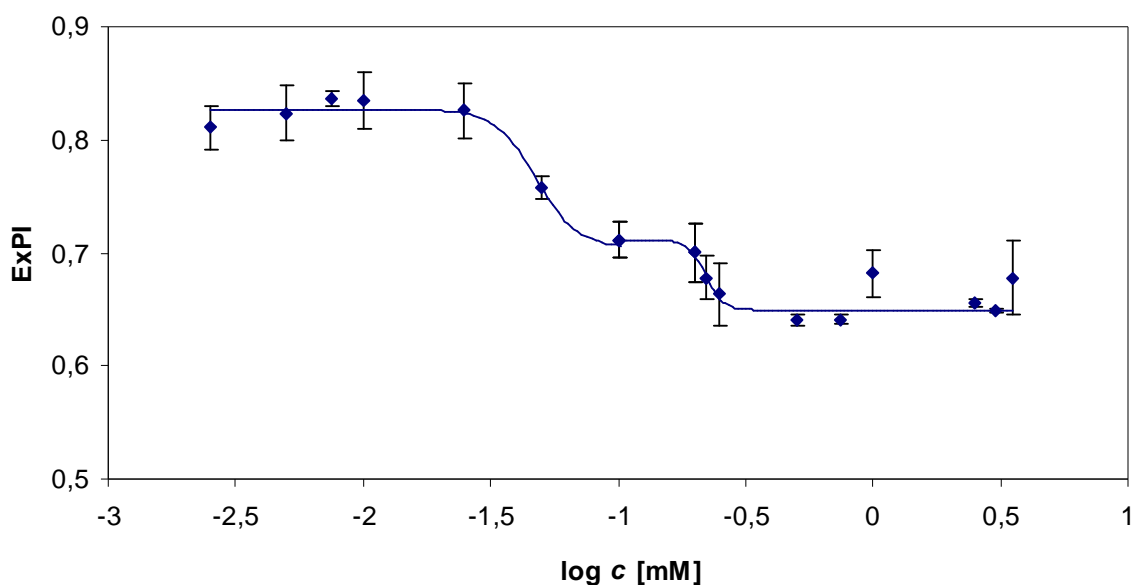
5.4 Studium agregace systému s přidavkem PSS



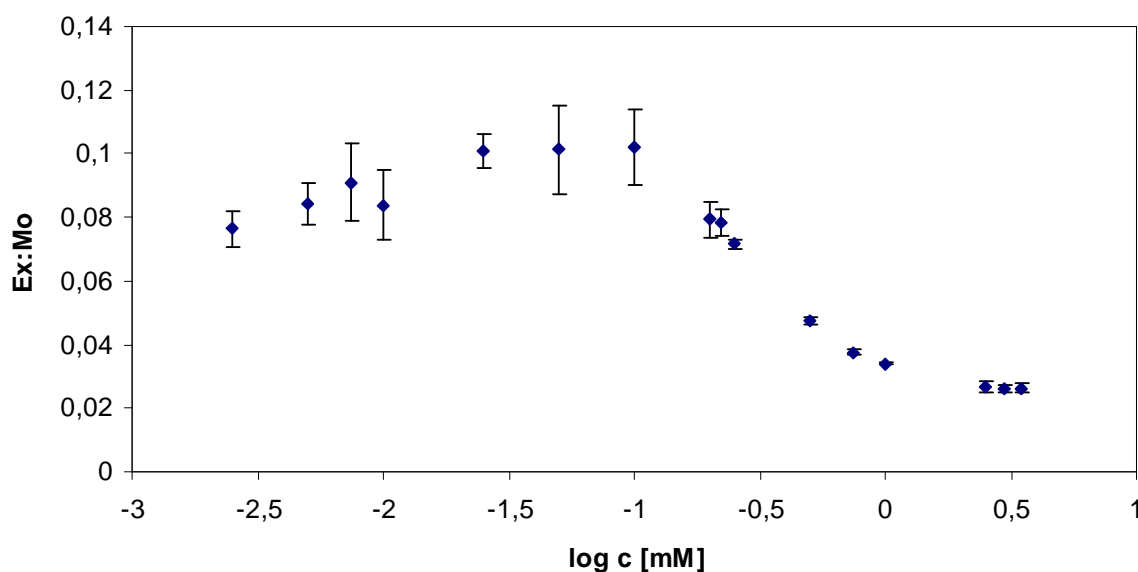
Graf 10 – Závislost $ExPI$ na logaritmu koncentrace Tritonu X-100 bez/ s přidavkem PSS (1 g.dm^{-3})



Graf 11 – Závislost $EmPI$ na logaritmu koncentrace DDAC s přidavkem PSS (1 g.dm^{-3})



Graf 12 – Závislost ExPI na logaritmu koncentrace systému Triton X-100 – DDAC s přidavkem PSS (1 g.dm^{-3}). Koncentrace Tritonu X-100 se měnila v rozmezí $0,0025 - 3 \text{ mM}$, koncentrace DDAC byla konstantní $0,042 \text{ mM}$



Graf 13 – Závislost poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace systému Triton X-100 – DDAC s přidavkem PSS (1 g.dm^{-3}). Koncentrace Tritonu X-100 se měnila v rozmezí $0,0025 - 3 \text{ mM}$, koncentrace DDAC byla konstantní $0,042 \text{ mM}$

Graf 10 zobrazuje závislost excitačního polaritního indexu na logaritmu koncentrace Tritonu X-100 bez/s přidavkem polyelektrolytu PSS. Křivky dle očekávání vykazují sigmoidní tvar. Hodnoty CMC bez/s přidavkem PSS se od sebe liší velmi málo, ale lze tvrdit, že přítomnost PSS zvyšuje agregační koncentraci Tritonu X-100. Hodnoty excitačního polaritního indexu před zlomem jsou od sebe vzdáleny přibližně o jednotku na ose y, což způsobil přidavek polyelektrolytu k neionogennímu Tritonu X-100. V systému neionogenního

tenzidu bez přídavku polyelektrolytu má křivka strmější průběh, což značí rychlejší tvorbu micel. Lze tedy říct, že v systému neionogenní tenzid – polyelektrolyt dochází k velmi slabé vzájemné interakci, ovšem nejspíše se formování domény v přítomnosti PSS neúčastní všechny molekuly neionogenního tenzidu.

Z grafu 11 je patrné, že kationaktivní DDAC v přítomnosti PSS interagoval s tímto polyelektrolytem a to za vzniku precipitátů. U systému ionogenní tenzid – polyelektrolyt tedy nebyla stanovena hodnota kritické micelární koncentrace, jelikož vzorky s precipitátem byly neměřitelné (*Příloha 1*).

Grafy 12,13 zobrazují křivky systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid/polyelektrolyt. Z grafu 12 vyplývá, že před prvním zlomem docházelo převážně k interakci PSS s DDAC, což značí hodnoty excitačního polaritního indexu. Hodnoty ExPI Tritonu X-100 s přídavkem polyelektrolytu PSS totiž vykazují mnohem vyšší hodnoty. Závislost Ex:Mo na logaritmu koncentrace (graf 13) taktéž ukazuje, že v systému již na začátku byly přítomny agregáty, které nejspíše odpovídají začínající tvorbě precipitátů DDAC s PSS. První zlom odpovídá kritické agregační koncentraci a druhý zlom odpovídá kritické micelární koncentraci systému. CAC je pro polyelektrolytem indukované agregáty, kdežto CMC je koncentrace, kdy je polyelektrolyt agregáty vysycen a vznikají volné micely. Otázkou je, zda volné micely Tritonu X-100 nebo směsné micely Tritonu X-100 a DDAC. Inflexní bod druhého zlomu se velmi blíží hodnotě CMC v systému Tritonu X-100-PSS, což značí, že druhý zlom byl ovlivněn převážně Tritonem X-100. Po druhém zlomu následuje plná solubilizace sondy. V tomto systému působil neionogenní tenzid Triton X-100 jako stabilizátor systému. Komplexně lze tvrdit, že systém ionogenní – neionogenní tenzid – polyelektrolyt interagoval.

Tabulka 6 – Porovnání hodnot CMC systémů v prostředí vody stanovené pomocí pyrenu při 25°C

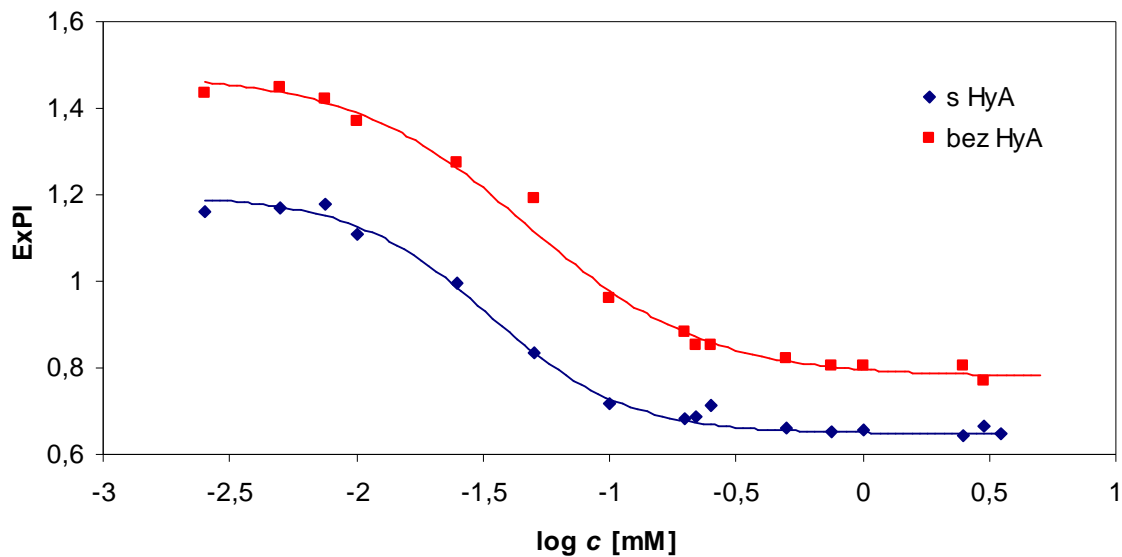
Systém	CMC [mM]	CAC [mM]
Triton X-100	0,327 ± 0,003	–
Triton X-100 – PSS	0,196 ± 0,003	–
DDAC – PSS	vznik precipitátů	–
Triton X-100 – DDAC	0,047 ± 0,007	–
Triton X-100 – DDAC – PSS	0,219 ± 0,007	0,046 ± 0,009



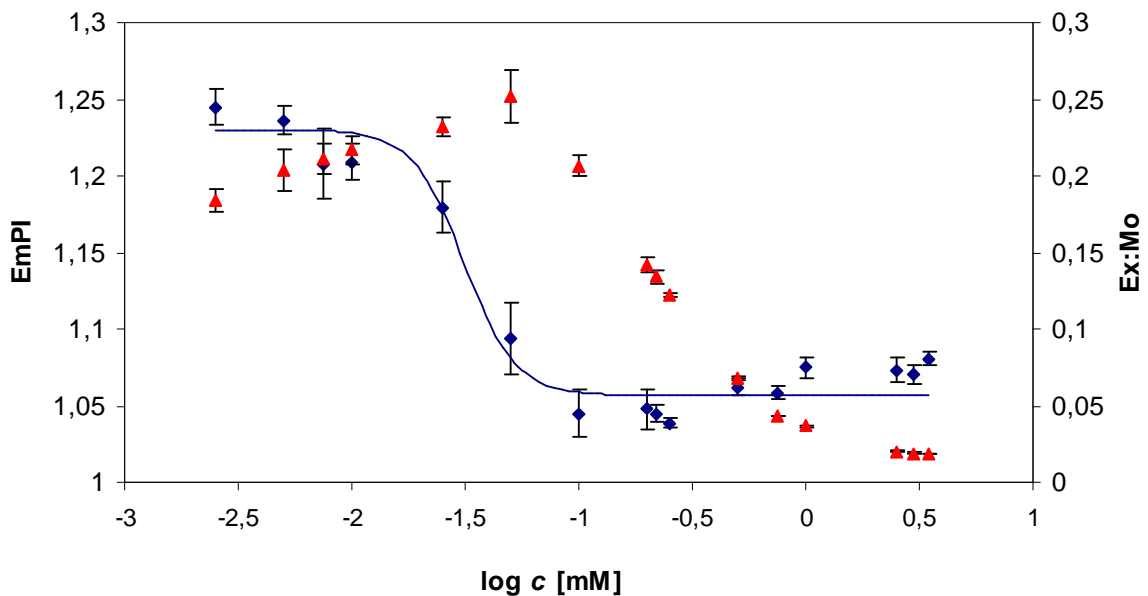
Obrázek 16 – Interakce polyelektrolytu a tenzidu [27]

5.5 Studium agregace systému s přidavkem hyaluronanu ve vodě

5.5.1 S přidavkem 0,3 MDa HyA

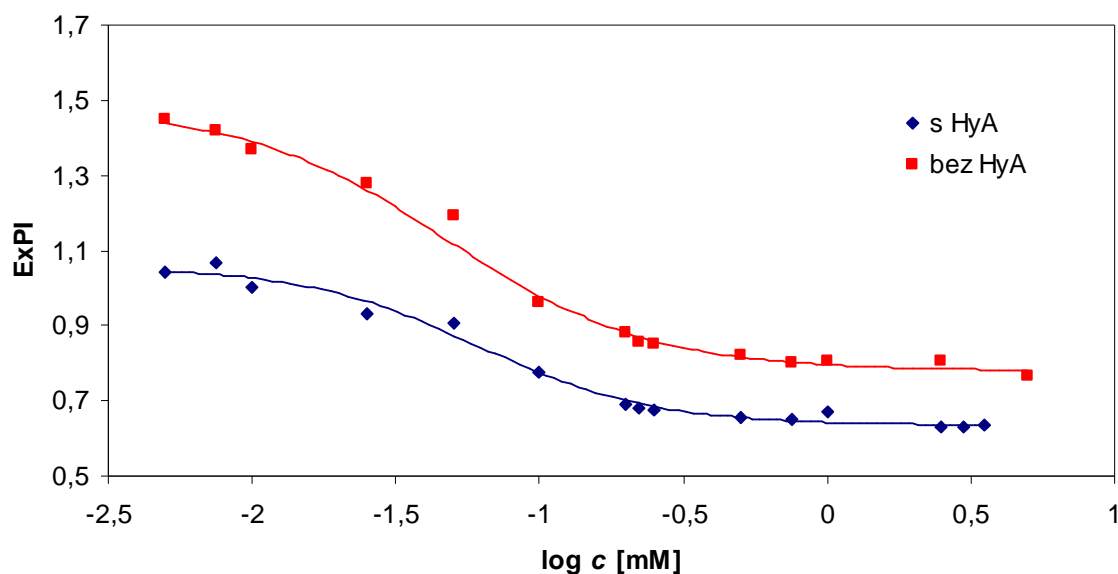


Graf 14 – Závislost ExPI na logaritmu koncentrace systému Triton X-100 – DDAC s přidavkem 0,3 MDa HyA. Koncentrace Tritonu X-100 se měnila v rozmezí 0,0025 – 3 mM, koncentrace DDAC byla konstantní 0,042 mM



Graf 15 – Závislost EmPI a poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace systému Triton X-100 – DDAC s přidavkem 0,3 MDa HyA. Koncentrace Tritonu X-100 se měnila v rozmezí 0,0025 – 3 mM, koncentrace DDAC byla konstantní 0,042 mM

5.5.2 S přidavkem 1,46 MDa HyA



Graf 16 – Závislost ExPI na logaritmu koncentrace systému Triton X-100 – DDAC s přidavkem 1,46 MDa HyA. Koncentrace Tritonu X-100 se měnila v rozmezí 0,0025 – 3 mM, koncentrace DDAC byla konstantní 0,042 mM

Agregační chování systému ionogenního – neionogenního tenzidu s přidavkem nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu je zobrazeno v **grafech 14-16**. Do systému byl přidáván hyaluronan o molekulových hmotnostech 0,3 MDa a 1,46 MDa. Ani jeden z výše uvedených grafů nevykazuje dvouzlomový charakter, přičemž křivky bez přítomnosti HyA i v přítomnosti HyA mají podobný sklon. Proces micelizace tedy nebyl ovlivněn přidavkem nízkomolekulárního ani vysokomolekulárního hyaluronanu. Lze tedy konstatovat, že molekulová hmotnost hyaluronanu má na hodnotu CMC systému minimální vliv. Hodnoty CMC jsou uvedeny v **tabulce 7**, ze které je patrné, že nedochází k žádným významnějším rozdílům mezi jednotlivými systémy. Přítomnost, ať už nízkomolekulárního nebo vysokomolekulárního hyaluronanu, mírně ovlivňuje hodnotu polaritního indexu. V **grafu 15** stojí za povšimnutí závislost poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace, ze kterého vyplývá, že již ve velmi nízkých koncentracích systému se začínají tvořit agregáty, které nejspíše odpovídají interakci DDAC s HyA (**Příloha 2**).

Tabulka 7 – Porovnání hodnot CMC systému s HyA v prostředí vody stanovené pomocí pyrenu při 25 °C

Systém	CMC [mM]
Triton X-100 – DDAC	0,047 ± 0,007
Triton X-100 + 0,3 MDa HyA	0,033 ± 0,004
Triton X-100 + 1,46 MDa HyA	0,061 ± 0,004

6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla provedena literární rešerše na téma interakce mezi polyelektrolytem a povrchově aktivními látkami pomocí fluorescenční spektrofotometrie. Bylo zjištěno, že v případě kationaktivních tenzidů s přidavkem polyelektrolytu sigmoidní křivky vykazují dvouzlomový charakter. Dále byla rešerše zaměřena na studium interakce mezi nativním hyaluronanem a tenzidy s ohledem na možné využití jako cíleného nosiče léčiv.

Experimentální část práce je zaměřena na výzkum interakcí v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid/polyelektrolyt pomocí fluorescenční spektrofotometrie. Jako ionogenní tenzid byl použit kationaktivní didecyldimethylamonium chlorid, neionogenní tenzid zastupuje oktylphenol ethoxylát a jako polyelektrolyt byl v první části práce použit poly(4-styrensulfonyl) sodný. V druhé části byl systém ionogenního tenzidu a neionogenního tenzidu zkoumán s přidavkem nativního hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech (0,3 MDa HyA, 1,46 MDa HyA). Doplnujícím experimentem bylo stanovení agregačního čísla systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid pomocí metody zhášení fluorescence. Jako zhášecí byl použit cetylpyridium chlorid a jako zhášená molekula pyren.

Nejprve byly provedeny základní experimenty s kationaktivním DDAC a neionogenním Tritonem X-100. Byla stanovena kritická micelární koncentrace DDAC v prostředí vody, 0,15 M NaCl a pufru PBS pomocí pyrenu a perylenu jako fluorescenčních sond. Bylo zjištěno, že ke změně CMC DDAC docházelo pouze v pufrovém prostředí. Sigmoidní křivka DDAC v pufru vykazovala dvouzlomový charakter, kde byl druhý zlom nejspíše způsoben změnou konformace agregátů DDAC. V případě neionogenního Tritonu X-100 nebyly pozorovány žádné výraznější změny CMC Tritonu X-100 ani v jednom prostředí.

Agregační chování systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid s přidavkem polyelektrolytu PSS bylo zkoumáno ve vodném prostředí pomocí pyrenu jako fluorescenční sondy. Bylo zjištěno, že v tomto systému docházelo k interakcím, což potvrzuje i dvouzlomová sigmoidní křivka. První zlom sigmoidní křivky odpovídá kritické agregační koncentraci systému a druhý zlom odpovídá kritické micelární koncentraci systému.

V poslední části této bakalářské práce bylo zkoumáno agregační chování v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid s přidavkem nízkomolekulárního a vysokomolekulárního nativního hyaluronanu. Tyto experimenty byly taktéž prováděny ve vodném prostředí s použitím pyrenu jako fluorescenční sondy. Bylo shledáno, že přídavek hyaluronanu nemá na hodnotu CMC systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid významný vliv. Dále lze konstatovat, že molekulová hmotnost nativního hyaluronanu minimálně ovlivňuje hodnotu CMC systému.

Lze konstatovat, že zadané cíle bakalářské práce byly splněny. Tato práce poskytla širší přehled o agregačním chování v systému ionogenní tenzid/neionogenní tenzid s přidavkem polyelektrolytu PSS a také nativního hyaluronanu. Na provedené experimenty by měla navázat další práce, která bude blíže studovat systémy s ohledem na možné využití jako cílené nosiče léčiv.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HARVEY, E. N. *A History of Luminiscence From the Earliest Times Until 1900*. The American Philosophical Society. Philadelphia, 1957, vol. 44
- [2] Technical, History of Fluorescence. *Blacklite* [online]. [cit. 2011-03-05]. Dostupné z WWW: <http://www.blacklite.com/Technical/history_of_fluorescence.htm>
- [3] SYCHRA, V., SVOBODA V., RUBESKA I. *Atomic fluorescence spectroscopy*. Van Nostrand Reinhold Company Ltd, 1975. ISBN 74-22264
- [4] FIŠAR, Z. *Principy fluorescenční spektroskopie*. Praha CUNI, 2006
- [5] VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. ISBN 3-527-29919-X
- [6] PELANT, I., VALENTA, J. *Luminiscenční spektroskopie, I. objemové krystalické polovodiče*. Praha Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0
- [7] LAKOWICZ, J, R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer. 2006. ISBN 0-387-31278-1.
- [8] FIŠAR, Z. *Nevlastní fluorofory v medicíně*. [online]. 2009, červenec. [cit. 2011-04-07]. Dostupné z WWW: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>>
- [9] DONALDSON, D. M., ROBERTSON, J. M., WHITE, J. G. The Crystal and Molecular Structure of Perylene. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Science*. 1953, prosinec. Vol. 220, pp. 311-321
- [10] GREENSPAN, P., FOWLER, S.D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of lipid research* [online]. 1985 [cit. 2011-02-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.jlr.org/content/26/7/781.abstract>>
- [11] GREENSPAN, P., MAYER, E. P., FOWLER, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol.* [online]. 1985, březen [cit. 2011-04-07]. Dostupné z WWW: <<http://jcb.rupress.org/content/100/3/965.long>>
- [12] ŠIMEK, L., HRNČIŘÍK, J. *Fyzikální chemie II. Koloidní a makromolekulární systémy*. Brno VUT, 1979.
- [13] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha VŠCHT, 1999. ISBN 80-7080-337-1
- [14] *Surfactants: Surface Active Agents* [online]. 1998, poslední revize 20. 1. 2008 [cit. 2011-02-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.chemistry.co.nz/surfactants.htm>>

- [15] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha VŠCHT, 2001. ISBN 80-7080-422-X
- [16] Tenzidy. *Wikipedie* [online]. [cit. 2011-03-30]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Tenzidy>>
- [17] KOMERS, K. *Základy koloidní chemie*. Pardubice, 1996. ISBN 80-7194-045-3
- [18] BARTOVSKÁ, L. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. [online]. Praha VŠCHT, 2000. [cit. 2011-02-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/bartovska/N403016.html>>
- [19] HASCALL, V.C., LAURENT, T. C. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997, prosinec [cit. 2011-03-05]. Dostupné z WWW: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#VIII>>
- [20] Hyaluronan@3Dchem.com [online]. 2008 [cit. 2011-04-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=425>>
- [21] NEUMANN, M.G., SCHMIT, C.C., IMAZAKI, E.T. A fluorescence emission study of the formation of induced premicelles in solutions of polyelectrolytes with ionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, vol 264, pp. 490-495
- [22] KUHN, P.S., LEVIN, Y., BARBOSA, M.C. Complex formation between polyelectrolytes and ionic surfactants. *Chemical physics letters*, 1998. vol 298, pp. 51-56
- [23] MARQUES, E.F., REGEV, O., KHAN, A., LINDMAN, B. Self-organization of double-chained and pseudodouble-chained surfactants: counterion and geometry effects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2003, pp.100-102, 83-104.
- [24] THALBERG, K., LIDMAN, B. Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Journal of Physical Chemistry*, 1989, vol. 93, pp. 1478 - 1483
- [25] YIN, D., YANK, W., GE, Z., YUANG, Y. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research*. 2005, květen, vol. 340, pp. 1201-1206
- [26] SCOTT, J. E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online]. 1998, březen [cit. 2011-03-05]. Dostupné z WWW: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>>
- [27] MONTEUX, C., et al. Interfacial Microgels Formed by Oppositely Charged Polyelectrolytes and Surfactants. 1. Influence of Polyelectrolyte Molecular Weight. *Langmuir*. 2004, vol. 20, pp. 5358-5366.

[28] Triton X-100. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2011-05-02]. Dostupné z WWW:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=X100|SIAL&N25=0&QS=ON&F=SPEC>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
CAC	kritická agregační koncentrace
CMC	kritická micelární koncentrace
CPC	cetylpyridium chlorid
CTAC	cetyltrimethylamonium chlorid
DDAC	didodecyldimethylamonium chlorid
DDAB	didodecyldimethylamonium bromid
DTAB	didodecyltrimethylamonium bromid
DTAC	didodecaltrimethylamonium chlorid
EmPI	emisní polaritní index; poměr intenzit fluorescence prvního a třetího maxima emisního spektra
ExPI	excitační polaritní index; poměr intenzit fluorescence při vlnových délkách 333 nm a 338 nm excitačního spektra
Ex:Mo	poměr intenzity fluorescence excimeru (470 nm) ku intenzitě fluorescence monomeru (373 nm) z emisního spektra
HyA	hyaluronan
NaCl	chlorid sodný
PAL	povrchově aktivní látka
PSS	poly(4-styrenulfonát) sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
Triton X-100	oktylphenol ethoxylát

8.2 Seznam symbolů

C	koncentrace látky
č.š.	číslo šarže
Da	1 dalton = 1 g.mol ⁻¹
I ₁	hodnota intenzity fluorescence prvního maxima emisního spektra pyrenu
I ₃	hodnota intenzity fluorescence třetího maxima emisního spektra pyrenu
I _E	hodnota intenzity fluorescence excimeru emisního spektra pyrenu
<i>k_q</i>	bimolekulární zhášecí konstanta
<i>K</i>	Stern-Volmerova konstanta
kDa	kilodalton, 10 ³ g.mol ⁻¹
MDa	megadalton, 10 ⁶ g.mol ⁻¹
M	mol.dm ⁻³
M _w	molární hmotnost
<i>N_{agg}</i>	agregační číslo
[<i>Q</i>]	koncentrace zhášeče
S ₀	základní stav molekuly

S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly
τ_0	doba života excitovaného stavu bez přítomnosti zhášedce
Φ	kvantový výtěžek v přítomnosti zhášedce
Φ_0	kvantový výtěžek bez přítomnosti zhášedce

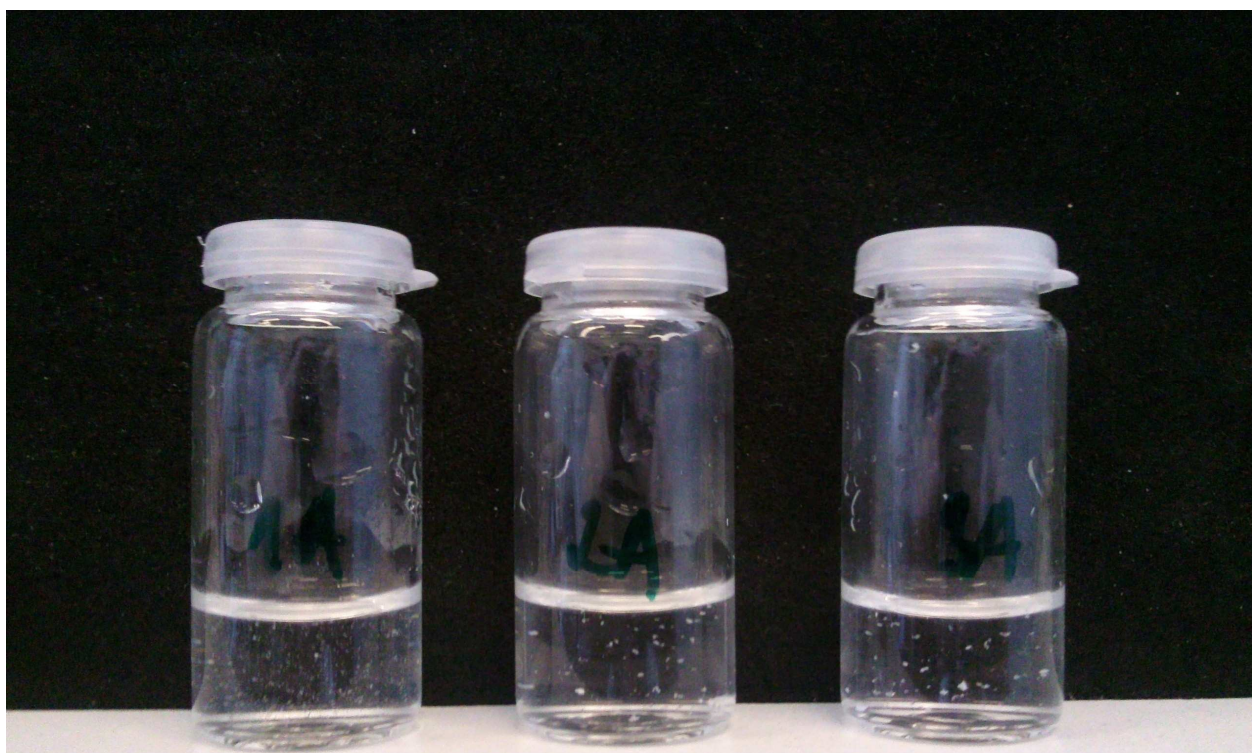
9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1



Příloha 1 – Vznik precipitátů v systému DDAC – PSS v prostředí vody

9.2 Příloha 2



Příloha 2 – Vznik sraženin v systému Triton X-100 – DDAC – 1,46 MDa HyA

9.3 Příloha 3

Tabulka 8 – Hodnoty CMC DDAC stanovené pomocí pyrenu, perylenu a nilské červeně jako fluorescenčních sond

Fluorescenční sonda	Prostředí	CMC [mM]
pyren	voda	$0,050 \pm 0,002$
	0,15 M NaCl	$0,047 \pm 0,001$
	pufř PBS	$0,018 \pm 0,002$
perylene	voda	$0,059 \pm 0,005$
	0,15 M NaCl	$0,058 \pm 0,003$
	pufř PBS	$0,041 \pm 0,003$
nilská červeně	voda	$0,085 \pm 0,004$
	0,15 M NaCl	$0,073 \pm 0,003$
	pufř PBS	$0,064 \pm 0,009$