

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

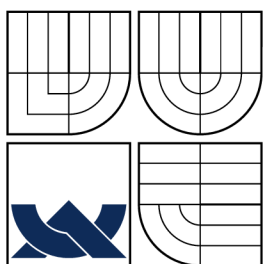
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

TRANSPORT BIOMEDICÍNSKY AKTIVNÍCH LÁTEK SKRZ
PORÉZNÍ MEMBRÁNY

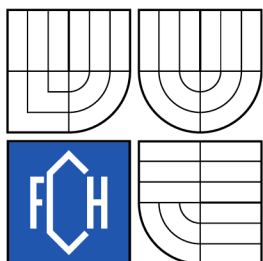
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KATEŘINA VAŠÍČKOVÁ



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

TRANSPORT BIOMEDICÍNSKY AKTIVNÍCH LÁTEK SKRZ
PORÉZNÍ MEMBRÁNY
TRANSPORT OF BIOMEDICAL ACTIVE COMPOUNDS THROUGH POROUS
MEMBRANES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KATEŘINA VAŠÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. JIŘÍ SMILEK

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0829/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Kateřina Vašíčková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	Ing. Jiří Smilek	
Konzultanti:	Ing. Jakub Mondek	

Název bakalářské práce:

Transport biomedicínsky aktivních látek skrz porézní membrány

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma transport biomedicínsky aktivních látek skrz porézní materiály.
2. Na základě literární rešerše vybrat vhodnou metodiku stanovení fundamentálních transportních parametrů difundujících látek.
3. Provést pilotní měření a ověřit aplikovatelnost vybraných fyzikálně-chemických metod.
4. Diskutovat naměřená data a navrhnout možné pokračování experimentu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kateřina Vašíčková
Student(ka)

Ing. Jiří Smilek
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Náplní této bakalářské práce je studium transportu biomedicínsky aktivních látek skrz porézní membrány. Hlavní cílem je otestovat a optimalizovat metodu penetrace micelárních roztoků vybraného tenzidu se solubilizovaným barvivem a v dalším kroku i se solubilizovaným léčivem. Vybraným tenzidem schopným tvorby micel je bromid cetyltrimethylamonný (CTAB) a jako modelová difúzní a fluorescenční sonda slouží barvivo nilské červeně. Solubilizovanou aktivní látkou je nesteroidní protizánětlivé léčivo ketoprofen s analgetickými a antipyretickými účinky. Difúzní procesy jsou realizovány ve vertikálních Franzových difúzních celách s polykarbonátovou membránou, jejíž velikost pórů je 2 μm . Během difúze jsou odebírány vzorky ve zvolených časových intervalech a následně vyhodnocovány metodou fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). Pomocí této metody je možné monitorovat probíhající difúzi v čase a to i při velmi nízkých, nanomolárních koncentracích vybrané fluorescenční sondy. Práce poskytuje přehled o chování nilské červeně v micelárním roztoku tenzidu při difúzních procesech a dále možnost rozšíření experimentu o použití aktivní látky, např. již zmíněného ketoprofenu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Difúze, micely, solubilizace, fluorescenční korelační spektroskopie, CTAB, nilská červeně

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with a study of transport of biomedical active compounds through porous membranes. The main goal is to optimize a penetration method of micellar solutions with a solubilized dye and subsequently with solubilized drug. Cetyltrimethylammonium bromide is chosen as a surfactant and a Nile red dye is used as a diffusion and fluorescence probe. Selected active compound is a nonsteroidal anti-inflammatory drug ketoprofen with analgesic and antipyretic effects. The diffusion processes are realized using Franz diffusion cells with polycarbonate membrane with a 2 μm size of poruses. The samples are withdrawn in a chosen time intervals and afterwards evaluated by a fluorescence correlation spectroscopy. Using this method, it is possible to screen the diffusion in time even in nanomolar concentrations of a fluorescence probe chosen. This thesis provides an overview of Nile red behaviour in the micellar solutions of surfactant during diffusion processes. The experiment can be extended using an active compound, for instance using a ketoprofen as it is mentioned above.

KEYWORDS

Diffusion, Micelles, Solubilization, Fluorescence correlation spectroscopy, CTAB, Nile red

VAŠÍČKOVÁ, Kateřina *Transport biomedicínsky aktivních látek skrz porézní membrány*: bakalářská práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2015. 51 s. Vedoucí práce byl Ing. Jiří Smilek

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Transport biomedicínsky aktivních látek skrz porézní membrány“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

(podpis autorky)

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Jiřímu Smilkovi za odborné vedení, za poskytnutí velkého množství konzultací, trpělivost a podnětné návrhy k práci. Mé poděkování patří také Ing. Jakubovi Mondekovi za pomoc při řešení experimentální části pomocí fluorescenční korelační spektroskopie a za odborné rady při problematice zpracování dat. Velký dík náleží také Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za zasvěcení do problematiky dynamického rozptylu světla. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za neustálou podporu a trpělivost.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Teoretická část	3
3.1	Disperzní systémy	3
3.1.1	Koloidně disperzní soustavy	3
3.1.2	Micelární koloidy	4
3.1.3	Povrchově aktivní látky	4
3.2	Micely	5
3.2.1	Velikost a tvar micel	6
3.2.2	Polymerní micely	7
3.3	Solubilizace micel	8
3.4	Difúze	11
3.4.1	Matematický popis difúze	12
3.4.2	Vybrané difúzní modely	13
3.4.3	Stanovení difúzního koeficientu metodou diafragmové cely	16
3.5	Dynamický rozptyl světla	17
3.6	Fluorescence a Jablonského diagram	19
3.7	Princip fluorescenční korelační spektroskopie	20
3.7.1	Experimentální uspořádání	21
3.7.2	Autokorelační analýza	21
3.7.3	Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie	23
4	Současný stav řešené problematiky	24
4.1	Solubilizace hydrofóbních barviv	24
4.2	Penetrace aktivních látek přes membrány	25
4.3	Chování nilské červeně při solubilizaci	28
4.4	Determinace difúzního koeficientu micel pomocí fluorescenční korelační spektroskopie	29
5	Experimentální část	31
5.1	Použité chemikálie	31
5.2	Použité přístroje	31
5.3	Penetrační experimenty	31
5.3.1	Příprava roztoku fluorescenční sondy	31
5.3.2	Příprava roztoku tenzidu	32
5.3.3	Příprava roztoku ketoprofenu	32

5.3.4	Příprava roztoků pro penetrační experimenty	32
5.3.5	Příprava difúzních cel	32
5.4	Analýza vzorků pomocí Fluorescenční korelační spektroskopie	33
5.5	Analýza vzorků pomocí Dynamického rozptylu světla	34
6	Výsledky	36
6.1	Výsledky měření pomocí Dynamického rozptylu světla	36
6.2	Výsledky měření pomocí fluorescenční korelační spektroskopie	38
7	Závěr	44
8	Literatura	46
9	Seznam zkratk	50
10	Seznam symbolů a veličin	51

SEZNAM OBRÁZKŮ

3.1	Schématické znázornění vzniku micely [6]	6
3.2	Tvary sférické, cylindrické a dvojvrstvé (planární micely) [7]	7
3.3	Obrázek reverzní micely [8]	7
3.4	Schématické znázornění tvorby micely z negativně nabitého homopolymeru a kladně nabitého kopolymeru [10]	8
3.5	Schématické znázornění slabě rozpustné látky jako funkce koncentrace tenzidu ve vodném roztoku [6]	9
3.6	Centra, kde látka může být solubilizována. Tučné čáry symbolizují látku, černé kruhy hydrofilní hlavičku, černé tučné křivky hlavičku PEO, světlé křivky konec tenzidu [6]	11
3.7	Elektrická dvojvrstva částice [24]	19
3.8	Jablonského diagram [28]	20
3.9	Schéma nastavení FCS [29]	22
4.1	Obecná struktura hemicyaninových barviv [6]	25
4.2	Aniontový efekt	28
4.3	Strukturní vzorec nilské červeně	29
5.1	Donorová a akceptorová část difúzní cely	33
5.2	Ilustrační obrázek přístroje Microtime 200	34
6.1	Graf distribuce velikosti částic pro 1. měření	37
6.2	Graf distribuce velikosti částic pro 2. měření	38
6.3	Graf autokorelační křivky pro systém nilská červeně a CTAB	39
6.4	Graf autokorelační křivky pro systém nilská červeně, CTAB a ketoprofen	40
6.5	Graf závislosti difúzního toku na čase pro systém CTAB a nilská červeně	41
6.6	Graf závislosti difúzního toku na čase pro systém CTAB, nilská červeně a ketoprofen	42

1 ÚVOD

Solubilizace aktivních látek do roztoků micel je nedílnou součástí při podávání léků, které je nutné penetrovat přes různorodé membrány v organismu. Právě solubilizování léčiva do micely umožní dopravit lék na konkrétní místo v jeho nezměněné podobě a bez případného zabrždění membránou. Četné řady publikací a vědeckých článků poukazují na to, že do micely nemusí být solubilizováno pouze léčivo, ale i barvivo, které svými vlastnostmi umožní detekovat některé jevy v organismu. Příkladem mohou být hemicyaninová barviva, jež jsou účinnými detektory citlivými na změny napětí v biomembránách a zároveň fluorescenčními indikátory přechodného napětí v neuronech a mozku.

Teoretická část této bakalářské práce je zaměřena na charakterizaci disperzních systémů, objasňuje podmínky nutné ke vzniku micelárních roztoků a solubilizaci aktivní látky do micely. Podstatná část je věnována difúzním procesům a použitým difúzním modelům. Závěr teoretické části shrnuje poznatky jiných autorů v námi zkoumané oblasti týkajících se solubilizace barviv či jiných aktivních látek a penetrace aktivních látek přes membrány.

Experimentální část je založena na optimalizaci metody, difúze ve skleněných Franzových celách a na následném vyhodnocování difúzních procesů. Jednotlivé roztoky micel tenzidu bromidu cetyltrimethylamonného se solubilizovaným barvivem nilské červeně, popř. léčivem ketoprofen byly podrobeny difúzi skrz porézní polykarbonátovou membránu simulující podmínky biomembrán v organismu. Pro studium difúzních procesů byla vybrána technika fluorescenční korelační spektroskopie, která umožňuje zkoumání difúzních procesů v biologických a koloidních systémech v časovém rozsahu μs – ms . Tato technika vyniká svou výjimečnou selektivitou a citlivostí, pomocí níž lze proměřit i velmi zředěné roztoky, avšak obsahující barvivo schopné fluorescence. V námi vybraném systému mohla být difúzní dynamika micely zkoumána díky solubilizovanému fluoreskujícímu barvivu nilské červeně.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem předložené bakalářské práce je zpracování literární rešerše zabývající se problematikou transportu biomedicínsky aktivních látek skrz porézní membrány. Na základě této rešerše vybrat látky a vhodnou difúzní techniku pro stanovení základních transportních parametrů. Dále použitou metodu optimalizovat a navrhnout možná pokračování experimentu. Následující body přináší shrnutí požadovaných hlavních cílů bakalářské práce:

- Zpracování literární rešerše na téma Transport biomedicínsky aktivních látek skrz porézní materiály.
- Na základě literární rešerše výběr vhodné metodiky stanovení fundamentálních transportních parametrů difundujících látek.
- Provedení pilotního měření a ověření aplikovatelnosti vybraných fyzikálně-chemických metod.
- Diskuze naměřených dat a návrh možného pokračování experimentu.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Disperzní systémy

Disperzní systém je soustava tvořená disperzním podílem a disperzním prostředím, přičemž disperzní podíl je v disperzním prostředí rozptýlen ve formě částic.

Rozdělení disperzních systémů podle počtu fází:

Homogenní disperzní systémy charakterizovány disperzním podílem a disperzním prostředím tvořící jednu fázi. Vznikají rozpuštěním disperzního podílu v disperzním prostředí a jsou stálé. Homogenními disperzními soustavami jsou pravé roztoky, roztoky polymerů a micelární koloidy.

Heterogenní disperzní systémy jsou soustavy, ve kterých je disperzní podíl od disperzního prostředí oddělen fázovým rozhraním. Nevznikají samovolně, proto je nutné dodat systému energii. Můžeme je připravit násilným rozptýlením pevné nebo kapalné fáze v disperzním prostředí, případně chemickou reakcí či fyzikálním pochodem vedoucí ke vzniku nové fáze ve formě disperzních částic. Soubor povrchů disperzních částic tvoří velkou plochu fázového rozhraní, z čehož vyplývá existence mezifázového napětí. Mikroheterogenní soustavy jsou tedy nestálé a mají tendenci se shlukovat nebo splývat a tvořit tak systém makroheterogenní. Heterogenními disperzními soustavami jsou soly a hrubé disperze [1], [2].

Rozdělení disperzních systémů podle velikosti částic: Rozměr neboli velikost disperzních částic charakterizuje jemnost, s jakou je disperzní podíl rozptýlen. Stupeň disperzity je převrácenou hodnotou rozměru disperzní částice [2].

Dle velikosti částic jsou disperzní systémy klasifikovány následovně:

- Analytické disperze – $d < 10^{-9}$ m
- Koloidní disperze – $10^{-9} < d < 10^{-6}$ m
- Hrubé disperze – $d > 10^{-6}$ m

Systém s disperzními částicemi stejné velikosti je nazýván jako monodisperzní. Polydisperzní systém obsahuje částice různé velikosti [1], [2].

3.1.1 Koloidně disperzní soustavy

Koloidní disperze jsou systémy tvořeny disperzním podílem a disperzním prostředím, přičemž velikost částic disperzního podílu se pohybuje v rozmezí 1 – 1000 nm. U koloidních částic je možnost pod mikroskopem pozorovat jejich náhodný pohyb způsobený srážkami disperzního prostředí s disperzními částicemi, tento jev se nazývá Brownův pohyb.

Při prostupu svazku paprsků koloidními částicemi dochází k rozptylu světla na malých částicích. V důsledku toho se svazek paprsků stává při bočním pozorování

viditelným a má tvar kužele (tzv. Tyndallův kužel), jehož vrchol je v místě, kde světelný paprsek vchází do prostředí s koloidními částicemi. Pod mikroskopem je možné spatřit větší disperzní částice jako svítící body, u menších částic je pozorován světelný pruh. Tento jev se nazývá Tyndallův efekt. Příkladem z denního života je vniknutí svazku světelných paprsků do ztemnělé místnosti se zviřeným prachem, který je hrubou disperzí v plyném disperzním prostředí. [1], [3].

Heterogenní koloidně disperzní systémy jsou označovány jako lyofobní, tedy mající nízkou afinitu k rozpouštědлу. *Lyofobní koloid* (lyosol) je typ koloidního systému, kdy disperzním prostředím je kapalina a podílem tuhá látka. Částice disperzního podílu jsou v daném prostředí nerozpustné. Pokud se jedná o disperzní prostředí s organickou fází, mluvíme o organosolech; pokud uvažujeme vodnou fází, mluvíme o hydrosolech. Lyofobní koloidy jsou termodynamicky nestabilní a jeví tedy tendence přecházet do stavu hrubé disperze.

Homogenní koloidně disperzní systémy nesou přívlastek *lyofilní*, tzn. jeví náklonnost k rozpouštědлу, tedy jsou solvatovány (částice tohoto systému jsou obaleny molekulami rozpouštědla). Vznikají samovolným rozpuštěním disperzního podílu v disperzním prostředí a jsou agregátně stálé. Lyofilní koloidy dělíme na molekulové a asociativní (micelární) koloidy. Molekulové koloidy jsou tvořeny makromolekulárními látkami, jako jsou polysacharidy, proteiny a polymery. Jedná se o koloidy s molární hmotností vyšší než $1000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [1].

3.1.2 Micelární koloidy

Micelární koloidy jsou termodynamicky stabilní systémy se schopností vytvářet micely. Vznik tohoto celku je podmíněn strukturou molekul micelárního koloidu. Molekula musí obsahovat skupiny s vysokou afinitou k rozpouštědлу a současně části, které jsou v daném prostředí nerozpustné. Jedná se o molekuly amfipatické neboli amfifilní. Touto vlastností se vyznačují zejména molekuly povrchově aktivních látek [1].

3.1.3 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (zkráceně PAL) neboli tenzidy jsou molekuly hojně využívané v koloidních systémech, např. mýdla, detergenty a baktericidní prostředky. Je však třeba zmínit, že tenzidy se nacházejí i v přírodních systémech a jsou nezbytné pro funkci našeho těla, např. soli žlučových kyselin produkované slinivkou břišní rozptylují tuk na částice koloidní velikosti, které pak dále proudí do krevního oběhu [4].

Jsou složeny ze dvou částí, jedna z nich je vysoce rozpustná v jedné z fází, druhá nikoliv. Strukturu tenzidu tvoří hydrofobní konec a hydrofilní hlavička. Hydrofobní částí bývá zpravidla dlouhý uhlovodíkový zbytek, často s halogenovou skupinou, nebo siloxanový řetězec. Hlavička tenzidu může nést náboj (kladný či záporný), může být amfoterní (zwitterionická) nebo neutrální. Typickým příkladem kationaktivního tenzidu je dodecyltrimethylammonium bromid (DTAB), anionaktivního tenzidu dodecylsulfát sodný (SDS), amfoterního tenzidu lecithin a neutrálního tenzidu *n*-dodecyl-tetraethylenoxid ($C_{12}E_4$) [6].

3.2 Micely

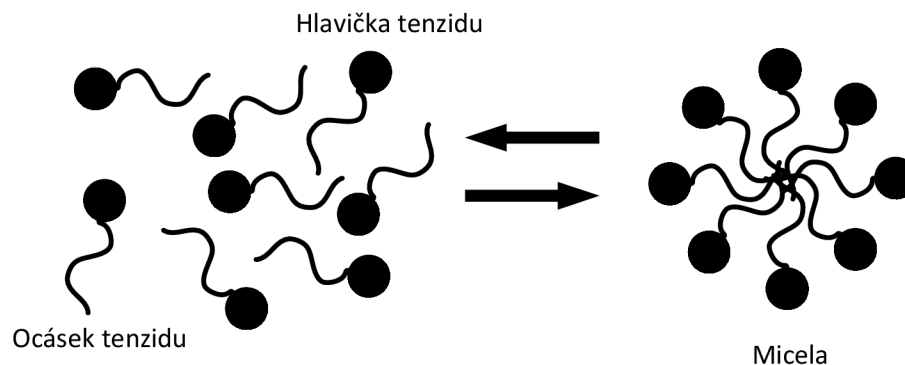
Přidáním povrchově aktivní látky do vodného roztoku jsou polární skupiny hlaviček hydratovány, tedy jsou vytvořeny vodíkové vazby s molekulami vody. Tento jev nemůže nastat u hydrofobního konce, naopak jistá nespojitost je zpozorována ve struktuře vody okolo těchto hydrofobních konců známá jako „hydrofobní efekt“. [4].

Termín *hydrofobní efekt* vyjadřuje schopnost nepolárních molekul asociovat se ve vodném roztoku. Při umístění nepolárních látek do vodného prostředí dochází k lokálnímu porušení sítě vodíkových vazeb. Molekuly vody se hromadí na povrchu nepolární látky, interagují s ní pomocí slabých van der Waalsových sil. Molekuly vody se však snaží zachovat co nejvíce vodíkových vazeb, což vede k uspořádání molekul vody kolem rozpuštěné nepolární látky. Nastává jev zvaný hydrofobní hydratace. Takto vynucená orientace molekul vody je entropicky nevýhodná, neboť dochází ke ztrátě rotačních módů volnosti. Aby se zabránilo těmto nevýhodným entropickým projevům, snaží se molekuly nepolární látky shlukovat dohromady. Molekuly vody orientované kolem molekuly nepolární látky mohou být uvolněny do roztoku. [5].

Z existence hydrofobního konce v roztoku lze vyvodit nárůst volné energie relativní k poklesu vodíkových vazeb. Pokud několik těchto konců vytvoří agregát, bude plocha na jeho povrchu menší, než celková plocha jednotlivých konců. Mezi jednotlivými hydrofobními konci se uplatní van der Waalsovy interakce a mezi polárními hlavičkami elektrostatické interakce (pokud mají náboj) [4].

Zvýšením teploty nad kritickou mez dojde k tvorbě agregátů z molekul povrchově aktivních látek, tyto agregáty se nazývají *micely*. Tato mez se nazývá Krafftův bod (Krafftova teplota) a pod její hranicí nemůžou být micely vytvořeny. Koncentrace, při kterých jsou micely tvořeny, nese název kritická micelární koncentrace (CMC). Proces micelizace probíhá tak, že hydrofobní konce se shromáždí, aby zabránily kontaktu s vodou, a naopak polární hlavičky se snaží zůstat na povrchu, aby jejich kontakt s vodou byl co největší. Právě při tomto seskupení má systém nejnižší energii, a pokud do systému nebudeme zasahovat, bude tento ustálený stav

přetrvávat. [4], [6].



Obr. 3.1: Schématické znázornění vzniku micely [6]

Měřením některých fyzikálních veličin lze stanovit hodnotu kritické micelární koncentrace. Při vzniku micel dochází k prudkým změnám povrchového napětí, molární vodivosti, osmotického tlaku i optických vlastností systému [1].

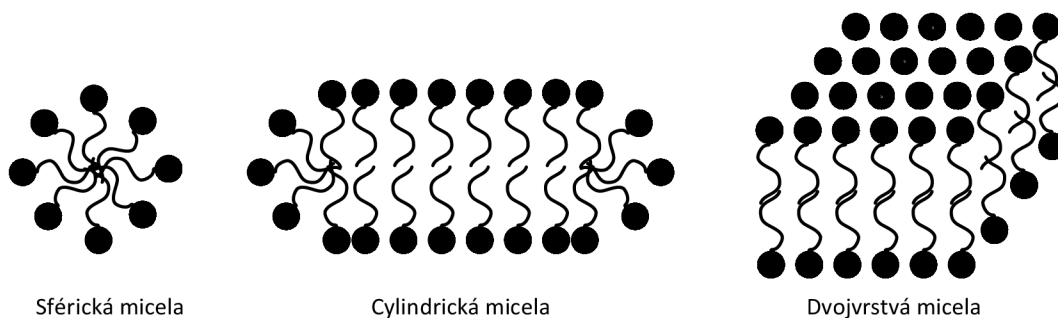
Povrchové napětí při vzniku micel prudce klesá a ustálí se až po jejím vzniku, kdy se veškerý přidávaný monomer spotřebuje na tvorbu micel. Molární vodivost klesá mírně a po překročení CMC klesá prudce. Osmotický tlak roste úměrně s koncentrací, ale po překročení CMC stoupá pomaleji [1].

3.2.1 Velikost a tvar micel

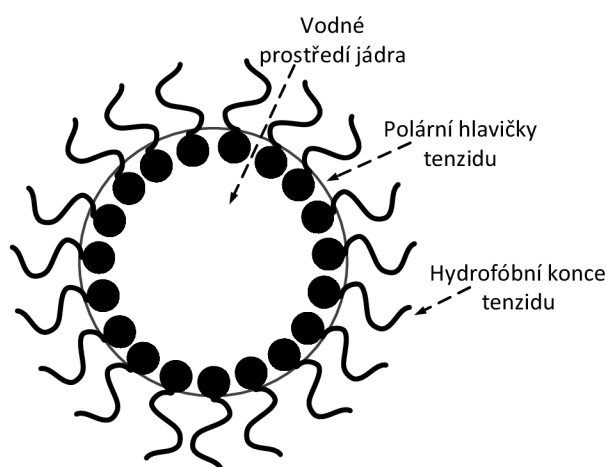
Micely mohou být sférické, cylindrické nebo planární. Jejich tvar a velikost může být kontrolována změnou chemické struktury tenzidu stejně jako změnou podmínek samotného roztoku, tedy např. teplotou, koncentrací, iontovou silou a změnou pH. V závislosti na typu tenzidu a vlastnostech roztoku mohou sférické micely růst v jednom rozměru a přejít na micely cylindrické, nebo ve dvou rozměrech a tím dají za vznik micelám dvojvrstevným nebo kotoučovitým. Růst micely je kontrolován převážně hlavičkou tenzidu. Hlavičky jsou v pozici těsně blízko u sebe tak, aby byl povrch tenzidu v micelle co nejmenší [6].

Ve vodném prostředí jsou molekuly tenzidu orientovány tak, aby polární hlavička směřovala směrem k vodné fázi a nepolární konec směrem od ní. V ionogenních micelách obsahuje styčná plocha mezi micelou a vodnou polární hlavičku s polárními skupinami, které disociují. Spolu s protionty přitahovanými disociovanými polárními skupinami tvoří elektrickou dvojvrstvu. Tloušťka dvojvrstvy je funkcí iontové síly roztoku a může být silně potlačena v přítomnosti elektrolytu [1], [6].

V nevodném prostředí vznikají tzv. reverzní micely tvořeny jádrem z polárních skupin a hydrofobním koncem směřujícím do nepolárního prostředí.



Obr. 3.2: Tvary sférické, cylindrické a dvojvrstvé (planární micely) [7]

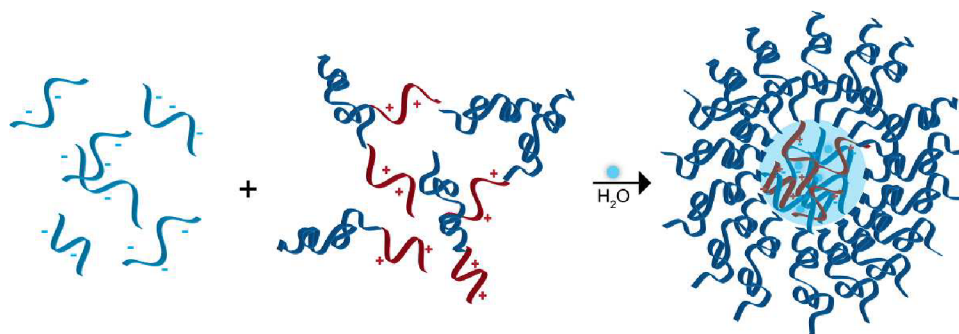


Obr. 3.3: Obrázek reverzní micely [8]

3.2.2 Polymerní micely

Polymerní micely se skládají z bloků kopolymerů obsahujících hydrofilní i hydrofobní monomerní jednotky jako je např. polypropylen oxid a polyethylen oxid. Tyto amfifilní bloky kopolymerů jsou schopny ve vodném prostředí tvořit micely. Jádrem micely je tvořeno hydrofobními bloky a obal micely se skládá z hydrofilních částí kopolymeru chránící hydrofobní bloky před stykem s vodou. Volná energie se tímto sníží, což je hnací silou pro formování micely, ke které dochází po překročení již zmíněné kritické micelární koncentrace. Velikost polymerních micel se pohybuje v rozsahu 10 – 200 nm a obecně platí, že pokud je hydrofilní obal delší než hydrofobní jádro, micela upřednostňuje tvar sférický [9].

Polymerním micelám je v dnešní době věnována zvláštní pozornost a to především ve farmaceutickém vývoji při podávání a distribuci léků do krevního oběhu. Mají výhodu značné stability, tudíž disociují pomalu, a to jim umožní zachovat si svou celistvost a dosáhnout svého cíle bez rozpadnutí se na monomerní jednotky.



Obr. 3.4: Schématické znázornění tvorby micely z negativně nabitého homopolymeru a kladně nabitého kopolymeru [10]

Vzhledem k tomu, že micely jsou při intravenózním podání vystaveny několika změnám (zředění, změny v pH), kontaktu s jinými buňkami a polymery, musí vůči těmto vlivům zůstat intaktní, a tedy být termodynamicky a kineticky stabilní. Termodynamická stabilita popisuje, jak systém zareaguje na vytvoření micel a jak dosáhne rovnováhy, kdežto kinetická stabilita popisuje chování systému v čase a podrobně líčí změny polymeru a rozložení micely po dosažení cíle [6], [9].

Základním parametrem charakterizujícím termodynamickou stabilitu je kritická micelární koncentrace. S ní je úzce spjata standardní volná energie micelizace ΔG_{mic} dle rovnice:

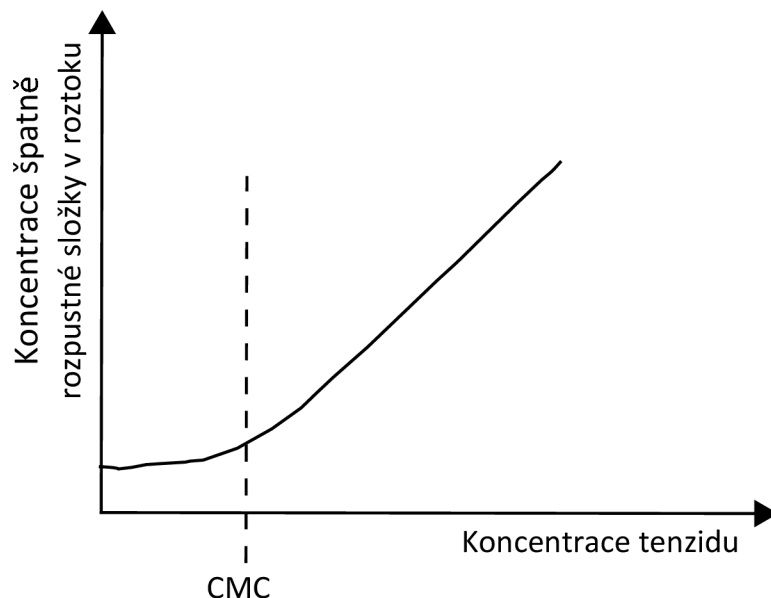
$$\Delta G_{mic} = RT \cdot \ln \text{CMC} \quad (3.1)$$

kde R univerzální plynová konstanta a T teplota. Polymerní micely vykazují nižší hodnoty CMC než micely povrchově aktivních látek, protože polymery mají více možností interakce než malé molekuly. Hodnota CMC může být určena ostrými změnami fyzikální veličin, ke kterým při této koncentraci dochází (velikost micely, optické vlastnosti, povrchové napětí, viskozita). Nejpoužívanějšími metodami pro jejich vysokou citlivost jsou vysoce-účinná kapalinová chromatografie (HPLC), dynamický rozptyl světla (DLS) a fluorescenční spektroskopie (FCS) [9].

3.3 Solubilizace micel

Důležitou vlastností micel je jejich schopnost solubilizovat těžce rozpustné látky ve vodě. Solubilizaci lze definovat jako spontánní rozpuštění látky reverzní interakcí s micelou povrchově aktivní látky ve vodě. Pokud si zakreslíme rozpustnost slabě rozpustné látky jako funkci koncentrace tenzidu, vidíme, že rozpustnost látky je nízká až do té doby, než tenzid dosáhne hodnoty kritické micelární koncentrace. Po

jejím překročení rozpustnost roste lineárně s koncentrací tenzidu, což indikuje, že solubilizace je spojena s micelizací [6].



Obr. 3.5: Schématické znázornění slabě rozpustné látky jako funkce koncentrace tenzidu ve vodném roztoku [6]

Z termodynamického hlediska lze solubilizaci považovat jako rozdělení aktivní látky (léčiva) mezi dvě fáze, micelu a vodné prostředí. Standardní volná energie solubilizace může být popsána následujícím vztahem:

$$\Delta G_s = -RT \cdot \ln P \quad (3.2)$$

kde R je univerzální plynová konstanta, T je absolutní teplota a P je rozdělovací koeficient mezi micelou a vodnou fází.

Obecně solubilizace molekuly povrchově aktivní látkou může být vyhodnocena na základě dvou veličin. Těmito veličinami jsou molární solubilizační kapacita, χ , a rozdělovací koeficient systému micela – voda, P . Hodnota χ je definována jako počet molů rozpuštěné látky (léčiva), která mohou být solubilizována jedním molem micelárního tenzidu, a charakterizuje schopnost tenzidu solubilizovat aktivní látku (léčivo). Hodnota χ může být vypočítána na základě obecné rovnice pro micelární solubilizaci:

$$\chi = \frac{S_{tot} - S_w}{C_{swf} - CMC} \quad (3.3)$$

kde S_{tot} je úplná rozpustnost aktivní látky, S_W je rozpustnost aktivní látky ve vodě, C_{swf} je molární koncentrace tenzidu v roztoku a CMC kritická micelární koncentrace. Nad hranicí CMC je koncentrace monomerního tenzidu přibližně rovna koncentraci CMC, výraz $C_{swf} - \text{CMC}$ je přibližně roven koncentraci tenzidu v micelární podobě, a tedy χ je roven poměru koncentrace aktivní látky v micle ku koncentraci tenzidu v micelární podobě.

Rozdělovací koeficient systému micela – voda, P , je charakterizován jako poměr koncentrace aktivní látky v micle ku koncentraci aktivní látky ve vodě. Platí tedy, že

$$P = \frac{S_{tot} - S_W}{S_W} \quad (3.4)$$

Kombinací rovnic 3.3 a 3.4 můžeme vyjádřit závislost veličin χ a P :

$$P = \frac{\chi (C_{swf} - \text{CMC})}{S_W} \quad (3.5)$$

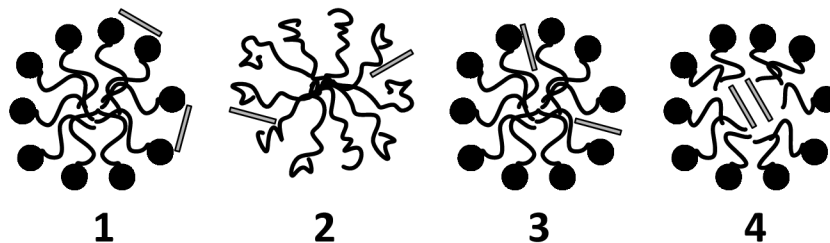
Aby byla eliminována závislost P na koncentraci tenzidu, uvažujme molární rozdělovací koeficient systému micela – voda, P_M , u kterého platí, že $C_{swf} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z toho vyplývá, že

$$P_M = \frac{\chi (1 - \text{CMC})}{S_W} \quad (3.6)$$

Čím nižší je hodnota CMC daného tenzidu, tím stabilnější jsou micely. Z farmaceutického hlediska je tento fakt nesmírně důležitý, neboť při podání léku micely tenzidů s nízkou hodnotou CMC v krvi přetrvávají, kdežto tenzidy s vysokou hodnotou disociují na monomery a jejich obsah se může srážet v krvi, což je z farmakologického hlediska nežádoucí [11].

Lze pozorovat několik center, kde aktivní látka může být solubilizována, jak je patrné z obrázku 3.6. Hydrofilní látky jsou adsorbovány na povrch micely (1), látky se střední rozpustností jsou lokalizovány mezi hydrofilními hlavičkami micely z polyethylen oxidu (PEO) (2) anebo mezi hlavičkou a prvními uhlíkovými atomy hydrofobního konce (3), a zcela nerozpustná hydrofobní látka je lokalizována uvnitř jádra micely (4), [12]. Existence několika různých míst solubilizace vyplývá ze skutečnosti, že fyzikální vlastnosti, jako jsou mikroviskozita, polarita a stupeň hydratace, nejsou jednotné podél samotné micely. Jedná se o vlastnosti měnící se s orientací v daném prostředí. Takovým látkám říkáme látky anizotropní [13] [14].

Kapacita tenzidu v solubilizaci aktivní látky závisí na několika faktorech, např. na chemické struktuře tenzidu či samotné látky, teplotě, pH a iontové síle. Neionogenní tenzidy jsou obvykle lepší než ionogenní tenzidy pro solubilizaci hydrofobní látky díky nízké hodnotě CMC. Pro polární látky není jednoduché přesně určit vztah



Obr. 3.6: Centra, kde látka může být solubilizována. Tučné čáry symbolizují látku, černé kruhy hydrofilní hlavičku, černé tučné křivky hlavičku PEO, světlé křivky konec tenzidu [6]

mezi stupněm solubilizace a chemickou strukturou, neboť solubilizace v tomto případě může nastat na povrchu i uvnitř micely [6].

3.4 Difúze

Přestup látky, který se uskutečňuje jako relativní mikroskopický transport některé ze složek směsi určitým směrem ve fázi, která se navenek nepohybuje, je důsledkem přirozeného pohybového stavu částic a nazývá se molekulová difúze, zkráceně difúze. Hnací silou přestupu látky je rozdíl koncentrací složky ve dvou místech, mezi kterými k transportu dochází. Mírou velikosti hnací síly přestupu látky je koncentrační gradient, tedy pokles koncentrace složky připadající na jednotku délky [15].

Při konstantní teplotě a tlaku maximální práce (jiné než objemové) vykonané jedním molem látky pohybující se z oblasti chemického potenciálu μ do oblasti chemického potenciálu $\mu + d\mu$ platí, že $dw = d\mu$. V systému, kde chemický potenciál závisí na prostorové souřadnici x , dostáváme

$$dw = d\mu = \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} dx \quad (3.7)$$

Obecně pro tuto práci dále platí, že

$$dw = -Fdx \quad (3.8)$$

kde F je síla působící v opačném směru. Pokud porovnáme rovnice 3.7 a 3.8, je patrné, že pokles chemického potenciálu může být interpretován jako efektivní síla působící na jeden mol molekul dané látky.

$$F = - \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} \quad (3.9)$$

Tato síla může spočívat ve spontánních tendencích molekul se rozptýlit a dle 2. termodynamického zákona zvýšit svou entropii (tj. míru neuspořádanosti), čímž dospěje ke stavu s co nejnižší vnitřní energií [16].

3.4.1 Matematický popis difúze

Adolf Fick jako první zpozoroval jistou analogii mezi difúzními procesy a vedením tepla, neboť difúzi tvoří neuspořádaný pohyb částic, který hraje podstatnou roli ve vedení tepla. Ve své práci tvrdil, že difúze může být na základě stejné matematické podstaty jako Fourierův zákon vedení tepla nebo Ohmův zákon pro vedení elektřiny. Z této hypotézy vychází Fickovy zákony [17].

1. *Fickův zákon* Difúzí dochází k vyrovnávání koncentrací v soustavách s koncentračním gradientem. Rychlost difúze vyjadřuje difúzní tok. Fick definoval celkový jednorozměrný difúzní tok J_1 jako

$$J_1 = Aj_1 = -AD \frac{\partial c_1}{\partial x} \quad (3.10)$$

kde A je velikost plochy, přes kterou látka difunduje, j_1 je tok přes jednotku plochy, c_1 je koncentrace a x vzdálenost. D je difúzní koeficient ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) a udává látkové množství difundující složky procházející přes jednotkovou plochu za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu [17].

Obecně lze 1. Fickův zákon zapsat takto:

$$j_1 = -D \cdot \text{grad } c_1 = -D \nabla c_1 \quad (3.11)$$

V této rovnici má difúzní tok charakter vektorové veličiny ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a odpovídá množství látky přenesené přes jednotkový objem za jednotku času. Je třeba zmínit, že rovnice 3.11 platí pro zředěné roztoky, neboť příspěvek konvekce je malý a difúzní tok neovlivňuje. Avšak v koncentrovaných roztocích je vliv konvekce patrný a matematický popis transportních procesů je mnohem komplikovanější [18].

Tato rovnice nepopisuje celý systém, nýbrž jen jednu difundující látku. Pokud tedy uvažujeme soustavu s dvěma difundujícími látkami, získáme soustavu dvou rovnic. Při stacionární difúzi, která je popsána 1. Fickovým zákonem, se koncentrační gradient s časem nemění [1], [17].

2. *Fickův zákon*

Tento zákon popisuje nestacionární difúzi, tedy difúzi, při které se mění koncentrační gradient s časem. Obecná formulace 2. Fickova zákona je

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \text{div} (D \cdot \text{grad } c_1) = D \cdot \text{div grad } c_1 \quad (3.12)$$

Vztah platí, pokud difúzní koeficient D není funkcí koncentrace c . Tato rovnice může být vyjádřena např. pro kartézský, cylindrický nebo sférický souřadnicový systém, je tedy na souřadnicovém systému nezávislá [15], [18]. Pokud nadále uvažujeme, že D není funkcí c a současně je zanedbán vliv konvekce, lze podobu 2. Fickova zákona zapsat takto:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + \frac{1}{A} \frac{\partial A}{\partial x} \frac{\partial c_1}{\partial x} \right) \quad (3.13)$$

Pokud je plocha A konstantní, lze vztah zjednodušit [17]:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} \quad (3.14)$$

3.4.2 Vybrané difúzní modely

Difúze skrz tenký film

Difúze skrz tenký film je jednoduchý modelový případ, kdy dva dobře míchané roztoky o koncentracích c_1 a c_2 jsou od sebe navzájem odděleny tenkým filmem. Oba tyto roztoky jsou zředěné a difúze trvá dostatečně dlouho. Akumulace látky ve filmu je nulová, proto je tento difúzní proces procesem ustáleným a obě koncentrace jsou nezávislé na čase. Podmínkou pro uplatnění tohoto modelu také je, aby objemy obou roztoků byly mnohem větší, než je objem filmu.

Rovnice 3.14 pro konstantní D pak přechází do tvaru

$$0 = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} \quad (3.15)$$

Integrací vztahu o tloušťce filmu l a zvolením okrajových podmínek, při kterých $c_1 = c_{10}$ pro $x = 0$ a $c_1 = c_{1l}$ pro $x = l$, získáme řešení popisující koncentrační profil

$$c_1 = c_{10} + (c_{1l} - c_{10}) \frac{x}{l} \quad (3.16)$$

Následnou derivací tohoto profilu nalezneme vztah pro difúzní tok:

$$j_1 = -D \frac{\partial c_1}{\partial x} = \frac{D}{l} (c_{10} - c_{1l}) \quad (3.17)$$

Závěry vyplývající z výše uvedených rovnice hovoří o linearitě koncentračního profilu a jeho závislosti na okrajových podmínkách a tloušťce filmu.

Membránová difúze

V případě membránové difúze existuje na rozhraní membrány a roztoku rovnováha, která je popsána rozdělovacím koeficientem H . Okrajové podmínky jsou $c_1 = HC_{10}$ pro $x = 0$ a $c_1 = HC_{1l}$ pro $x = l$. Koncentrační profil vypadá pak takto:

$$c_1 = HC_{10} + H(C_{1l} - C_{10}) \frac{x}{l} \quad (3.18)$$

Dochází k vytvoření diskontinuit na rozhraní membrána – roztok. Pokud je rozpustnější látka více rozpustná v membráně než v okolním roztoku, koncentrace vzrůstá. Pokud je tomu naopak, koncentrace klesá. Rovnice difúzního toku je následující:

$$j_1 = \frac{[DH]}{l} (C_{10} - C_{1l}) \quad (3.19)$$

Výraz v hranatých závorkách se nazývá permeabilita a je zjišťována experimentálně [17].

Difúze skrz porézní médium

Pokud nahradíme homogenní membránu membránou s póry, difúze už nebude jednorozměrná. Celou geometrii pórů v sobě zahrnuje efektivní difúzní koeficient D_{eff} a vztah pro difúzní tok vypadá následovně:

$$j_1 = \left[\frac{D_{eff}H}{l} \right] (C_{10} - C_{1l}) \quad (3.20)$$

Membránová difúze spřažená s chemickou reakcí

Mnohdy se setkáváme s případem, kdy difundující látka reaguje rychle a reverzibilně s jinou nehybnou látkou uvnitř membrány. K této situaci může dojít např. u reakcí v polymerních systémech a časové změna sledované látky při jednodimenzionální difúzi pak vypadá následovně:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + r_1 \quad (3.21)$$

kde r_1 je rychlost chemické reakce vyjádřena vztahem

$$r_1 = \frac{dc_1}{dt} \quad (3.22)$$

Při membránové difúzi spřažené s chemickou reakcí nemá samotná reakce žádný efekt na difúzní tok. V ustáleném stavu platí

$$0 = -\frac{\partial}{\partial x} j_1 - r_1 \quad (3.23)$$

Chemickou reakcí se přemění látka 1 na látku 2 s obdobnou bilancí

$$0 = -\frac{\partial}{\partial x}j_2 - r_1 \quad (3.24)$$

Protože produkt reakce je v membráně nehybný, je tok j_2 nulový a tím pádem i rychlost reakce je nulová. Koncentrační profil látky 1 zůstává tedy nezměněn. Jakmile totiž difúze dosáhne ustáleného stavu, je lokální koncentrace difundující látky v jakémkoliv místě v membráně v rovnováze s množstvím produktu reakce. Tyto lokální koncentrace se s časem nemění, a tím pádem se nemění množství reakčního produktu. Difúze pokračuje beze změny. Tento model je však jediný, kdy chemická reakce difúzi neovlivňuje. Ve většině případů je tomu naopak a difúzní tok se výrazně zvýší. Pokud je difúze neustálená, difúzní koeficient může narůst do velkých hodnot i bez přítomnosti reakce [17].

Koncentračně závislá difúze

V předchozích případech jsme předpokládali, že difúzní koeficient je konstantní. Avšak v případě difúze vody skrz film nebo v roztocích detergentů může dojít k náhlému poklesu hodnoty difúzního koeficientu v důsledku vyšší viskozity nebo snížení teploty. Chceme tedy najít difúzní tok skrz tenký film, při kterém se difúze ostře mění. Uvažujme kritickou koncentraci c_{1c} . Při hodnotě menší než je kritická koncentrace, bude difúze rychlá, nad její hranici se difúze zpomalí. Problém lze idealizovat představou o dvou filmech, přilnutých těsně k sobě. Přejít mezi nimi nastane, když koncentrace bude rovna c_{1c} .

V obou filmech ustálená rovnováha vede ke stejné rovnici:

$$0 = \frac{dj_1}{dx} \quad (3.25)$$

Difúzní tok j_1 je v celém filmu konstantní. Avšak vysoká koncentrace v levém filmu způsobuje existenci malého difúzního koeficientu D_1 :

$$j_1 = -D_1 \frac{dc_1}{dx} \quad (3.26)$$

Výraz lze snadno integrovat

$$\int_0^{x_c} j_1 dx = -D_1 \int_{c_{10}}^{c_{1c}} j_1 dc_1 \quad (3.27)$$

Výsledkem je pak

$$j_1 = \frac{D_1}{x_c} (c_{10} - c_{1c}) \quad (3.28)$$

V pravém filmu je koncentrace malá a difúzní koeficient D_2 je tedy velký:

$$j_1 = -D_2 \frac{dc_1}{dx} = \frac{D_2}{l - x_c} (c_{1c} - c_{1l}) \quad (3.29)$$

Neznámou polohu x_c lze najít snadno s vědomím toho, že difúzní tok je stejný v obou filmech:

$$x_c = \frac{l}{\frac{D_2 (c_{1c} - c_{1l})}{D_1 (c_{10} - c_{1c})}} \quad (3.30)$$

a výsledná podoba rovnice difúzního toku je tedy

$$j_1 = \frac{D_1 (c_{10} - c_{1c}) + D_2 (c_{1c} - c_{1l})}{l} \quad (3.31)$$

Pokud se kritická koncentrace rovná průměru hodnot c_{10} a c_{1l} , pak bude difúzní koeficient roven aritmetickému průměru těchto dvou difúzních koeficientů [17].

3.4.3 Stanovení difúzního koeficientu metodou diafragmové cely

Metoda diafragmové cely je ověřenou a jednoduchou metodou pro zkoumání difúze plynů nebo kapalin skrz membránu. Je nenáročná na sestavení a lze s ní stanovit difúzní koeficient s relativní chybou pouze 0,2%. Diafragmová cely se skládá ze dvou částí oddělených od sebe skleněnou fritou nebo porézní membránou. Části jsou naplněny roztokem o různé koncentraci a roztok je po celou dobu experimentu míchán magnetickým míchadlem. Měří se koncentrace obou roztoků v různých časových intervalech a difúzní koeficient se stanoví z následujícího vztahu:

$$D = \frac{1}{\beta t} \ln \left[\frac{(c_{1,dolni} - c_{1,horni})_0}{(c_{1,dolni} - c_{1,horni})_t} \right] \quad (3.32)$$

kde β je geometrická konstanta charakterizující danou cely a vychází z tohoto vztahu:

$$\beta = \frac{A}{l} \ln \left(\frac{1}{V_{horni}} + \frac{1}{V_{dolni}} \right) \quad (3.33)$$

A je plocha, přes kterou látka difunduje, l je tloušťka membrány a V je objem jednotlivých částí cely. Výpočet difúzních koeficientů vyžaduje přesnou znalost rozdílů koncentrací, ne koncentrací samotných. Je tedy vyžadována přesná chemická analýza. Důležitá je také přesná hodnota konstanty β , která se zjišťuje experimentálně. Zpravidla jsou preferovány membrány s menšími póry, neboť větší póry mohou způsobit nežádoucí míchání v membráně.

Pro přesné stanovení je vhodnější použít skleněnou fritu a délku experimentu několik dní, avšak pro běžné laboratorní účely stačí jako membránu použít filtrační papír s délkou experimentu pár hodin [17].

3.5 Dynamický rozptyl světla

Koloidní částice mají schopnost rozptýlit elektromagnetické záření, a jejich velikost a tvar může být vyhodnocen na základě analýzy intenzity rozptýleného záření. Při metodě dynamického rozptylu světla (také označované jako Fotonová korelační spektroskopie) laser produkuje koherentní záření (tzn. frekvence záření je stále stejná a rozdíl fází vyzařovaných paprsků zůstává nezměněn [19]), částice ve zředěné disperzi záření rozptylují, a protože je záření koherentní, fázový poměr zůstává zachován. To znamená, že disperze se chová jako třídídimenzionální difrakční pole. Když se částice pohybují, pohybuje se taktéž difrakční obrazec a to náhodným pohybem. Z detektoru lze pozorovat malou oblast se světlými pohybujícími se body a jejich rychlost závisí na Brownově pohybu [4].

Detektor je spojený s fotonovým korelátorem a intenzita světla je měřena jako funkce času. Celkový čas může být nastaven a intenzita je měřena v sériích krátkých časových intervalů, dokud není dosaženo hodnoty celkového času. Tento časový interval je označován termínem zpožděný korelační čas, τ_c . Intenzita rychle kolísá nahoru a dolů v závislosti na pohybujících se částicích. Tudíž mezi dvěma z těchto časů je silná korelace intenzit. Přístroj vyhodnocuje korelační funkci srovnáváním počtů fotonů na začátku s počtem fotonů ve zpožděném časovém intervalu. Korelační funkce klesá exponenciálně:

$$g(\tau_c) = \exp(-\tau_c D Q^2) \quad (3.34)$$

kde D translační difúzní koeficient částice, τ_c zpožděný korelační čas. DQ^2 je čas, kdy částice difunduje přes vzdálenost Q^{-1} . Data jsou zakreslována jako přirozený logaritmus proti Q^2 . Výsledkem je pak přímka, z jejichž směrnice je získána hodnota translačně difúzního koeficientu D [4].

Translačně difúzní koeficient D udává rychlost Brownova pohybu. Brownův pohyb je náhodný pohyb částic. Náhodný proto, že částice jsou atakovány obklopujícími molekulami rozpouštědla. Čím větší částice je, tím pomalejší bude Brownův pohyb. Velikost částic je pak vypočítána použitím Stokesovy Einsteinovy rovnice:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3.35)$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr, D translační difúzní koeficient částice, k Boltzmannova konstanta, T absolutní teplota a η viskozita.

Průměr získaný metodou DLS se vztahuje k tomu, jak částice difunduje uvnitř kapaliny, proto tedy nese označení hydrodynamický průměr. Získaný průměr je průměr koule, která má stejný translačně difúzní koeficient jako zkoumaná částice [20].

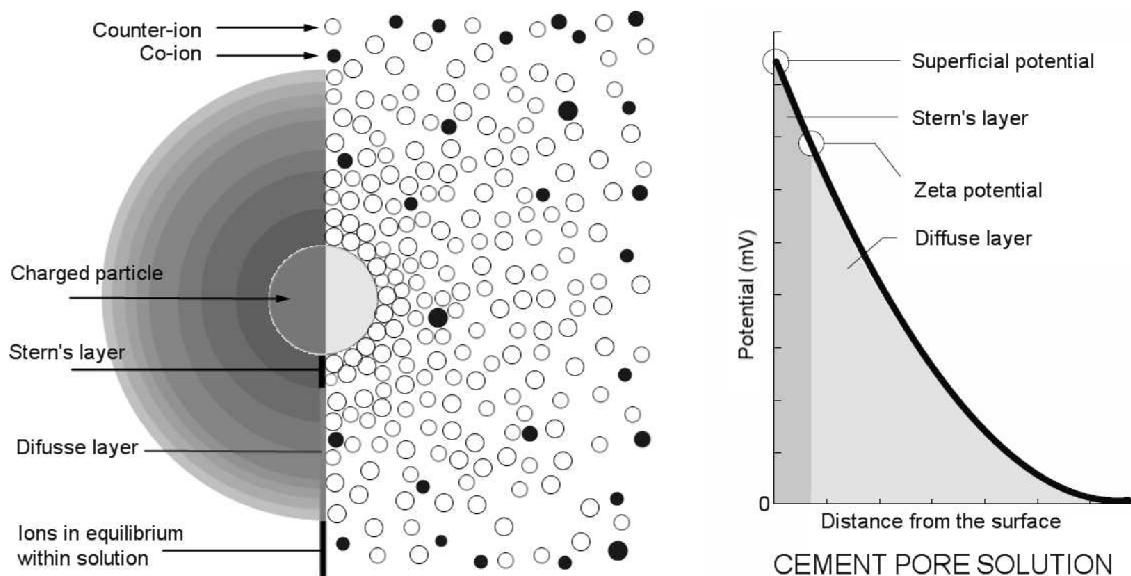
Pokud disperze bude obsahovat kulovité monodisperzní částice, pak hydrodynamický průměr bude korespondovat s průměrem získaným z mikroskopického měření. Jestliže však nejsou sférické nebo jsou pokryty stabilizační vrstvou nezanedbatelné tloušťky, hydrodynamický průměr bude větší než ten, který je obdržen z mikroskopického měření.

Čím širší bude distribuce velikostí, tím více bude stoupat rozsah difúzních časů. Korelační funkce pak bude získána jako suma jednotlivých exponenciálních poklesů intenzit rozptýleného světla, zatížená pravděpodobností zpožděných časů. Je třeba brát v úvahu, že každá disperze má nějaký stupeň polydisperzity [4].

Pro určení disperzní stability a charakterizaci elektrického náboje se měří hodnota zeta potenciálu [21]. Měření zeta potenciálů dává detailní pohled mezi disperze a agregáty a pomocí něj je také možno zlepšit vlastnosti měřených disperzních systémů [22].

Povrch částice tvoří elektrická dvojvrstva. Primární vrstva nese náboj vytvořený disociací polárních skupin nebo adsorbovaných iontů, sekundární vrstva obsahuje ionty opačné k náboji vrstvy primární. Skládá se ze dvou podvrstev. Ze Sternovy, která je tvořena protiionty k primární vrstvě, a která neutralizuje náboj primární (pevné) vrstvy, a z difúzní vrstvy s pohyblivými protiionty a s ionty z jiných elektrolytů. Při pohybu disperzní částice se primární a Sternova vrstva pohybuje s částicí. Ionty v difúzní vrstvě se mohou pohybovat samostatně. Na povrchu částice tedy existuje pohyblivé rozhraní rozdělující ionty dvojvrstvy na ionty pohybující se nezávisle a ionty zakotvené k povrchu částice. Potenciál nacházející se v místě pohybového rozhraní se nazývá zeta potenciál. Jeho hodnota vypovídá o tloušťce Sternovy a difúzní vrstvy. Nízká hodnota svědčí o silné tloušťce difúzní vrstvy, kdežto hodnota zeta potenciálu blízká se k nule značí převod protiiontů z difúzní vrstvy do vrstvy Sternovy a částice se navenek chová jako elektricky neutrální [2].

Měřením rychlosti částic v elektrickém poli lze zjistit hodnotu zeta potenciálu. Rychlost na jednotku intenzity elektrického pole je známa jako elektroforetická mobilita μ_E . Hodnota zeta potenciálu reflektuje, jak částice zareaguje na blížící se částici. Současně pomáhá určit vlastnosti suspenze. Pokud jsou repulze mezi blížící se částicemi a suspenzí velké, částice se udrží v disperzním systému. V opačném případě vytvoří s částicemi agregát. Pro uchování systému v disperzi by hodnota zeta potenciálu měla být vyšší než 25 mV (kladná i záporná). Obecně řečeno vyšší absolutní hodnota zeta potenciálu koreluje se stabilnějším systémem. Naopak pokud je zapotřebí separovat částice z okolní tekutiny, je nutné snížit jeho hodnotu [23].



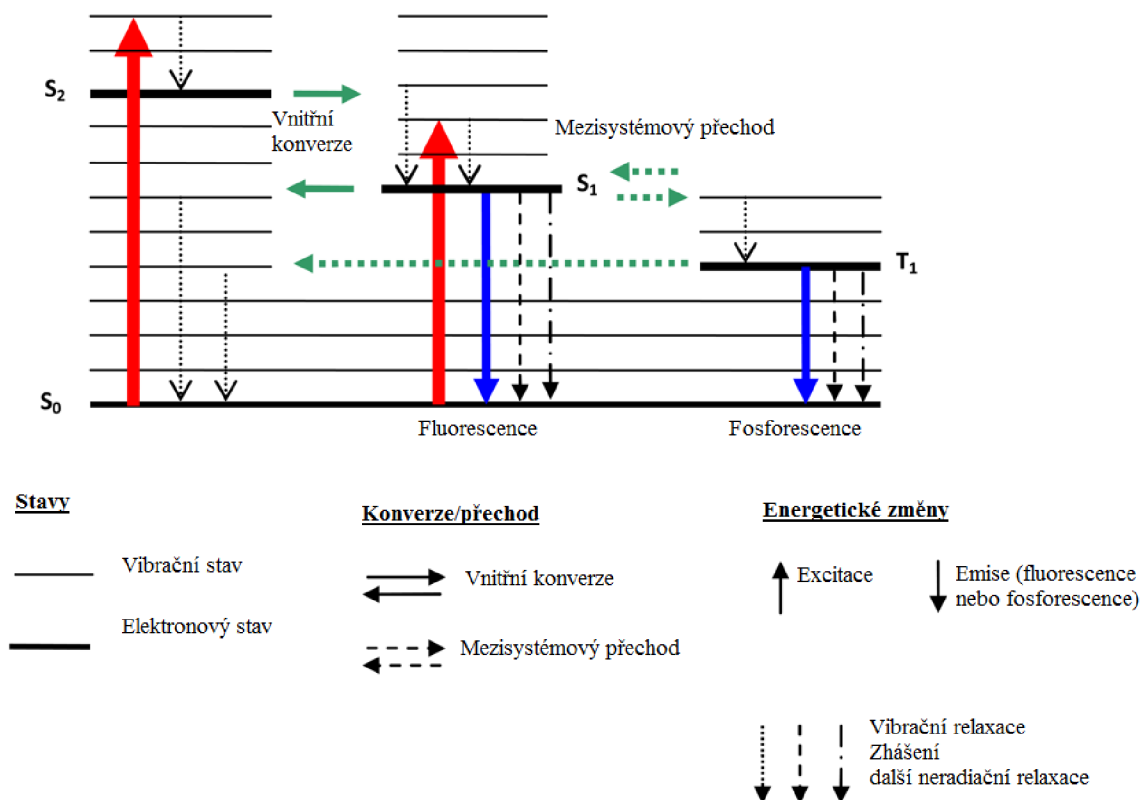
Obr. 3.7: Elektrická dvojvrstva částice [24]

3.6 Fluorescence a Jablonského diagram

Fluorescence se spolu s fosforescencí řadí mezi tzv. fotoluminiscenční jevy, při kterých dochází k emisi kvanta záření. Rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí je v povaze excitovaných stavů. Fotoluminiscenční jevy znázorňuje Jablonského diagram 3.8. Molekula fluoroforu je schopna absorbovat foton emitovaný zdrojem záření. Při absorpci fotonu přeskočí elektron dané molekuly na jednu z vibračních hladin některého z excitovaných singletových stavů, tedy stavů s vyšší energií. Po absorpci záření se snaží elektron dostat zpět na základní hladinu a energii uvolnit. Pokud se elektron nachází na jedné z vibračních hladin excitovaného stavu S_2 , bude se snažit neradiačním přechodem (nezářivým přechodem bez emise fotonu, při kterém je energie uvolněna ve formě tepla), zvaným vibrační relaxace, dostat na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu, a pak dalším neradiačním přechodem, tentokrát vnitřní konverzí, na vibrační hladinu singletového stavu S_1 . Poté dojde k uvolnění energie ve formě fotonu a elektron se vrací na základní energetickou hladinu S_0 . Tento jev se nazývá fluorescence a vzhledem k tomu, že elektron má v excitovaném stavu opačný spin než elektron v základní energetické hladině, jedná se o jev spinově dovolený.

Při fosforescenci se elektron z excitovaného singletového stavu dostává tzv. mezisystémovým přechodem do tripletového excitovaného stavu, a až poté je uvolněna energie ve formě fotonů a elektron se dostává na základní energetickou hladinu S_0 . V tripletovém excitovaném stavu má elektron stejnou spinovou orientaci jako elektron v základní hladině, jedná se proto o jev spinově zakázaný. Z tohoto důvodu

je obecně známo, že proces fosforescence je časově delší ve srovnání s fluorescencí. Fosforescenci je možné pozorovat i po sepnutí budícího zdroje záření, kdežto fluorescence zaniká ihned po vypnutí budícího zdroje [26].



Obr. 3.8: Jablonského diagram [28]

3.7 Princip fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je jednou z technik s vysokým rozlišením prostorové a časové analýzy biomolekul s extrémně nízkou koncentrací. Na rozdíl od jiných fluorescenčních technik parametrem primárního zájmu není samotná emisní intenzita, ale spíše spontánní fluktuace intenzity způsobené nepatrnými odchylkami od tepelné rovnováhy. Obecně platí, že všechny fyzikální parametry, které vedou k těmto fluktuacím, jsou přístupné fluorescenční korelační spektroskopii. Základním konceptem FCS je zkontrolovat počet pozorovaných molekul, počet natolik malý, že každá molekula v podstatě přispívá k měřenému signálu. Jedině tehdy se dá provádět analýza spontánních, nekoordinovaných fluktuací [27].

Výhodou této techniky je možnost zkoumání difúzních procesů v biologických a koloidních systémech v časovém rozsahu $\mu\text{s} - \text{ms}$. Pomocí této metody může být

srovnávána difúzní dynamika micely, která má v sobě zabudované barvivo schopné fluorescence. Vzhledem k výjimečné selektivitě a citlivosti FCS lze proměřit i velmi zředěné roztoky [25].

FCS může fungovat správně jedině tehdy, pokud se nějakým způsobem podaří snížit koncentrace a pozorované objemy natolik, aby pouze pár molekul bylo současně detekováno a zároveň, aby kvantový výtěžek fluorescence na jedinou molekulu byl co největší. Toho může být dosaženo kombinací FCS s konfokální detekcí. V tomto případě je přicházející laserový paprsek silně zaměřen štěrbinou objektivu v difrakčně omezeném místě. Pouze pár fluoroforů v oblasti osvětlené laserem je excitováno. Pro FCS jsou optimální nanomolární koncentrace, neboť detekční objem je omezen na méně než 1 femtolitr [27].

3.7.1 Experimentální uspořádání

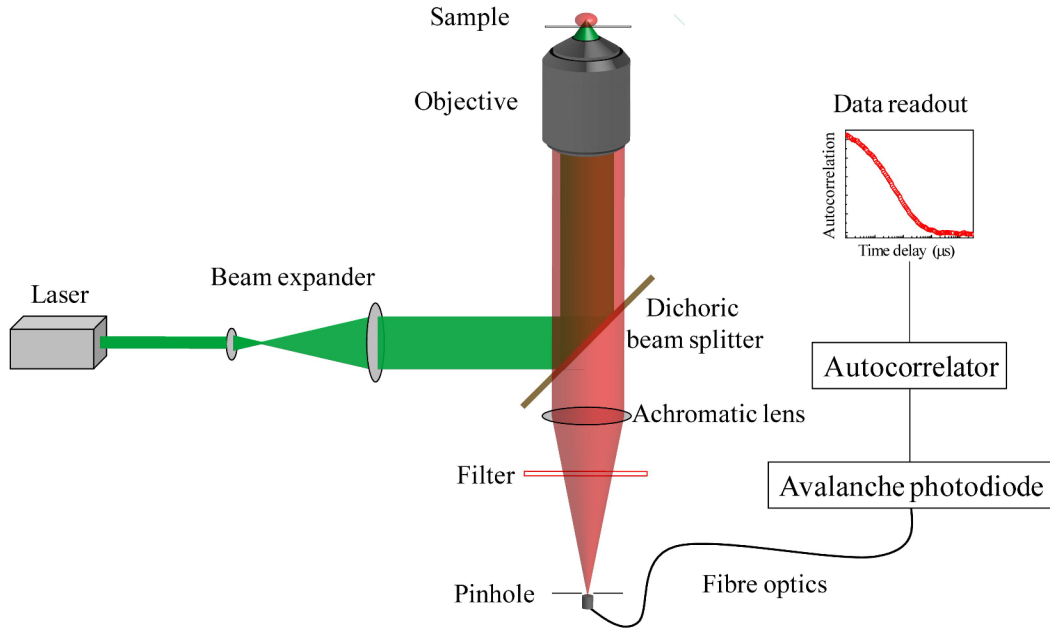
Excitované záření způsobené laserovým paprskem je směřováno do mikroskopu pomocí dichroického zrcátka a zaměřeno do vzorku. Fluorescenční záření ze vzorku je sbíráno objektivem a prochází skrz dichroické zrcátko a emisní filtr. Clona zablokuje veškeré fluorescenční záření nepocházející z ohniskové oblasti, a tím zajistí axiální rozlišení. Poté je záření zaostřeno na detektor.

Poměr signál – šum jednotlivých FCS křivek kriticky závisí na použití filtračního systému. Dichroické zrcátko slouží v podstatě jako separátor vlnových délek. Odklání excitační světlo a přenáší fluorescenci zatíženou batochromním efektem. Avšak účinnost blokování laseru je velmi malá, proto je žádoucí použít další emisní filtr. Pásmové filtry přizpůsobené emisním vlastnostem pozorovaného barviva garantují vysokou detekční specifickou při dostačujícím kvantovém výtěžku. Umožňují potlačit rozptýlené laserové světlo (Rayleighův rozptyl) a také Ramanův rozptyl.

Požadavky kladené na fluorofor netkví pouze ve vysokém kvantovém výtěžku. Klíčovou vlastností je fotostabilita, která musí být dostatečně vysoká, aby barvivo bylo schopné ustát obrovskou sílu zaměřeného laseru až $100 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ [27].

3.7.2 Autokorelační analýza

Fluorescenční signál zachycený detektorem podléhá autokorelační analýze, pokud se chceme zaměřit na jeden konkrétní druh fluorescenční částice. Fluktuace jsou kvantifikovány časovou autokorelací zaznamenaného signálu. V podstatě tato autokorelační funkce poskytuje míru „podobnosti“ časového signálu „na své fázově posunuté kopii“ a zvýrazňuje charakteristické časové konstanty základních procesů.



Obr. 3.9: Schéma nastavení FCS [29]

Normalizovaná autokorelační funkce je definována jako

$$G(\tau) = \frac{\langle \partial F(t) \cdot \partial F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.36)$$

kde F jsou fluktuace fluorescenčního signálu a τ značí zpožděný čas.

Dále je třeba charakterizovat vztah mezi laterálním difúzním časem, během kterého molekula zůstává v konfokálním objemu, a difúzním koeficientem D

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4 \cdot D} \quad (3.37)$$

Pro efektivní objem platí, že

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (3.38)$$

Můžeme tedy vypočítat autokorelační funkci pro jeden volně difundující druh molekul

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_z}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (3.39)$$

Z kalibračního měření získáme rozměry r_0 a z_0 . Lokální koncentrace fluoreskujících molekul může být určena z velikosti autokorelační křivky $G(0)$

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{eff} \cdot \langle C \rangle} \iff \langle C \rangle = \frac{1}{V_{eff} \cdot G(0)} \quad (3.40)$$

Doposud jsme předpokládali, že se vlastnosti chromoforu nemění se změnou zaostření laseru. Tento předpoklad však neplatí pro reálná barviva. Molekula barviva může přejít do tripletového stavu. Tento přechod je kvantově zakázaný, chromofor potřebuje daleko více času, aby přešel opět do základního stavu. Během této doby barvivo neemituje žádné fotony, což se projeví tmavými úseky. Do nové podoby autokorelační funkce je nutno tento jev zahrnout [27].

3.7.3 Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (dále jen FLCS) je metoda vzniklá fúzí fluorescenční korelační spektroskopie a časově rozlišeného čítání fotonů (TCSPC, vycházející z anglického názvu Time-Correlated Single Photon Counting). FLCS nezahrnuje „fittování“ modelu komplikované autokorelační funkce, nýbrž je vypočítána separovaná autokorelační funkce pro každou očekávanou složku intenzity. Jediným předpokladem je fakt, že rozdílné emise mají různé doby života fluorescence. Jádrem této metody je statistická separace různých příspěvků intenzit vykonaná na jednofotonové úrovni [30].

Při získávání dat touto metodou je excitace pulzována a jsou zaznamenána dvě nezávislá časová měření pro každý detekovaný foton. První čas tzv. makroskopický zaznamenávající polohu fotonu již od začátku experimentu a druhý čas neboli mikroskopický zpožděný čas (v TCSPC nazýván jako „*channel number*“) měřený vzhledem k nástupu excitačního pulsu až do doby zaregistrování dalšího fotonu. Makroskopický čas je stejně jako u FCS experimentů používán k výpočtu změn intenzit fluorescence v čase a ke stanovení difúzního koeficientu a koncentrace pomocí autokorelační funkce. Mikroskopický čas slouží k vytvoření vyhasínacích křivek. Tyto dva časy jsou vyhodnocovány současně při výpočtu autokorelační funkce [31].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Solubilizace hydrofóbních barviv

Skupina vědců kolem **A.R. Tehrani-Bagha** studovala solubilizaci dvou organických barviv [32], konkrétně Sudan I a Quinizarin, v přítomnosti neionogenních, anionogenních, kationogenních tenzidů a neionogenních bloků kopolymerů použitím UV-VIS spektroskopie. Zkoumali, jaký vliv na solubilizaci má změna teploty, pH a přidání elektrolytu. Bylo zjištěno, že přidáním soli a zvýšením teploty solubilizace vzrůstá pro obě barviva. Solubilizace obou barviv byla téměř stejná v rozsahu pH 3-12 v přítomnosti SDS a pentaethylglykolu-mono-undodecyl etheru ($C_{11}E_5$). Její účinnost se však výrazně zvýšila při překročení pH 12 a v přítomnosti kationogenního tenzidu bromidu dodecyltrimethylammoného. Tento fakt byl přisuzován interakci mezi ionizovanou formou barviva a pozitivně nabitou hlavičkou tenzidu. Cílem těchto měření bylo najít cestu ke zlepšení solubilizační účinnosti a zvýšení solubilizační kapacity.

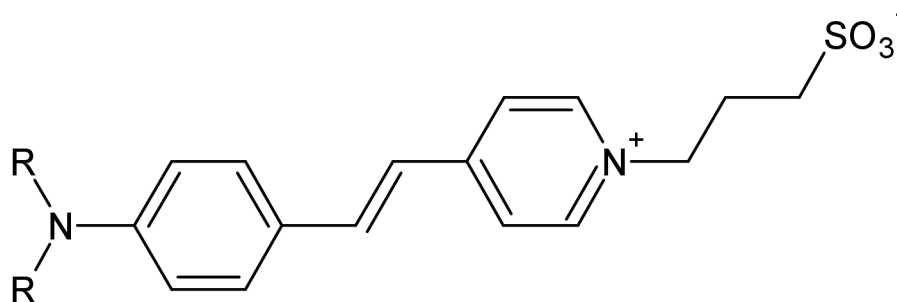
Samotná práce byla započata stanovením kritické micelární koncentrace ionogenních tenzidů měřením vodivosti. Kritická micelární koncentrace neionogenních tenzidů byla stanovena pomocí měření povrchového napětí. Jak bylo očekáváno, naměřené hodnoty CMC byly vyšší o 1 – 2 řády pro ionogenní tenzidy než pro tenzidy neionogenní díky repulzím polárních skupin na hlavičce tenzidu. Zvýšením teploty se solubilizační účinnost nejvíce projevila u $C_{11}E_5$, méně však u nízkomolekulárních látek.

Zvýšení pH mělo značný vliv na strukturu obou barviv, neboť došlo k deprotonaci hydroxylových skupin. U Quinizarinu se tento fakt projevil změnou barvy ze žluté na fialovou. Deprotonace také vedla k mírnému zvýšení rozpustnosti barviv ve vodě a také ke změně tvaru a velikosti samotné micely. Přídavkem soli solubilizační kapacita vzrostla pro ionogenní i neionogenní tenzidy.

Shrnutím naměřených výsledků se zjistilo, že solubilizační účinnost je zhruba stejná pro obě barviva přidáním ionogenního nebo neionogenního tenzidu a při kyselem nebo neutrálním prostředí. Účinnost kationogenního DTAB se výrazně zlepšila po překročení hodnoty pH 8, čímž bylo dosaženo interakce mezi deprotonovaným barvivem a pozitivně nabitou polární skupinou tenzidu.

Publikace kolektivu autorů v čele s **S. S. Shan** [33] se zabývala solubilizací hemicyaninových barviv do micely kationogenního tenzidu bromidu cetyltrimethylammoného (CTAB). Tato amfifilní barviva jsou účinnými detektory citlivými na změny napětí v biomembránách a populárními fluorescenčními indikátory přechodného napětí v neuronech a v mozku. Detekce rychlých změn elektrického potenciálu

v biologických membránách je studována na základě fotofyzikálních vlastností barviva. Obecná struktura těchto barviv je následující,



Obr. 4.1: Obecná struktura hemicyaninových barviv [6]

kde $R = (\text{CH}_3)$ až $(\text{C}_6\text{E}_{13})$. Fyzikální chování micel tenzidů může sloužit jako modelový případ pro znázornění biologických systémů. Takový model je užitečný pro studování interakcí biologických povrchů s ostatními molekulami.

V této práci se autoři zaměřili na zkoumání vlivu délky alkylového řetězce barviva na samotnou solubilizaci tenzidem CTAB. Sulfonová skupina barviva je elektrostaticky přitahována polární skupinou CTAB micely. Čím kratší je alkylový řetězec, tím polárnější barvivo je, a tím složitější je transport barviva z vody do nepolárního prostředí jádra micely. Na druhé straně takto polární hemicyaninová barviva jsou více mísitelná s polárními oblastmi na povrchu micely, tudíž méně hydrofóbní molekuly barviv jsou přítomny většinu času na povrchu micely. Dále např. dva aromatické kruhy tvořící základ barviva jsou úzce sdruženy s polárními skupinami CTAB, což má za následek, že molekula barviva neproniká hluboko do micely, ledaže hydrofobicita barviva není dostatečně vysoká, aby překonala elektrostatické interakce s polárními skupinami CTAB.

Dále byla provedena měření diferenciální absorpance pro šest různých hemicyaninových barviv při koncentraci tenzidu CTAB. Bylo zpozorováno, že hodnota diferenciální absorpance je téměř nulová při nízkých koncentracích tenzidu, výrazně však stoupá po překročení hodnoty CMC, což indikuje vzrůstající množství solubilizovaného barviva. Ačkoliv molekuly barviva jsou začleněné do micely, chromofory jsou nadále orientovány blízko k povrchu, a tudíž absorbují záření mnohem účinněji než ve velkém objemu vodného roztoku.

4.2 Penetrace aktivních látek přes membrány

Publikace finských autorů v čele s **S. Akermanem** [34] se zabývá transportem léčiv skrz porézní iontoměničové membrány, které mají svůj potenciál v systémech pro po-

dání léků. Konkrétně se zaměřili na faktory ovlivňující propustnost těchto membrán, jako je pH, iontová síla či vlastnosti samotného léčiva. Pro tyto experimenty byly vybrány porézní membrány z polyakrylové kyseliny (PAA) roubované polyvinyliden fluoridem (PVDF). Tyto membrány jsou kation selektivní díky částečné disociaci karboxylových skupin v roubovaných PAA řetězcích.

Propustnost porézních roubovaných polymerních membrán může být kontrolována iontovou silou případně pH pronikající látky nebo např. teplotou. Velkou roli hraje především konformační uspořádání roubovaných řetězců.

Pro zjištění vlivu pH na koformační uspořádání PAA řetězců byla zkoumána morfologie membrány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

Propustnost neutrálních léčiv skrz PVDF-PAA membránu byla závislá na pH. Tok mannitolu napříč membránou se snížil 1,7 krát při zvýšení pH z 2,0 na 5,8. Avšak další zvýšení pH na tok látky už nemělo žádný vliv. Stejný trend byl pozorován i u kofeinu. Při pH 2,0 jsou karboxylové skupiny PAA řetězce prakticky nedisociované, tudíž póry v membráně jsou otevřené a dovolují látkám těmito póry difundovat. Když však pH vzroste z 2,0 na 5,8, konformace roubovaných PAA řetězců značně expanduje díky repulzím mezi ionizovanými karboxylovými skupinami. Expandované řetězce zčásti póry zablokují, difúzní tok malých molekul jako je mannitol nebo kofein je snížen a difúzní tok větších molekul, např. dextransů, je zcela zabrzděn. Analýza pomocí SEM tyto změny v membránové porositě potvrdila, neboť vzorek při pH 2 byl více porézní než vzorek při pH 8,6.

Vliv náboje léčiva byl studován v rozsahu pH 5,8-8,6, při kterém je propustnost membrány prakticky konstantní. Ukázalo se, že kationtová léčiva prochází membránou 1,5-2 krát rychleji v ionizované formě než v neionizované. V případě aniontových byl výsledek obrácený. Ionizovaná forma zapříčinila pomalejší tok asi o 50 % než forma neionizovaná. Tento výsledek vychází z kationtoměničové povahy použitých membrán. Umožňují transport pozitivně nabitých částic, ale odpuzují částice negativně nabitě.

Studie potvrzuje, že kromě konformačních změn řetězců membrán také vlastnosti daných léčiv významně ovlivňují difúzní tok přes roubované membrány.

Skupina autorů kolem **V.A. Varghese** [35] zaměřila svůj výzkum na studii transportu skrz chloroformovou kapalnou membránu, aby objasnila schopnost laurylsulfátu sodného v podobě reverzní micely být nosičem kadmiových iontů. Transport se uskutečnil mezi dvěma kapalnými rozhraními.

Pro nosičem zprostředkovaný transport skrz kapalnou membránu je zdrojem inspirace usnadněný transport v biologii, např. transport kyslíku pomocí hemoglobinu. V této studii byly molekuly nosiče přidány do nevodné fáze (membrány), která je nemísitelná s oběma vodnými fázemi: se zdrojovou fází a přijímací fází. V nevodném prostředí jsou molekuly nosiče, tedy samotného tenzidu prezentovány jako reverzní

micely. Neexistuje obecný mechanismus přenosu kapiček mikroemulze přes rozhraní. Mechanismus se mění v závislosti na typu systému, na povaze tenzidu a membrány. Vzhledem k tomu, že kadmium je nechvalně známý polutant, jeví se tahle studie jako významný přínos pro snížení znečištění životního prostředí.

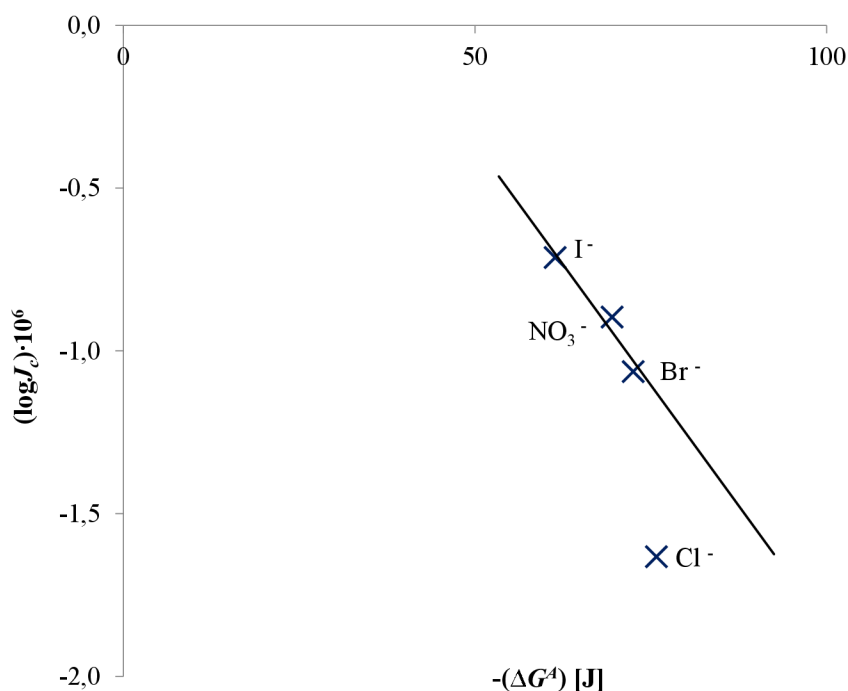
Experimenty byly provedeny použitím difúzních cel z pyrexového skla. Známý objem chloroformu byl přiveden do cely. Do chloroformové kapalně membrány byl přidán tenzid, který způsobil její zakalení. Po přidání vody do zdrojové části cely byla kapalná fáze membrány míchána magnetickým míchadlem, dokud membrána nebyla transparentní, což indikovalo tvorbu reverzních micel. Poté byla dodána vodná fáze. Kapaliny ve zdrojové a přijímací fázi měly hladinu na stejné úrovni. Po určitém časovém intervalu byl odebrán 1 ml vzorku pro analyzování kadmiových iontů užitím atomového absorpčního spektrometru.

Tak jako je tenzid schopen tvořit reverzní micely v nevodné fázi, je rovněž schopný tvořit micely ve vodných fázích. Proto je nutné odhadnout koncentrace tenzidu ve zdrojové a přijímací cele. Pro vyloučení možnosti, že se ve vodných fázích vytvořily micely laurylsulfátu sodného (NaLS), byla měřena koncentrace sodíku atomovou absorpční spektrometrií. Tyto koncentrace byly však velmi malé oproti koncentraci CMC NaLS, proto možnost tvorby micel ve vodné fázi byla vyloučena.

Transport kademnatých iontů byl zpočátku velmi rychlý, s přibývajícím časem se však zpomalil. Toto chování odpovídá modelu difúze, který předpokládá, že rozpuštěná látka prochází přes první kapalně rozhraní, je návázána na nosič a tento aglomerát poté prochází druhým kapalným rozhraním, kde je disociován a uvolňuje rozpuštěnou látku do přijímací části. Volný nosič se pak vrací zpátky a celý proces se opakuje.

Pět různých koncentrací tenzidu bylo proměřeno a výsledky odhalily, že největší rychlost transportu vyjádřena pomocí difúzního toku J_c byla při hodnotě CMC. Při poloviční koncentraci byla rychlost velmi malá, a to díky tomu, že reverzní micely ve vodné fázi ještě nebyly vytvořeny a nemohly se chovat jako nosiče. Rychlost transportu je ovlivněna tzv. aniontovým efektem. Laurylsulfát sodný je ionogenním tenzidem a rychlost reakce úzce korelovala s volnou energií hydratace ΔG^A doprovozázejícího aniontu.

Studie ukázala, že reverzní micely tvořené NaLS se v chloroformové kapalně membráně chovají jako nosiče kademnatých iontů. Tato domněnka byla potvrzena při pozorování chloridu cetylpyridinia, který byl přidán do kapalně membrány, avšak žádný transport kademnatých iontů nebyl zaznamenán, a to i po překročení CMC. Tento jev byl však očekáván, neboť dutina reverzní micely z chloridu cetylpyridinia byla pozitivně nabitá stejně jako kademnaté ionty, které do ní nemohly být zavedeny.



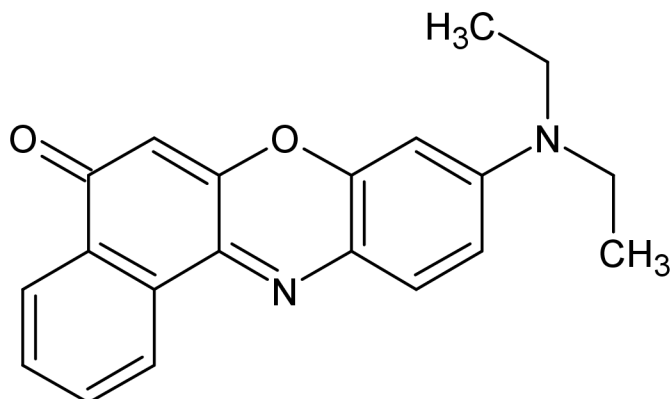
Obr. 4.2: Aniontový efekt

4.3 Chování nilské červeně při solubilizaci

Tým vědců kolem **Indah Nurita Kurniasihe** [36] zkoumal chování nilské červeně ve vodných roztocích tenzidu a v roztocích micelárních pomocí optických spektroskopických metod a dynamického rozptylu světla. Vzhledem k vysoké citlivosti nilské červeně k prostředí, ve kterém se nachází, bývá často používána k prozkoumání místní polaritý různých heterogenních systémů zahrnujících micely, reverzní micely, lipozomy a proteiny.

Na základě spektroskopických měření autoři zjistili, že spektra nilské červeně v přítomnosti ionogenního tenzidu (SDS a CTAB) v submicelárních koncentracích vykazují maximum v rozsahu vlnových délek 450-500 nm doplněné o intenzivní rameno v červené oblasti spektra. Tohle neobvyklé spektroskopické chování zpozorované před samotným utvořením micel a výskyt nového píku svědčí o silných vazebných interakcích mezi dvěma molekulami barviva nebo mezi molekulou barviva a molekulou tenzidu. Tudíž je možné si představit, že taková interakce může vést k vytvoření barvivo–tenzid nebo barvivo–barvivo agregátů ve vodě držené pohromadě pomocí $\pi - \pi$ vazeb nebo pomocí hydrofóbních interakcí. Velmi pravděpodobné jsou zmíněné $\pi - \pi$ vazby vzniklé kondenzací aromatických kruhů nilské červeně.

Nilská červeně se rozpouští v řadě rozpouštědel, avšak vykazuje velmi nízkou roz-



Obr. 4.3: Strukturální vzorec nilské červeně

použitelnost ve vodě. Tudíž předpoklad, že barvivo bude v micelle solubilizováno v jejím vnitřku, je zcela na místě. Pro tvorbu micelárního systému vybrali autoři neionogenní tenzid Triton X-100. Podle spektroskopických dat však bylo zjištěno, že nilská červeně je lokalizována ve vnější oblasti micely. Dále autoři přišli s tvrzením, že spektrální odpověď silně závisí na koncentraci barviva a má za následek případný vznik agregátů. Ve velmi zředěných roztocích (s koncentrací $\leq 0,016$ mg/ml) solubilizované barvivo existuje především jako monomer a platí, že fluorescenční intenzita značně roste se zvyšující se koncentrací. Při vyšších koncentracích může dojít k rovnovážnému stavu, solubilizované barvivo existuje ve formě monomerů i dimerů, a je tedy pozorován postupný pokles fluorescenční intenzity se zvyšující se koncentrací nilské červeně ($> 0,064$ mg/ml). Toto fluorescenční zhasnutí je způsobeno $\pi - \pi$ vazbami jednotlivých chromoforů. Při dalším zvýšení koncentrace dosáhnou agregáty velikosti okolo 150 nm.

Autoři článku chtěli svými experimenty především poukázat na fakt, že nilská červeně neprostupuje do vnitřku hydrofóbní části micely, ale upřednostňuje setrvat na jejím vnějším povrchu. Tento jev má za následek tvorbu agregátů při vyšších koncentracích pomocí $\pi - \pi$ interakcí.

4.4 Determinace difúzního koeficientu micel pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

Franziska Luschtinetz a **Carsten Dosche** [37] ve své studii determinovali difúzní koeficient tenzidu Tween 20 ve formě micel v různých koncentracích tenzidu pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Jako tzv. marker difúze micel bylo použito fluorescenční barvivo 9,10-bis(fenylethynyl)antracen (BPEA). Uvedený neionogenní tenzid může sloužit ke zvýšení rozpustnosti a ke zvýšení stability roztoků proteinů.

Dvojice autorů předpokládá, že velmi malá rozpustnost barviva BPEA ve vodě způsobí jeho solubilizaci z větší části pouze do vnitřku micely, a proto rozhraní mezi micelární a vodnou fází bude nedotčené. Dále vzhledem k relativně malé velikosti micel, intramolekulární dynamika barviva uvnitř micely může být zanedbána. Difúzní koeficienty tenzdiu Tween 20 byly determinovány pomocí FCS v koncentracích $10^{-4} - 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

FCS měření byla provedena pomocí inverzního časově-rozlišeného fluorescenčního mikroskopu a získání dat a vypočítání autokorelační křivky $G(\tau)$ bylo uskutečněno pomocí softwaru SymPhoTime 4.9. Autokorelační křivky vypočítány pomocí crosskorelace fotonů ze dvou různých jednofotonových lavinových fotodiod. Fokální objem (w_0, z_0) byl určen z kalibrace standardu rhodaminu 6G ve vodě se známým difúzním koeficientem.

Normalizované autokorelační funkce byly fittovány v souladu se standardním modelem pro třídídimenzionální difúzi

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2} \quad (4.1)$$

kde N je průměrný počet fluoreskujících molekul v konfokálním objemu, D je difúzní koeficient, w_0 a z_0 jsou efektivní fokální průměry.

Díky malé rozpustnosti barviva BPEA ve vodě, FCS křivky poskytují přímou informaci o difúzním pohybu micel. Ve srovnání s autokorelační křivkou rhodaminu 6G je difúzní koeficient BPEA snížen jako důsledek difúze micel.

Publikace má za cíl metodu FCS vyzdvihnout, a to především její použitelnost i při velmi zředěných micelárních roztocích. Navíc výjimečné vlastnosti barviva BPEA (vysoký fluorescenční kvantový výtěžek, solvatace pouze v micelární fázi, prakticky žádná difúze uvnitř micely) z něj činí velmi vhodné barvivo pro použití tzv. difúzního markeru.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Tab. 5.1: Seznam použitých chemikálií

Název	Výrobce	číslo CAS
Nilská červeň	Sigma-Aldrich spol., s.r.o.	7385-67-3
CTAB	Sigma-Aldrich spol., s.r.o.	57-09-0
Ketoprofen	Sigma-Aldrich spol., s.r.o.	22071-15-4
Rhodamin 6G	Sigma-Aldrich spol., s.r.o.	989-38-8
Aceton	Sigma-Aldrich spol., s.r.o.	67-64-1
Milli Q voda	Milipore Academic	
Silikonová pasta	Lučební závody a.s. Kolín	

5.2 Použité přístroje

- Systém MicroTime 200
- DLS Malvern ZetaSizer Nano ZS
- analytické váhy Sealtec SBC 31
- magnetická míchačka Lavat Chotutice

5.3 Penetrační experimenty

5.3.1 Příprava roztoku fluorescenční sondy

Kvantifikované množství nilské červeně bylo naváženo do odměrné baňky, která byla doplněna acetonem na objem 25 ml. Připravený roztok byl proměřen na spektrometru a jeho koncentrace byla zjištěna na základě platnosti Lambert-Beerova zákona. Pro Lambert-Beerův zákon platí

$$A = -\log \frac{\phi}{\phi_0} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (5.1)$$

kde A je absorbance, ϕ_0 je vstupní zářivý tok, ϕ je výstupní zářivý tok, ϵ je molární extinkční koeficient, l tloušťka optického prostředí, kterým paprsek prochází, a c molární koncentrace absorbující látky [38].

Zásobní roztok nilské červeně o koncentraci $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl uchováván v chladu.

5.3.2 Příprava roztoku tenzidu

Potřebné množství tenzidu CTAB bylo naváženo na analytických vahách a doplněno Milli Q vodou na objem 250 ml tak, aby koncentrace roztoku byla $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Připravený zásobní roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

5.3.3 Příprava roztoku ketoprofenu

Potřebné množství léčiva ketoprofen bylo naváženo na analytických vahách a doplněno acetonem na objem 25 ml tak, aby koncentrace roztoku byla $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Připravený zásobní roztok byl uchováván při laboratorní teplotě.

5.3.4 Příprava roztoků pro penetrační experimenty

Z připraveného zásobního roztoku nilské červeně bylo vždy odpipetováno určité množství barviva do odměrné baňky a doplněno acetonem na objem 25 ml. Rozpouštědlo bylo poté odpařeno v digestoři do vzniku filmu nilské červeně. Na film barviva bylo napipetováno 25 ml připraveného roztoku tenzidu CTAB a kádinka byla vložena na 15 minut do ultrazvukového zařízení Ultrasonic Compact Cleaner. Poté byl vzniklý roztok nilské červeně a tenzidu CTAB připraven na penetrační experimenty.

Krom penetračních experimentů roztoku micel CTAB se solubilizovanou nilskou červení byl také prováděn experiment difúze roztoku micel CTAB, nilské červeně a léčiva ketoprofen. Film nilské červeně byl připraven stejným způsobem, na který bylo napipetováno 25 ml roztoku ketoprofenu a rozpouštědlo se opět nechalo odpařit do vytvoření filmu. Na film bylo obdobně napipetováno 25 ml připraveného roztoku tenzidu CTAB a kádinka byla vložena na 15 minut do ultrazvukového zařízení Ultrasonic Compact Cleaner. Vzniklý roztok sloužil k následujícím penetračním experimentům.

5.3.5 Příprava difúzních cel

Penetrační experimenty byly realizovány pomocí Franzovy difúzní cely (PermaGear, Inc). Na přiléhající plochu donorové i akceptorové části byla nanese vrstva silikonového oleje. Do akceptorové části bylo umístěno magnetické míchadlo. Mezi obě části difúzní cely byla vložena polykarbonátová membrána s velikostí pórů $2 \mu\text{m}$. Cella byla dotažena a umístěna pomocí držáků na magnetickou míchačku. Do akceptorové části bylo pomocí injekční stříkačky nadávkováno 20 ml deionizované vody. Do donorové části bylo stejným způsobem nadávkováno 5 ml připraveného roztoku CTAB se solubilizovanou nilskou červení, čímž byl zahájen difúzní experiment. Horní

část cely a otvor na odběr vzorků byl přikryt aluminovou fólií. Vzorky byly odebírány v určených časových intervalech, a to po 0,5; 1; 2; 3 a 24 hod, kdy byl penetrační experiment ukončen. Po ukončení difúze byl taktéž odebrán vzorek z donorové části cely.



Obr. 5.1: Donorová a akceptorová část difúzní cely

5.4 Analýza vzorků pomocí Fluorescenční korelační spektroskopie

Pro následující měření byl použit systém přístrojů MicroTime 200 firmy PicoQuant. Přístroj s laserem o vlnové délce 510 nm, který vede paprsek pomocí optického vlákna, paprsek přivede na dichroické zrcátko, odkud se odrazí do mikroskopu Olympus IX 71. V mikroskopu prochází objektivem s vodní imerzí (při 60 násobném zvětšení) až se dostane do vzorku.

Mezi vzorkem a objektivem je kapka vody, aby bylo mezi vzorkem a objektivem dosaženo co nejpodobnějšího indexu lomu, a tím se zvýší rozlišení. Ze vzorku jde fluorescenční záření přes objektiv a mikroskop, dichroickým zrcátkem prochází dál přes emisní filtr (550/46). Poté proniká přes 50 μm clonku na dělicí věže, kde je fluorescence rozdělena do dvou detektorů – lavinových fotodiod.

Před každým měřením byl přístroj nastaven přes odraz na sklíčku a pohybováním clonky a čoček před detektorem. Přístroj byl nakalibrován pomocí vhodného standardu Rhodaminu 6G. Po kalibraci byly odebrané vzorky nilské červeně a tenzidu CTAB proměřovány 10 minut, v případě nilské červeně, tenzidu CTAB a ketoprofenu stačilo 5 minutové měření.

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru SymPhoTime 64 a Microsoft Excel.



Obr. 5.2: Ilustrační obrázek přístroje Microtime 200

5.5 Analýza vzorků pomocí Dynamického rozptylu světla

Pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS (firmy Malvern Instruments) byla analyzována velikost částic využitím metody dynamického rozptylu světla (DLS). Pro měření zeta potenciálu byla využita metoda elektroforetického rozptylu světla (ELS).

Měření probíhalo ve skleněných kyvetách. V případě měření pomocí metody DLS byl vzorek ozářen laserovým paprskem (konkrétně He-Ne laserem) o vlnové délce 632,8 nm. Byl sledován rozptyl světla pod úhlem 173° (jedná se o detekci zpětného rozptylu světla). Rozptyl světla byl detekován ve vzdálenosti 1 mm od přední stěny kyvety. Měření probíhalo při 25°C , disperzním prostředím byla voda. Každé měření bylo dvakrát opakováno, přičemž jedno měření bylo tvořeno 10 dílčími skeny.

Při měření zeta potenciálu byla do kyvety se vzorkem ponořena tzv. „dip“ elektroda. Pro měření byl využit stejný laserový paprsek jako při metodě DLS. Bylo detekováno světlo, které projde v přímém směru. Do vzorku byl pouštěn proud

a byla sledována pohyblivost nabitých částic ve vzorku k opačně nabitým elektrodám. Pohybující se částice způsobily fázovou změnu laserového paprsku v porovnání s referenční hodnotou. Z této změny byla určena elektroforetická pohyblivost částic ve vzorku a při znalosti permitivity prostředí, viskozity vody a teploty měření byla hodnota přepočítána na zeta potenciál. Aby byl vzorek elektrostaticky stabilní, nesmí být hodnota zeta potenciálu v rozmezí $-30 - 30$ mV.

6 VÝSLEDKY

6.1 Výsledky měření pomocí Dynamického rozptylu světla

Z uvedených výsledků měření zeta potenciálu lze vidět, že v sérii prvních měření systému nilské červeně a tenzidu CTAB byla absolutní hodnota zeta potenciálu před i po ukončení difúze vysoká a dosahovala hodnot 68 - 69 mV. Tato hodnota naměřeného zeta potenciálu vypovídá o vysoké stabilitě částic a celý systém můžeme považovat za stabilní. Na základě těchto výsledků měření lze tvrdit, že by během celého měření nemělo docházet k vzájemné agregaci, velikost částic by se neměla během experimentu měnit, čili rychlost transportu by neměla být ovlivňována změnou velikosti micel.

U dalších měření provedených, která nebyla provedena ihned po ukončení difúze, ale s určitou časovou prodlevou několika dnů, absolutní hodnota zeta potenciálu klesla na přibližně 30 mV. Přestože vzorky byly připraveny stejným způsobem, domníváme se, že právě s časem se stabilita částic výrazně snížila, tudíž mohlo dojít ke koagulaci molekul a vzniku agregátů.

Tab. 6.1: Naměřené hodnoty zeta potenciálu

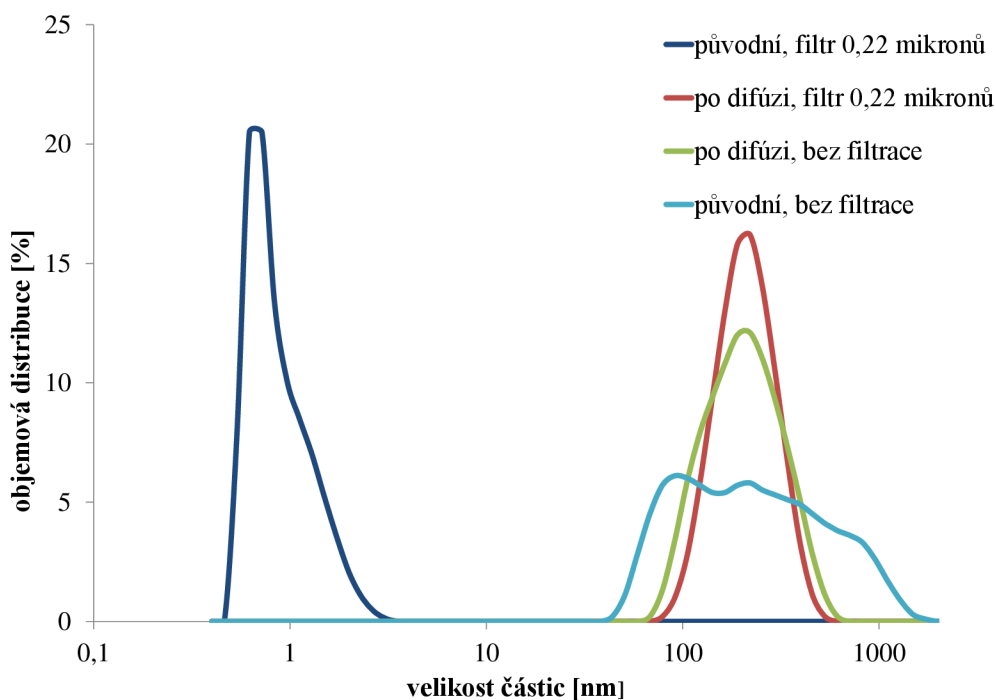
Měření	T [°C]	ZP [mV]	G [S]
1.1	25	78,3	0,242
1.2	25	65,7	0,225
1.3	25	60,5	0,222
	průměr	68,2	0,230
	smodch	9,2	0,011
2.1	25	74,3	0,134
2.2	25	65,3	0,131
2.3	25	68,2	0,13
	průměr	69,3	0,132
	smodch	4,6	0,002

Z analýzy distribuce velikosti částic lze vidět, že v původním roztoku před zahájením difúze převažovala velikost částic kolem 1 nm, kdežto v roztoku po ukončení difúze byly nalezeny částice mnohonásobně vyšší. Částice v roztoku po ukončení difúze dosáhly velikosti až 100 nm bez předchozího přefiltrování roztoku. Po jeho přefiltrování za pomoci filtru s velikostí pórů 0,22 μm sice vymizely předchozí velké

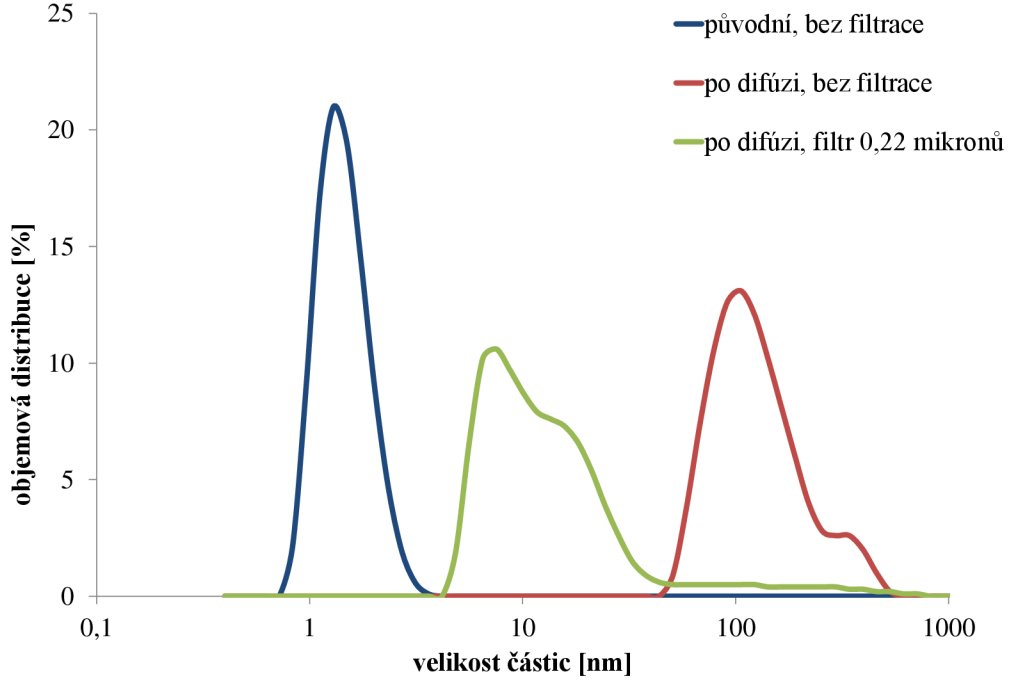
částice možných prachových nečistot, ale přesto u částic systému nilská červeň a tenzid CTAB převažovalo zastoupení velikosti kolem 7 - 16 nm.

U dalšího měření vypadala distribuce velikosti částic obdobně. S pomocí filtru bylo dosaženo velikosti částic kolem 1 nm v původním roztoku, tohoto výsledku však nebylo nikdy dosaženo u roztoků po ukončení difúze, ať už s použitím filtru s velikosti pórů 0,22 μm či bez něj. U roztoků po ukončení difúze vždy převažovalo zastoupení větších částic s velikostí až několika stovek nm.

Jak již bylo výše zmíněno, v roztocích mohly být přítomny nečistoty, přesto jsme však po jejich odstranění pomocí filtru nacházeli neočekávané větší částice. Je však pravděpodobné, že s časem se částice mohly agregovat (tedy během difúze trvající 24 hodin), což by vysvětlovalo i snížení zeta potenciálu, a tedy snížení stability částic. Na výsledky měl tedy vliv čas a prostředí. Toto však nebylo hlavní náplní předložené bakalářské práce, nicméně se nabízí sofistikovanější výzkum této problematiky, který může být rozvinut při další studii.



Obr. 6.1: Graf distribuce velikosti částic pro 1. měření



Obr. 6.2: Graf distribuce velikosti částic pro 2. měření

6.2 Výsledky měření pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

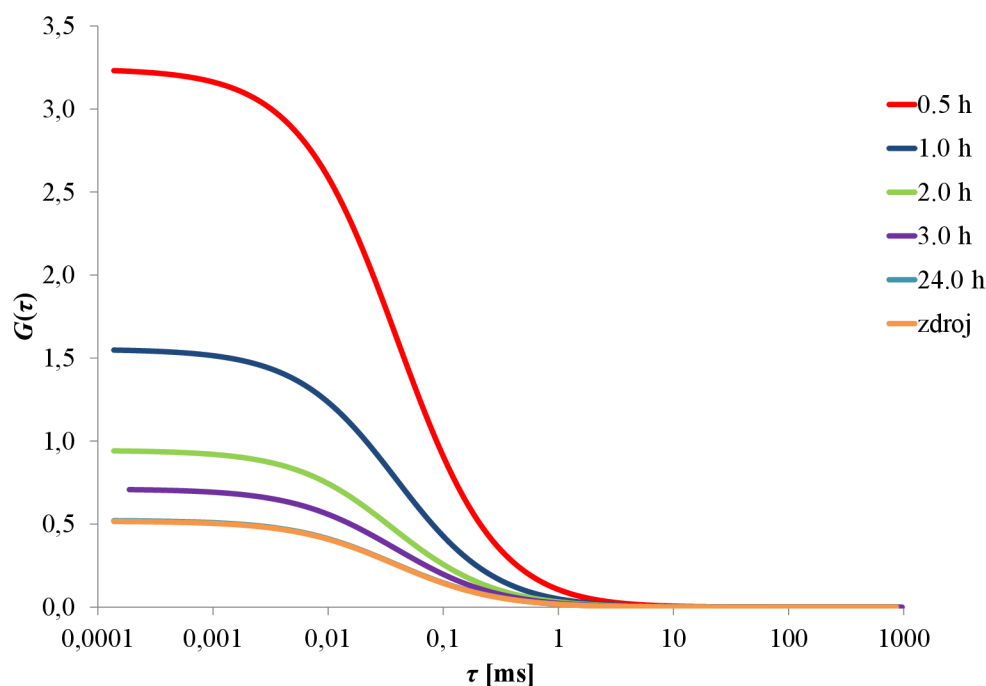
Naměřená data byla zpracována pomocí FLCS analýzy. Nejprve byla provedena tzv. kroskorelace mezi dvěma detektory. Kroskorelace umožní odstranit pozadí a „afterpulsing“ vycházející z odezvy detektorů, a tedy každý reálný pulsní signál může být následován „afterpulesem“ v pozdější době. Použití dvou detektorů zajišťuje přesnější výsledky. Výsledkem je křivka sigmoidního tvaru, které podléhá fittování podle níže uvedené rovnice 6.1. Fittováním byl software schopen zjistit počet částic, a na základě znalosti efektivního objemu z kalibrace na Rhodamin 6G vypočetl koncentraci proměřovaných vzorků.

$$G(t) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{trip}} \right) - 1 \right] \right] \sum_{i=0}^{n_{Diff}-t} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{diff}[i]} \right] \left[1 + \frac{t}{\tau_{diff}[i]\kappa^2} \right]^{0.5}} \quad (6.1)$$

Úvodní měření spočívala pouze v optimalizaci použité metody, která nakonec vedla ke zvýšení koncentrace roztoků nilské červeně, k výběru vhodné membrány

(místo původní membrány s 1 μm póry byla použita membrána s 2 μm póry) a k prodloužení času difúze na 24 h, aby došlo k vyrovnání koncentrací. V počátečních měření se část micel se solubilizovanou nilskou červení zachytávala na polykarbo-nátové membráně, a tudíž ve vzorcích z akceptorové části cely nebyla dostatečná detekovatelná koncentrace nilské červeně. Když tento fakt porovnáme s výsledky z DLS měření, tedy možný vznik agregátů alespoň části micel, je možné, že částice nemohly membránou projít a docházelo k jejich zachytávání na povrchu membrány nebo v jejích pórech.

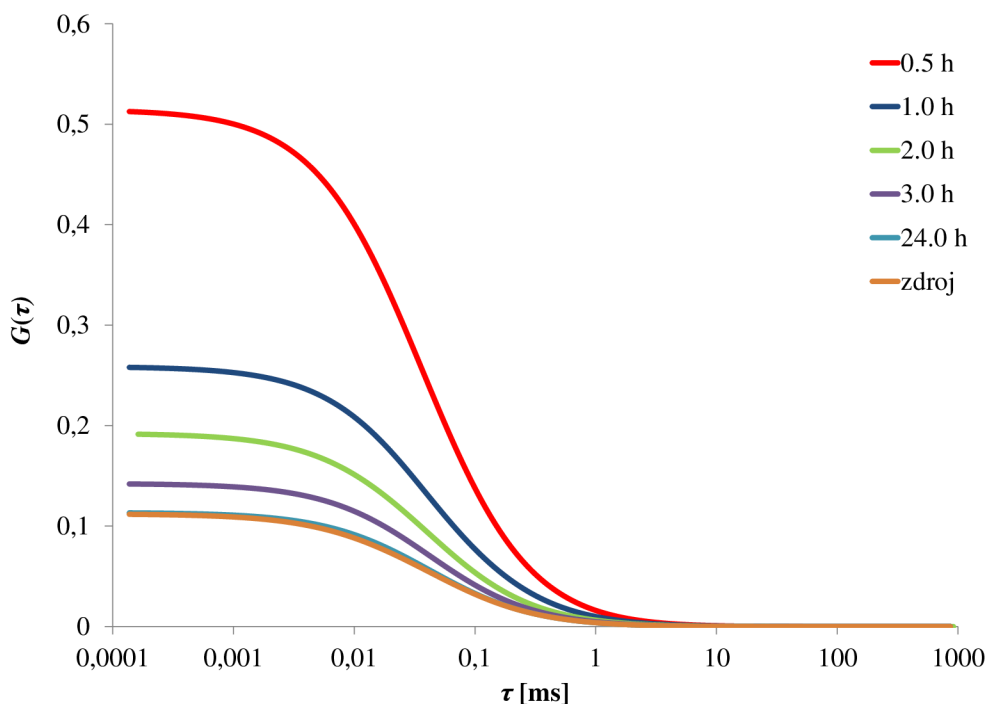
Po zvýšení koncentrace roztoku nilské červeně se podařilo alespoň částečně tento problém odstranit tak, aby prodifundované množství bylo přístrojem detekovatelné. Výsledkem měření vzorků odebraných v časových intervalech po 0,5; 1; 2; 3 a 24 hod byla již zmíněná série sigmoidních křivek a přesné hodnoty koncentrací proměřovaných vzorků.



Obr. 6.3: Graf autokorelační křivky pro systém nilská červeně a CTAB

Z grafu 6.3 lze vyčíst, že hodnota $G(\tau)$ se pro delší čas difúze posunula k nižším hodnotám, neboť $G(\tau_0)$ je převrácenou hodnotou počtu molekul v efektivním objemu. Z toho vyplývá, že s vyšší koncentrací látky je hodnota $G(\tau_0)$, tedy i hodnota $G(\tau)$ nižší. Koncentrace v akceptorové části difúzní cely rostla až do jejího vyrovnání s koncentrací v donorové části cely.

V případě solubilizování kromě nilské červě i léčiva ketoprofen, viz. graf 6.4, lze pozorovat stejnou závislost jako u předchozího systému. Koncentrace roztoku v akceptorové části cely s časem rostla až do jejího vyrovnání. Experiment se může tedy dále rozvíjet i v použití jiných aktivních látek.



Obr. 6.4: Graf autokorelační křivky pro systém nilská červeň, CTAB a ketoprofen

Ze získaných hodnot koncentrací vzorků po jednotlivých odběrech byly vypočítány difúzní koeficienty membrány pro oba systémy. Hodnoty byly vypočítány na základě difúzního modelu přes membrány, kde pro difúzní tok j platí

$$j = - \ln \left(1 - \frac{2 \cdot c}{c_0} \right) \quad (6.2)$$

kde c_0 je původní koncentrace roztoku a c je koncentrace odebraného vzorku v určitém časovém momentu. Dále pak již mohl být vypočítán difúzní koeficient pomocí lineární regrese.

$$D_0 = \frac{dj}{dt} \quad (6.3)$$

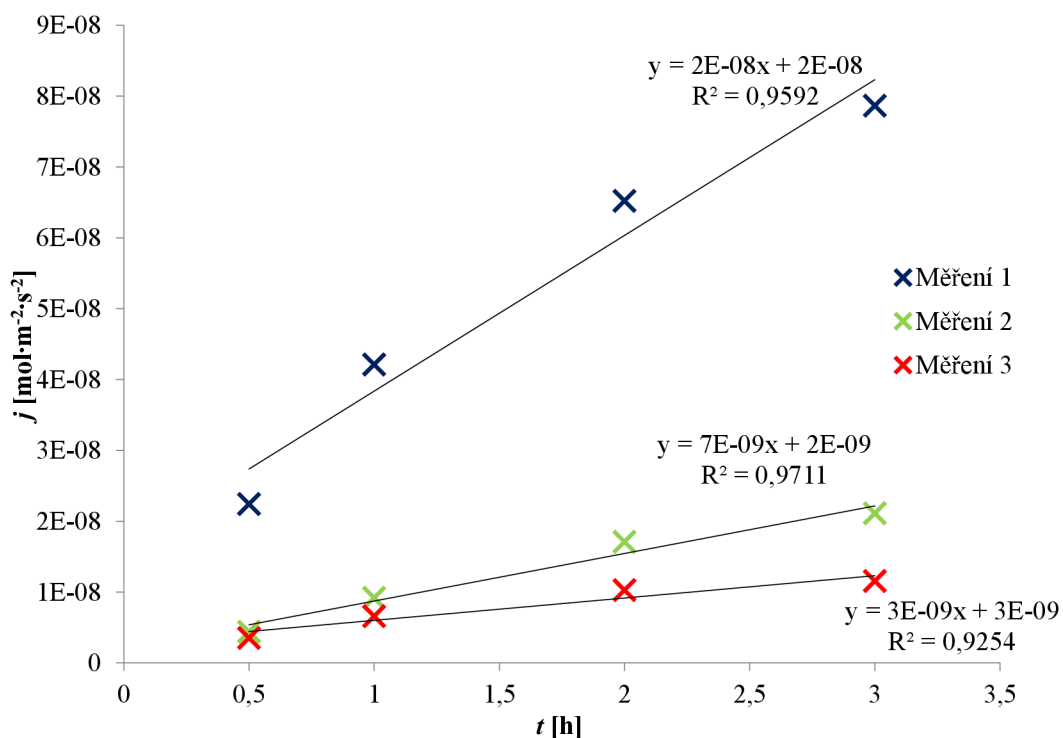
Hodnoty difúzních koeficientů jsou v níže uvedené tabulce 6.2.

Pro oba systémy platí, že množství prodifundované látky s časem lineárně rostlo, a to velmi výrazně u systému CTAB, nilská červeň a ketoprofen v případě Měření 1,

Tab. 6.2: Hodnoty vypočítaných difúzních koeficientů

Měření	D_0 [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	
	CTAB + NR	CTAB + NR + ketoprofen
1	$1,41 \cdot 10^{-9}$	$5,149 \cdot 10^{-9}$
2	$3,87 \cdot 10^{-10}$	$2,26 \cdot 10^{-10}$
3	$4,81 \cdot 10^{-10}$	$1,02 \cdot 10^{-8}$

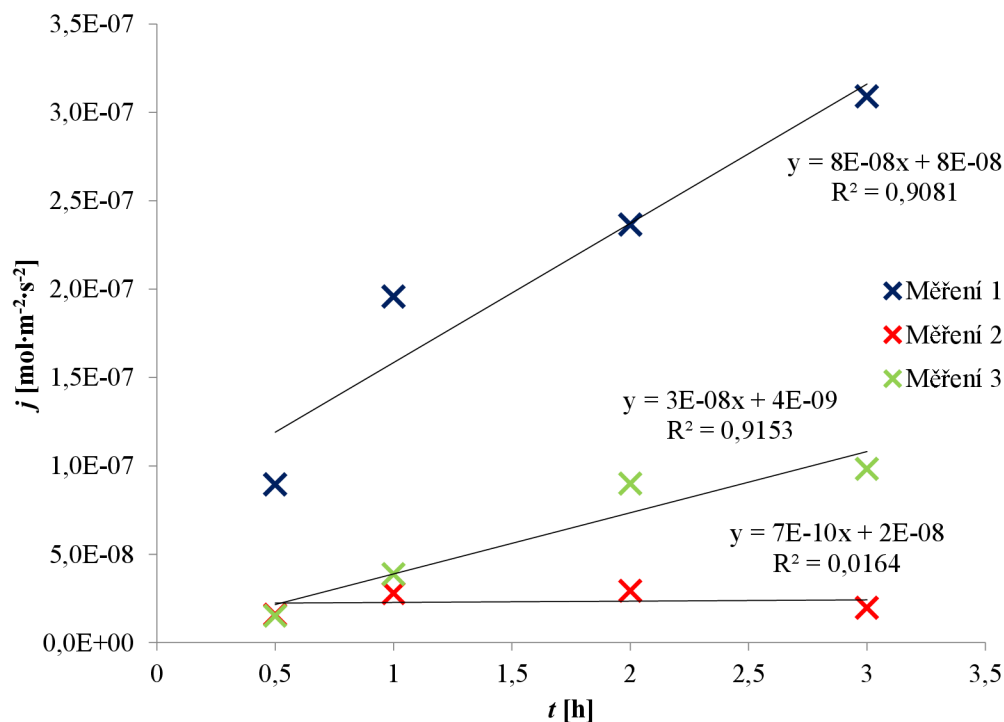
jak je patrné z grafu 6.6. V případě Měření 2 stejného systému je tato závislost spíše konstantní a prodifundované množství bylo velmi malé. Systém CTAB a nilská červeň vykazuje stejnou závislost, hodnoty difúzních toků jsou však řádově nižší a skrz propenetrovalo menší množství micel než v případě systému s léčivem. Obecně nelze tvrdit, že přítomnost léčiva difúzi napomáhá a celý proces urychluje, neboť jednotlivé difúzní profily se liší pro každé měření.



Obr. 6.5: Graf závislosti difúzního toku na čase pro systém CTAB a nilská červeň

Hodnoty difúzních koeficientů hovořící o schopnosti látky difundovat skrz membránu jsou v řádech $10^{-10} - 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Pro Měření 2 a 3 u systému CTAB a nilská červeň se liší jen nepatrně, což souvisí se stejnou rychlostí difúzního procesu. U systému CTAB, nilská červeň a ketoprofen se hodnota vypočteného difúzního koeficientu liší v každém měření, přestože difúze probíhala za stejné laboratorní

teploty. Odchýlení v jednotlivých hodnotách pro oba systémy mohlo být způsobeno nedokonalým odstraněním filmu nilské červeň ze dna kádinky, tudíž vždy odlišnou počáteční koncentrací micelárního roztoku. Vzhledem k vysoké citlivosti FCS se i nepatrné odchylky u roztoků s nanomolární koncentrací při měření výrazně projeví.



Obr. 6.6: Graf závislosti difúzního toku na čase pro systém CTAB, nilská červeň a ketoprofen

Provedená pilotní měření s sebou přinesla mnoho možností, které umožňují daný experiment rozvíjet i nadále. Měření vzorků pomocí fluorescenční korelační spektroskopie potvrzuje unikátnost této techniky tkvící nejen ve zjištění přesných koncentrací i nanomolárních vzorků, ale poskytuje mnoho informací o vlastnostech použité fluorescenční sondy. Při dalších měřeních by bylo vhodné vyzkoušet i jiná barviva a porovnat výsledky s nilskou červeň. Nilská červeň je určitě vhodnou sondou pro fluorescenční měření, ale díky své struktuře se může v roztoku micel chovat jinak, než bylo očekáváno, jak je uvedeno v kapitole 4.3. Bylo předpokládáno, že nilská červeň bude solubilizovat do středu micely, aby zamezila kontaktu s hydrofilním prostředím, avšak k tomuto jevu nemuselo vůbec docházet. Díky přítomnosti aromatických kruhů ve struktuře je nilská červeň schopna tvořit tzv. $\pi - \pi$ vazby způsobující navázání barviva ne do středu micely, ale na její vnější část. Tenhle jev pak může vést k vytvoření agregátů micel a k nemožnosti projít skrz póry membrány.

Další optimalizace metody může spočívat k prodloužení doby míchání roztoků nilské červeně a tenzidu CTAB tak, aby celý film nilské červeně byl rozrušen a nezůstal usazen na dně kádinky. Tím by se zajistila požadovaná koncentrace původního roztoku. Rozrušení filmu nilské červeně může však trvat několik dní.

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium solubilizace aktivních látek do micel tenzidu CTAB a na transport těchto micel skrz syntetické porézní membrány, které simulují membrány v lidském těle. Cílem bylo optimalizovat metodu transportu micelárních roztoků pomocí difúzní techniky ve skleněných Franzových celách s použitou fluorescenční sondou a aktivní látkou. Jednotlivé difúzní profily byly vyhodnoceny na základě měření pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Pro stanovení dalších charakteristik micelárních roztoků sloužila metoda dynamického rozptylu světla.

Stabilita a velikost difundujících částic micel se solubilizovaným barvivem nilské červeně a léčivem byla posuzována dle výsledků objemové distribuce částic a dle hodnot zeta potenciálů. Tyto vlastnosti byly zjišťovány pro původní roztok a pro roztok po ukončení difúze, po ustanovení rovnováhy. Množství látky prodifundované skrz polykarbonátovou porézní membránu bylo stanoveno technikou fluorescenční korelační spektroskopie, která vyhodnocovala vzorky s nanomolární koncentrací. Takéž zaznamenávala časový průběh difúze vzorků odebraných v určitých časových intervalech. Z hodnot koncentrací příslušných vzorků pak mohly být stanoveny jednotlivé difúzní koeficienty pro zvolený difúzní systém s, respektive bez, aktivní látky v podobě léčiva.

Nezbytnou součástí této práce je charakteristika samotných disperzních systémů se zaměřením na povrchově aktivní látky, micely a schopnost těchto látek solubilizovat aktivní látky, v našem případě barviva a léčiva. Podstatná část věnující se jednotlivým difúzním technikám nastiňuje problematiku transportu micelární roztoků skrz membrány.

Z měření pomocí dynamického rozptylu světla vyplývá, že tenzid CTAB je schopen tvořit micely s velikostí přípustnou pro jejich difúzi přes membránu, avšak jejich stabilita v čase klesá a nabízí se možnost tvorby agregátů podpořenou přítomností barviva nilské červeně. Přítomnost aromatických kruhů ve struktuře barviva může vést k vytvoření $\pi - \pi$ vazeb v micelárním roztoku. Tento jev pak může mít za následek neschopnost částic zcela prodifundovat membránou a není ani vyloučena vysoká afinita těchto micel k povrchu membrány.

Pomocí fluorescenční korelační spektroskopie byla zvolená difúzní technika optimalizována, neboť výsledky měření svědčily o pomalém průběhu difúze a tudíž nutnosti prodloužení jednotlivých časových intervalů odběrů vzorků, a tedy celkového času na ustanovení rovnováhy, která nastala po 24 hodinách. Stanovené difúzní profily hovoří o velmi proměnlivých hodnotách difúzních koeficientů pro oba vybrané systémy, tenzidu CTAB a nilské červeně a tenzidu CTAB, nilské červeně a léčiva ketoprofen.

Tato práce může být rozšířena o další experimenty a nabízí se mnoho možností

jejich realizace v podobě aplikace dalších biomedicínsky aktivních látek či zvolení jiných povrchově aktivních látek a porovnání jejich chování při difúzních procesech. V neposlední řadě je možná náhrada syntetické membrány za kůži, čímž by se docílilo většího přiblížení k biologickým systémům.

8 LITERATURA

- [1] BARTOVSKÁ, L. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická [Praha], 2005, 244 s. ISBN 80-7080-579-x.
- [2] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická [Praha], 2001, 198 s. ISBN 80-7080-422-x.
- [3] Co je co v koloidní a povrchové chemii: Výkladový slovník. In: BARTOVSKÁ, L. a M. ŠÍŠKOVÁ. *Vydavatelství: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. [cit. 2015-04-30]. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/tyndalluv_jev.html>
- [4] GOODWIN, J. *Colloids and interfaces with surfactants and polymers*. Chichester: Wiley, 2009, xii, 376 s. ISBN 978-0-470-51881-6.
- [5] STIBOR, I. Úvod do supramolekulární chemie. In: *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR*. [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/1_Stibor.pdf>
- [6] RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA JR. A.; TAVARES, L. C. Micellar solubilization of drugs. *Journal Pharm Pharm Sci* [online]. 2005 July 8; 8(2): 147–165. Published online 2005 July 8. [cit. 2015-04-29].
- [7] RANGEL-YAGUI, C. O., A. PESSOA-JR a D. BLANKSCHTEIN. Two-phase aqueous micellar systems: an alternative method for protein purification.
- [8] NEZHAD, E. H., et al. DNA Encapsulation in an Anionic Reverse Micellar Solution of Dioctyl Sodium Sulfosuccinate. *Physical Chemistry*. 2013, 3.1: 7-10.
- [9] OWEN S. C., D. P. Y. CHAN a Molly S. SHOICHET. Polymeric micelle stability. *Nano Today*. 2012, vol. 7, issue 1, s. 53-65. DOI: 10.1016/j.nantod.2012.01.002.
- [10] The University of Chicago: Tirrell Research Group. *The University of Chicago* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://tirrell.ime.uchicago.edu/Research/Polyelectrolyte_Micelles.html>.
- [11] YOKOYAMA, M. Block copolymers as drug carriers. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 1991, 9.3-4: 213-248.

- [12] TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2001, vol. 73, 2-3, s. 137-172. DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00299-1.
- [13] DUTT, G. B. How Critical Micelle Temperature Influences Rotational Diffusion of Hydrophobic Probes Solubilized in Aqueous Triblock Copolymer Solutions.
- [14] Introduction to Anisotropy. In: *University of Cambridge: Dissemination of IT for the Promotion of Materials Science* [online]. [cit. 2015-04-30].
- [15] DOJČANSKÝ, J. *Chemické inženýrstvo II.* 2nd Ed. Bratislava: Malé centrum, 1999, 392 s. ISBN 80-967-0648-9.
- [16] ATKINS, Peter W. *Atkins' Physical Chemistry*. 7th ed. Oxford: Oxford University Press, 2002, 1149 s. ISBN 01-987-9285-9.
- [17] CUSSLER, E. *Diffusion mass transfer in fluid systems*. 2nd Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, 580 s. ISBN 05-215-6477-8.
- [18] SEDLÁČEK, P. Hydrogely huminových kyselin - experimentální model i aplikační forma. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 139 s. (přílohy 51 s.). Vedoucí dizertační práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [19] PAVELEK M., JANOTOVÁ E. a J. ŠTĚTINA. Vizualizační a optické měřicí metody. *Odbor termomechaniky a techniky prostředí, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <<http://ottp.fme.vutbr.cz/~pavelek/optika/0206.htm>>.
- [20] Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. In: *Particle Size Analysis, Zeta Potential Measurement, Rheology, SEC/GPC* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>>.
- [21] NanoSight NS500, Single particle zeta potential platform with integrated fluidics for automation. In: *Particle Size Analysis, Zeta Potential Measurement, Rheology, SEC/GPC* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <<http://www.malvern.com/en/products/product-range/nanosight-range/nanosight-ns500/default.aspx>>.
- [22] Zeta potential, The benefits of using zeta potential measurements to improve formulation stability and shelf life and reduce formulation time and cost. In:

- Particle Size Analysis, Zeta Potential Measurement, Rheology, SEC/GPC* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <<http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential/>>.
- [23] The Zeta Potential. *Colloidal dynamics: leaders in colloidal measurement* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <<http://www.colloidal-dynamics.com/docs/CDE1Tut1.pdf>>.
- [24] PEDRAJAS, C., V. RAHHAL a R. TALERO. Determination of characteristic rheological parameters in Portland cement pastes. *Construction and Building Materials*. 2014, vol. 51, s. 484-491. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2013.10.004.
- [25] LUSCHTINETZ, F. a C. DOSCHE. Determination of micelle diffusion coefficients with fluorescence correlation spectroscopy (FCS). *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009, vol. 338, issue 1, s. 312-315. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.06.064.
- [26] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy* 2nd Ed. New York: Kluwer Academic Publishers, 1999, 698 s. ISBN 03-064-6093-9.
- [27] SCHWILLE, P.; HAUSTEIN, E. Fluorescence correlation spectroscopy-an introduction to its concepts and applications. In: *Biophysical Society* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <<http://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/schwille.pdf>>.
- [28] CHASTEEN, T. G. Jablonski Diagram: Relaxation mechanism for excited state molecules. In: *Sam Houston State University* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://www.shsu.edu/chm_tgc/chemilumdir/JABLONSKI.html>.
- [29] Fluorescence correlation spectroscopy: Schematic of FCS setup. In: *Wikimedia Commons* [online]. [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_of_FCS_setup.png>.
- [30] KAPUSTA, P., WAHL M., BENDA A., HOF M. a J. ENDERLEIN. Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. *Journal of Fluorescence*. 2006-12-27, vol. 17, issue 1, s. 43-48. DOI: 10.1007/s10895-006-0145-1.
- [31] BÜLTER, A., BLECKMANN A a U. ORTMANN. FLCS – Advances in Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Science Lab* [online]. PicoQuant GmbH, Berlin, Germany, 2011 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: <<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/flcs-advances-in-fluorescence-correlation-spectroscopy/>>.

- [32] TEHRANI-BAGHA, A.R., R.G. SINGH a K. HOLMBERG. Solubilization of two organic dyes by anionic, cationic and nonionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, vol. 417, s. 133-139. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.10.006.
- [33] SHAH, S.S., M. S. KHAN, H. ULLAH a M. A. AWAN. *Solubilization of Amphiphilic Hemicyanine Dyes by a Cationic Surfactant, Cetyltrimethylammonium Bromide*. Journal of Colloid and Interface Science. 1997, vol. 186, issue 2, s. 382-386. DOI: 10.1006/jcis.1996.4649.
- [34] AKERMAN, S. Transport of drugs across porous ion exchange membranes. *Journal of Controlled Release*. vol. 50, 1-3, s. 153-166. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00131-4.
- [35] VARGHESE, V.A., S. UPADHYAY a R.C. SRIVASTAVA. Carrier-mediated transport through liquid membranes. *Journal of Membrane Science*. 1994, vol. 93, issue 3, s. 229-235. DOI: 10.1016/0376-7388(94)00079-4.
- [36] KURNIASIH, Indah Nurita, Hua LIANG, Parveen Choudhary MOHR, Gaurang KHOT, Jürgen P. RABE a Andreas MOHR. 2015. Nile Red Dye in Aqueous Surfactant and Micellar Solution. *Langmuir*. 31(9): 2639-2648. DOI: 10.1021/la504378m.
- [37] LUSCHTINETZ, F. a C. DOSCHE. 2009. Determination of micelle diffusion coefficients with fluorescence correlation spectroscopy (FCS). *Journal of Colloid and Interface Science*. 338(1): 312-315. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.06.064.
- [38] KHOPKAR, S. M.. *Basic concepts of analytical chemistry*. Tunbridge Wells: New Academic Science. ISBN 9788122411591.
- [39] PicoQuant: Fluorescence Microscopes [online]. [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <<https://www.picoquant.com/products/category/fluorescence-microscopes>>.

9 SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam
BPEA	9,10-bis(fenylethynyl)anthracen
C ₁₁ E ₁₅	pentaethylenglykol-mono-undodecyl ether
C ₁₂ E ₄	<i>n</i> -dodecyl-tetraethylenoxid
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DLS	dynamický rozptyl světla
DTAB	dodecyltrimethylammonium bromid
ELS	elektroforetický rozptyl světla
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FLCS	časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie
HPLC	vysoce-účinná kapalinová chromatografie
NaLS	laurylsulfát sodný
PAA	polyakrylová kyselina
PAL	povrchově aktivní látky
PEO	polyethylenglykol
PVDF	polyvinylidem fluorid
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TCSPC	časově rozlišené čítání fotonů
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra

10 SEZNAM SYMBOLŮ A VELIČIN

Symbol	Význam	Jednotka
ΔG_{mic}	standardní volná energie micelizace	J
R	univerzální plynová konstanta	$J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$
T	teplota	K
P	rozdělovací koeficient	
χ	molární solubilizační kapacita	
S_{tot}	úplná rozpustnost aktivní látky	$mol \cdot dm^{-3}$
S_W	rozpustnost aktivní látky ve vodě	$mol \cdot dm^{-3}$
C_{swf}	molární koncentrace tenzidu v roztoku	$mol \cdot dm^{-3}$
P_M	rozdělovací koeficient systému micela–voda	
μ	chemický potenciál	$J \cdot mol^{-1}$
w	práce vykonána jedním molem látky	J
x	prostorová souřadnice	
p	tlak	Pa
F	síla působící v opačném směru	N
J_i	difúzní tok	$mol \cdot s^{-1}$
j_i	difúzní tok přes jednotkovou plochu	$mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
A	velikost plochy	m^2
D	difúzní koeficient	$\mu m^2 \cdot s^{-1}$
t	čas	s
l	tloušťka filmu	m
H	rozdělovací koeficient	
r_1	rychlost chemické reakce	$mol \cdot dm^{-3} \cdot s^{-1}$
β	geometrická konstanta charakterizující difúzní celu	m^{-2}
$g(\tau_c)$	korelační funkce u DLS	
τ_c	zpožděný korelační čas	s, ms
DQ^2	čas, kdy částice difunduje přes vzdálenost $Q - 1$	s
$d(H)$	hydrodynamický průměr	m
k	Boltzmannova konstanta	$J \cdot K^{-1}$
η	viskozita	$m^2 \cdot s^{-1}$
$G(\tau)$	autokorelační funkce	
F	fluktuace korelačního signálu	
r_0, z_0	charakteristické rozměry detekčního objemu	
V_{eff}	efektivní objem	
τ	laterální difúzní čas	s
ΔG^A	volná energie hydratace	J