



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# VLIV PARAMETRŮ DISPERGACE NA FORMOVÁNÍ VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ

INFLUENCE OF DISPERSION PARAMETERS ON FORMATION OF VESICULAR SYSTEMS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Katarína Vajcíková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1549/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Katarína Vajcíková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Vliv parametrů dispergace na formování vezikulárních systémů

### Zadání bakalářské práce:

- 1) V dostupné literatuře zjistit využívané parametry ultrazvukové dispergace v přípravě vezikulárních systémů s přihlédnutím ke kataniontovým tenzidům.
- 2) Na základě rešerše navrhnout rozsah parametrů pro přípravu vhodného modelového systému kataniontového tenzidu na bázi SDS a CTAB. Zároveň vybrat vhodnou instrumentální techniku pro ověření vlivu dispergačních parametrů.
- 3) Stanovit vliv dispergačních parametrů na vlastnosti kataniontových vezikulárních systémů.
- 4) Vyhodnotit zvolené postupy a dosažené výsledky z hlediska přípravy těchto systémů.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Katarína Vajcíková  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Práca popisuje metódu prípravy kataniontových vezikulárnych systémov použitím metódy ultrazvukovej dispergácie s cieľom nájsť najvhodnejšie parametre na prípravu systému s dlhodobou fyzikálnou stabilitou. Porovnávanými parametrami boli amplitúda ultrazvukovej vlny, energia použitá na dispergáciu a objem deionizovanej vody použitej na prípravu systému tvoreného záporne nabitým tenzidom dodecylsulfátom sodným a kladne nabitým tenzidom hexadecyltrimetylamónium bromidom. Z dôvodu zvýšenia stability a udelenia kladného náboja bol použitý tenzid dimetyldioctadecylamónium chlorid a taktiež bol na zvýšenie stability pridaný cholesterol. Jednotlivé systémy boli porovnávané v čase na základe ich veľkosti, zeta potenciálu a zakalenia roztoku. Veľkosť častíc a koeficient polydisperzity boli merané metódou dynamického rozptylu svetla. Pomocou elektroforetického rozptylu svetla bol určený zeta potenciál a metódou UV-VIS spektrofotometrie bol na základe merania turbidity sledovaný zákal jednotlivých vzoriek. Výsledky práce prezentujú najvhodnejšie parametre ultrazvukovej dispergácie pri použití homogenizátora Bandelin SONOPULS UW 3200. Použitie týchto parametrov vykazuje vznik systémov s dlhodobou fyzikálnou stabilitou, čo znamená, že môžu byť použiteľné pre ďalšie aplikácie.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Amfifilný iontový pár, kataniontové vezikuly, ultrazvuková dispergácia, dynamický rozptyl svetla, zeta potenciál, koeficient polydisperzity, UV-VIS spektrofotometria

## **ABSTRACT**

The work describes a method for the preparation of catanionic vesicular systems using the method of ultrasonic dispersion in order to find the most suitable parameters for the preparation of a system with long-term physical stability. The parameters compared were the amplitude of the ultrasonic wave, the energy used for dispersion, and the volume of deionized water used to prepare a system consisting of the negatively charged surfactant sodium dodecyl sulfate and the positively charged surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide. To increase stability and provide a positive charge, the surfactant dimethyldioctadecylammonium chloride was used and cholesterol was also added to increase stability. The individual systems were compared over time because of their size, zeta potential and turbidity of the solution. Particle size and polydispersity coefficient were measured by the dynamic light scattering method. The zeta potential was determined by electrophoretic light scattering, and the turbidity was monitored by UV-VIS spectrophotometry based on the measurement of turbidity. The results present the most suitable parameters of ultrasonic dispersion using Bandelin SONOPULS UW 3200. The use of these parameters shows the emergence of systems with long-term physical stability, which means that they can be used for other applications.

## **KEYWORDS**

Ion pair Amphiphile, catanionic vesicles, ultrasonic dispersion, dynamic light scattering, zeta potential, polydispersity index, UV-VIS spectrophotometry

VAJCÍKOVÁ, Katarína. *Vliv parametrů dispergace na formování vezikulárních systémů* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123792>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

### **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

### ***Pod'akovanie:***

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať vedúcemu svojej bakalárskej práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za možnosť byť súčasťou jeho tímu a za ochotu a čas, ktorý mi venoval na konzultáciách. Veľké ďakujem takisto patrí Ing. Martine Havlíkovej za pomoc pri práci v laboratóriu a pri spracovaní bakalárskej práce.

## OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>9</b>
2.1 Tenzidy .....	9
2.1.1 Dodecylsulfát sodný (SDS).....	9
2.1.2 Hexadecyltrimetylamónium bromid (CTAB).....	10
2.1.3 Dimetyldioctadecylamónium chlorid (DoDAC).....	10
2.2 Micielárne koloidy .....	10
2.2.1 Vznik a štruktúra micel.....	12
2.3 Vezikuly.....	13
2.4 Kataniontové vezikulárne systémy.....	14
2.4.1 Fyzikálna stabilita.....	14
2.4.2 Aplikácia.....	16
2.5 Ultrazvuková dispergácia .....	16
2.6 Dynamický rozptyl svetla.....	18
2.6.1 Zeta potenciál .....	19
2.6.2 Koeficient polydisperzity PdI .....	20
2.7 UV-VIS spektrofotometria .....	20
<b>3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....</b>	<b>21</b>
3.1 Príprava kataniontových vezikúl s kladne nabitým surfaktantom .....	21
3.2 Príprava systému cIPA ultrazvukovou dispergáciou s rôznymi koncentraciami cholesterolu .....	22
3.3 Formovanie vezikulárnych systémov s nízkym PdI pomocou metódy ultrazvukovej dispergácie .....	22
3.4 Lipozómy s obsahom periodícínu použitím rôznej amplitúdy a rôzneho času dispergácie .....	23
<b>4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>24</b>
4.1 Chemikálie .....	24
4.2 Zhrnutie cieľov práce .....	24
4.3 Použité metódy.....	25
4.3.1 Príprava zásobných roztokov tenzidov .....	25
4.3.2 Príprava zásobného prášku IPA .....	25
4.3.3 Príprava zásobných roztokov v chloroforme .....	25
4.3.4 Príprava cIPA s cholesterolom.....	26

4.3.5	Ultrazvuková dispergácia.....	26
4.3.6	Dynamický rozptyl svetla a zeta potenciál .....	26
4.3.7	UV-VIS spektrofotometria.....	27
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>28</b>
5.1	Deň dispergácie – veľkosť častíc pomocou DLS.....	28
5.1.1	Koeficient polydisperzity PdI .....	30
5.1.2	Zeta potenciál .....	30
5.2	Testy stability.....	31
5.2.1	Rehydratácia 60 ml deionizovanej vody.....	31
5.2.2	Rehydratácia 30 ml deionizovanej vody.....	35
5.2.3	Rehydratácia 15 a 5 ml deionizovanej vody .....	38
<b>6</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>LITERATÚRA .....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>PRÍLOHA.....</b>	<b>45</b>
9.1	1.deň – veľkosť častíc vzoriek o objeme 30 ml a 15 ml.....	45
9.2	Hodnoty PdI jednotlivých vzoriek: .....	46
9.3	Grafy pre vzorky s objemom 30 ml .....	46
9.4	Grafy pre vzorky s objemom 15 ml .....	47
9.5	Grafy pre vzorky s objemom 5 ml .....	49

## 1 ÚVOD

Vezikuly sú koloidné častice tvorené jednou alebo viacerými dvojvrstvovými membránami, ktoré od seba oddeľujú vnútorné a vonkajšie objemy kvapalnej fáze. Môžu ich vytvárať lipidy, povrchovo aktívne látky ako napríklad tenzidy alebo blokové kopolyméry vo vodnom roztoku. Tieto sústavy umožňujú uskutočňovať mnohé výmenné procesy buniek s vonkajším prostredím. Termín *kataniontové vezikulárne systémy* je v oblasti koloidnej vedy pomerne novým pojmom, ale v posledných rokoch priťahujú tieto systémy pozornosť, najmä vďaka potenciálnemu využitiu ako nosiče liečiv, kedy dokážu postupne uvoľňovať enkapsulované liečivo a cielene ho distribuovať, či nosiče DNA pre farmaceutické aplikácie s relatívne nízkymi nákladmi [1,2].

Kataniontové vezikuly možno vytvoriť zmiešaním kationových a aniónových povrchovo aktívnych látok prostredníctvom elektrostatických interakcií medzi polárnymi skupinami (hydrofilnými hlavami). Vplyvom tejto elektrostatickej interakcie dochádza k znižovaniu voľnej energie systému a po odstránení protiiontov vzniká amfifilný iontový pár IPA (z anglického ion pair amphiphile).

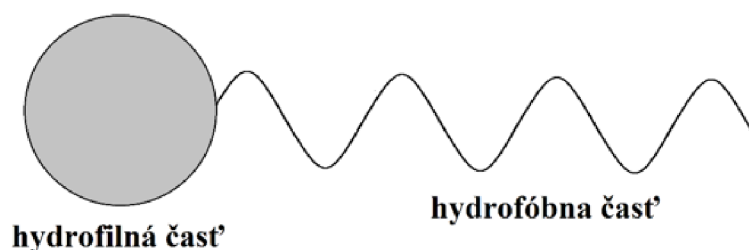
Cieľom tejto práce je stanoviť vplyv dispergačných parametrov na vlastnosti týchto systémov a nájsť parametre, ktorých použitím dostaneme systémy s dlhodobou fyzikálnou stabilitou. Ultrazvuková dispergácia je dôležitým krokom prípravy kataniontových vezikúl, ktorý ovplyvňuje veľkosť vezikúl a ich následnú stabilitu. Boli porovnávané tri parametre dispergácie a to amplitúda a energia sonotrody a objem vody použitej na rehydratáciu roztoku pri príprave vzoriek. Stabilita systémov s rôznymi parametrami dispergácie bola následne porovnávaná využitím techniky dynamického rozptylu svetla a to meraním veľkosti častíc a koeficientu polydisperzity a pomocou elektroforetického rozptylu svetla meraním zeta potenciálu a taktiež bola využitá metóda UV-VIS spektrofotometrie k meraniu zakalenia roztokov.



## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Tenzidy

Tenzid je povrchovo aktívna látka, ktorá je schopná sa aj pri nízkej koncentrácii hromadiť na fázovom rozhraní a tým znižovať medzifázovú energiu sústavy. Dôvodom hromadenia je snaha systému dosiahnuť čo najnižšiu energiu. Všeobecne sa tenzidy skladajú z dvoch častí hydrofilnej (polárnej hlavičky) a hydrofóbnej (nepolárna časť obsahujúca dlhý nepolárny uhlíkovitý reťazec), vid' Obr.1. Vo vodnom prostredí smeruje hydrofilná časť k rozpúšťadlu a hydrofóbna časť sa naopak snaží čo najviac obmedziť kontakt s rozpúšťadlom. Tenzidy rozdeľujeme podľa ich hydrofilnej časti na neionické a ionické, ktoré sa ďalej rozdeľujú na anionické, kationické a amfotérne [3].

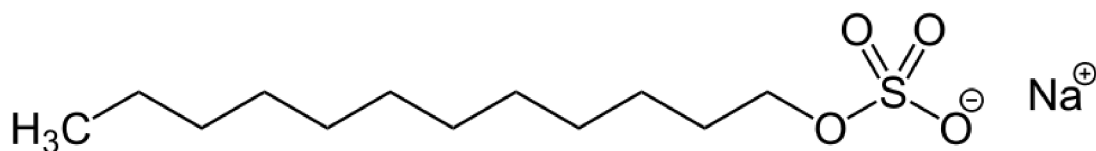


Obr.1: Základná štruktúra tenzidu

#### 2.1.1 Dodecylsulfát sodný (SDS)

Dodecylsulfát sodný, iným názvom laurylsulfát sodný, je organická soľ organosulfátu skladajúca sa z 12 uhlíkového nepolárneho reťazca pripojeného k polárnej záporne nabitej sulfátovej skupine, preto ho zaraďujeme medzi anionické tenzidy. Je to biela tuhá horľavá látka, prášok bez zápachu, ktorého pH sa pohybuje v rozmedzí 6 až 9 s molekulovou hmotnosťou 288,37 g/mol [4]. Štruktúra SDS je zobrazená na Obr.2.

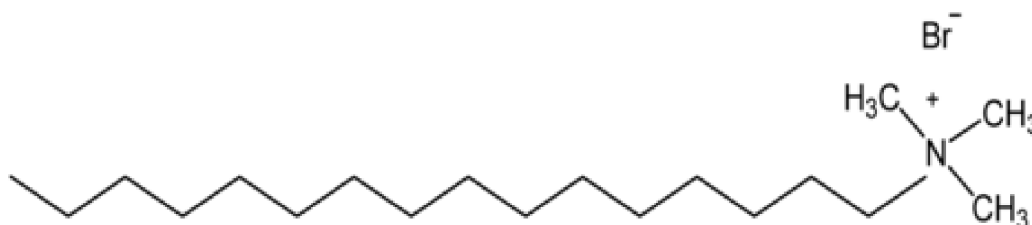
Používa sa ako súčasť čistiacich prostriedkov, kde sa uplatňujú jeho detergentné vlastnosti. SDS je účinná povrchovo aktívna látka, ktorá sa v nižších koncentráciach nachádza aj v zubných pastách, šampónoch, prípravkoch do kúpeľa (schopnosť vytvárať penu) apod. [5].



Obr.2: Štruktúra SDS [6]

### 2.1.2 Hexadecyltrimetylamónium bromid (CTAB)

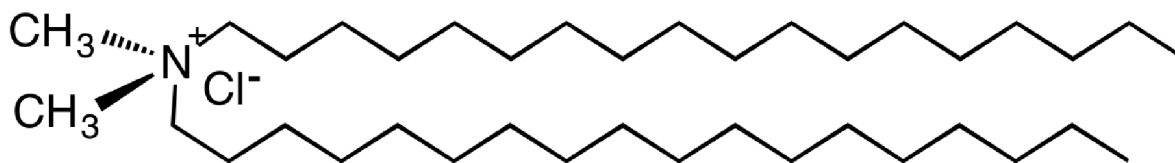
Hexadecyltrimetylamónium bromid zaradujeme medzi kationické tenzidy, pretože vo svojej štruktúre obsahuje 16 uhlíkový nepolárny reťazec pripojený k dusíku s tromi metylovými skupinami (vid'. Obr.3). Nachádza sa vo forme kvartérnej amóniovej soli obsahujúcej atóm brómu. Jedná sa o biely kryštalický prášok s molekulovou hmotnosťou 364,45 g/mol. Využíva sa pri tvorbe pufrových roztokov pre extrakciu DNA alebo ako antiseptické činidlo [7].



Obr.3: Štruktúra CTAB [8]

### 2.1.3 Dimetyldioctadecylamónium chlorid (DoDAC)

Dimetyldioctadecylamónium chlorid je zlúčenina označovaná ako kvartérna amóniová soľ a patrí medzi kladne nabitú dvojreťazcovú surfaktanty. Je to pevná látka s molekulovou hmotnosťou 586,64 g/mol, ktorá má detergentné vlastnosti a v minulosti sa využívala ako zmäkčovač bielizne. Dnes nachádza využitie ako súčasť vlasových prípravkov, najmä vďaka svojim antistatickým účinkom [9].



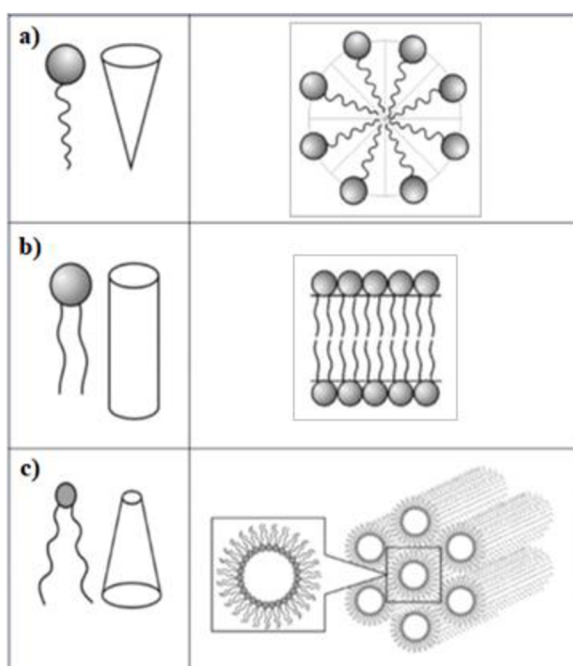
Obr.4: Štruktúra DoDAC [10]

## 2.2 Micelárne koloidy

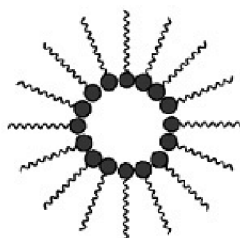
Zvolením vhodného rozpúšťadla a pri určitej koncentrácii môžu molekuly niektorých nízkomolekulárnych látok asociovať do tej miery, že vytvárajú častice koloidných rozmerov. Tieto polymolekulárne útvary sa nazývajú micely a látky, ktoré sa týmto spôsobom správajú, označujeme ako micelárne alebo asociatívne koloidy. Stupeň asociácie primárnych molekúl a ich počet v micelle, a taktiež tvar, štruktúra a priemerný rozmer micely sa menia s fyzikálnymi podmienkami, ale podobne ako ich makroskopické vlastnosti, sú určené okamžitým stavom systému. Micelárne koloidy sú teda reverzibilné systémy [11].

Micely sú koloidné častice, ktoré v zriedených roztokoch vykazujú približne guľovitý tvar. Vytvárajú ho tenzidy, ktoré sa vo vodnom prostredí správajú tak, že ich hydrofilný úsek smeruje k rozpúšťadlu a hydrofóbne reťazce sa snažia, aby ich kontakt s vodou bol minimálny. Micely uplatňujú svoju funkciu v biológii aj v priemysle najmä vďaka svojim solubilizačným schopnostiam. Nepolárne látky môžu prechádzať do vodnej fáze potom, čo boli rozpustené v uhlíkovodíkovom jadre micely. Micelárne systémy sa využívajú pri organickým syntézach, pri terciárnej ťažbe ropy a najmä ako detergenty [12].

Medzi iné možné micelárne štruktúry vzniknuté vo vodnom roztoku zahrňujeme laminárne, valcovité (viď. Obr.5) alebo reverzné (obrátené) micely, ktoré vznikajú v nepolárnom prostredí. U takýchto micel smerujú polárne hlavičky do stredu micely a zhlukujú sa za vzniku hydrofilného jadra. Hydrofóbne uhlíkové reťazce sú potom smerované do nepolárneho rozpúšťadla (Obr.6) [13].



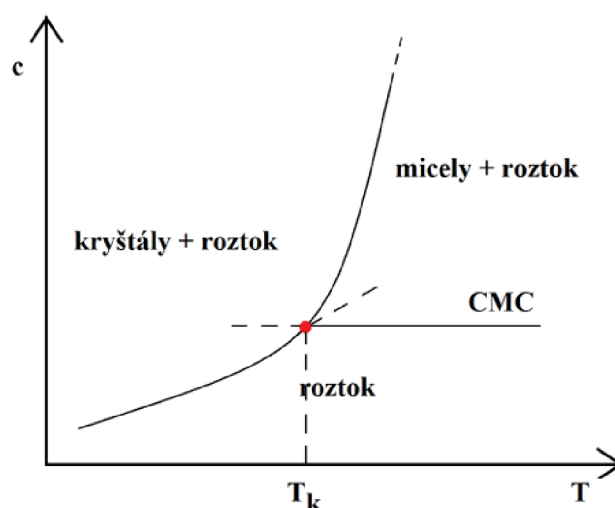
Obr.5: a) klasická micela, b) laminárna (Mc Bainova) micela, c) valcovitá micela [14]



Obr.6: Reverzná micela

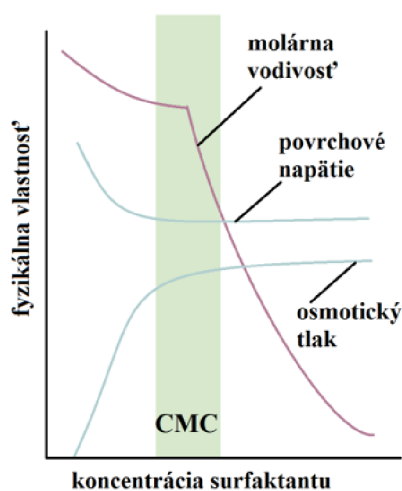
### 2.2.1 Vznik a štruktúra micel

Ako vyplýva z Obr.7, micely sa tvoria iba pri teplotách nad *Krafftovou teplotou*, resp. Krafftovým bodom ( $T_k$ ), a koncentráciách vyšších než je kritická micelárna koncentrácia (CMC). Krafftov bod je hodnota teploty, pri ktorej sa rozpustnosť tenzidov rovná CMC a môže teda dochádzať ku vzniku micel. Pri teplote nižšej ako Krafftova teplota je rozpustnosť tenzidov malá, micely sa netvoria a vzniká rovnováha medzi kryštálmi a pravým roztokom tenzidu, ktorého koncentrácia rastie pri zvyšovaní teploty [1].



Obr.7: Stavový diagram sústavy micelotvorný tenzid – voda [1]

*Kritická micelárna koncentrácia* je koncentrácia, pri ktorej začína v pravom roztoku micelárneho koloidu tvorba micel. Obvykle sa pohybuje v rozmedzí  $10^{-5}$  až  $10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>. Pod touto koncentráciou je micelárny koloid v stave unimérnych molekúl, nad ňou však všetky pridávané molekuly asociujú do micel [15]. CMC sa prejavuje výraznou zmenou fyzikálnych vlastností roztoku, najmä jeho molárnej vodivosti. Zmena vlastností roztoku pri CMC nie je náhla, ide o tzv. prechodovú oblasť, kde sa fyzikálne vlastnosti menia s koncentráciou síce plynulo, ale nelineárne, ako prezentuje Obr.8 [12].



Obr.8: Typická zmena niektorých fyzikálnych vlastností vodných roztokov SDS [12]

Podľa teploty, charakteru, tvaru a koncentrácií molekúl surfaktantov môžu micely nadobúdať mnoho rôznych tvarov. Dôležitou veličinou pre predpoveď tvaru micely je *úložný faktor* (*packing parameter*):

$$N_s = \frac{V}{A \cdot l}, \quad (1)$$

kde  $V$  je objem hydrofóbnej časti amfifilnej molekuly,  $A$  je plocha vyhradená pre hydrofílnu skupinu na povrchu micely a  $l$  je maximálna dĺžka hydrofóbneho reťazca. Hodnota úložného faktoru v závislosti na tvare micely je uvedená v Tab.1 [12].

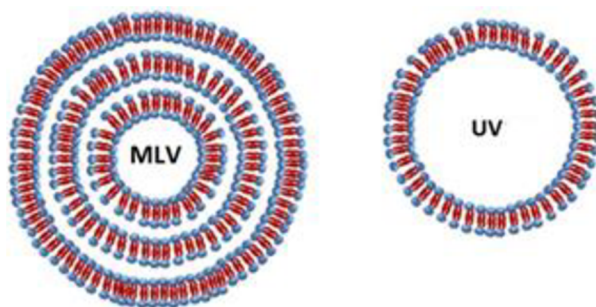
Tab.1: Závislosť tvaru micel na hodnote úložného faktoru  $N_s$  [12]

Hodnota $N_s$	Tvar micely
<0,33	Micely guľového tvaru
0,33 až 0,50	Valcové tyčinky
0,50 až 1,00	Vezikuly
1,00	Planárne dvojvrstvové membrány
>1	Reverzné micely a iné tvary

### 2.3 Vezikuly

Vezikuly sú koloidné častice tvorené jednou alebo viacerými dvojvrstvovými membránami, ktoré od seba oddeľujú vnútorné a vonkajšie objemy kvapalnej fáze. Môžu ich vytvárať lipidy, povrchovo aktívne látky alebo blokové kopolyméry vo vodnom roztoku. Tieto sústavy umožňujú uskutočňovať mnohé výmenné procesy buniek s vonkajším prostredím [1].

Membrána vezikuly sa skladá z hydrofilnej časti smerujúcej k rozpúšťadlu a hydrofóbneho reťazca orientovaného do vnútra dvojvrstvy, s cieľom zamedziť kontaktu s rozpúšťadlom. V závislosti na podmienkach prípravy môžu vezikuly nadobúdať rôzne rozmery a štruktúry. Multilamelárne vezikuly MLV obsahujú viac dvojvrstiev a veľkosť takejto vezikuly sa pohybuje v rozmedzí (0,1–0,3)  $\mu\text{m}$ . Unilamelárne vezikuly obsahujú iba jednu dvojvrstvu a delíme ich na LUV (*Large unilamellar vesicles*) s veľkosťou (0,1–10)  $\mu\text{m}$  a SUV (*Small unilamellar vesicles*) s veľkosťou  $\leq 0,1 \mu\text{m}$ . V posledných rokoch sa štúdie vezikulárnych systémov zaoberajú vezikulami ako potenciálnymi nosičmi liečiv, vďaka ich väčšej enkapsulačnej kapacite, čo im dáva výhodu oproti micelám [16].

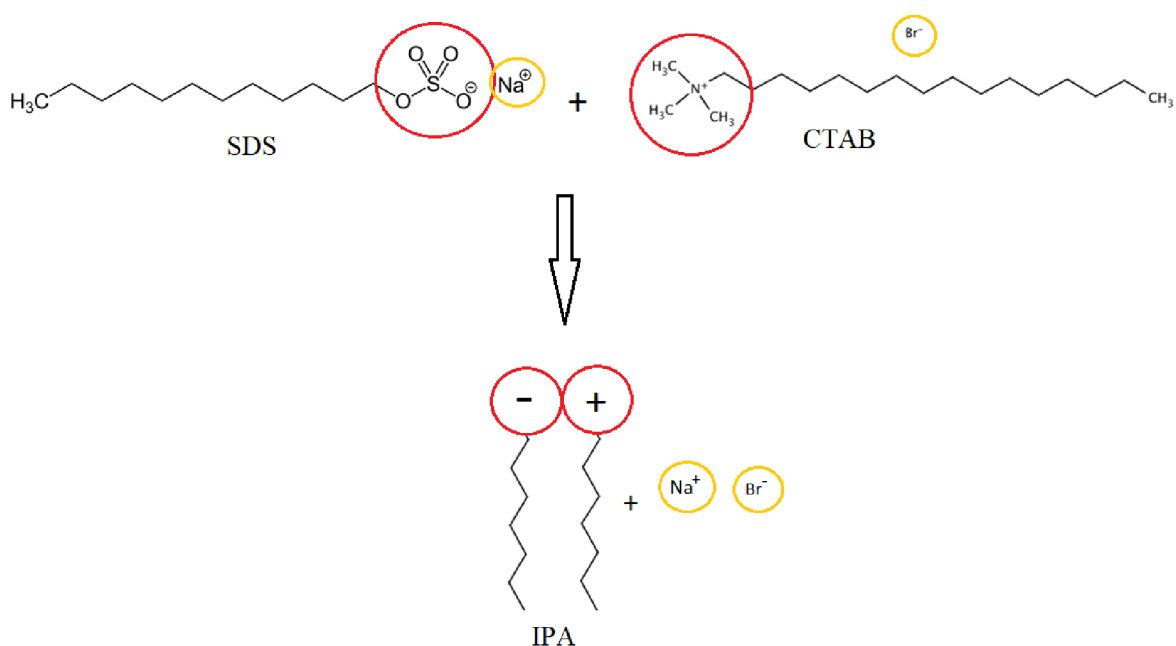


Obr.9: Porovnanie multilamelárnej a unilamelárnej vezikuly [17]

## 2.4 Kataniontové vezikulárne systémy

Vezikuly zložené z lipidov sa nazývajú lipozómy a keďže sú pomerne netoxické, môžu sa po čase rozložiť in vivo. Avšak praktické využitie lipozómov je za dôvodu vysokých nákladov obmedzené. Náhradou sa zdajú byť kataniontové vezikuly pripravené z lacných povrchovo aktívnych látok. Kataniontové vezikuly s dlhodobou fyzikálnou stabilitou možno vytvoriť zmiešaním kationových a aniónových povrchovo aktívnych látok prostredníctvom elektrostatických interakcií medzi polárnymi skupinami (hydrofilnými hlavami). Elektrostatická interakcia medzi opačne nabitými polárnymi skupinami znižuje voľnú energiu a po odstránení protiiontov sa zvyšok nazýva amfifilný iontový pár IPA (z anglického ion pair amphiphile) [18].

IPA sú tvorené spárovaním dvoch opačne nabitých povrchovo aktívnych látok a následnom odstránení protiiontov. Vznik IPA možno klasifikovať do 3 typov: výmena iónov, extrakcia a metódy zrážania. Pri použití metódy zrážania sú zmiešané povrchovo aktívne látky v ekvimolárnom pomere a pri určitom kritickom parametre balenia [18]. Kritický parameter balenia sa využíva na predpovedanie štruktúry agregátov povrchovo aktívnych látok vo vodnom prostredí. Pri vzniku IPA je kritický parameter balenia väčší ako pri vzniku micel a preto IPA radšej tvoria vezikuly ako micely [19].



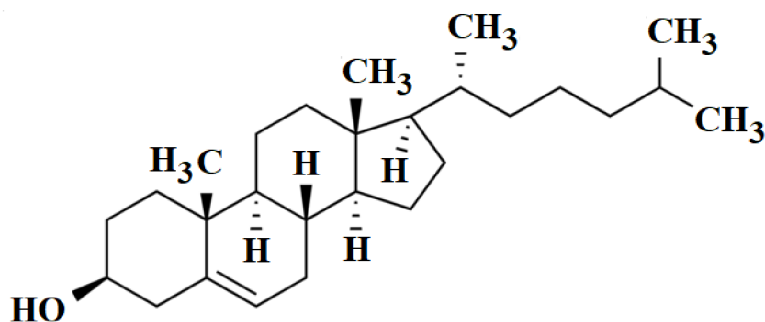
Obr.10: Vznik IPA z CTAB a SDS po odstránení protiiontov

### 2.4.1 Fyzikálna stabilita

Všeobecne IPA komplexy pripravené zo zmesi dvoch opačne nabitých povrchovo aktívnych látok metódou zrážania nedisponujú dobrou fyzikálnou stabilitou a preto sa na zvýšenie fyzikálnej stability zavádzajú aditíva ako sú nabité povrchovo aktívne látky (napr. kladný dvojreťazcový surfaktant), cholesterol alebo alkoholy [19].

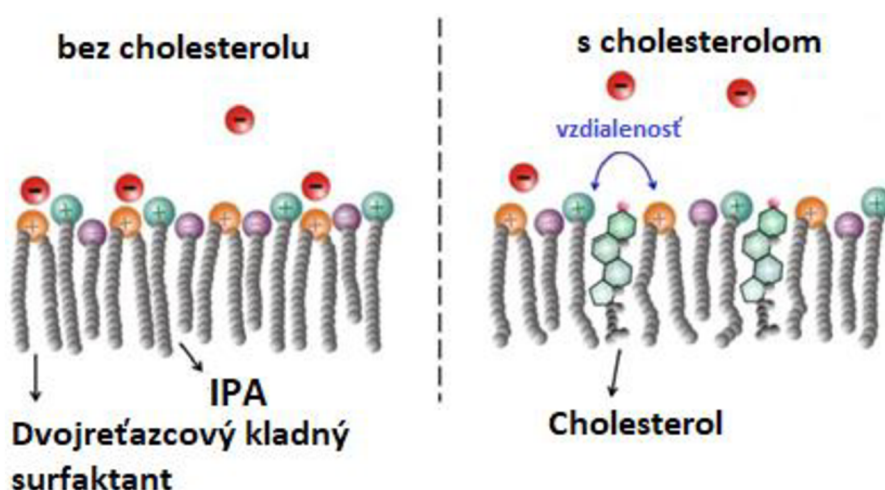
### 2.4.1.1 Cholesterol

Cholesterol je steroidná látka, ktorá zohráva v bunkách cicavcov dôležitú úlohu pri modulácii fyzikálnych vlastností fosfolipidových membrán. Hlavný faktor, ktorý podmieňuje zmenu fyzikálnej stability dvojvrstiev je štruktúra cholesterolu [20]. Pridanie správneho množstva cholesterolu pri príprave vezikulárneho systému IPA obsahujúceho dvojreťazcový kladný surfaktant zväčšuje vzdialenosť medzi nabitými hlavnými skupinami povrchovo aktívnych látok a naopak znižuje tendenciu väzby protiiontov, čo vedie k výraznejšiemu nábojovému charakteru vezikúl [21].



Obr.11: Štruktúra cholesterolu [22]

Sterolový kruh cholesterolu má tendenciu maximalizovať kontakt so susednými uhl'ovodíkovými reťazcami, vďaka čomu sa dôjde k zlepšeniu mechanickej pevnosti dvojvrstvy (viď.Obr.12). Prítomnosť cholesterolu v dvojvrstvových štruktúrach kationtových vezikúl s obsahom dvojreťazcového kladného surfaktantu teda nielen zlepšuje inter-vezikulárnu elektrostatickú odpudivosť, ale taktiež upravuje intra-molekulové balenie, čo vedie k zlepšeniu fyzikálnej stability vezikúl [21].



Obr.12: Demonštrácia dvojvrstvy PAL bez prítomnosti a prítomnosťou cholesterolu [21]

### 2.4.2 Aplikácia

Kataniontové vezikulárne systémy priťahujú veľkú pozornosť najmä vďaka potenciálnemu využitiu v mnohých aplikáciách pre farmaceutické a medicínske účely. Vďaka prítomnosti hydrofilnej a hydrofóbnej oblasti sú schopné solubilizovať hydrofilné aj hydrofóbne látky a takisto enkapsulovať liečivá. Hlavnou výhodou týchto systémov je ich spontánna tvorba vo vodnom roztoku a takisto nižšia cena oproti alternatívnym lipozómom [23].

Zaujímavou alternatívou enkapsulácie liečiv je vytvorenie kataniontového komplexu z povrchovo aktívneho liečiva a opačne nabitých povrchovo aktívnej látky, kedy sa liečivo stáva súčasťou membrány, takže nie je problém s integritou a tesnosťou vezikulárnej membrány [24].

Interakciou záporne nabitých molekúl DNA a kataniontových vezikúl vzniká komplex, ktorý umožňuje vstup DNA do bunky prostredníctvom endocytózy a uľahčuje tak dodávanie DNA do buniek. Ďalšie potenciálne aplikácie kataniontových vezikulárnych systémov vo farmaceutickom a medicínskom priemysle sú procesom rôznych výskumov [2].

### 2.5 Ultrazvuková dispergácia

Ultrazvuková homogenizácia, tiež nazývaná aj sonifikácia patrí medzi často využívané metódy k deziintegrácii buniek, emulgácii, homogenizácii, ultrazvukovému čisteniu a taktiež k dispergácii vzoriek. Účinkom ultrazvukových vln na chemické systémy sa zaoberá oblasť chémie nazývaná sonochemia. Ultrazvukový homogenizátor generuje ultrazvukové pole o vysokej intenzite a amplitúde, ktoré je pomocou sondy prenášané do kvapaliny. Výhodou ultrazvukovej homogenizácie je vysoko účinná redukcia veľkosti častíc v kvapaline, vďaka čomu sa dá dosiahnuť lepšej rovnorodosti a stability vzoriek a takisto možnosť presnej kontroly prevádzkových parametrov, najmä oscilačných amplitúd a tlaku kvapaliny [25].

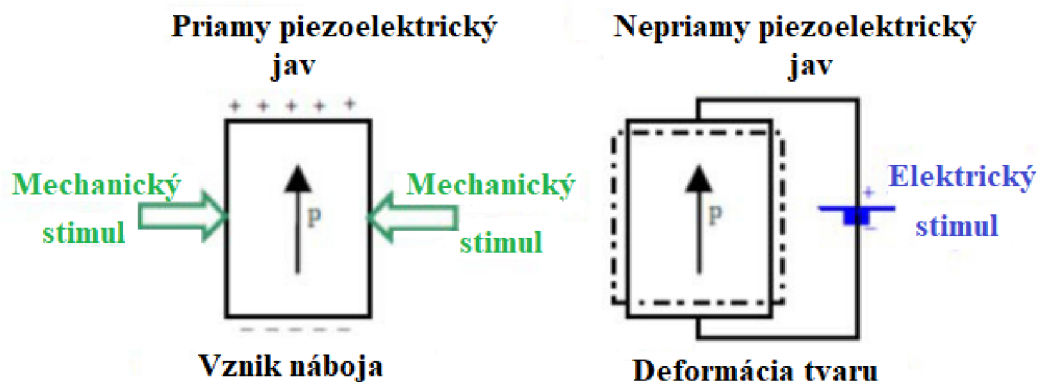
V biologických aplikáciách sa sonifikácia často využíva k narušeniu bunčných membrán a k uvoľneniu obsahu bunky. Pri príprave vezikulárnych systémov vznikajú použitím ultrazvukovej energie unilamelárne vezikuly (SUV) z multilamelárnych (MLV) [26].

Ultrazvukový homogenizátor sa skladá z troch hlavných zložiek. Tvorí ho vysokofrekvenčný napäťový generátor, ultrazvukový konvertor a ultrazvuková sonda [27]. Ultrazvukový generátor je zdroj napätia o vhodnej amplitúde a frekvencii. Ak je toto napätie aplikované na vhodný materiál, premení elektrickú energiu dodávanú generátorom na mechanické kmitanie o danej frekvencii. Tento jav sa nazýva nepriamy piezoelektrický jav. Na rozdiel od priameho piezoelektrického javu, kedy je pri mechanickej deformácii na povrchu kryštálu merateľný náboj, je pri nepriamom piezoelektrickom jave keramický oscilátor stimulovaný elektricky, čo zapríčiňuje deformáciu kryštálu (viď.Obr.13) [28].

Oscilátor musí byť vytvorený z piezoelektrického materiálu, najčastejšie používaným je PZT (olovo-zirkonát-titanát), čo znamená, že sa skladá z kryštálov zirkonátu olova ( $\text{PbZrO}_3$ ) a titanátu olova ( $\text{PbTiO}_3$ ). Mechanická oscilácia je následne prenášaná do vzorky pomocou štandardnej hlavice (sonotrody), alebo hlavice s akustickým medzičlánkom.

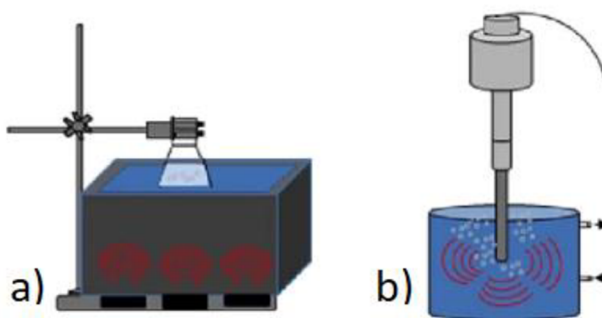


Poslednou časťou je ultrazvuková sonda, ktorá prevádza ultrazvukovú energiu do vzorky. Existujú rôzne druhy sond: mikrosondy, kónické sondy a sondy s plochým zakončením o rôznych priemeroch [27].



Obr.13: Demonštrácia priameho a nepriameho piezoelektrického javu [29]

Najpoužívanejšie typy ultrazvukových homogenizátorov sú ultrazvuková kúpeľ a tyčová ultrazvuková sonda, znázornené na Obr.14. Rozdiely medzi nimi sú najmä v účinnosti a procesných schopnostiach. Žiadúce účinky ultrazvuku, ako sú už vyššie spomínaná homogenizácia či dispergácia, sú spôsobené kavitáciou. Kavitácia je definovaná ako vznik, rast a kolaps bublín v kvapaline. Tento jav nastáva v kvapalinách pri rýchlych lokálnych zmenách tlaku. Pri použití ultrazvukovej kúpele je kavitácia v tekutine nekontrolovateľne distribuovaná, čo má za následok nízku intenzitu účinku ultrazvuku a jeho nerovnomerné šírenie. Na druhej strane, výhodou ultrazvukovej sondy je vznik intenzívnej ultrazvukovej zóny priamo pod sondou, takže účinok ultrazvuku je intenzívnejší a proces je teda plne kontrolovaný, reprodukovateľný a intenzita distribuovaná rovnomerne [30,31].

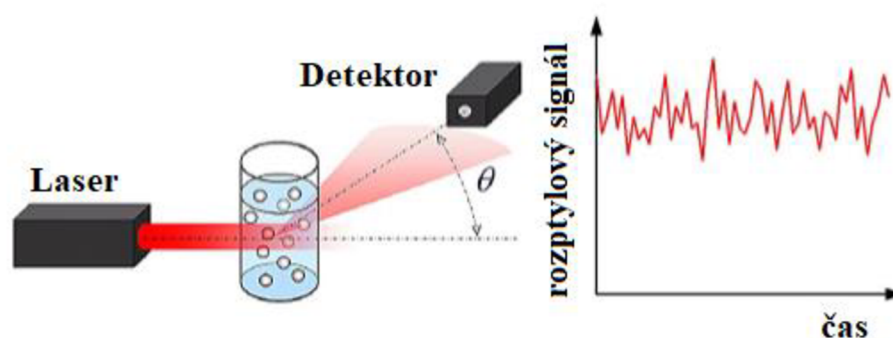


Obr.14: a) ultrazvuková kúpeľ, b) ultrazvuková sonda [32]

## 2.6 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (DLS) je významná technika dimenzovania (určovania rozmerov) pre nanočastice zahŕňajúce napr. proteíny, koloidné či disperzné systémy, ktorých veľkosť zasahuje až do oblasti pod 1 nm. Vďaka tejto technike vieme určiť charakteristiky častíc alebo roztoku ako veľkosť častíc, molekulovú hmotnosť či zeta potenciál (ak sa častica nachádza v elektrickom poli a hovoríme teda o tzv. elektroforetickom rozptyle svetla) [33].

Základný princíp merania spočíva v meraní fluktuácie intenzity svetla z laserového zdroja, rozptýleného objektmi nachádzajúcimi sa vo vzorke. Tieto fluktuácie súvisia s interferenčným zoslabovaním a zosilňovaním svetla rozptýleného na nestacionárnych časticách disperznej fáze, podliehajúcich Brownovmu pohybu [34].



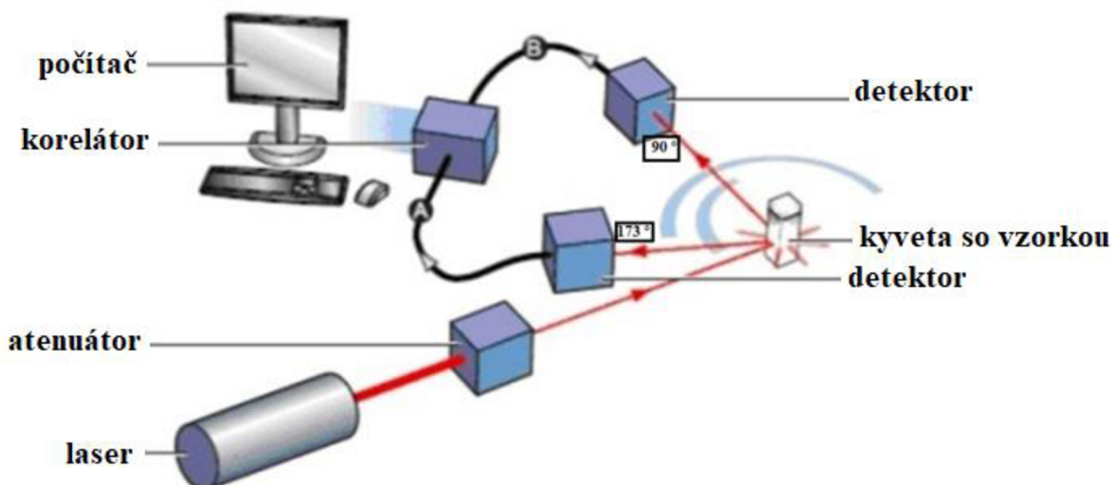
Obr.15: Princíp DLS: Svetlo rozptýlené jemnými časticami osvetlenými laserom merané s vysokým časovým rozlíšením pod definovaným uhlom [35]

Vzťah medzi rýchlosťou Brownovho pohybu častice a veľkosťou častice určuje *Stokes-Einsteinova rovnica*, vďaka ktorej vieme vypočítať hydrodynamický polomer častice ( $r_H$ ):

$$r_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot D}, \quad (2)$$

kde  $k_B$  je Boltzmannova konštanta,  $T$  je termodynamická teplota,  $\eta_0$  viskozita rozpúšťadla a  $D$  je difúzny koeficient zistený pomocou štatistickej analýzy [36].

Najdôležitejšou časťou prístroja je laser. Za ním sa nachádza atenuátor (zoslabovač), ktorý znižuje intenzitu dopadajúceho žiarenia laseru. Monochromatické koherentné žiarenie dopadá na vzorku, kde sú rozptýlené častice. Následne je žiarenie zachytené optickými prvkami, pomocou ktorých sa meria intenzita rozptýleného svetla a je detekovaná na 2 rôznych typoch detektorov a to buď pod uhlom  $90^\circ$ , alebo častejšie pod uhlom  $173^\circ$  (používa sa na detekciu častíc o vyššej koncentrácii). Za detektorom sa nachádza korelátor, ktorý spracováva intenzitu rozptylu svetla po sebe idúcich meraní a následnú informáciu o veľkosti častíc vyhodnocuje počítač. Schéma prístroja je zobrazená na Obr.16 [37].



Obr.16: Inštrumentácia prístroja na meranie DLS [37]

### 2.6.1 Zeta potenciál

Zeta potenciál je označenie pre elektrokinetický potenciál ( $\zeta$ ) v koloidných systémoch, ktorý sa meria pomocou metódy elektroforetického rozptylu svetla. Je to vlastne potenciálový rozdiel medzi objemom kvapaliny a tenkou vrstvou protiiontov pútaných k povrchu častice, teda na rozhraní medzi kompaktnou a difúznou časťou elektrickej dvojvrstvy. Elektrickú dvojvrstvu tvorí vnútorná časť, ktorá sa nazýva Sternova vrstva (ióny viazané pevne) a vonkajšia časť priťahovaná iónmi opačného znamienka, ktoré sú viazané elektrickými a absorpčnými silami. Práve tieto vzdialenejšie ióny vytvárajú difúznou vrstvu. Vo vnútornej vrstve sú ióny nepohyblivé, no v difúznej vrstve sa pohybujú. Difúzna vrstva sa vyznačuje teoretickou hranicou [12].

Potenciál, ktorý vzniká na “rovine sklzu” tj. na tejto teoretickej hranici nazývame ako elektrokinetický potenciál alebo zeta potenciál. Ten sa mení podľa vzdialenosti od povrchu častice. Systém je elektrostaticky stabilný, ak má dostatočne záporný alebo dostatočne kladný zeta potenciál a odpudivé sily sú dostatočne veľké. Nestabilný systém sa vyznačuje hodnotami zeta potenciálu od -30 mV do +30 mV. Kompozícia difúznej vrstvy sa líši v závislosti na pH, iontovej sile, koncentrácii apod. [12,38].

## 2.6.2 Koeficient polydisperzity PDI

Koloidné disperzné sústavy možno klasifikovať podľa mnohých kritérií. Jedným z nich je klasifikácia podľa veľkosti, kedy ich rozdeľujeme na monodisperzné (obsahujúce častice rovnakej veľkosti) a polydisperzné (obsahujúce častice rôznych veľkostí). Pre popis veľkosti častíc využívame parameter koeficient polydisperzity PDI [1]. Koeficient polydisperzity je všeobecne používaný k meraniu šírky distribúcie molekulových hmotností častíc. Je definovaný ako:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}, \quad (3)$$

kde  $M_w$  je hmotnostný priemer jednotlivých molekulových hmotností častíc a  $M_n$  je početný priemer jednotlivých molekulových hmotností častíc [39].

V súvislosti s DLS reprezentuje koeficient PDI distribúciu veľkostných populácií v danej vzorke, tzn. že popisuje koľko materiálu (vezikúl) je prítomného v každom segmente líšiaceho sa molekulovou hmotnosťou. Číselná hodnota PDI sa pohybuje medzi 0 až 1. Hodnota 0,0 označuje dokonale monodisperznú vzorku a 1 zasa vysoko polydisperzný systém častíc. V praxi sa v aplikáciách pre dodávanie liečiv využívajú lipozómy a vezikulárne systémy, ktorých maximálna hodnota PDI sa pohybuje na hranici 0,3, čo znamená, že systém je považovaný za dostatočne monodisperzný a teda použiteľný pre ďalšie aplikácie [39,40].

## 2.7 UV-VIS spektrofotometria

Molekulová absorpčná spektrometria v ultrafialovej a viditeľnej oblasti sa zaoberá meraním a interpretáciou elektrónových spektier molekúl látok, ktoré absorbujú elektromagnetické žiarenie v rozsahu vlnových dĺžok 200 až 800 nm [41].

Princíp UV-VIS spektrofotometrie spočíva v meraní energie, ktorá bola pri prechode žiarenia vzorkou (látkou) absorbovaná a prezentuje ju bezrozmerná veličina *absorbancia*. Výsledkom merania je absorpčné spektrum, ktoré je graficky znázornené ako závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke. Ak sa energia absorbujúceho žiarenia rovná nule, je nulová aj absorbancia. Matematické vyjadrenie popisujúce závislosť absorpcie elektromagnetického žiarenia na vlastnostiach materiálu, cez ktorý žiarenie prechádza popisuje Bouguer-Lambert-Beerov zákon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (4)$$

kde  $A$  je absorbancia,  $\varepsilon$  je molárny absorpčný (extinkčný) koeficient charakteristický pre každú látku,  $c$  je koncentrácia a  $l$  je dĺžka kvety [42].

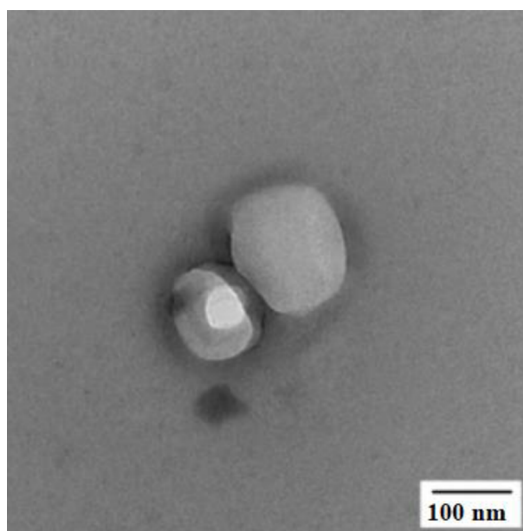
Pri prechode svetla vzorkou môže dochádzať aj k jeho rozptyľovaniu. Tejto skutočnosti využíva metóda turbidimetria, ktorá využíva rozptyl svetla časticami v koloidných roztokoch. Výsledná meraná veličina sa potom nazýva turbidita [43].

### 3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

V nasledujúcej kapitole je uvedená literárna rešerš využitia parametrov ultrazvukovej dispergácie pri príprave vezikulárnych systémov s prihliadnutím ku kataniontovým tenzidom. Keďže však doteraz našla metóda ultrazvukovej dispergácie využitie najmä pri príprave lipozómov, v ďalších štúdiách použitých v nasledujúcej literárnej rešerši zaoberajúcich sa vplyvom ultrazvukovej energie a amplitúdy boli využívané lipozómy, keďže sa svojou štruktúrou a funkciou najviac podobajú kataniontovým vezikulárnym systémom.

#### 3.1 Príprava kataniontových vezikúl s kladne nabitým surfaktantom

*Chih-Jung Wu a spol.* sa zaoberali prípravou IPA zloženého z kladne nabitého CTAB, záporne nabitého SDS a pridaním kladne nabitého surfaktantu a cholesterolu za vzniku cIPA (kladne nabitého amfifilného iontového páru). Boli pripravené vodné roztoky kladne a záporne nabitých tenzidov CTAB a SDS o objeme 500 ml a koncentrácii 20 mM. Roztoky boli v ekvimolárnom pomere zmiešané a ponechané deň na vyzrážanie. Následne bola zrazenina oddelená od vodnej fáze pomocou centrifugácie pri 5500 otáčkach za minútu (CN2060, rotor RA5006, Hsiangtai, Taiwan). Vzniknutá zrazenina získaného IPA bola premytá a vysušená viac ako 3 dni pri teplote 50 °C. Vzniknutý tuhý prášok IPA bol zmiešaný s dihexydecyldimethylamónium bromidom (DHDAB) v pomere 9:1 za vzniku cIPA. Bolo pridaných 10 ml chloroformu k rozpusteniu cIPA a následne bol chloroform odparený za prídavku 3 mm sklenených guľčiek. Tenký film cIPA bol následne hydratovaný 60 ml vody a sonifikovaný. Takto pripravené vezikuly boli zobrazené pomocou metódy transmisnej elektrónovej mikroskopie (model H-7500, Hitachi, Japan), viď Obr.17. Dvojvrstvá štruktúra kataniontových vezikúl bola potvrdená enkapsuláciou (zapuzdrením) fluorescenčnej sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu. Nemeraná hodnota fluorescenčnej anizotropie sa pohybovala okolo hodnoty 0,25. Táto hodnota poukazuje na vytvorenie vezikulárnej štruktúry [18].



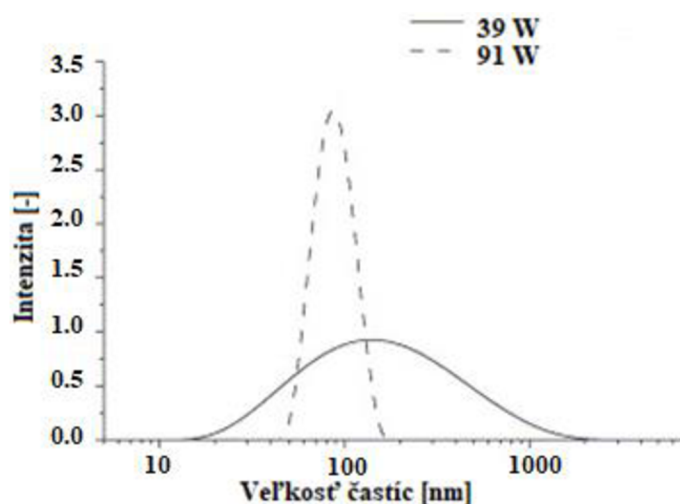
Obr.17: Snímka kataniontových vezikúl získaná pomocou TEM [18]

### 3.2 Príprava systému cIPA ultrazvukovou dispergáciou s rôznymi koncentraciami cholesterolu

*Chien-Hsiang Chang a spol.* v prácach zaoberajúcich sa prípravou systému obsahujúceho kladne nabitý tenzid CTAB, záporne nabitý tenzid SDS s obsahom rôznych kladne nabitých surfaktantov (DXDAB, DTDAB, DODAB) a cholesterolu o rôznych koncentráciach (0, 10, 30 a 43 mol. %) uvádzajú použitie ultrazvukového dispergátora (model VCX-750, Sonic and Materials, Inc., USA). Ako parametre dispergácie používali amplitúdu 20 %, energiu 25 kJ a objem 60 ml rehydratovanej vody použitej pri príprave systému. Tvorba kataniontových vezikúl bola potvrdená pomocou techniky transmisnej elektrónovej mikroskopie (model H-7500, Hitachi, Japan). Veľkosť kataniontových vezikúl bola stanovená pomocou DLS (model Nano ZS, Malvern, UK) s použitím He-Ne laserového zdroja o vlnovej dĺžke 632,8 nm. Zeta potenciál bol stanovený pomocou metódy elektroforetického rozptylu svetla. Veľkosť častíc sa pohybovala v rozmedzí (60–100) nm a bolo zistené, že systémy s prídavkom cholesterolu o koncentrácii 43 mol. % vykazujú najlepšiu stabilitu a ich veľkosť sa pohybovala s rozmedzí (80–100) nm [21,44].

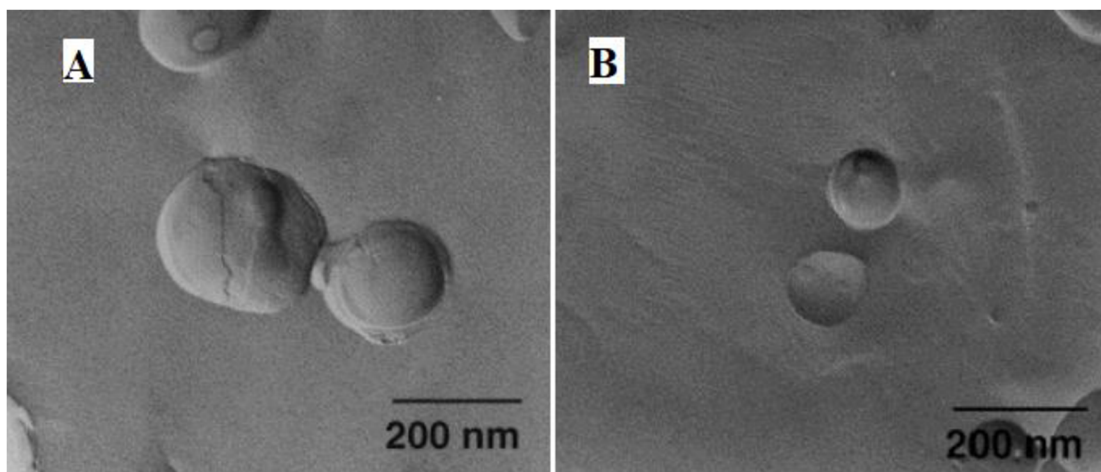
### 3.3 Formovanie vezikulárnych systémov s nízkym PdI pomocou metódy ultrazvukovej dispergácie

*J. Pereira-Lachataignerais a kol.* sa zaoberali vplyvom ultrazvukovej energie a času dispergácie na formovanie fosfatidilcholinových lipozómov. Používali homogénizátor Autotune, model 130 W s frekvenciou 20 kHz a titánovú ultrazvukovú sondou s priemerom 3 mm. Vzorky lipozómov s objemom 10 ml boli sonifikované pri laboratórnej teplote a parameter energie privádzanej do generátora sa pohyboval v rozmedzí 39 až 91 W (konkrétne 39, 52, 65, 78, a 91 W) pri optimálnom čase sonifikácie 3000 s. Vo výsledku boli porovnané veľkosti častíc, lamelarita a polydisperzita vzoriek pomocou metódy DLS a FFEM (Freeze-fracture electron microscopy) [45].



Obr.18: Krivky distribúcie veľkosti častíc sonifikovaných vzoriek pri použití energie 39 W (minimálna použitá energia) a 91 W (maximálna použitá energia) [45]

Ako vyplýva z Obr.18, čím bola použitá vyššia hodnota energie privádzanej do ultrazvukového generátora, tým bola lepšia distribúcia veľkosti jednotlivých častíc, čo znamená že bol získaný úzky pík distribúcie s nízkou polydisperzitou. Takisto bola porovnaná lamelarita vezikúl pomocou metódy FFEM, kedy pri použití maximálnej energie 91 W boli získané SUV (unilamelárne) vezikuly a pri použití minimálnej energie 39 W boli získané MLV (multilamelárne) vezikuly s viditeľnými viacerými dvojrstvami a výrazne väčšou veľkosťou okolo 200 nm [45].



Obr.19: A) multilamelárne vezikuly (39 W), B) unilamelárne vezikuly (91 W) [45]

### 3.4 Lipozomy s obsahom periodocínu použitím rôznej amplitúdy a rôzneho času dispergácie

Pedocin je bakteriocín, teda antimikrobiálna látka, ktorá sa používa ako potenciálny biokonzervačný prostriedok proti psychotrofnému patogénu *Listeria monocytogenes*. Avšak priame podanie tejto látky do organizmu nevykazuje požadovaný účinok. **K. Narsaiah a kol.** sa v tejto štúdií snažili zakomponovať pedocin do lipozómov a dosiahnuť tak riadeného uvoľňovania. Jednou z častí práce bolo štúdium vplyvu koncentrácie fosfolipidov, amplitúdy a doby sonifikácie na veľkosť nanolipozómov. Emulgácia ultrazvukom prebehla za použitia prístroja Vibra Cell Sonicator (VCX 500, Sonics and Materials, Inc., USA) s frekvenciou 24 kHz. Boli sledované rôzne koncentrácie fosfolipidov (lecitínu alebo fosfatidilcholinu) a príprava lipozómov prebehla pri rôznych parametroch dispergácie. Boli použité dispergačné amplitúdy 40, 50 a 60 % a hodnoty času dispergácie 3,5 a 7 minút. Veľkosť nanolipozómov bola stanovená pomocou DLS (Zetasizer Nanoseries, ZEN3600, Malvern Instruments, UK) s použitím He-Ne laserového zdroja. Meranie prebehlo pri laboratórnej teplote pod detekčným uhlom 173°. Vo výsledku bolo zistené, že veľkosť nanolipozómov sa zvyšovala so vzrastajúcou koncentráciou fosfolipidov a naopak klesala so zvyšovaním amplitúdy a doby sonifikácie [46].

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Chemikálie

#### *Dodecylsulfát sodný*

$M_w = 288,38$  g/mol, CAS: 151-21-3, Sigma Aldrich

#### *Hexadecyltrimetylamónium bromid*

$M_w = 364,45$  g/mol, CAS: 57-09-0, Sigma Aldrich

#### *Dimetyldioctadecylamónium chlorid*

$M_w = 586,64$  g/mol, CAS: 107-64-2, Alfa Aesar

#### *Cholesterol*

$M_w = 386,65$  g/mol, CAS: 57-88-5, Sigma Aldrich

#### *Chloroform*

CAS: 67-66-3, Penta s.r.o.

#### *Deionizovaná voda*

H<sub>2</sub>O, Systém ELGA

### 4.2 Zhrnutie cieľov práce

Na základe vypracovanej literárnej rešerše uvedenej v kap. 3 a na základe spolupráce s National Cheng Kung University v Taiwane, pod vedením prof. Changa boli zvolené vhodné parametre ultrazvukovej dispergácie s prihliadnutím k použitiu odlišného modelu ultrazvukového dispergátora s nižšou frekvenciou (20 kHz). Cieľmi práce bolo zistiť využívané parametre ultrazvukovej dispergácie na formovanie vezikulárnych systémov s prihliadnutím ku kataniontovým tenzidom. Základnými parametrami bol zvolený objem 60 ml a energia 25 kJ použité pri príprave IPA z tenzidov CTAB a SDS. Ďalšie parametre odvíjajúce sa od týchto základných boli navrhnuté vzhľadom k použitiu iného modelu ultrazvukového dispergátora, tj. dispergátora s nižšou frekvenciou. Cieľom bolo skúmanie použitia rôznych objemov vody použitej na rehydratáciu. Bol zvolený pôvodný objem 60 ml a následne polovičné objemy 30 a 15 ml a objem 5 ml ako najmenší možný použiteľný objem (vysvetlenie v kap.5.2.3). Ďalším parametrom bola zvolená amplitúda a to konkrétne 25, 50 a 75 %. Posledným parametrom bola energia, ktorej rozmedzie bolo zvolené na 25, 15 a 10 kJ. Cieľom práce bolo takisto vybrať vhodné inštrumentačné techniky. Použitie tyčového ultrazvukového dispergátora bolo zvolené kvôli lepšej účinnosti na rozdiel od ultrazvukovej kúpele a na overenie vplyvu dispergačných parametrov bola zvolená metóda dynamického rozptylu svetla a elektroforetického rozptylu svetla na meranie veľkosti, zeta potenciálu a koeficientu polydisperzity jednotlivých pripravených častíc a nakoniec UV-VIS spektrofotometria k meraniu zakalenia jednotlivých vzoriek.



### 4.3 Použité metódy

#### 4.3.1 Príprava zásobných roztokov tenzidov

Boli pripravené vodné roztoky tenzidov o koncentrácii 20 mM rozpustením 3,669 g hexadecyltrimetylamónium bromidu v 500 ml deionizovanej vody a rozpustením 2,894 g dodecylsulfátu sodného v rovnakom objeme, 500 ml deionizovanej vody. Roztoky boli ponechané na magnetickej miešačke 24 hod.

#### 4.3.2 Príprava zásobného prášku IPA

Nasledujúci deň boli roztoky zmiešané v ekvimolárnom pomere 1:1 a opäť ponechané na magnetickej miešačke 24 hod. Roztoky boli následne centrifugované 10 minút pri 3500 ot/min, aby došlo k oddeleniu zrazeniny. Výsledná zrazenina bola získaná filtráciou za zníženého tlaku, kedy došlo premytím deionizovanou vodou k odstráneniu protiiontov. Zrazenina bola potom ponechaná v sušiarňi 3 dni pri teplote 50 °C. Po 3 dňoch bol získaný zásobný prášok IPA.

#### 4.3.3 Príprava zásobných roztokov v chloroforme

Na základe uváženia rôznych objemov deionizovanej vody potrebnej na prípravu kataniontových vezikulárnych systémov bola pre každý objem vypočítaná koncentrácia a navážka zásobného prášku IPA rozpusteného v 10 ml chloroformu, ktoré sú uvedené v Tab.2.

Tab.2: Vypočítané hodnoty koncentrácie a navážky IPA na prípravu jednotlivých vzoriek s rôznymi objemami.

$V_{\text{deioniz.vody}}$ [ml]	$c_{\text{IPA}}$ [mM]	$V_{\text{chloroform}}$ [ml]	$m_{\text{IPA}}$ [g]
60	120	10	0,6600
30	60	10	0,3300
15	30	10	0,1650
5	10	10	0,0550

Obdobným spôsobom bola vypočítaná aj koncentrácia a navážka DoDAC rozpusteného v 5 ml chloroformu, uvedené v Tab.3.

Tab.3: Vypočítané hodnoty koncentrácie a navážky DoDAC na prípravu jednotlivých vzoriek s rôznymi objemami.

$V_{\text{deioniz.vody}}$ [ml]	$c_{\text{DoDAC}}$ [mM]	$V_{\text{chloroform}}$ [ml]	$m_{\text{DoDAC}}$ [g]
60	120	5	0,3520
30	60	5	0,1760
15	30	5	0,0880
5	10	5	0,0293

#### 4.3.4 Príprava cIPA s cholesterolom

Na prípravu vzoriek o všetkých objemoch bol použitý rovnaký postup a to zmiešanie 900  $\mu$ l zásobného roztoku IPA v chloroforme a 100  $\mu$ l zásobného roztoku DoDAC v chloroforme za vzniku 1 ml roztoku kladne nabitého kataniontového vezikulárneho systému (cIPA). Objemy boli zvolené tak, aby bol dodržaný pomer IPA:DoDAC 9:1. Následne bol tento objem doplnený príslušnou navážkou 43 mol. % cholesterolu. Potrebné navážky cholesterolu uvádza nasledujúca tabuľka:

Tab.4: Vypočítané hodnoty navážky cholesterolu pre jednotlivé objemy vzoriek

$V_{\text{deioniz.vody}}$ [ml]	$m_{\text{cholesterol}}$ [g]
60	0,0350
30	0,0175
15	0,0088
5	0,0029

Do sklenenej nádoby obsahujúcej príslušné množstvo IPA, kladne nabitého dvojreťazcového surfaktantu a cholesterolu boli pridané sklenené guľičky (tak aby pokryli dno nádoby) a chloroform bol nechaný na odparenie 24 hod za vzniku tenkého filmu na týchto guľičkách.

#### 4.3.5 Ultrazvuková dispergácia

Nasledujúci deň bol ku guľičkám pridaný príslušný objem deionizovanej vody (60, 30, 15, a 5 ml) na rehydratáciu, vzorky boli z vortexované a dispergované pomocou ultrazvukového homogénizátora Bandelin SONOPULS UW 3200 so sondou VS 70 T. Ultrazvuková sonda s priemerom 13 mm bola ponorená do vzorky a sonifikácia prebiehala pri rôznych parametroch dispergácie navrhnutých na základe literárnej rešerše uvedenej v kapitole 3. Jedným z parametrov boli rôzne amplitúdy nastaviteľné na displeji prístroja (boli porovnávané amplitúdy 25, 50 a 75 %). Počas sonifikácie bolo dosiahnutých rôznych energií, a to konkrétne 10, 15 a 25 kJ. Celkovo bolo teda sonifikovaných 36 vzoriek, líšiacich sa objemom vody použitej na rehydratáciu, amplitúdou a dosiahnutou ultrazvukovou energiou dodanou do vzorky.

#### 4.3.6 Dynamický rozptyl svetla a zeta potenciál

Jedným z cieľov práce bolo vybrať vhodnú inštrumentačnú techniku pre overenie vplyvu dispergačných parametrov. Bola použitá technika dynamického rozptylu svetla a k meraniu veľkosti častíc jednotlivých vzoriek bol použitý prístroj ZetaSizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments, UK s použitím 10 mW He-Ne laserového zdroja o vlnovej dĺžke 630 nm. Meranie prebiehalo v režime *size* v sklenených kyvetách, kedy bola časť vzorky prevedená do kyvety a nastavené jednotlivé parametre merania, ako rozpúšťadlo (ktorým bola v našom prípade voda) a jednotlivé počty meraní a opakovaní. Meranie prebiehalo po vytemperovaní vzorky na teplotu 25 °C, v troch sériách po 12 meraní a každé meranie trvalo 10 sekúnd.

Z týchto troch sérií meraní bol potom vytvorený priemer. Výsledkom merania je graf závislosti intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc a korelačná krivka, ktorá zobrazuje priebeh merania a vďaka nej vieme určiť, či meranie prebehlo v poriadku. U vzoriek, ktoré boli monodisperzné a ich koeficient polydisperzity (PdI) sa pohyboval okolo hodnoty 0,3 sme potom pri vyhodnocovaní mohli použiť strednú hodnotu veľkosti častíc (Z-average). U vzoriek, ktorých PdI bol väčší ako 0,3 sme strednú hodnotu veľkosti častíc použiť nemohli, pretože vzorky boli veľmi polydisperzné, čo znamená, že vo vzorke distribuovali aj častice o veľmi malých alebo naopak veľmi veľkých rozmeroch, takže by prístroj nevyhodnotil správnu hodnotu Z-average.

Hodnota zeta potenciálu bola zisťovaná taktiež na prístroji ZetaSizer Nano ZS použitím metódy elektroforetického rozptylu svetla a do vzorky v sklenenej kyvete bola ponorená dip cela s meracou elektródou, ktorá do systému vkladá napätie a následne sa sleduje fázová odozva na vloženom napätí. Meranie prebiehalo v režime *zeta* a hodnota zeta potenciálu bola vypočítaná Smulochowským modelom, ktorý sa používa pre zisťovanie hodnoty zeta potenciálu vzoriek v polárnom prostredí (v našom prípade vo vode). Parametre merania boli nastavené obdobne ako pri meraní size, až na počet sérií, tentokrát bolo nastavených 5 sérií opakovaní.

Jednotlivé vzorky boli merané vždy v 1. deň (deň dispergácie) a porovnávané priemerné veľkosti častíc a hodnota zeta potenciálu, ktorá informuje o stabilite systému. Taktiež prebehli stabilitné testy obdobným spôsobom v rozmedzí dní až týždňov (záležalo na konkrétnom vzorku) až do získania nestabilných systémov.

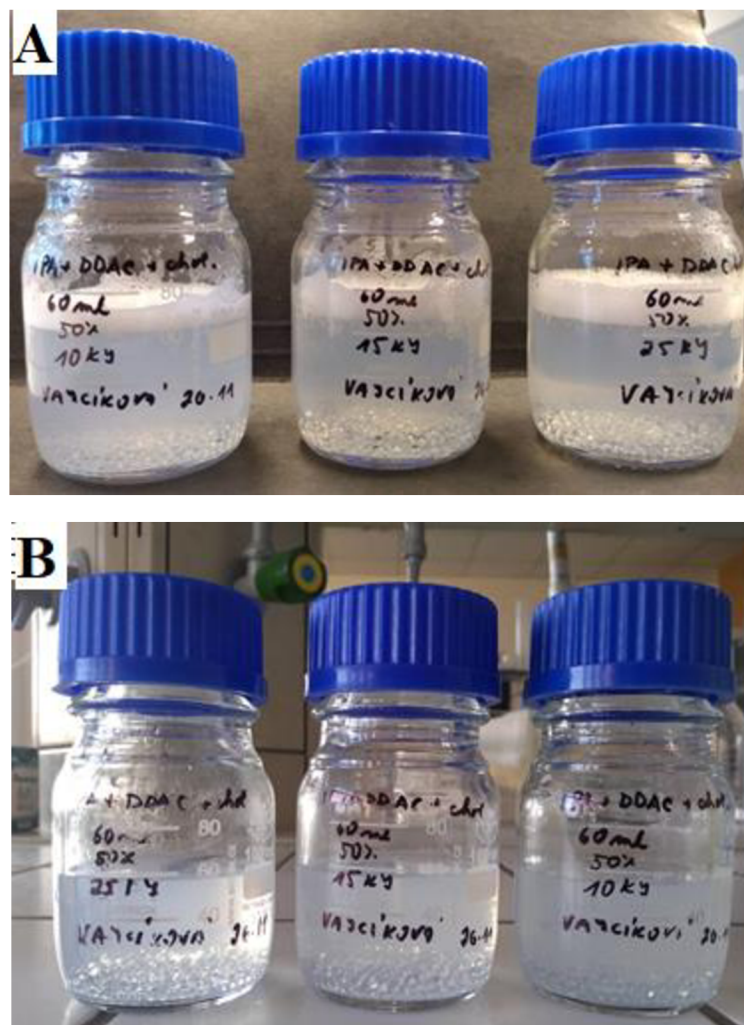
#### **4.3.7 UV-VIS spektrofotometria**

Na meranie turbidity bol použitý UV-VIS spektrofotometer s jednopaprskovým usporiadaním Varian Cary50 Probe s použitím xenónovej výbojky. Jednotlivé vzorky boli prevedené do kremennej kyvety s dĺžkou 1 cm. Parametre vlnových dĺžok boli nastavené v rozmedzí od 300 do 700 nm. Výsledkom merania je spektrum závislosti turbidity na vlnovej dĺžke. Porovnaním absorbných spektier jednotlivých vzoriek môžeme porovnávať zmenu zakalenia vzorky, ktorá má úzky súvis so stabilitou vzorky. Jednotlivé dáta boli zobrazené pomocou softwaru CaryWinUV a následne vyhodnotené v programe MS Excel.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Deň dispergácie – veľkosť častíc pomocou DLS

Veľkosti vzniknutých vezikúl boli sledované pomocou metódy DLS a to hneď prvý deň, teda po rehydratácii príslušným objemom deionizovanej vody a následnej dispergácii. Jednotlivé vzorky boli ihneď po dispergácii mierne zakalené, avšak po chvíľkovom usadení sa vizuálne zdali byť čirejšie a tak mohlo byť prevedené meranie pomocou DLS.

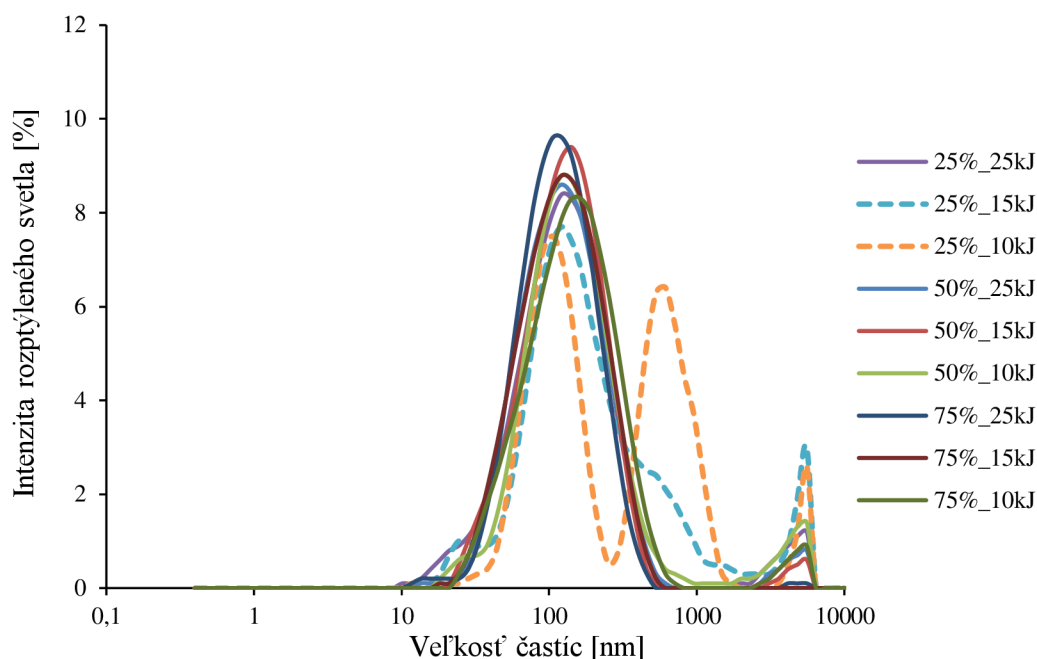


Obr.20: Vzorky o objeme 60 ml, s použitou amplitúdou 50 % a rôznymi energiami,

A) ihneď po dispergácii, B) po chvíľkovom usadení

Na rehydratáciu deionizovanou vodou boli použité štyri rôzne objemy zvolené na základe literárnej rešerše a modelu prístroja, ako už je spomenuté v kapitole 4.2, ktoré boli následne dispergované. Dispergácia prebehla pri rôznych podmienkach. Konkrétne boli použité tri rôzne hodnoty energie, a to 10, 15 a 25 kJ, a pri každej energii bola menená amplitúda na 25, 50 a 75 %. Hodnoty amplitúdy boli zvolené tak, aby bol značný rozdiel medzi amplitúdami a dal sa teda prípadne značne odlišiť rozličný výsledok merania a takisto s prihliadnutím ku konkrétnemu modelu prístroja na ultrazvukovú dispergáciu.

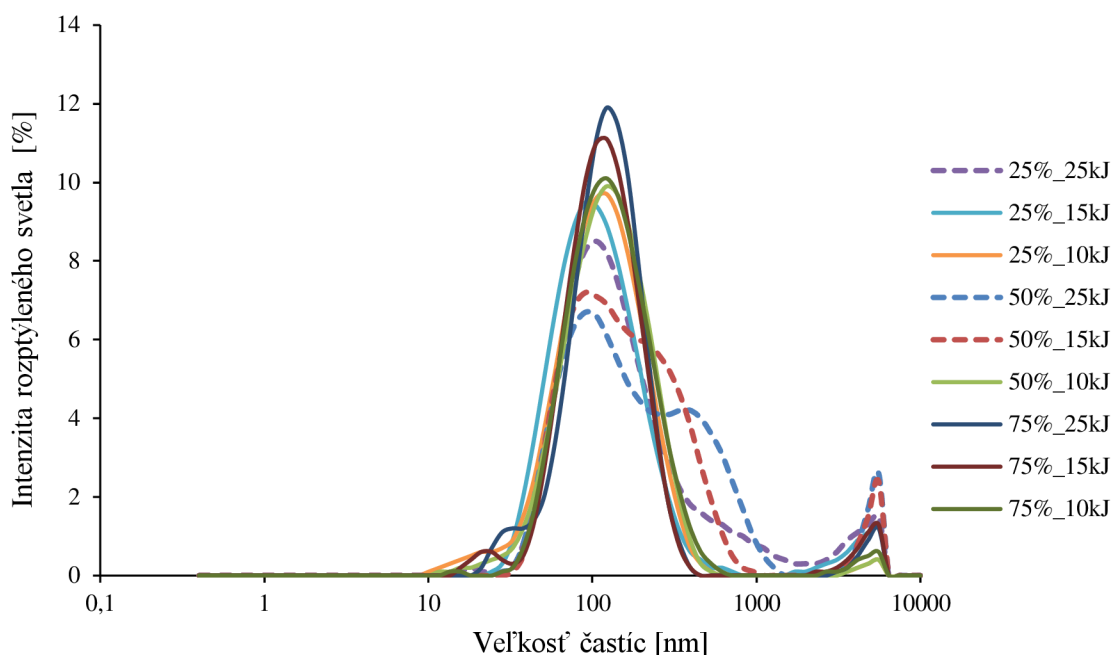
Na Obr.21 je znázornená závislosť intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc, teda vzniknutých vezikúl a to pre celkový objem 60 ml, pre rôzne energie a amplitúdy. Už v deň dispergácie je vidieť, že vzorky s použitou amplitúdou 25 % a energiách 10 a 15 kJ vykazujú nestabilné, polydisperzné častice, pretože je zjavná prítomnosť častíc o veľkosti 1000 a 10000 nm. Veľkosť častíc ostatných vzoriek je približne rovnaká a pohybovala sa okolo 100 nm.



Obr.21: Graf veľkosti častíc vzoriek o objeme 60 ml v deň dispergácie

Ak celkový objem vzoriek po rehydratácii činil 30 a 15 ml, v prvý deň dispergácie sa veľkosť častíc nelíšila od predpokladaného stabilného modelu. Pre každú použitú energiu a amplitúdu vznikali vezikuly s pomerne rovnakou veľkosťou a to cca (100–110) nm. Grafy intenzity rozptýleného svetla v závislosti na veľkosti častíc pre objemy 30 a 15 ml sú uvedené v kapitole 9.1 v PRÍLOHE.

Pri celkovom objeme 5 ml vznikali pomerne polydisperzné systémy, ako reprezentuje Obr.22, a to najmä pri amplitúde 50 % a energiách 15 a 25 kJ. Taktiež použitie amplitúdy 25 % a energie 25 kJ vykazuje vznik polydisperzných častíc.



Obr.22: Graf veľkosti častíc vzoriek o objeme 5 ml v deň dispergácie

### 5.1.1 Koeficient polydisperzity PdI

Významným kritériom je koeficient polydisperzity, ktorý sa u stabilných monodisperzných vzoriek pohybuje v rozmedzí 0–0,3 [39]. U vzoriek o objeme 60 ml bolo pozorované, že ak bola použitá energia 10 kJ, pri použití všetkých amplitúd vznikali častice s veľkou polydisperzitou. Veľkú hodnotu PdI vykazovali všetky vzorky s použitou amplitúdou 25 %, čo znamená, že túto amplitúdu môžeme pri vzorkách o objeme 60 ml označiť za nevyhovujúcu.

Ako ďalšie nevyhovujúce parametre sa dajú označiť amplitúda 25 % aplikovaním na vzorky o objeme 30 ml. U vzoriek o objeme 5 ml s amplitúdou 50 %, pri aplikovaní energií 15 a 25 kJ a amplitúdou 75 % a energiou 25 kJ sme dostali taktiež distribúciu polydisperzných častíc. Podrobná tabuľka hodnôt koeficientu polydisperzity jednotlivých vzoriek je uvedená v Tab.7, kapitole 9.2 v PRÍLOHE.

### 5.1.2 Zeta potenciál

Hodnota zeta potenciálu sa v deň dispergácie u vzoriek s objemom 60 a 30 ml pohybovala v stabilnej oblasti s hodnotou v rozmedzí (75–45) mV. Najvyššia hodnota zeta potenciálu 75,4 mV bola dosiahnutá pri meraní vzorky s objemom 60 ml, použitím amplitúdy 50 % a energie 25 kJ.

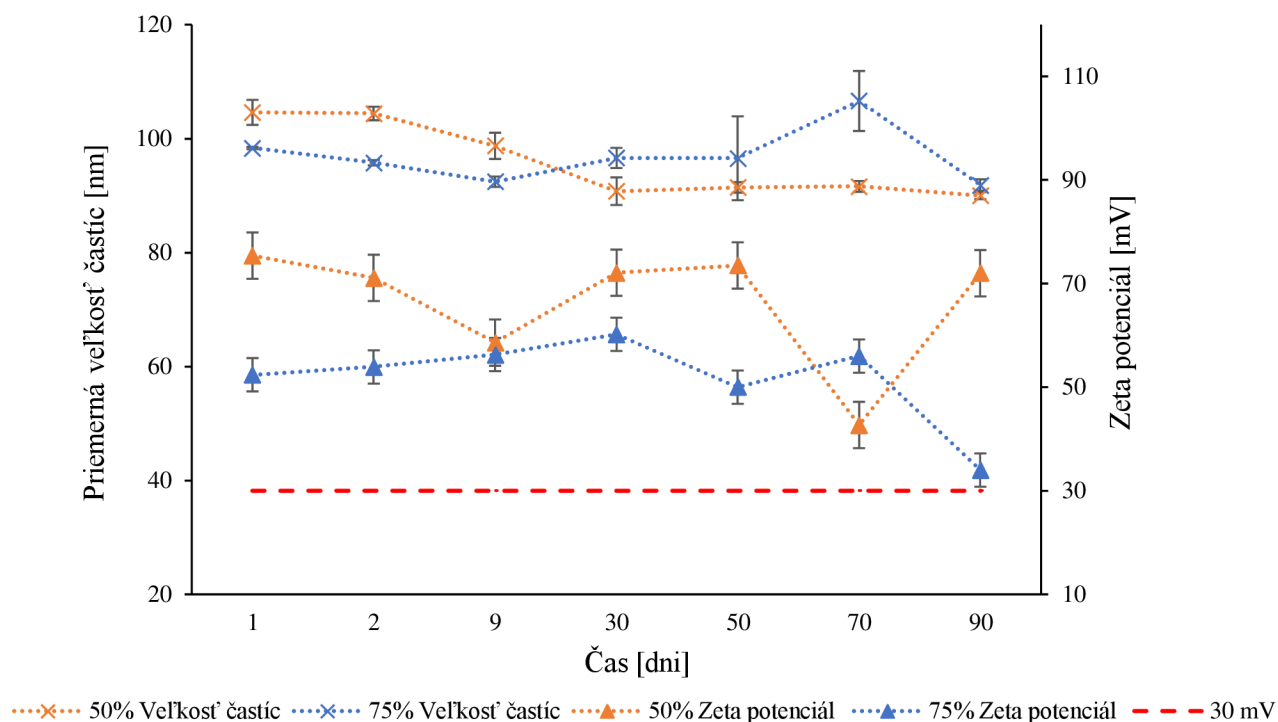
U vzoriek s objemom 15 a 5 ml bol nameraný zeta potenciál, ktorý sa pohyboval na hranici stability 30 mV a najnižšia hodnota zeta potenciálu 30,1 mV bola dosiahnutá pri vzorke o objeme 15 ml, použitím amplitúdy 75 % a energie 15 kJ. Na základe hodnoty zeta potenciálu teda neboli v deň dispergácie vylúčené žiadne vzorky.

## 5.2 Testy stability

Všetky pripravené vzorky boli následne merané po dobu niekoľko desiatok dní od ich prípravy a to z dôvodu preverenia ich dlhodobej stability. Počas týchto dní bola premeriavaná veľkosť častíc metódou DLS, z tejto analýzy bola stanovená hodnota PdI a taktiež bol meraný zeta potenciál metódou ELS. U niektorých vzoriek bolo okometricky pozorované zakalenie, a preto bola u týchto vzoriek zmeraná aj turbidita pomocou metódy UV-VIS spektrofotometrie. Na meranie dlhodobej stability boli ale zvolené len tie vzorky, ktoré neboli vylúčené v kapitole 5.1, teda vzorky, ktoré zostali stabilné a nevykazovali vyšší stupeň polydisperzity aj niekoľko hodín po dispergácii.

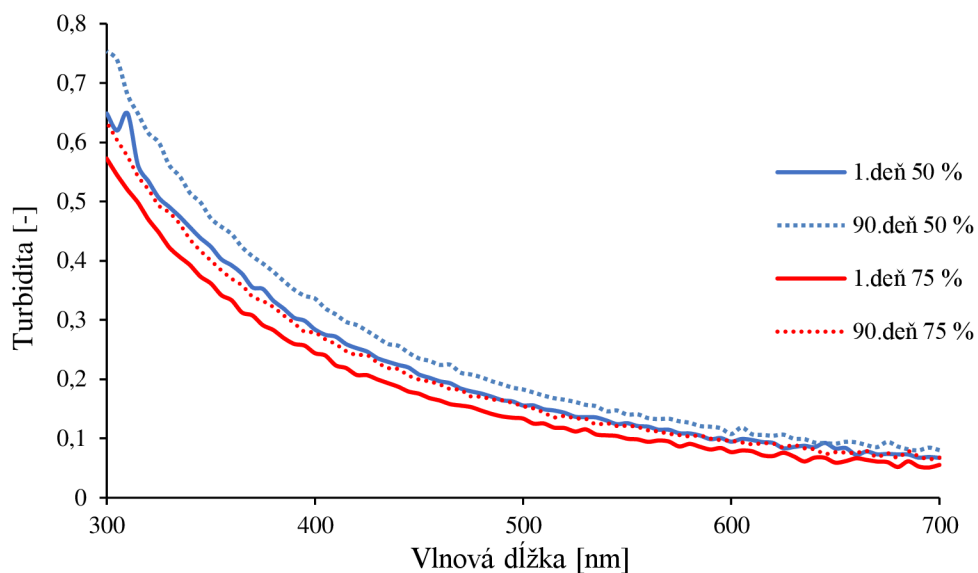
### 5.2.1 Rehydratácia 60 ml deionizovanej vody

Vzorky o objeme 60 ml boli premeriavané pomocou DLS celkovo 90 dní. Keďže vzorky, na ktoré bola aplikovaná amplitúda 25 %, boli nevyhovujúce už v prvý deň dispergácie, ďalej boli prevádzané stabilitné testy iba u vzoriek s použitou amplitúdou 50 a 75 %. Obr.23 prezentuje graf priemernej veľkosti častíc a zeta potenciál vzoriek na dobe merania pri aplikovaní celkovej energie 25 kJ. Častice vykazovali po celú dobu merania priemernú veľkosť cca 100 nm. Hodnota zeta potenciálu mierne kolísala, avšak stále sa pohybovala v stabilnej oblasti, cca (50–60) mV. Červená prerušovaná čiara v grafe znázorňuje hranicu zeta potenciálu, pod ktorou sa nachádza nestabilná oblasť. Kolísanie hodnôt veľkosti a zeta potenciálu môže byť spôsobené odchýlkou merania daného prístroja.



Obr.23: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 60 ml, amplitúdach 50 % a 75 % a energii 25 kJ

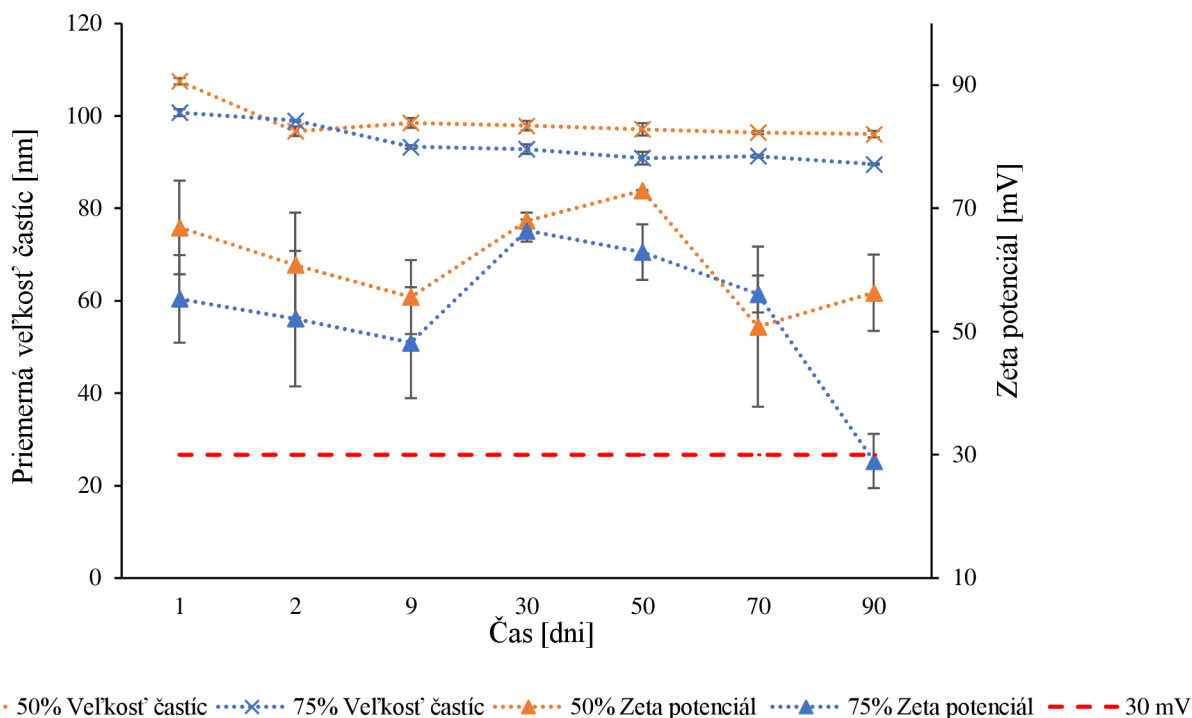
U všetkých vzoriek bola v priebehu 90 dní meraná aj turbidita, teda zmena zákalu týchto vzoriek. Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek s objemom 60 ml, energii 25 kJ a použitých amplitúdach 50 a 75 % je zobrazený na Obr.24. Z grafu je zrejmé, že zakalenie sa v čase merania u oboch vzoriek menilo minimálne, čo potvrdzuje minimálne rozdiely vo veľkostiach častíc jednotlivých vzoriek.



Obr.24: Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek o objeme 60 ml, amplitúdach 50 % a 75 % a energii 25 kJ v prvý a posledný deň merania

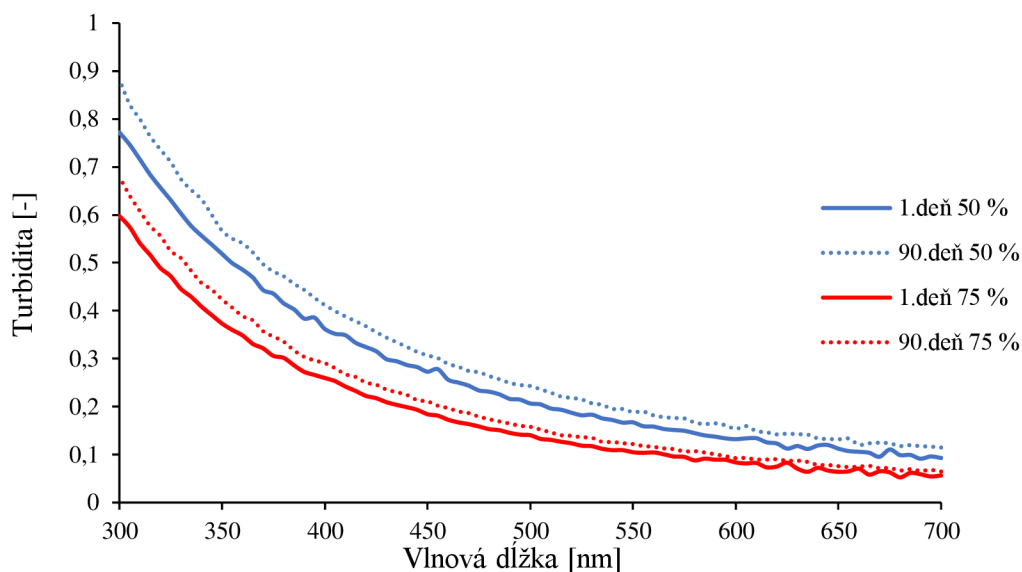
Distribúcia častíc vzoriek pri aplikovaní celkovej energie 15 kJ sa taktiež pohybuje v rozmedzí (100–110) nm (viď.Obr.25). Hodnota zeta potenciálu sa 90.deň u vzorky s aplikovanou amplitúdou 75 % približuje hranici stability 30 mV.





Obr.25: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 60 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 15 kJ

Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek s objemom 60 ml, energii 15 kJ a amplitúdach 50 a 75 % je zobrazený na Obr.26. Je vidieť, že zakalenie vzoriek sa taktiež veľmi nemenilo a nedochádzalo teda k výraznému zrážaniu vezikul. Tieto výsledky korešponujú s meraním DLS, kedy je vidieť, že veľkosť častíc sa rapídne nemenila.



Obr.26: Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek o objeme 60 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 15 kJ v prvý a posledný deň merania

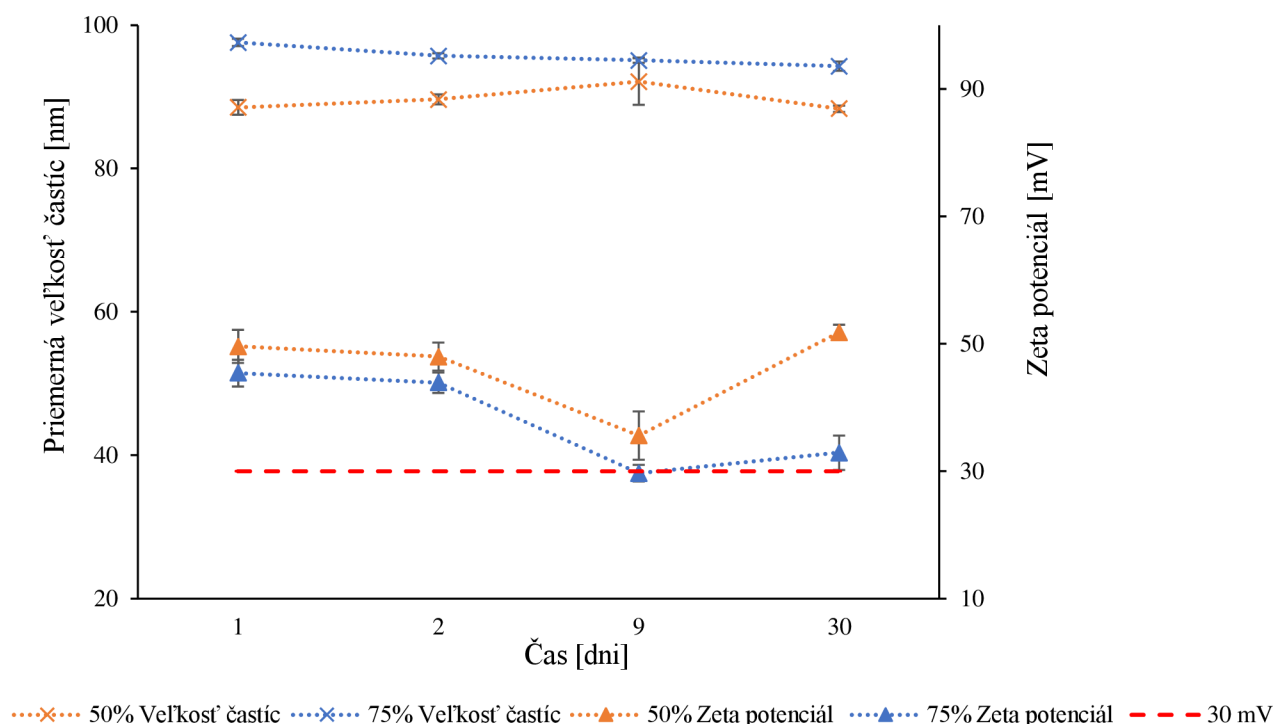
V Tab.5 sú zobrazené hodnoty priemernej veľkosti častíc, koeficientu polydisperzity a zeta potenciálu spomínaných vzoriek s objemom deionizovanej vody 60 ml a použitými amplitúdami 50 a 75 % merané počas celého stabilného testu, tj. 90 dní.

*Tab.5: Namerané priemerné hodnoty vzoriek o objeme 60 ml*

	<b>Priemerná veľkosť častíc [nm]</b>	<b>PdI [-]</b>	<b>Zeta potenciál [mV]</b>	<b>Stabilita [dni]</b>
<b>50 %</b>				
25 kJ	95,92 ± 6,5	0,286 ± 0,037	66,48 ± 3,4	>90
15 kJ	98,59 ± 4,0	0,282 ± 0,014	61,62 ± 6,1	>90
10 kJ	106,12 ± 7,7	0,351 ± 0,025	62,82 ± 5,7	>90
<b>75 %</b>				
25 kJ	96,87 ± 4,9	0,274 ± 0,049	51,82 ± 5,7	>90
15 kJ	93,93 ± 4,2	0,248 ± 0,001	52,86 ± 5,8	>90
10 kJ	110,30 ± 4,4	0,319 ± 0,024	59,13 ± 5,4	>90

### 5.2.2 Rehydratácia 30 ml deionizovanej vody

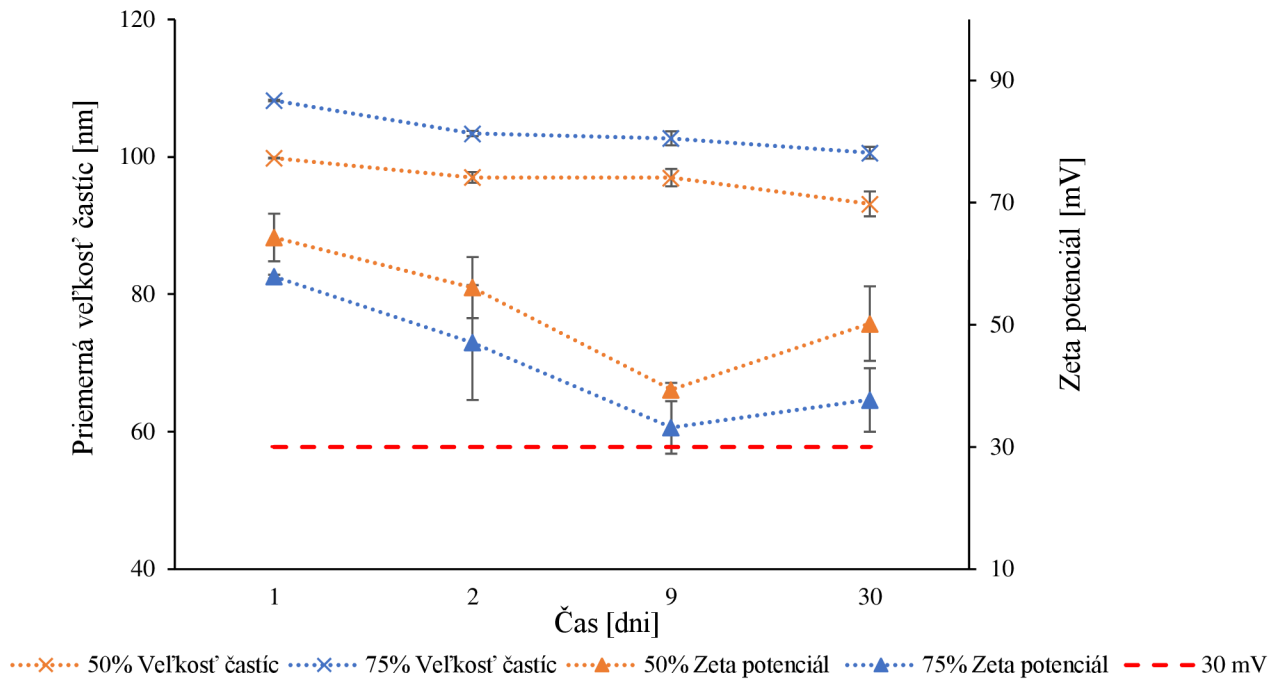
Vzorky o objeme 30 ml boli premeriavané pomocou DLS po dobu iba 30 dní a to z dôvodu nízkeho zeta potenciálu, ktorý sa pohyboval pod hranicou stability 30 mV (červená čiarkovaná čiara vid'.Obr.27) Vzorky, na ktoré bola aplikovaná amplitúda 25 %, boli vzhľadom na vysokú hodnotu koeficientu polydisperzity označené za nevyhovujúce už v prvý deň dispergácie, stabilné testy boli prevádzané už iba u vzoriek s použitou amplitúdou 50 a 75 %. Obr.27 demonštruje priemernú veľkosť častíc a zeta potenciál vzoriek s použitou energiou 25 kJ. Veľkosť častíc sa u týchto vzoriek pohybovala v rozmedzí (88–100) nm, avšak ich hodnota zeta potenciálu bola už v 9.deň merania príliš nízka a vzorky sa teda dajú označiť za nevyhovujúce.



Obr.27: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 30 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 25 kJ

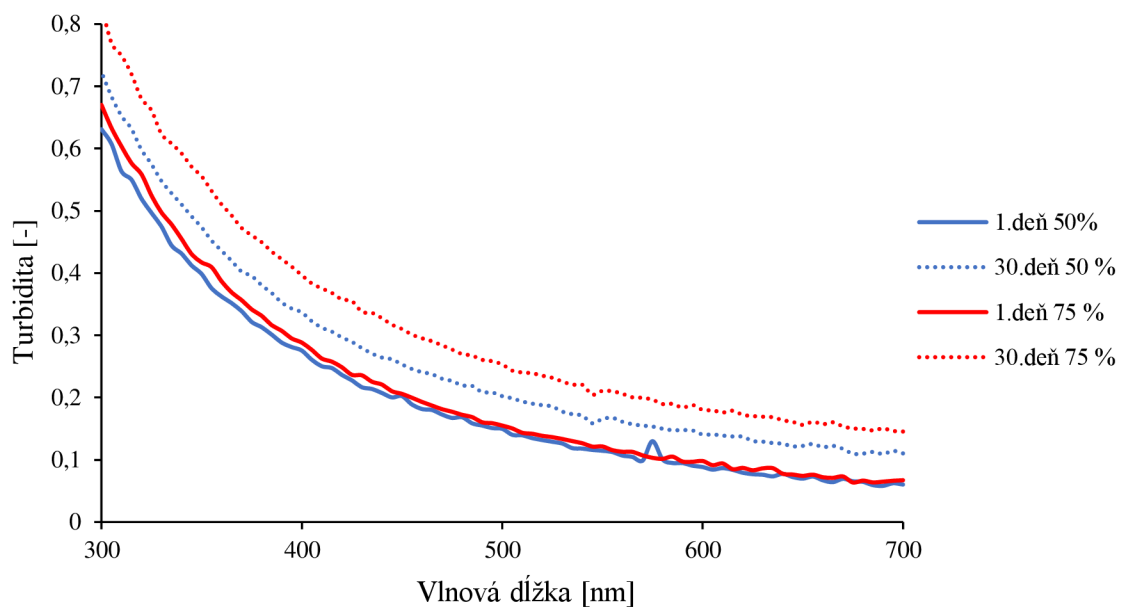
Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek s objemom 30 ml, energii 25 kJ a použitých amplitúdach 50 a 75 % je zobrazený na Obr.34 v PRÍLOHE.

Najvhodnejšími parametrami ultrazvukovej dispergácie pri použití objemu 30 ml deionizovanej vody sa zdajú byť energia 15 kJ a amplitúdy 50 a 75 %. Pri použití týchto parametrov je priemerná veľkosť častíc v rozmedzí (96–110) nm a hodnota zeta potenciálu neprekračuje hranicu stability 30 mV (vid'.Obr.28).



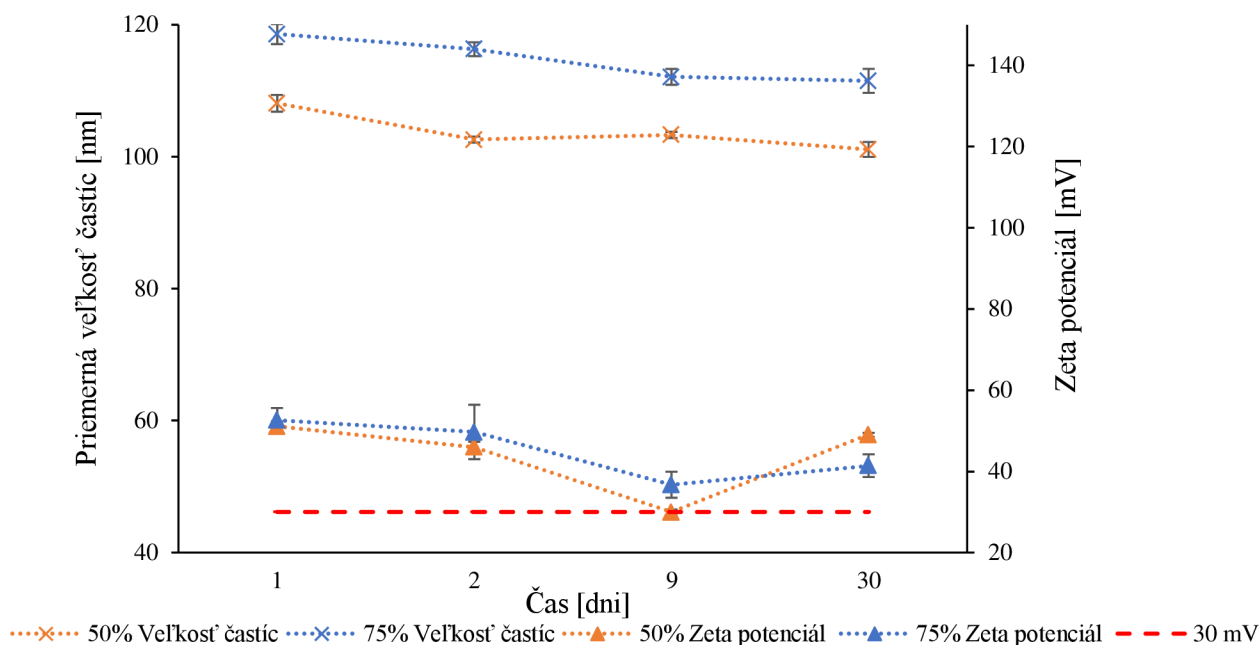
Obr.28: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 30 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 15 kJ

Meraním závislosti turbidity na vlnovej dĺžke (viď.Obr.29) je vidieť, že zakalenie jednotlivých vzoriek sa postupom času mierne menilo a to najmä u vzorky s použitou amplitúdou 75 %.



Obr.29: Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek o objeme 30 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 15 kJ v prvý a posledný deň merania

Pri použití energie 10 kJ a amplitúde 75 % dostávame vezikuly s vyššou hodnotou priemernej veľkosti častíc a to cca 118 nm. Hodnota zeta potenciálu vzorky s použitou amplitúdou 50 % prekračuje 9.deň hranicu stability 30 mV (viď.Obr.30). Vzorky s týmito použitými parametrami teda možno označiť za nevyhovujúce.



Obr.30: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 30 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 10 kJ

Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek s objemom 30 ml, energii 10 kJ a použitých amplitúdach 50 a 75 % je zobrazený na Obr.35 v PRÍLOHE.

Tab.6 zobrazuje hodnoty priemernej veľkosti častíc, koeficientu polydisperzity a zeta potenciálu vzoriek s použitým objemom 30 ml deionizovanej vody a použitými amplitúdami 50 a 75 %. Stabilitný test prebiehal celkovo 30 dní.

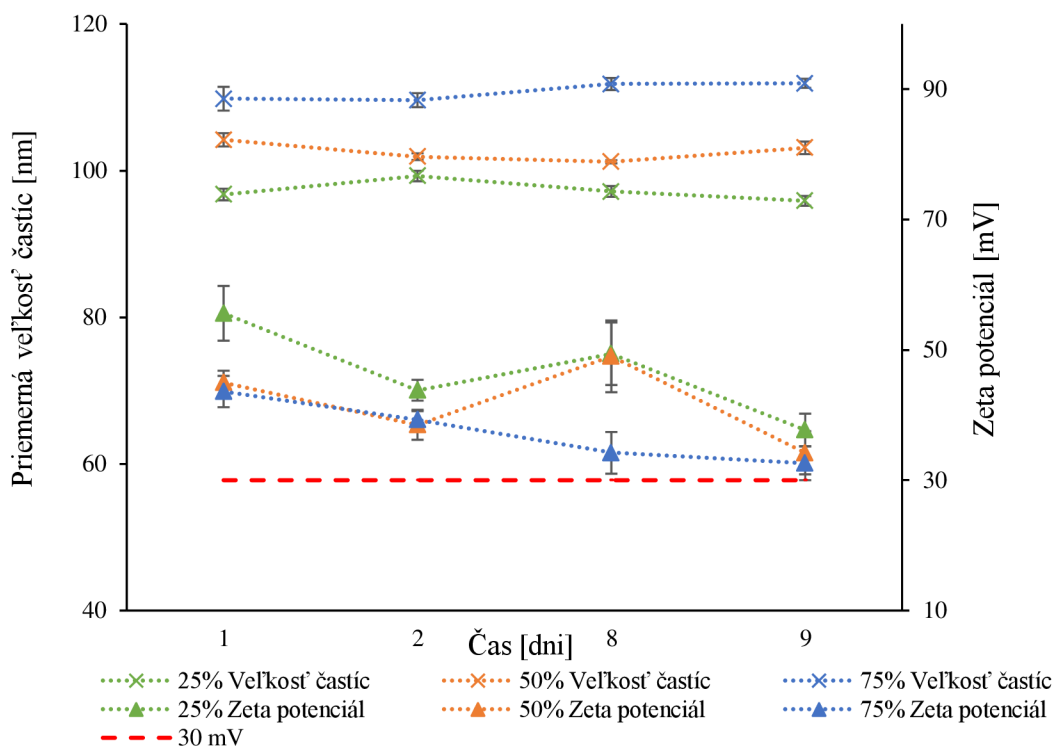
Tab.6: Namerané priemerné hodnoty vzoriek o objeme 30 ml

	Priemerná veľkosť častíc [nm]	PdI [-]	Zeta potenciál [mV]	Stabilita [dni]
<b>50 %</b>				
25 kJ	89,68 ± 1,8	0,249 ± 0,009	46,25 ± 2,5	>30
15 kJ	96,75 ± 2,8	0,252 ± 0,009	52,52 ± 4,0	>30
10 kJ	103,78 ± 3,0	0,264 ± 0,020	44,11 ± 0,9	±9
<b>75 %</b>				
25 kJ	95,69 ± 1,4	0,235 ± 0,007	37,98 ± 1,9	±9
15 kJ	103,73 ± 3,2	0,257 ± 0,006	43,98 ± 4,8	>30
10 kJ	114,63 ± 3,4	0,280 ± 0,008	45,14 ± 3,9	>30

### 5.2.3 Rehydratácia 15 a 5 ml deionizovanej vody

Pri použití objemu 15 ml deionizovanej vody a následnej dispergácii boli pri použití všetkých parametrov získané vzorky, ktorých zeta potenciál sa už 2. deň po dispergácii blížil hranici stability 30 mV. Meranie zeta potenciálu vzoriek 8. deň po dispergácii potvrdilo vznik nestabilných systémov a tak sa vzorky s použitím všetkých parametrov dajú označiť za nevyhovujúce. Grafy priemerných veľkostí a zeta potenciálu na čase dispergácie jednotlivých vzoriek sú uvedené na Obr.36, 37, 38 v kapitole 9.4 v PRÍLOHE.

Objem 5 ml deionizovanej vody použitej na rehydratáciu pri príprave vzoriek kataniontových vezikulárných systémov bol zvolený ako najmenší možný, pretože vplyvom vysokej energie dodávanej do vzorky a zvýšenej teploty sondy, ktorá je vplyvom dispergácie zahrievaná boli sklenné guľičky nachádzajúce sa na dne nádoby roztrieštené a vylietavali do okolia spolu s kvapôčkami vzorky. Z pôvodných 5 ml nakoniec ostalo len niečo cez 4 ml, čo je objem potrebný na prevedenie do kyvety pri meraní turbidity pomocou UV-VIS spektrofotometrie. Vzorky boli premeriavané po dobu 9 dní, avšak stabilné systémy s hodnotou zeta potenciálu nad 30 mV sa podarilo získať iba pri aplikovaní najmenej hodnoty použitej energie, tj. 10 kJ (viď. Obr.31). Ostatné parametre dispergácie sa dajú pri použití objemu 5 ml označiť za nevyhovujúce. Grafy priemerných veľkostí a zeta potenciálu na čase dispergácie týchto vzoriek sú uvedené na Obr.39, 40 v kapitole 9.5 v PRÍLOHE.



Obr.31: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 5 ml, amplitúdach 25, 50 a 75 % a energii 10 kJ

## 6 ZÁVER

Tenzidy a aj kataniontové vezikulárne systémy nimi tvorené majú tendenciu sa v dôsledku zmeny teploty a podnebia správať odlišne. Keďže správna príprava je jedným z kľúčových krokov výskumu nosičových systémov, ktorý prebieha na Fakulte chemickej v spolupráci s National Cheng Kung University v Taiwane, bolo potrebné upresnenie prípravy týchto systémov a zohľadnenie použitia konkrétneho ultrazvukového dispergátora, ktorý je používaný na fakulte.

Cieľom tejto práce bolo zistiť využívané parametre ultrazvukovej dispergácie kataniontových vezikulárnych systémov a navrhnúť rozsah parametrov pre prípravu vhodného modelového systému na báze tenzidov CTAB a SDS s použitím ultrazvukového homogenizátora Bandelin SONOPULS UW 3200 so sondou VS 70 T.

Zvolenie vhodných parametrov ultrazvukovej dispergácie zohráva pri príprave kataniontových vezikulárnych systémov veľkú úlohu. Účelom je dosiahnutie stabilných systémov obsahujúcich SUV vezikuly s veľkosťou (90–110) nm, hodnotou PdI pod 0,3 a zeta potenciálom nad 30 mV, aby sme dostali stabilné vezikulárne systémy.

Na základe literárnej rešerše a prihliadnutím ku konkrétnemu ultrazvukovému dispergátoru boli zvolené a porovnávané rôzne objemy vzoriek, použité amplitúdy a energie dodávané pomocou dispergátora do vzorky. Bolo zistené, že pri použití homogenizátora Bandelin SONOPULS UW 3200 sú najvhodnejšími parametrami objem 60 ml, amplitúdy 50 a 75 % s aplikovanými energiami 25 a 15 kJ. Pri použití týchto parametrov boli pomocou metód dynamického a elektroforetického rozptylu svetla získané vezikulárne systémy s priemernou veľkosťou častíc ( $96 \pm 5$ ) nm, hodnotou PdI cca 0,28 a kladnou hodnotou zeta potenciálu v rozmedzí (51–66) mV. Kladná hodnota zeta potenciálu bola očakávaná na základne prídania kladného surfaktantu DoDAC do systému.

Pri použití vzoriek s polovičným objemom 30 ml bolo pozorované, že na dosiahnutie stabilných systémov boli potrebné rovnaké amplitúdy, ale približne polovičná hodnota energie.

Vzorky s objemom 15 ml a 5 ml možno označiť za nepoužiteľné pre ďalšie aplikácie, pretože po dispergácii boli získané nestabilné systémy s veľkou hodnotou PdI a hodnotou zeta potenciálu v nestabilnej oblasti. Bolo teda potvrdené, že sonda je nevhodná pre vzorky s objemom 5 ml, ako vyplýva aj zo špecifikácie u výrobcu [47]. Avšak ani objem 15 ml, ktorý je blízkou hraničnou hodnotou (20 ml) nevykazuje prijateľné charakteristiky.

Použitím metódy UV-VIS spektrofotometrie bolo na základe merania turbidity porovnávané zakalenie jednotlivých vzoriek. Krivky jednotlivých spektier stabilných vzoriek sa počas merania menili minimálne, nestabilné vzorky vykazovali väčšie odchýlky.

## 7 LITERATÚRA

- [1] ŠČUKIN, E. D., A.V. PERCOV a E.A. AMELINOVÁ. *Koloidní chemie*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1990, ISBN 80-200-0259-6.
- [2] BRAMER, Tobias, Noel DEW a Katarina EDSMAN. Pharmaceutical applications for cationic mixtures. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007, (59), 1319-1334. DOI: 10.1211/jpp.59.10.0001. ISSN 0022-3573
- [3] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes: *Chemické listy*. Praha, 1999, (93) 421-427.
- [4] *Bezpečnostní list: Identifikace látky/směsi a společnosti/podniku*. In: . Nemecko: Department Health, Safety and Environment, 2015, 1907/2006. Dostupné z: [https://www.carlroth.com/downloads/sdb/cs/5/SDB\\_5136\\_CZ\\_CS.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/sdb/cs/5/SDB_5136_CZ_CS.pdf)
- [5] Sodium lauryl sulfate. Toxnet - Toxicology data network [online]. Rockville Pike: National Library of Medicine, 2015. Dostupné z: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~7WEm7r:1>
- [6] PRASAD NIRULA, Tulasi, Ajaya BHATTARAI a Sujeet KUMAR CHATTERJEE. Sodium dodecylsulphate: A very useful Surfactant for Scientific Investigations. *The Journal of Knowledge and Innovation*. Department of Chemistry, Mahendra Morang Adarsh Multiple Campus, Tribhuvan University, Biratnagar, Nepal, 2014, 2(1), 111-113. ISSN 2350-8884(P).
- [7] Material Safety Data Sheet: Cetyltrimethylammonium bromide MSDS. Science Lab: Chemicals and Laboratory Equipment [online]. 2013. Dostupné z: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923367>
- [8] Ask an Expert: What is CTAB and why is it toxic? Why is it used in gold nanorod synthesis?. *Nanohybrids* [online]. [cit. 2020-01-13]. Dostupné z: <https://nanohybrids.net/pages/what-is-ctab-and-why-it-is-used-in-gold-nanorod-synthesis>
- [9] *Material Safety Data Sheet: Dimethyldistearylammonium Chloride* [online]. In: . SPECTRUM LABORATORY PRODUCTS INC., 2009 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/ZQ196.pdf>
- [10] Dimethyldioctadecylammonium chloride [online]. In: [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/40167?lang=en&region=CZ>
- [11] Micelární koloidy. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001, s. 165. ISBN 80-7080-422-X.
- [12] ATKINS, Peter a Julio DE PAULA. Fyzikální chemie. *Atkin's Physical Chemistry*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013, s. 633-634. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [13] Structure of micelles. J. SHAW, Duncan. *Introduction to colloid and surface chemistry*. 4. Great Britain: MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall, 1991, s. 87-88. ISBN 0 7506 1182 0.
- [14] OBRUČA, Stanislav. *Liposomy – příprava charakteristika a využití*. Brno. VUT v Brne.



- [15] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Co je co v povrchové a koloidní chemii: výkladový slovník* [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005 [cit. 2020-01-14]. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-001/](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/)
- [16] BIJU, S.S., Sushuma TALEGAONKAR, P.R. MISHRA a R.K.Khar. Vesicular systems: An overview. *The Indian Journal of Pharmacy*. 2006, **2**(68), 141-153. DOI: 10.4103/0250-474X.25707.
- [17] SHEIKHPOOR, Mojhgana, Leila BARANI a Alibakhsh KASAEIAN. Biomimetics in drug delivery: A critical review. *Journal of Controlled Release*. 2017, (253). DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.026.
- [18] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged cationic vesicles from ion pair amphiphile with double - chained surfactant. *Colloid and polymer science*. **292**, 589-597. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9.
- [19] KUO, An-Tsung a Chien-Hsiang CHANG. Recent strategies in the Development of Cationic Vesicles. *Journal of Oleo Science*. Japan, 2016, **5**(65), 377-384. DOI: 10.5650/jos.ess.15249
- [20] HOSSANN, Martin, Zulfiya SUYUNYAEVA a Rebecca SCHMIDT. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *Journal of Controlled Release*. 2012, **2**(162), 400-406. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.032.
- [21] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged cationic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. Taiwan, 2018, (92), 29-35. DOI: 10.1016/j.jtice.2018.02.013.
- [22] Cholesterol. In: *Sigma Aldrich* [online]. Germany, 2020 [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8667?lang=en&ion=CZ>
- [23] V.DHAWAN, Vivek a Mangal S. NAGARSENKER. Cationic systems in nanotherapeutics – Biophysical aspects and novel trends in drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*. India: Department of Pharmaceutics, Bombay College of Pharmacy, Kalina, Santacruz (E), Mumbai 400098, 2017, (266), 331-345. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.09.040.
- [24] GUHA, Pritam, Biplab ROY, Prasant NAHAK, Chien CHANG a Amiya K. PANDA. Exploring the dual impact of hydrocarbon chainlength and the role of piroxicam a conventional NSAID on soylcithin/ion pair amphiphiles mediated hybrid vesicles for brain - tumor targeted drug delivery. *COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS*. 2018, (546), 334-345. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.03.025.
- [25] Ultrazvukové homogenizátory Bandelin Sonopuls. *Verkon: společnost pro Vaši laboratoř* [online]. 2009 [cit. 2020-01-23]. Dostupné z: <https://www.verkon.cz/blog/nove-v-nabidce-ultrazvukove-homogenizatory-bandelin-sonopuls/>

- [26] C.SHEN, Katherine, Srikanth KAKUMANU, Carl D.BECKETT a James A.LAUGHARN JR. Use of Adaptive Focused Acoustics™ ultrasound in controlling liposome formation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015, (27), 638-645. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.04.027.
- [27] Functionality of a ultrasonic homogenizer. In: *BANDELIN* [online]. Berlin [cit. 2020-03-19]. Dostupné z: [https://bandelin.com/produkte/ultrasonic\\_homogenizers/functionality\\_of\\_a\\_ultrasonic\\_homogenizer/?lang=en](https://bandelin.com/produkte/ultrasonic_homogenizers/functionality_of_a_ultrasonic_homogenizer/?lang=en)
- [28] Ultraakustické procesy. *Výrobní procesy*. [elektronická skripta] Brno: FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, 2014, [cit. 2020-01-24] s. 126-140.
- [29] CH. GARIMELLA, Raghu, Dr.V.R. SASTRY a Mohammed SHOEB MOHIUDDIN. Piezo-Gen-An Approach to Generate Electricit from Vibrations. *Procedia Earth and Planetary Science*. India: Department of Mining Engineering, NITK-Surathkal, Mangalore, 2015, (11), 445-456. DOI: 10.1016/j.proeps.2015.06.044.
- [30] *Hielscher Ultrasound Technology: Probe-Type Sonication vs. Ultrasonic Bath: An Efficiency Comparison Read more: <https://www.hielscher.com/probe-type-sonication-vs-ultrasonic-bath-an-efficiency-comparison.htm>* [online]. Nemecko: Hielscher Ultrasound Technology [cit. 2020-01-24]. Dostupné z: <https://www.hielscher.com/probe-type-sonication-vs-ultrasonic-bath-an-efficiency-comparison.htm>
- [31] ASADI, Amin, Farzad POURFATTAH, Imre MIKLÓS SZILÁGYI a Masoud AFRAND. Effect of sonication characteristics on stability, thermophysical properties, and heat transfer of nanofluids: A comprehensive review. *Ultrasonics - Sonochemistry*. 2019, (58), 1-16. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2019.104701.
- [32] CHEMAT, Farid, Natacha ROMBAUT, Alice MEULLEMIESTRE a Mahammad TURK. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2017, (41), 357-377. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.04.016.
- [33] Zetasizer Nano ZS90. Malvern Panalytical[online]. Velká Británie: Malvern Panalytical Ltd, 2015 [cit. 2019-10-31]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90>
- [34] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ. *Chemické listy*. 2014, (108), 479-482.
- [35] Dynamic light scattering (DLS): Understanding DLS. *Characterization of Nanoparticles*. , 138-172. DOI: 10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9.
- [36] Dynamic Light Scattering: Theory. LS Instruments AG[online]. LS Instruments AG, b.r. [cit. 2019-10-31]. Dostupné z: <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls/dynamic-light-scattering-theory/>

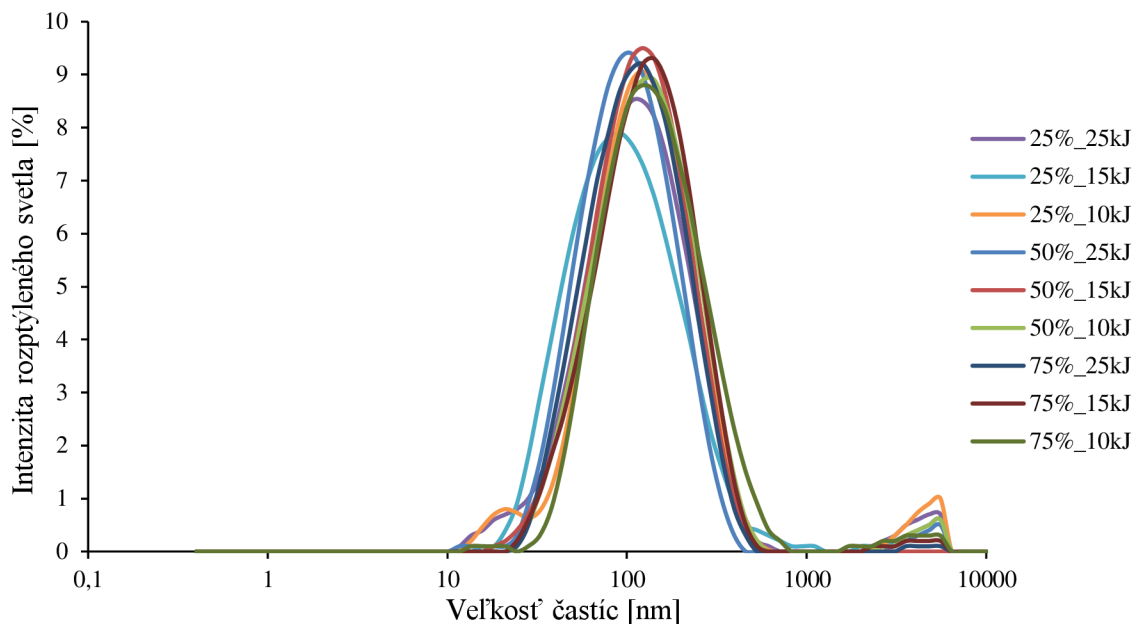
- [37] Dynamic Light Scattering - Understanding the Basics. AZO Nano [online]. [cit. 2019-01-24]. Dostupné z: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>
- [38] MONTES RUIZ-CABELLO, F, Gregor TREFALT, Plinio MARONI a Michal BORKOVEC. Electric double-layer potentials and surface regulation properties measured by colloidal-probe atomic force microscopy. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*[online]. 2014, roč. 90, č.1, s. 12301 DOI: 10.1103/PhysRevE.90.012301
- [39] DANAEI, M., M. DEGHANKHOLD, F.H. DAVANARI a R. JAVANMARD. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier System. *Pharmaceutics*. 2018, **10**(57), 1-17. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [40] VERMA, D.D., S. VERMA, G. BLUME a A. FAHR. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, (258), 141-151. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00183-2.
- [41] ČERMÁKOVÁ, Ludmila, Irena NĚMCOVÁ a Petr RYCHLOVSKÝ. *Spektrometrické analytické metody I*. Praha: Vydavatelství Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
- [42] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [43] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Měření rozptylu světla* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-001/hesla/mereni\\_rozptylu\\_svetla.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_rozptylu_svetla.html)
- [44] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced Physical Stability of Mixed Ion Pair Amphiphile/Double-chained Cationic Surfactant Vesicles in the Presence of Cholesterol. *Journal of Oleo Science*. 2018, **6**(67), 727-735. DOI: 10.5650/jos.ess18008.
- [45] LACHATAIGNERAIS, J.Pereira, R. PONS, P. PANIZZA, L. COURBIN, J. ROUCH a O. LÓPEZ. Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chemistry and Physics and Lipids*. 2006, (140), 88-97. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2006.01.008.
- [46] NARSAIAH, K., S.N. JHA, Robin A. WILSON, H.M. MANDGE a . Pediocin-Loaded Nanoliposomes and Hybrid Alginate–Nanoliposome Delivery Systems for Slow Release of Pediocin. *BioNanoScience*. 2013, **3**, 37-42. DOI: 10.1007/s12668-012-0069-y.
- [47] *SONOPULS Ultrasonic Homogenizers: Instructions for Use* [online]. In: . Germany: BANDELIN electronics, 2016, 2016 [cit. 2020-04-25]. Dostupné z: [https://bandelin.com/Bedienungsanleitung/HD/HD3xxx\\_GB\\_BANDELIN.pdf](https://bandelin.com/Bedienungsanleitung/HD/HD3xxx_GB_BANDELIN.pdf)

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

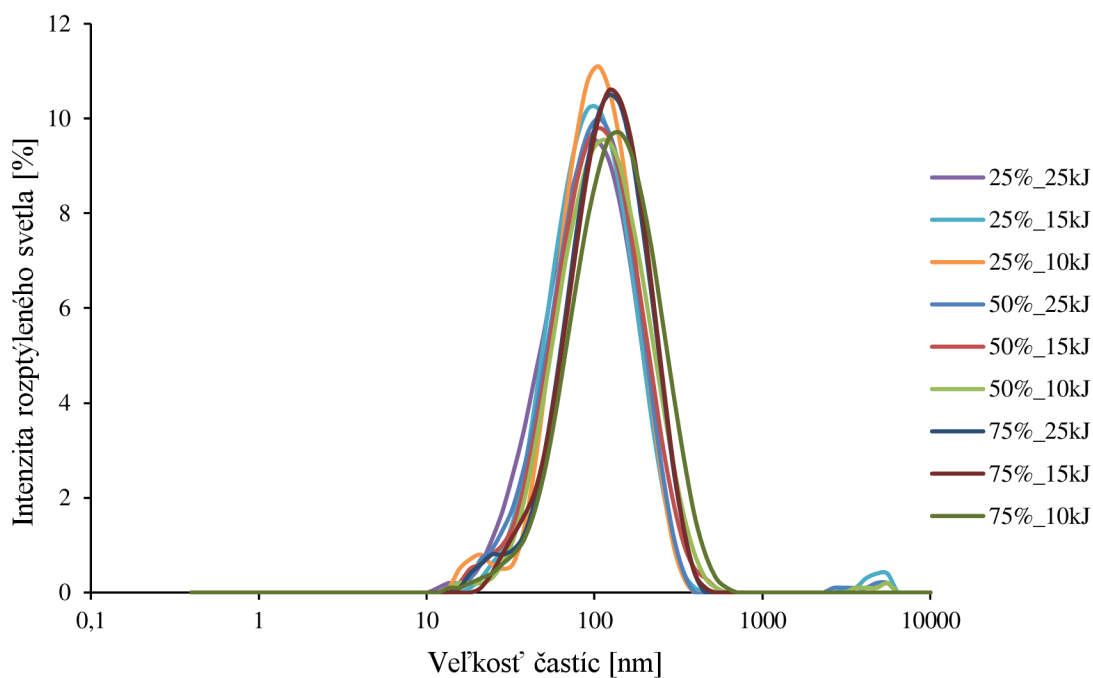
<b>Skratka</b>	<b>Význam skratky</b>
$A$	Absorbancia
$c$	Koncentrácia
CMC	Kritická micelárna koncentrácia
CTAB	Hexadecyltrimetylamónium bromid
$D$	Difúzny koeficient
DLS	Dynamický rozptyl svetla
DoDAC	Dimetyldioctadecylamónium chlorid
$\varepsilon$	Molárny extinkčný koeficient
ELS	Elektroforetický rozptyl svetla
IPA	Amfifilný iontový pár
$k_B$	Boltzmannova konštanta
$l$	Dĺžka kyvety
LUV	Veľké unilamelárne vezikuly
MLV	Multilamelárne vezikuly
$N_s$	Úložný faktor
PdI	Koeficient polydisperzity
$r_H$	Hydrodynamický polomer častice
SDS	Dodecylsulfát sodný
SUV	Malé unilamelárne vezikuly
$T$	Termodynamická teplota
$T_k$	Krafftova teplota
$V$	Objem
$\mu_0$	Viskozita rozpúšťadla

## 9 PRÍLOHA

### 9.1 1.deň – veľkosť častíc vzoriek o objeme 30 ml a 15 ml



Obr.32: Graf veľkosti častíc prvý deň po dispergácii vzoriek o objeme 30 ml



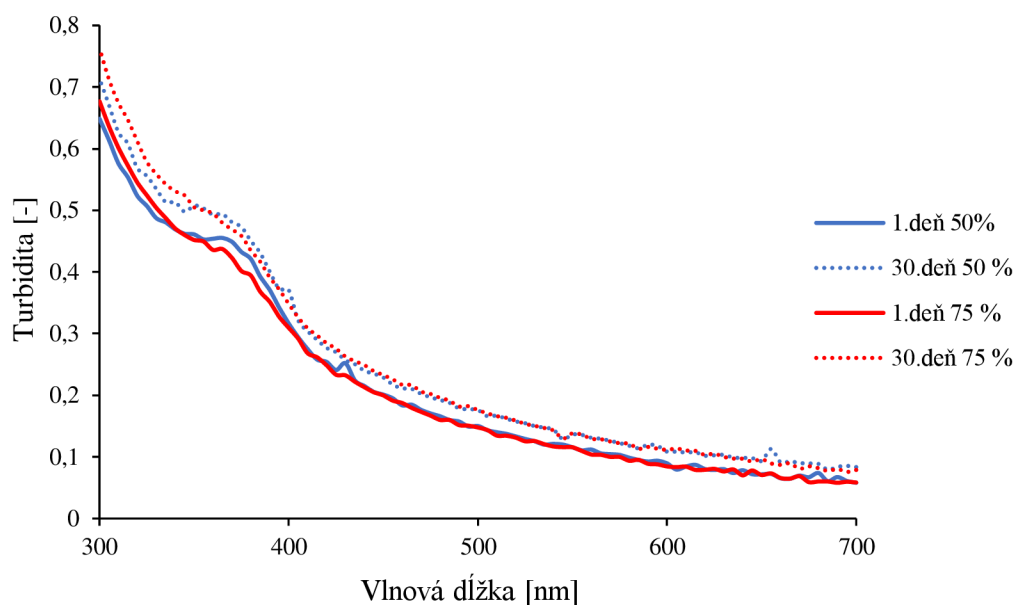
Obr.33: Graf veľkosti častíc prvý deň po dispergácii vzoriek o objeme 15 ml

## 9.2 Hodnoty PDI jednotlivých vzoriek:

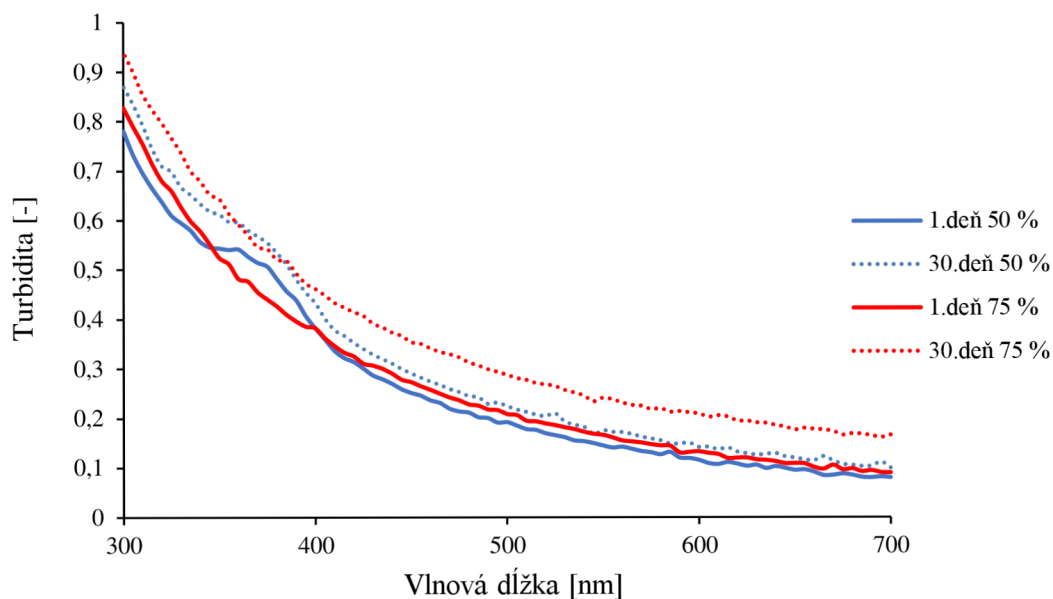
Tab.7: Hodnoty koeficientu polydisperzity všetkých vzoriek v deň dispergácie

		25kJ	15kJ	10kJ
60 ml	25 %	<b>0,391</b>	<b>0,592</b>	<b>0,596</b>
	50 %	0,300	0,289	<b>0,389</b>
	75 %	0,249	0,259	<b>0,362</b>
30 ml	25 %	<b>0,369</b>	<b>0,306</b>	<b>0,355</b>
	50 %	0,254	0,248	0,293
	75 %	0,244	0,261	0,271
15 ml	25 %	0,252	0,257	0,243
	50 %	0,253	0,247	0,258
	75 %	0,235	0,239	0,251
5 ml	25 %	<b>0,509</b>	<b>0,444</b>	0,261
	50 %	<b>0,394</b>	<b>0,355</b>	0,272
	75 %	<b>0,319</b>	0,289	0,262

## 9.3 Grafy pre vzorky s objemom 30 ml

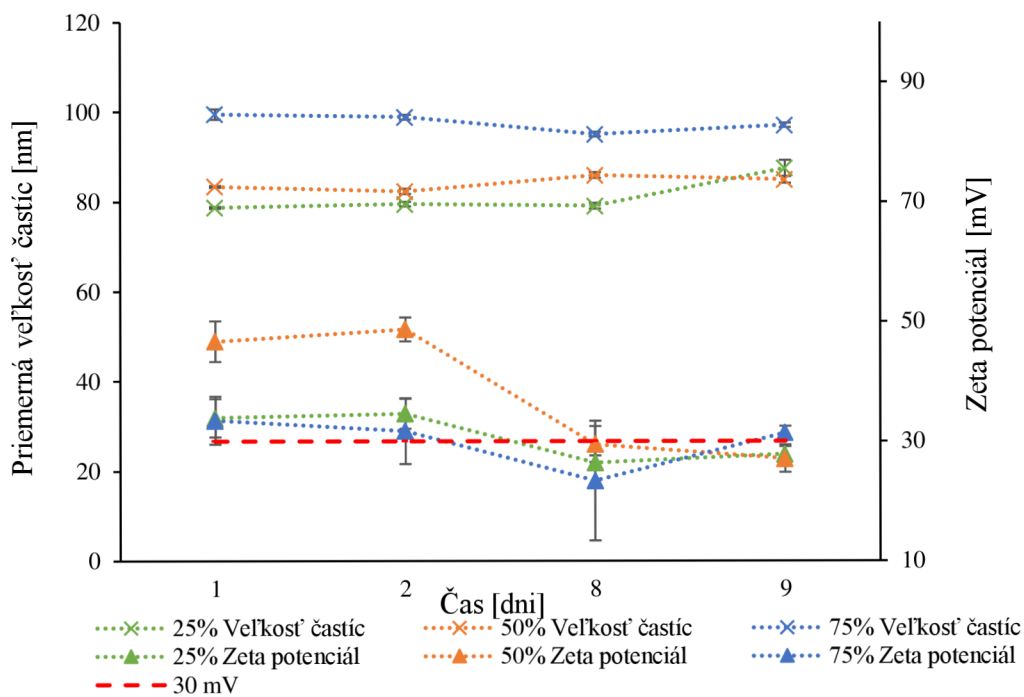


Obr.34: Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek o objeme 30 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 25 kJ v prvý a posledný deň merania

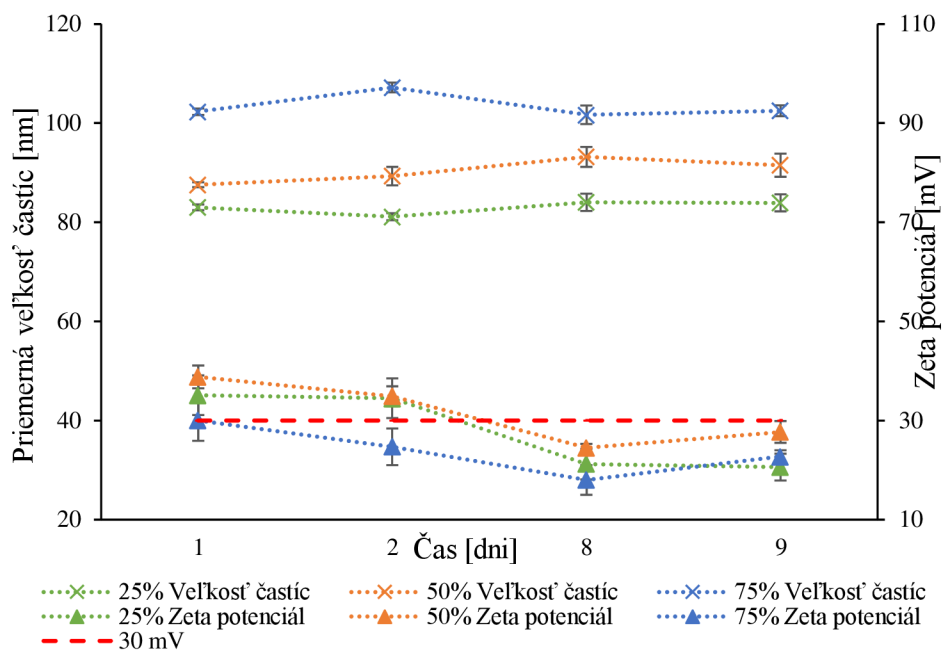


Obr.35: Graf závislosti turbidity na vlnovej dĺžke vzoriek o objeme 30 ml, amplitúdach 50 a 75 % a energii 10 kJ v prvý a posledný deň merania

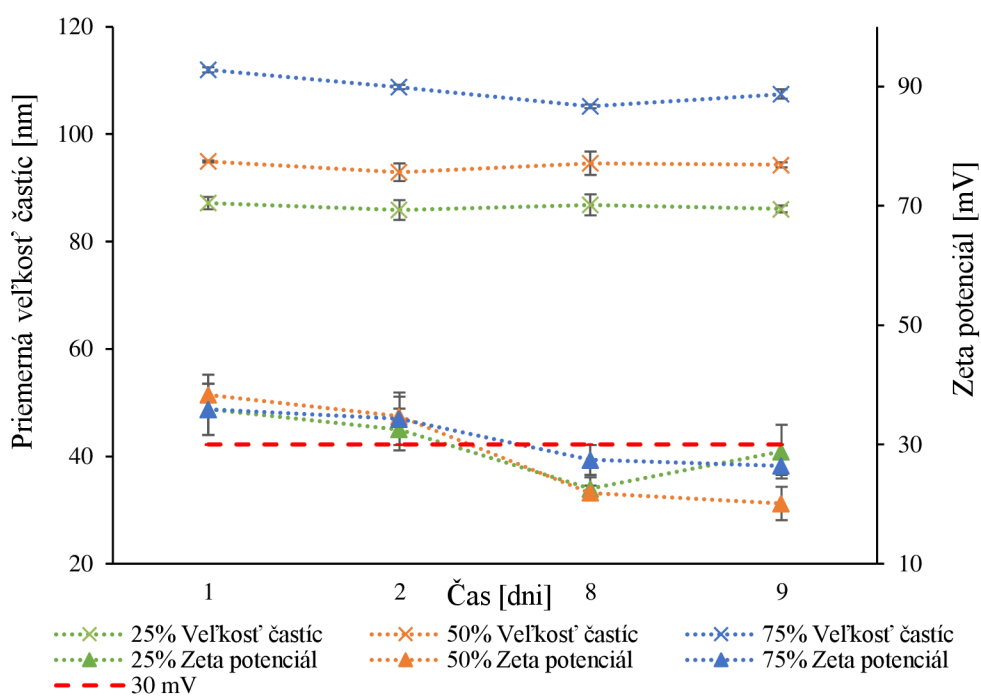
#### 9.4 Grafy pre vzorky s objemom 15 ml



Obr.36: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 15 ml, amplitúdach 25, 50 a 75 % a energii 25 kJ



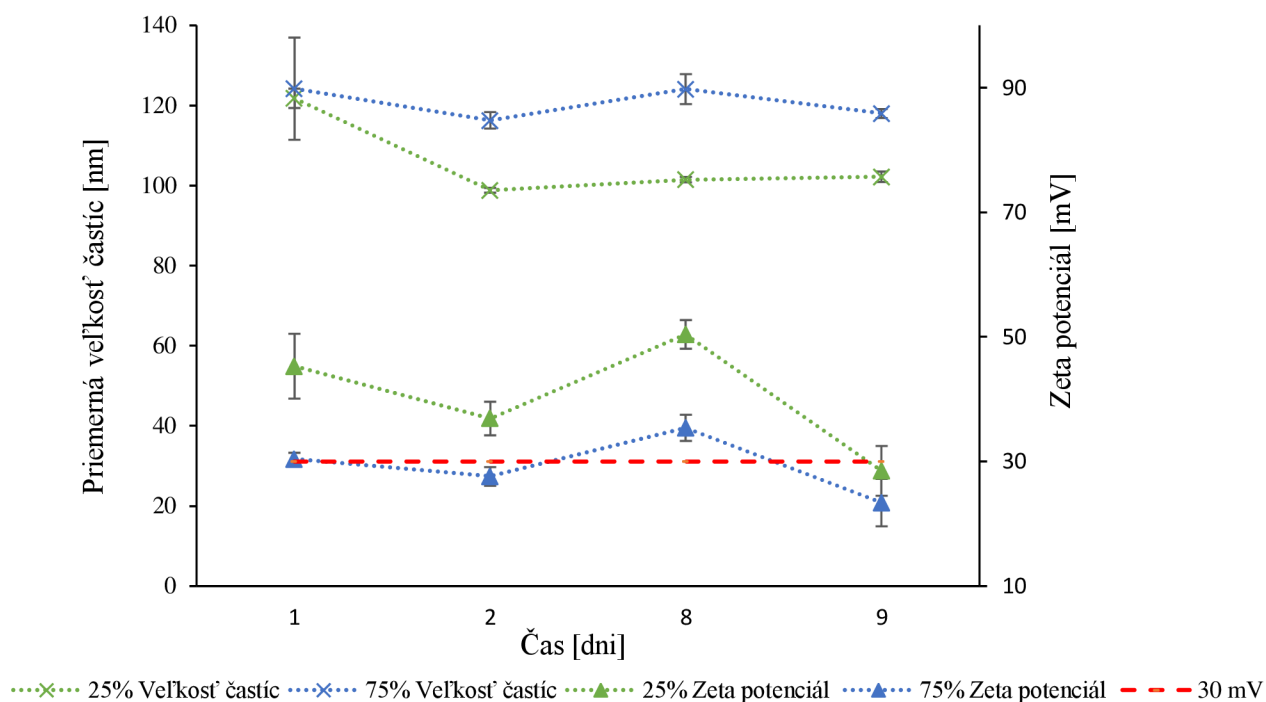
Obr.37: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 15 ml, amplitúdach 25, 50 a 75 % a energii 15 kJ



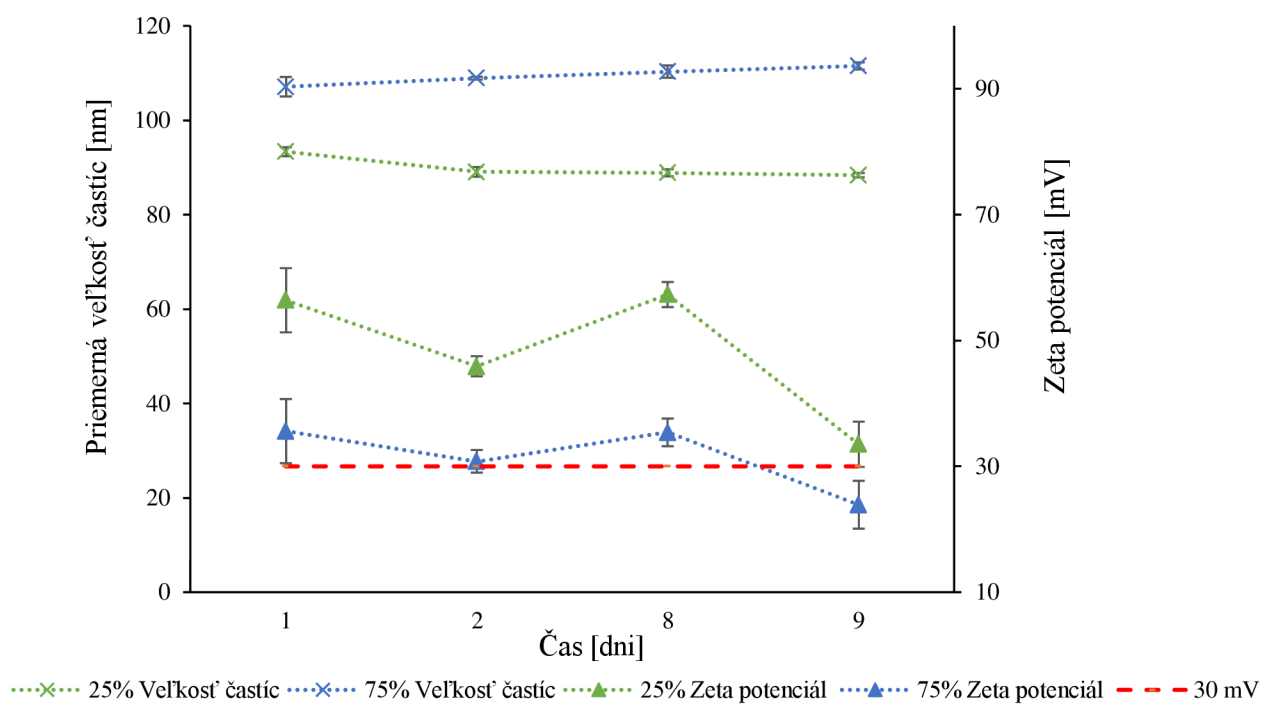
Obr.38: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 15 ml, amplitúdach 25, 50 a 75 % a energii 10 kJ



## 9.5 Grafy pre vzorky s objemom 5 ml



Obr.39: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 5 ml, amplitúdach 25 a 75 % a energii 25 kJ



Obr.40: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o objeme 5 ml, amplitúdach 25 a 75 % a energii 15 kJ