

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

VLIV PH NA VLASTNOSTI AGREGÁTŮ POLYELEKTROLYT-TENZID

INFLUENCE OF PH ON POLYELECTROLYTE-SURFACTANT SYSTEM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JANA HEJNÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2011



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0510/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Jana Hejná	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce:	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D. Ing. Tereza Halasová	

Název bakalářské práce:

Vliv pH na vlastnosti agregátů polyelektrolyt-tenzid

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na téma sledování vlivu pH na systémy polyelektrolyt-tenzid (zejména kationaktivní tenzid-polyanionický biopolymer) a na rozsah pH přítomný ve fyziologických podmínkách. Zároveň navrhnout vhodnou metodiku pro sledování těchto systémů.
2. Na základě rešerše navrhnout vhodná prostředí o různém pH a realizovat experimenty zaměřené na sledování vlivu pH na hydrofobní jádra agregátů.
3. Prozkoumat ovlivnění stability agregátů hyaluronan tenzid při různém pH a různém složení pufru.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska použití těchto systémů v kosmetice a farmacii.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

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

Jana Hejná
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byl studován vliv pH na agregaci polyelektrolyt- tenzid za použití fluorescenční spektroskopie a jako fluorescenční sonda byl použit pyren. Jako polyelektrolyt byl použit hyaluronan o dvou různých molekulových hmotnostech. Byly použity dva tenzidy, ionogenní kationaktivní tenzid cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a druhý byl neionogenní tenzid polyoxyethylene (20) (TWEEN (20)). Při měření vlivu pH, v rozsahu hodnot 3-10, nebyly pozorovány žádné významné změny systému. Systém je stabilní vůči změnám pH v pozorovaném rozmezí. Při vyšší koncentraci ionogenního kationaktivního tenzidu (CTAB) a vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu docházelo k fázové separaci gelu.

ABSTRACT

In this bachelor thesis, was studied influence of pH on aggregation polyelectrolyte-surfactant system using fluorescence spectroscopy and pyrene as fluorescent probe was used. As polyelectrolyte, hyaluronan with different molecular weight was used. Two surfactants cationic surfactant cetyltrimethylamonium bromide (CTAB) and nonionic surfactants polyoxyethylene (20) (TWEEN 20) were selected for interaction with hyaluronan. In the pH range from 3 to 10, no signifact changes in the aggregate non-polar core was observed. This mean system is stable against changes in the observed pH range. At system with higher concentrations of cationic surfactant (CTAB) and higher molecular weight hyaluronan occurred phase separation and gel exclusion was observed.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, pyren, tenzidy, pH, fluorescenční spektroskopie

KEYWORDS

hyaluronan, pyrene, surfactants, pH, fluorescence spectroscopy

HEJNÁ, J. *Vliv pH na vlastnosti agregátů polyelektrolyt-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 35 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za odborný dohled. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. a Ing. Tereze Halasové za trpělivost, cenné rady a připomínky, bez kterých by tato bakalářská práce nemohla vzniknout.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Fluorescenční spektroskopie	7
2.1.1. Fluorescenční sondy	9
2.1.2. Pyren	9
2.2. Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti	11
2.3. Kyselina hyaluronová	11
2.3.1. Výroba kyseliny hyaluronové	12
2.4. Asociativní (micelární) koloidy	12
2.4.1. Kritická micelární koncentrace (CMC)	14
2.4.2. Měření kritické micelární koncentrace	14
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	15
4. MATERIÁLY A METODY	16
4.1. Použité chemikálie	16
4.1.1. Polyelektrolyty	16
4.1.2. Fluorescenční sondy	16
4.1.3. Tenzidy	16
4.1.4. Další použité chemikálie	17
4.2. Příprava zásobních roztoků a vzorků	17
4.2.1. Příprava zásobních roztoků pufru	17
4.2.1.1. Zásobní roztok octanového tlumivého roztoku	17
4.2.1.2. Zásobní roztok tlumivého roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera	18
4.2.2. Zásobní roztok HyA	18
4.2.3. Zásobní roztoky tenzidů	18
4.2.4. Určení CMC CTAB a TWEEN v pufrech	18
4.2.5. Zjišťování CMC CTAB a TWEEN v přítomnosti HyA v pufrech	19
4.2.6. Zjišťování vlivu pH na chování CTAB a TWEEN v přítomnosti HyA	19
4.3. Měření absorpčních a fluorescenčních spekter pyrenu	19
4.4. Vyhodnocení	20
4.4.1. Stanovení kritické micelární koncentrace	20
4.4.2. Korekce intenzity fluorescence	21
4.5. Stanovení chyby měření	21
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	22
5.1. Hodnoty CMC CTAB	22
5.2. Hodnoty CMC TWEEN	24
5.3. Vliv pH na agregáty CTAB a HyA	26
5.4. Vliv pH na agregáty TWEEN a HyA	28
6. ZÁVĚR	30
7. REFERENCE	32
8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	34
9. PŘÍLOHY	35

1. ÚVOD

V tkáních lidského těla se vyskytuje látka, bez které bychom např. bezbolestně nechodili nebo bychom neviděli, ale na druhou stranu bychom neumírali na rakovinu. Tento polysacharid vyskytující se v kůži, očním sklivci, pupeční šňůře, chrupavce a synoviální tekutině se nazývá hyaluronan. Hyaluronanu jako tělu vlastní látky využijí nádorové a některé bakteriální buňky. Tyto buňky se hyaluronanem obalí a nechají se pomocí něho vyživovat a pokud jsou dostatečně vyživovány, mohou se rozmnožovat. Dokonce se mohou přes hyaluronan dostat do krevního řečiště, které je zanechá na vhodnější místo k jejich životu.

Některé bakterie se z ochranných důvodů obalují hyaluronanem, této vlastnosti se využívá k průmyslové produkci hyaluronanu. V čistém prostředí laboratoře se pěstují bakterie kmene *Streptococcus* a *Pasteurella* k produkci hyaluronanu. Hyaluronan je rozpustný ve vodě a je extrémně hydrofilní molekulou, na 1 mol hyaluronanu připadá 1000 mol vody, toho se využívá u humektantů (zvlhčující látky) a lubrikantů. Protože bakterie jsou schopny poskytovat poměrně velké množství hyaluronanu, rozšířilo se i jeho použití v kosmetice a medicíně. Medicínské využití hyaluronanu je široké. Využívá se v oftalmologii při výměně čoček, v ortopedii a revmatologii, kde se aplikuje do synoviální tekutiny, čímž snižuje bolest při chůzi, využívá se také při hojení ran a v tkáňovém inženýrství. Protože se množství hyaluronanu v kůži s věkem snižuje, přidává se hyaluronan do kosmetických přípravků proti vráskám. V kosmetice se využívá hyaluronanu také při různých plastických operacích, jako je např. vyhlazování vrásek.

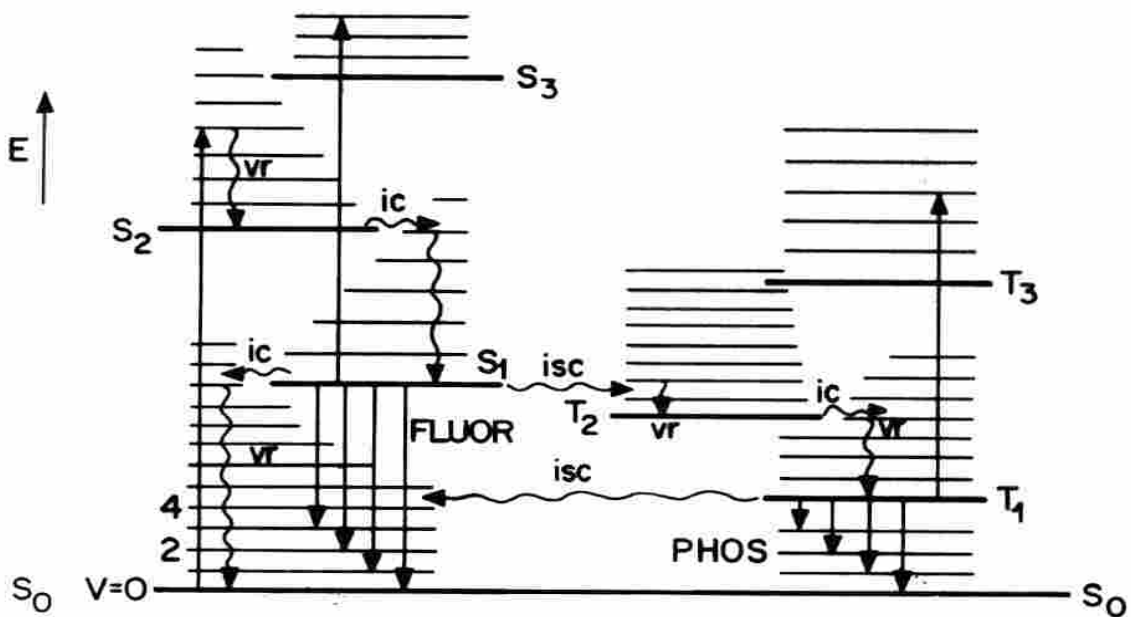
Jak už bylo řečeno hyaluronan je látka tělu vlastní a jako taková ochraňuje nádorové buňky v době, kdy by bylo tělo schopno s nimi bojovat a zahubit je. Ve chvílích kdy je imunitní systém odhalí, je už většinou pozdě na to aby se s nimi sám vypořádal. Ale i když jsou nádorové buňky velké a přerůstají v tumor, stále potřebují výživu, proto k sobě stále přitahují hyaluronan. Protože, zatím nejsme schopni dostatečně účinně léčit rakovinu, hledají se stále nové a nové způsoby léčby a indikace účinných látek. Jednou z možných indikací je tzv. cílený nosič. Jako cílený nosič by mohl být použit hyaluronan, na kterém by se pomocí tenzidu mohli vytvořit dostatečně velké micely pro rozpuštění léčiva, ale zároveň dostatečně malé na to, aby prošly buňkami lidského těla. Protože v okolí tumoru se vyskytuje kyselé pH je důležité zjistit, jestli systém hyaluronan-tenzid není ovlivňován různými hodnotami pH.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Fluorescenční spektroskopie

Principem fluorescenční spektroskopie je to, že elektron přijme určité kvantum energie a díky tomu se dostane ze svého základního energetického stavu do excitovaného stavu. Na základní elektronové hladině (S_0) se molekula nachází v singletovém stavu, to znamená, že má odlišný spin. Molekula může ze základního singletového stavu (S_0) přecházet do singletového (S_1 , S_2) nebo tripletového (T_1 , T_2) stavu. Tripletový stav znamená, že hodnoty spinového čísla jsou stejné. Excitovaná molekula je nestabilní a snaží se dostat zpět do svého základního stavu, toho může dosáhnout buď zářivými, nebo nezářivými přechody. Molekula se může v rámci excitace dostat nejen na vyšší singletový nebo tripletový stav, ale také na některou z vyšší vibračních hladin. Přechod z vyšších vibračních hladin do základní vibrační hladiny probíhá vždy nezářivě, jde o vibrační deaktivaci. Další nezářivé přechody mohou nastat mezi vyššími energetickými hladinami stejné multiplicity ($S_2 \rightarrow S_1$) nebo ($T_2 \rightarrow T_1$), tyto nezářivé přechody se označují jako vnitřní konverze molekuly. Při vnitřní konverzi molekuly dochází k tomu, že molekula předává přebytečnou energii do okolí a tím se dostává na nejnižší vibrační hladinu nižšího energetického stavu. K nezářivým přechodům většinou nedochází mezi singletovou hladinou S_1 a základní singletovou hladinou S_0 , protože mezi nimi je velký energetický rozdíl. Energetický rozdíl, který je mezi excitovanými energetickými hladinami $S_2 \rightarrow S_1$ je nižší než mezi hladinami $S_1 \rightarrow S_0$.

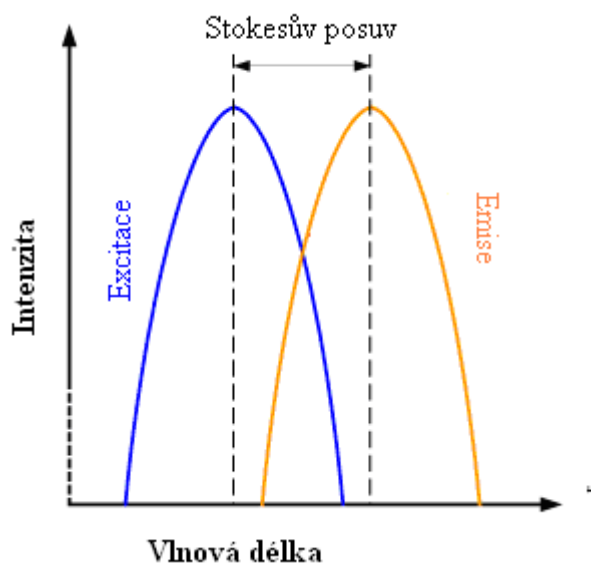
Pokud molekula přechází nezářivě z excitovaného singletového stavu S_1 do excitovaného tripletového stavu T_1 a poté zářivým přechodem do základního energetického singletového stavu S_0 tak hovoříme o fosforescenci. Pokud molekula přechází z excitovaného singletového stavu S_1 do základního energetického singletového stavu S_0 přímým zářivým přechodem pak hovoříme o fluorescenci. Intenzita fluorescence i fosforescence je závislá na počtu molekul v excitovaném stavu. Přechod z excitovaného do základního stavu trvá asi 10^{-7} - 10^{-8} s [1]. Přechody mezi jednotlivými energetickými hladinami nejlépe znázorňuje Jablůňského diagram.



Obr. 1. Jablonskiho diagram [2]

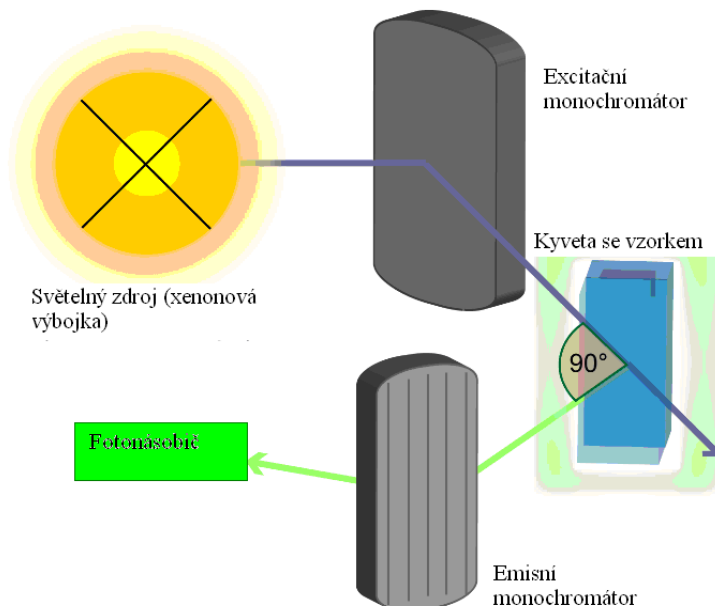
V Jablonskiho diagramu jsou zářivé přechody vyznačeny rovnými čarami a nezářivé přechody jsou vyznačeny vlnovkami. Při nezářivých přechodech, které probíhají mezi jednotlivými vibračními hladinami jednotlivých energetických stavů, nedochází ke změně celkové energie systému, proto nedochází k emisi záření.

Fluorescenční spektroskopie se díky své rychlosti, vysoké selektivitě a poměrně jednoduché detekci využívá v celé řadě oborů, jako jsou analytická chemie, biomedicína (identifikace a dělení buněk v průtokové cytometrii), genetických analýzách a spoustě dalších oborů. Fluorescence se také využívá jako ochranný prvek bankovek a například tonic obsahuje chinin, který podléhá fluorescenci [3].



Obr. 2. Stokesův posuv [4]

Absorpční a fluorescenční spektrum jsou vzájemně zrcadlově symetrická, avšak fluorescenční spektrum je posunuto k vyšším vlnovým délkám, tomuto jevu se říká Stokesův posuv. Stokesův posuv se zvyšuje s rostoucí polaritou rozpouštědla, proto jsme schopni pomocí fluorescenčních sond odhadnout polaritu rozpouštědla, fluorescenční molekula musí mít dipól moment v excitovaném stavu vyšší než v základním stavu [5].



Obr. 3. Fluorimetr [6]

2.1.1. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se přidávají ke vzorku. Na vzorek se vážou nekovalentně a často u toho mění svoje fluorescenční vlastnosti [7].

Fluorescenční sondy rozdělujeme na vnitřní sondy a vnější kovalentně nebo nekovalentně vázané sondy. Nejlepší jsou vnitřní sondy, kterých je velmi málo, takovými sondami jsou například tryptofan v proteinech. Kovalentně vázané sondy se připojují k povrchově aktivní látce, řetězci polymeru, fosfolipidu, bílkovině nebo polynukleotidům. Kovalentní vazbu je možné uskutečnit na aminoskupině a na thiolové skupině. V současné době se používají fluorescein a rhodamin. Vzhledem k složitosti systému molekul a makromolekul s kovalentně vázanými specifickými sondami, se většina měření provádí s nekovalentně vázanými sondami. Místa, kde dochází k solubilizaci vnější sondy, se řídí jejich chemickou podstatou a výslednou interakcí, proto je zásadní charakter sondy, ten může být hydrofilní, hydrofobní nebo amfifilní povahy. Pro výběr sondy je důležitá znalost její citlivosti na určité vlastnosti mikroprostředí, ve kterém se nachází, jako je například polarita nebo kyselost. Volba vhodné fluorescenční sondy rozhoduje o získání jednoznačných výsledků [8].

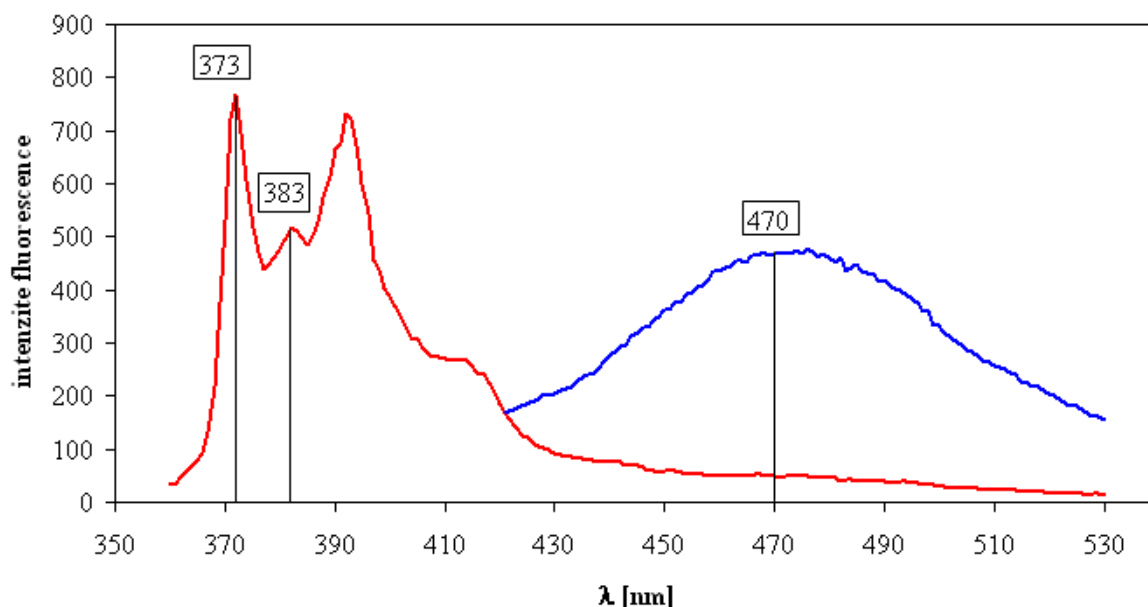
2.1.2. Pyren

Pyren je nejlépe excitován světlem o vlnové délce 335 nm, protože při této vlnové délce se nachází jeho excitační maximum. Při fluorescenčním měření s pyrenem se může využít jak emisního tak excitačního spektra.

U emisního spektra se využívají hodnoty intenzity fluorescence při vlnové délce 373 a 383 nm, neboli intenzity maxima prvního ($I_1; I_M$) a třetího (I_3) píku [9]. U emisního spektra můžeme využít i intenzitu fluorescence při vlnové délce 470 nm (I_E), tato vlnová délka je pro pyren charakteristická a označuje se jako excimer. Hodnota intenzity fluorescence excimeru závisí na počtu micel v systému. S rostoucí koncentrací tenzidu, v blízkosti jeho kritické micelární koncentrace, dochází v systému k vytváření micel, ve kterých může být pyren rozpuštěn. Díky malému počtu micel v roztoku, obsahuje každá micela více jak jednu molekulu pyrenu a díky tomu pozorujeme nárůst hodnoty intenzity fluorescence excimeru. Dalším přidáním tenzidu nad jeho CMC se zvyšuje i počet micel v roztoku a tím dochází k poklesu intenzity fluorescence excimeru k nule.

Po překročení hodnoty CMC se intenzita fluorescence excimeru snižuje. Emisní spektrum pyrenu můžeme vyhodnotit dvěma způsoby. Prvním a přesnějším způsobem vyhodnocování je vyhodnocování poměru prvního a třetího píku, tento poměr se nazývá emisní polaritní index (EmPI). Do grafu se vynáší závislost EmPI na koncentraci tenzidu a tato závislost se prokládá Boltzmanovou sigmoidní křivkou, ze které se snadno zjistí hodnota CMC. Druhou možností jak vyhodnotit emisní spektrum pyrenu je vytvoření poměru excimeru ku monomeru (E:M) a jeho následné vnesení do grafu v závislosti na koncentraci tenzidu. Tato závislost se nedá proložit žádnou známou matematickou funkcí, proto se za hodnotu CMC považuje koncentrace tenzidu, při kterém je maximum poměru E:M. Takto stanovená hodnota CMC je pouze orientační, protože nelze proměřit všechny hodnoty koncentrace tenzidu. Emisní spektrum pyrenu je vyobrazeno na obrázku číslo 4.

Při vyhodnocování měření s pyrenem můžeme využít také excitačního spektra. Z excitačního spektra se vyberou hodnoty intenzity fluorescence náležící vlnovým délkám 333 a 338 nm, tyto hodnoty se dají do poměru. Poměr intenzity fluorescence při vlnové délce 333 nm ku intenzitě fluorescence při vlnové délce 338 nm se nazývá excitační polaritní index (ExPI). Excitační polaritní index se stejně jako emisní polaritní index vynáší do grafu v závislosti na koncentraci tenzidu. Vyhodnocení vzniklé závislosti probíhá podobným způsobem ko u emisního polaritního indexu.



Obr. 4. Emisní spektrum pyrenu, modrou čarou je znázorněn excimer v blízkosti CMC

2.2. Molekulová absorpční spektrofotometrie v UV-VIS oblasti

Absorpce záření ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra je dána přechodem elektronu mezi dvěma a více elektronovými hladinami v molekule. Excitovaná molekula přechází do základního stavu bez radiace a zářivá energie se mění na tepelnou, čímž se zvyšuje kinetická energie molekuly. UV-VIS spektrofotometrie se řídí Bouguer-Lambert-Beerovým zákonem, který vyjadřuje vztah mezi intenzitou dopadajícího a prošlého záření, délkou absorbující vrstvy a koncentrací vzorku:

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon_\lambda \cdot l \cdot c}$$

kde ϵ_λ je molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$], l je délka absorbující vrstvy [cm] a c je koncentrace vzorku [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$].

V UV-VIS spektrofotometrii můžeme měřit tyto veličiny:

$$\text{Transmittance: } T = \frac{I}{I_0} \quad 0 \leq T \leq 1$$

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad 0 \leq T \leq 100$$

$$\text{Absorbance: } \alpha = 100 - T\% \quad 0 \leq \alpha \leq 100$$

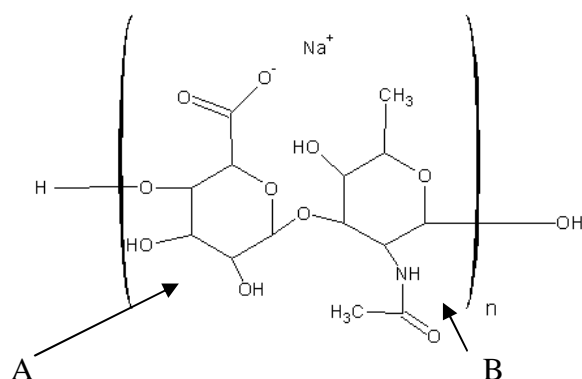
$$\text{Absorbance: } A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T \quad (A > 0)$$

$$A = 2 - \log T\%$$

[1]

2.3. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová se vyskytuje v polyaniontové formě, proto se spíše používá název hyaluronan. K. Mayer a J. W. Palmer v roce 1934 izolovaly z očního sklivce dobytka polysacharid s vysokou molekulovou hmotností, známý jako hyaluronan [10]. Ve 30. a 40. letech 20. století byl hyaluronan izolován také z očního sklivce prasat, z roztoků hovězí krve, z bakterii streptokoků a z kohoutích hřebínků. Izolací z kohoutích hřebínků jsme schopni dosáhnout největších molekulových hmotností HyA a to 3,5 – 4 MDa.



Obr. 5. Dimerní jednotka hyaluronanu složená z *D*-glukuronové kyseliny (A) a *D*-*N*-acetylglukosaminu (B)

Kyselina hyaluronová je nerozpustná ve vodě, kdežto hyaluronan je ve vodě rozpustný, nejčastěji se používá hyaluronan sodný. Hyaluronan o nízké koncentraci rozpuštěný ve vodě vytváří koloidní roztok, se zvyšující se koncentrací se zvyšuje viskozita roztoku, viskozita roztoku se zvyšuje až do vytvoření gelu.

Hyaluronan vytváří lineární řetězce skládající se z dimerních jednotek, které se mezi sebou vážou $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbou. Monomerní jednotky, ze kterých je dimer složený jsou D-glukuronová kyselina (A) a D-N-acetylglukosamin (B), monomerní jednotky se mezi sebou vážou $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou [11]. Hyaluronan je extrémně hydrofilní molekula, je to látka, která je tělu vlastní a je nezbytným komponentem extracelulárního matrixu.

Hyaluronan se vyskytuje ve všech tkáních obratlovců (kohoutí hřebínky, kůže, klouby rohovka [10]) a vyskytuje se také u bakteriálního kmene *Streptococcus* a *Pasteurella*, čehož se využívá k průmyslové produkci HyA. Hyaluronan se nevyskytuje u rostlin a dokonce se u nich nevyskytuje ani nic co by bylo podobné hyaluronanu.

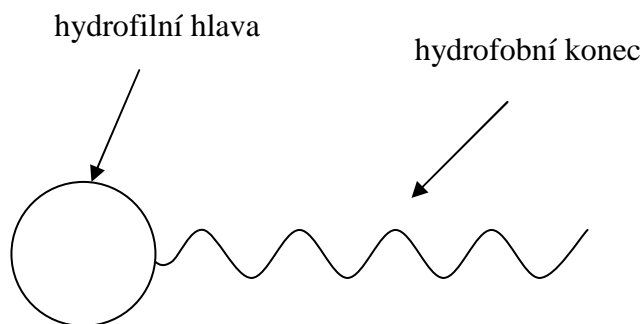
2.3.1. Výroba kyseliny hyaluronové

Hyaluronan se průmyslově vyrábí dvěma hlavními způsoby, jedním způsobem je extrakce ze živočišných zdrojů a druhým bakteriální produkce HyA. Při extrakci ze živočišných zdrojů je důležité nejprve rozbít strukturu, ze které se má kyselina hyaluronová izolovat. Na rozrušení struktury se používají různé metody, např. drcení, homogenizace, rozrušení pomocí enzymů nebo organických rozpouštědel. Tkáň se zbaví krve a mohou se konzervovat nebo sušit. Vysušené tkáň se nechají nabotnat, po rozmixování se přefiltruje synoviální tekutina a sklivec, tím se vyčistí od pojivové tkáň. Z tkání se pak různými metodami separují proteiny a dochází k uvolnění HyA. Takto vyrobená HyA může obsahovat různé nečistoty. Nejzávažnější nečistotou jsou bakteriální endotoxiny, kterých se sice můžeme zbavit sterilizací, po které bakterie umřou, ale zanechají po sobě specifickou biologickou stopu, díky které se prokáže její přítomnost.

Při bakteriální produkce je HyA syntetizována jako extracelulární kapsule patogenního streptokoka skupiny A a C. Po fermentaci se hyaluronát sodný získá zahřátím kultivačního roztoku a následnou filtrací. Takto získaný hyaluronát sodný se několikrát precipituje pomocí cetylpyridinium chloridu (CPC) a ethanolu, dokud není čistý. Pro snížení obsahu bílkovin v hyaluronanu se používá aktivní uhlí.

2.4. Asociativní (micelární) koloidy

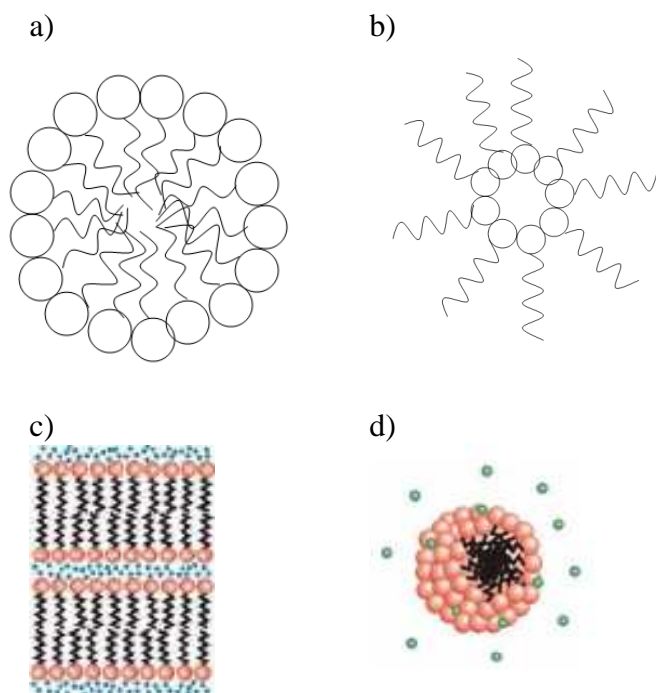
Charakteristickou vlastností koloidů je např. schopnost rozptylovat viditelné světlo, neprocházet póry buněčné membrány, vykazovat tzv. Brownův pohyb. Koloidy rozdělujeme na hydrofobní a hydrofilní. Hydrofobní koloidy mají menší povrchové napětí, na svém povrchu vážou málo molekul vody, jsou málo stabilní, nazývají se sóly a patří sem některé lipidy a některé anorganické látky. Hydrofilní koloidy jsou stabilizovány hydratačním obalem, který se tvoří na jejich povrchu. Nazývají se koloidní roztoky a tvoří je bílkoviny globulárního typu. Micely vznikají z pravých roztoků některých nízkomolekulárních látek vratnou asociací [12]. Tenzid, neboli povrchově aktivní látka, je složená z hydrofilní hlavy, kterou tvoří polární skupina a hydrofobního konce, což je uhlovodíkový řetězec složený z 8-18 uhlíků.



Obr. 6. *Struktura micelárního koloidu*

Povrchově aktivní látky dělíme podle schopnosti disociovat ve vodě na neionogenní a ionogenní. Neionogenní PAL se skládají z dlouhého uhlovodíkové řetězce a polárních, neionogenních skupin, takovými skupinami mohou být hydroxylové nebo esterové skupiny, a nejsou schopné elektrolytické disociace a nenesou žádný náboj. Mezi neionogenní tenzidy se řadí polyoxyetylen (20), neboli TWEEN (20) (dále v textu jen TWEEN).

Ionogenní PAL se dělí na kationtové, aniontové a amfoterní (náboj micely závisí na pH) [13]. Aniontové ionogenní PAL jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin (přirozená mýdla) a soli alkylsulfonových kyselin (umělá mýdla). Alkylsulfonové kyseliny na rozdíl od vyšších mastných kyselin tvoří micelární koloidy, protože kyselá skupina $-\text{SO}_3\text{H}$ je na rozdíl od skupiny $-\text{COOH}$ ve vodě dostatečně disociována. Při disociaci kationtových ionogenních PAL ve vodě je aktivní kationt. Skupiny, které poskytují kationt, jsou např. oktadecylamonium chlorid, soli čtyřsytných amonných bází (cetyltrimethylamonium bromid CTAB) a pyridinové sloučeniny substituované na atomech dusíku (cetylpyridinium chlorid).



Obr. 7. a) micela; b) reverzní micela c) laminární (McBainova) micela, d) malá (Hartleyova) micela [14]

2.4.1. Kritická micelární koncentrace (CMC)

Roztok tenzidu (povrchově aktivní látky) se od ostatních roztoků neliší, do chvíle než nastane hodnota kritické micelární koncentrace (CMC). Po překročení hodnoty CMC se jednotlivé molekuly tenzidu začnou shlukovat do systémů znaných micely. Molekula tenzidu může tvořit micely, protože jeden konec molekuly je polární a druhý nepolární. Při vytvoření micely ve vodě dochází k tomu, že nepolární konce molekul se shlukují uprostřed micely a polární části molekul jsou orientovány do roztoku. Uprostřed micely vzniká nepolární prostředí, ve kterém se mohou rozpouštět nepolární látky. Tyto micely se hromadí při mezifázovém rozhraní a ovlivňují jeho vlastnosti, toho se využívá při měření CMC. Micely v roztoku ovlivňují např. povrchové napětí, osmotický tlak, vodivost, magnetickou rezonanci nebo solubilizaci [15].

2.4.2. Měření kritické micelární koncentrace

Hodnotu CMC tenzidu může zjistit několika metodami. Obvyklými metodami měření CMC jsou měření vodivosti, měření povrchového napětí a solubilizace přidaného barviva. Mezi méně obvyklé metody měření CMC se řadí infračervená spektrometrie, potenciometrie, NMR a fluorescenční spektrometrie [13].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Léčba nádorových onemocnění se za posledních několik let výrazně zlepšila, avšak stále se potýká s problémem vedlejších příznaků, jako jsou vypadávání vlasů nebo leukémie. Z tohoto důvodu se snaží vědci z celého světa najít jiný způsob léčby rakoviny. Jednou z možností jak léčit nádorová onemocnění je léčba pomocí cílených nosičů. Existuje několik druhů cílených nosičů, např. mikročástice [16], nanočástice [17,18], liposomy [19] a polymerní micely [20,21], zatím žádný z dosud vyvinutých cílených nosičů nemá dostatečně dobré výsledky na to, aby mohl být použit prakticky. V posledních letech se značná část vědců uchyluje ke zkoumání polymerních micel.

Bylo zjištěno, že polymerní micely jsou mnohem stabilnější než tenzidické micely. Polymerní micely mohou ve svém vnitřním jádru rozpouštět hydrofobní sloučeniny a díky hydrofilnímu obalu a malé velikosti se mohou dlouho dobu v oběhu pohybovat *in vivo* (neboli živé) a následně se hromadit v nádorových buňkách [19]. Nádor může mít široký rozsah hodnot pH, od velmi nízkých hodnot až po hodnoty pH nalezené v normálních tkáních. Již v roce 1984 věděli, že hodnota pH buněčného prostředí může mít vliv na účinnost různých léčebných přípravků [22].

V roce 2008 byly studovány hydrogely, pomocí pufrů o různých hodnotách pH v roztocích simulujících zranění. Hydrogely byly připravovány ze syntetických a přírodních polymerů jako jsou polyvinyl alkohol, di-*n*-butylftalát, hydrochlorid tetracyklinu a Sterculia guma která se získává ze stromu rostoucího ve střední a severní Indii. Tyto hydrogely byly studovány za účelem použití při efektivnějším hojení ran, tento předpoklad byl v závěru potvrzen. Směs těchto polymerů vytvoří materiál, který má lepší mechanické vlastnosti, biokompatibilitu a flexibilitu než je tomu u jednotlivých komponentů. Systémy byly studovány pomocí Fourierovy transformace infračerveného spektra (FTIR spektrometrie) a pomocí UV-spektrometrie. [24].

Pomalé hojení ran je jednou z hlavních léčebných a ekonomických otázek lékařství dodnes. Kožní hojení ran má 3 fáze: zánět, množení buněk a remodelace tkáně. Tento článek se zabývá již známými metoda léčení zranění. Zánětlivá reakce kožní poranění je způsobena cytokiny a chemokiny a s pH gradientem mají zásadní vliv na buněčnou funkci. Změny pH přispívají k opožděnému hojení ran. V průběhu hojení zranění se pH může měnit důsledkem enzymové aktivity, proto se jako vhodné léčebné prostředky jeví biologicky rozložitelné polymery [23].

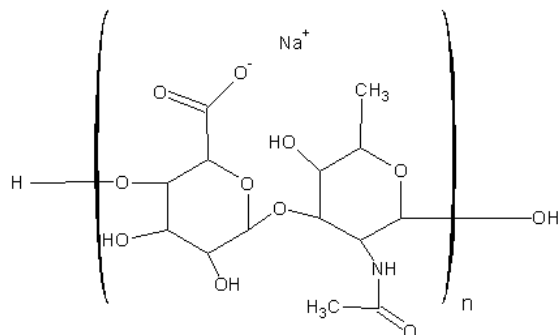
Extracelulární pH nádorové tkáně je významně nižší než je tomu u normální tkáně, kdežto intracelulární pH mají přibližně stejnou hodnotu. Tohoto pH gradientu by mohlo být využito k léčbě rakoviny. Nádor byl rozřezán a aplikován na zadní nohu myši s následně byl sledován růst nádoru v určitých intervalech. Po dosažení potřebné velikosti nádoru, byly myši rozřazeny do tří skupin. Na jedné skupině myši bylo měřeno pH, zbylé dvě skupiny myši byly léčeny, k jedné skupině byla kromě léčiva přidána glukóza. Intracelulární pH nádoru bylo měřeno pomocí magnetické rezonance, hodnota pH byla následně zjištěna pomocí chemického posunu anorganického fosfátu. Extracelulární pH nádoru bylo měřeno pomocí sondy, skleněná mikroelektroda. V tomto článku se zaměřili na léčbu rakoviny pomocí slabé kyseliny nebo zásady. Zjistili, že pro léčbu rakoviny by mohla být vyvinuta chemoterapeutika, na bázi slabé kyseliny o vhodném pK_a [25].

4. MATERIÁLY A METODY

4.1. Použité chemikálie

4.1.1. Polyelektrolyty

Nativní hyaluronan

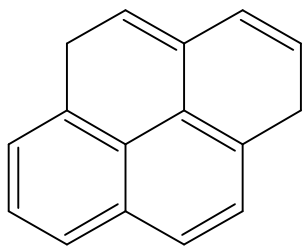


HyA Mw = 106 kDa, CPN spol. s.r.o., šarže 190707-E1

HyA Mw = 1,36 MDa, CPN spol. s.r.o., šarže 050907-7

4.1.2. Fluorescenční sondy

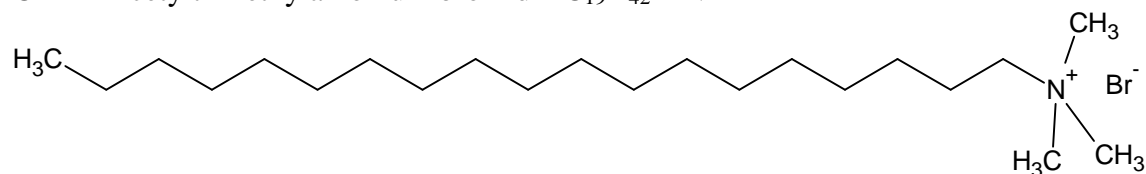
Pyren – C₁₆H₁₀



Mw = 202,25 g·mol⁻¹, for fluorescence, Fluka GmbH, šarže 2049273, CAS # 129-00-0

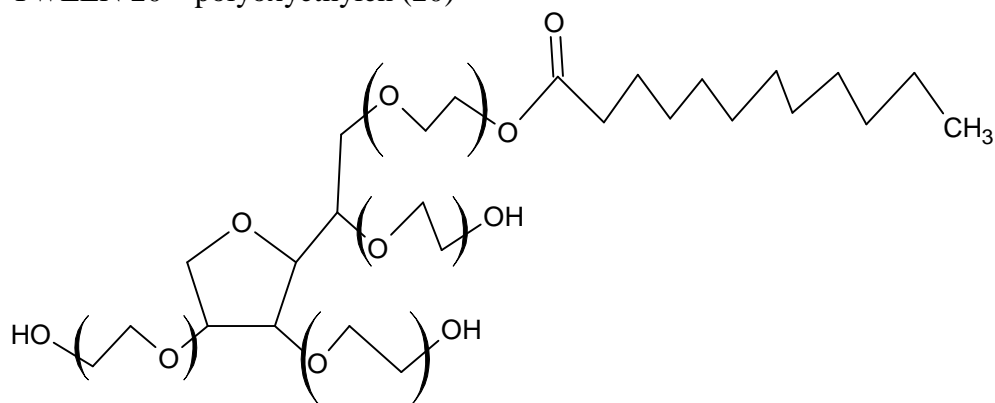
4.1.3. Tenzidy

CTAB – cetyltrimethylamonium bromid – C₁₉H₄₂BrN



Mw = 364,45 g·mol⁻¹, Sigma-Aldrich, šarže 200-311-3, CAS # 57-09-0

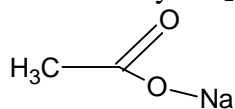
TWEEN 20 – polyoxyetylen (20)



Mw = 1227,54 g·mol⁻¹, Sigma-Aldrich, šarže 087K01981, CAS # 9005-64-5

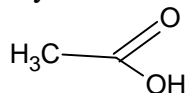
4.1.4. Další použité chemikálie

Octan sodný – C₂H₃O₂Na



Mw = 82,03 g·mol⁻¹, p.a., Lach-Ner s.r.o., CAS # 6131-90-4

Kyselina octová – C₂H₄O₂



Mw = 60,0516 g·mol⁻¹, p.a., Lach-Ner s.r.o., CAS # 64-19-7

Tetraboritan sodný dekahydrát – Na₂B₄O₇·10H₂O

Mw = 381,37 g·mol⁻¹, Lach-Ner, CAS # 1303-96-4

Hydroxid sodný – NaOH

Mw = 39,9971 g·mol⁻¹, p.a., Lach-Ner Neratovice EINECS 215-185-5, CAS # 1310-73-2

Kyselina chlorovodíková – HCl

Mw = 36,46 g·mol⁻¹, 35 %, p.a., Lach-Ner s.r.o., šarže 231-595-7, CAS # 7647-01-0

Chlorid sodný – NaCl

Mw = 58,443 g·mol⁻¹, p.a., Lach-Ner s.r.o., šarže 231-598-3, CAS # 7647-14-5

4.2. Příprava zásobních roztoků a vzorků

4.2.1. Příprava zásobních roztoků pufru

4.2.1.1. Zásobní roztok octanového tlumivého roztoku

Pro přípravu tlumivého octanového roztoku o pH = 4,6 bylo potřeba nejdříve připravit zásobní roztok kyseliny octové o molární koncentraci 0,2 mol·dm⁻³ a roztok octanu sodného o molární koncentraci 0,2 mol·dm⁻³. Zásobní roztok kyseliny octové byl připraven zředěním 12,01 cm³ kyseliny octové 36% v 1 dm³ vody. Zásobní roztok octanu sodného byl připraven rozpuštěním 16,416 g octanu sodného v 1 dm³ vody. Octanový tlumivý roztok byl připraven smícháním 510 cm³ kyseliny octové a pH bylo upraveno na 4,6 přidáváním octanu sodného. Při přípravě toho tlumivého roztoku voda. Standardně byla použita voda, která byla

purifikovaná přístrojem Milliphore. Připravený zásobní roztok pufru byl skladován při laboratorní teplotě.

4.2.1.2. Zásobní roztok tlumivého roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera

Pro přípravu tlumivého roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera o $\text{pH} = 10$ bylo potřeba připravit zásobní roztoky tetraboritému sodného o molární koncentraci $0,025 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a hydroxidu sodného o molární koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Zásobní roztok tetraboritanu sodného byl připraven rozpuštěním $9,5343 \text{ g}$ tetraboritanu sodného dekahydrát v 1 dm^3 vody. Zásobní roztok hydroxidu sodného byl připraven rozpuštěním 2 g hydroxidu sodného v 500 cm^3 vody. Tlumivý roztok $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera byl připraven smícháním 500 cm^3 tetraboritanu sodného a 183 cm^3 hydroxidu sodného a výsledná hodnota pH byla upravena na 10 přidáváním vody. Při přípravě toho tlumivého roztoku voda, která byla purifikovaná přístrojem Milliphore. Připravený zásobní roztok pufru byl skladován při laboratorní teplotě.

4.2.2. Zásobní roztok HyA

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství nativního hyaluronanu a ten byl následně rozpuštěn asi v 80 cm^3 pufru. Po dokonalém rozpuštění hyaluronanu byl objem upraven pomocí odměrné baňky na 100 cm^3 . Všechny zásobní roztoky hyaluronan byly uchovávány v lednici při teplotě do 5°C . Zásobní roztoky hyaluronanu byly připraveny o koncentraci $5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Byl použit hyaluronan s molekulovou hmotností 106 kDa a $1,36 \text{ MDa}$.

Zásobní roztoky HyA (obě molekulové hmotnosti) byly připraveny v octanovém tlumivém roztoku, v tlumivém roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera a v roztoku $0,15 \text{ M NaCl}$.

4.2.3. Zásobní roztoky tenzidů

Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství tenzidu (CTAB a TWEEN) a ten byl rozpuštěn asi v 80 cm^3 pufru. Po dokonalém rozpuštění byl objem upraven pomocí odměrné baňky na 100 cm^3 . Všechny zásobní roztoky všech tenzidů byly uchovávány při laboratorní teplotě. Zásobní roztoky CTAB o koncentraci $5\cdot 10^{-3}$ a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a TWEEN o koncentraci $1\cdot 10^{-3}$ a $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byly připraveny v octanovém tlumivém roztoku, v tlumivém roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ podle Batese a Bowera a v roztoku $0,15 \text{ M NaCl}$.

4.2.4. Určení CMC CTAB a TWEEN v pufrech

Nejdříve byla navržena vhodná koncentrační řada CTAB (resp. TWEEN), v jejímž rozsahu se vyskytuje předpokládaná hodnota kritické micelární koncentrace. Do každé vialky bylo napipetováno $40 \mu\text{l}$ zásobního roztoku pyrenu o koncentraci $2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, výsledná koncentrace pyrenu ve vialkách byla $2\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Po odpaření acetonu byl do vialek přidáváno potřebné množství tenzidu CTAB (resp. TWEEN) a na závěr byly vialky doplněny

pufrem na objem 4 cm^{-3} (octanový tlumivý roztok nebo tlumivý roztok $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera). Vzorky byly před samotným měřením míchány po dobu 24 hodin.

4.2.5. Zjišťování CMC CTAB a TWEEN v přítomnosti HyA v pufrech

Měření bylo prováděno s dvěma typy nativního hyaluronanu – 106 kDa a 1,36 MDa. Všechny zásobní roztoky, tedy roztoky CTAB, TWEEN i hyaluronanu byly namíchány v octanovém tlumivém roztoku i tlumivém roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera. Koncentrace pyrenu v měřených vzorcích byla $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Příprava vzorků probíhá vždy stejným způsobem: nejprve bylo do vialek napipetováno potřebné množství pyrenu, po odpaření rozpouštědla, bylo přidáno potřebné množství tenzidu CTAB (resp. TWEEN), následně byl do vialek přidán 1 cm^{-3} HyA o výsledné koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a molekulové hmotnosti 106 kDa nebo 1,36 MDa. Nakonec byly vzorky doplněny pufrem (octanový tlumivý roztok nebo tlumivý roztok $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$ podle Batese a Bowera) na objem 5 cm^{-3} . Než bylo provedeno samotné měření, byly vzorky míchány 24 hodin.

4.2.6. Zjišťování vlivu pH na chování CTAB a TWEEN v přítomnosti HyA

Vzorek pro měření vlivu pH byl připraven tak, že bylo do uzavíratelné nádoby o objemu 100 cm^3 napipetováno potřebné množství pyrenu, tak aby výsledná koncentrace pyrenu ve vzorku byla $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a poté bylo odpařeno rozpouštědlo. Do odměrné baňky o objemu 100 cm^3 bylo odpipetováno potřebné množství tenzidu CTAB (TWEEN) a HyA o molekulové hmotnosti 106 kDa (1,36 MDa) a molekulové koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a odměrná baňka byla doplněna po rysku roztokem 0,15 M NaCl a tento roztok byl přelit do nádoby s pyrenem. Takto připravený vzorek byl před samotným měřením míchán po dobu 24 hodin.

Zásobní roztoky tenzidů CTAB o koncentraci $5 \cdot 10^{-3}$ a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a TWEEN o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ a $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a HyA byly připraveny v roztoku 0,15 M NaCl.

Samotné měření bylo prováděno tak, že vzorek v nádobě byl umístěn na míchačku a byl do něho ponořen pH-metr. Na pH-metru byla zjištěna hodnota pH a při dané hodnotě pH bylo proměřeno fluorescenční spektrum, pokud byl vzorek zakalen, bylo proměřeno také absorpční spektrum. Poté byl vzorek vrácen zpět, byla upravena hodnota pH a celý postup se opakoval. Hodnota pH byla upravována pomocí HCl do kyselé oblasti a pomocí NaOH do zásadité oblasti.

4.3. Měření absorpčních a fluorescenčních spekter pyrenu

Měření fluorescenčních spekter bylo prováděno na přístroji Luminiscence spektrometr AMINCO-Bowan Series 2 s xenonovou (150W) a zábleskovou (7W) lampou, byla použita kyveta o optické dráze 1 cm. Teplota cely s kyvetou byla udržována na hodnotě 25°C pomocí oběhového termostatu Grant s externím chlazením.

Nastavení fluorimetru pro měření s pyrenem:

emisní sken: excitační monochromátor = 335 nm (excitační vlnová délka), 360-530 nm (rozsah vlnových délek, ve kterém bylo měření prováděno), 4/4 (velikost štěrbin fluorimetru, tzv. bandpass pro excitace/emise), $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ (rychlost jakou bylo měření prováděno).

Při měření byl sledován první pík (hodnota fluorescence při vlnové délce asi 373 nm), třetí pík (hodnota fluorescence při vlnové délce asi 383 nm) a excimer (hodnota fluorescence při vlnové délce 470 nm)

excitační sken: emisní vlnová délka = 392 nm, 310-350 nm (rozsah vlnových délek, ve kterých bylo měření prováděno), 4/4 (velikost štěrbinu fluorimetru, tzv. bandpass pro excitace/emise), 5 nm·s⁻¹ (rychlost jakou bylo měření prováděno). Při měření byla sledována fluorescence při vlnové délce 333 a 338 nm.

Měření absorpčních spekter bylo prováděno na přístroji UV-VIS spektrometru Varian typ Cary 50 Probe. Absorpční spektra se měřila v rozsahu 200-800 nm s krokem 1 nm a rychlostí 400 nm·s⁻¹.

4.4. Vyhodnocení

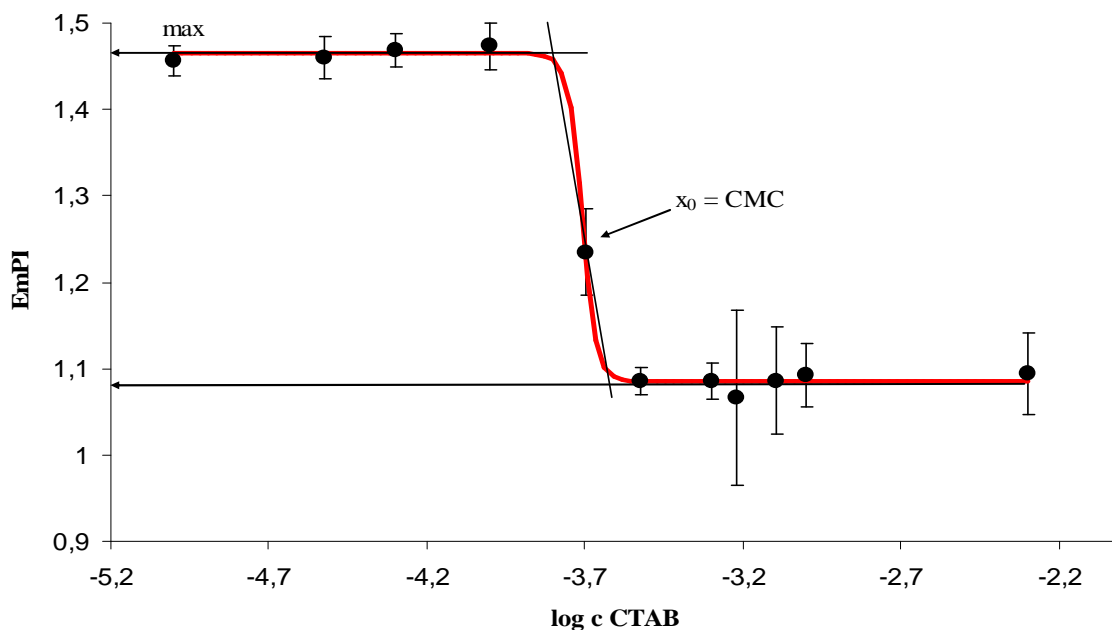
4.4.1. Stanovení kritické micelární koncentrace

Kritická micelární koncentrace se určuje ze závislosti emisního polaritního indexu, excitačního polaritního indexu a poměru excimeru ku monomeru na koncentraci tenzidu. Emisní polaritní index (EmPI) je dán poměrem intenzity fluorescence při vlnové délce 373 nm ku intenzitě fluorescence při vlnové délce 383 nm. Excitační polaritní index (ExPI) je dán poměrem intenzity fluorescence při vlnové délce 333 nm ku intenzitě fluorescence při vlnové délce 338 nm. E:M (excimer ku monomer) poměr intenzit fluorescencí při vlnové délce 470 nm ku intenzitě fluorescence při vlnové délce 373 nm.

EmPI, ExPI a E:M se vynášejí do grafu v závislosti na měnící se koncentraci tenzidu (určování CMC) nebo na měnícím se pH (vliv pH). Grafy pro určování CMC se prokládají Boltzmanovou sigmoidní křivkou, která má tvar:

$$ExPI(EmPI) = \frac{\max - \min}{1 + e^{\frac{x-x_x}{\Delta x}}} + \min$$

kde max a min jsou horní a dolní limity sigmoidy, x je koncentrace tenzidu, x_x je inflexní bod sigmoidy a Δx je gradient.



Obr. 8. Charakteristické parametry Boltzmannovy sigmoidní křivky

4.4.2. Korekce intenzity fluorescence

Korekce je nutné provádět u vzorků, které jsou zakalené. Korekce se provádí výpočtem, ale je nutné k tomu mít data z UV-VIS spektrometru.

Vzorec pro výpočet korekcí:

$$F_{kor} = F_{obs} \cdot 10^{0,5(A_{EX} - A_{EM})}$$

kde F_{obs} je fluorescence při určité vlnové délce, A_{EX} je absorbance při excitované vlnové délce sondy (v případě pyrenu při 335 nm) a A_{EM} je absorbance při vlnové délce, která je korigována.

4.5. Stanovení chyby měření

Většina měření na určování CMC byla prováděna třikrát, proto jsou závislosti v grafech uváděné jako průměrné hodnoty všech tří měření. Průměrná hodnota byla určena pomocí funkce PRŮMĚR v programu MS EXCEL. V grafech jsou také uvedeny chybové úsečky, které byly určeny jako směrodatná odchylka pomocí funkce SMODCH v programu MS EXCEL. Měření na vliv pH byla prováděna jen jednou.

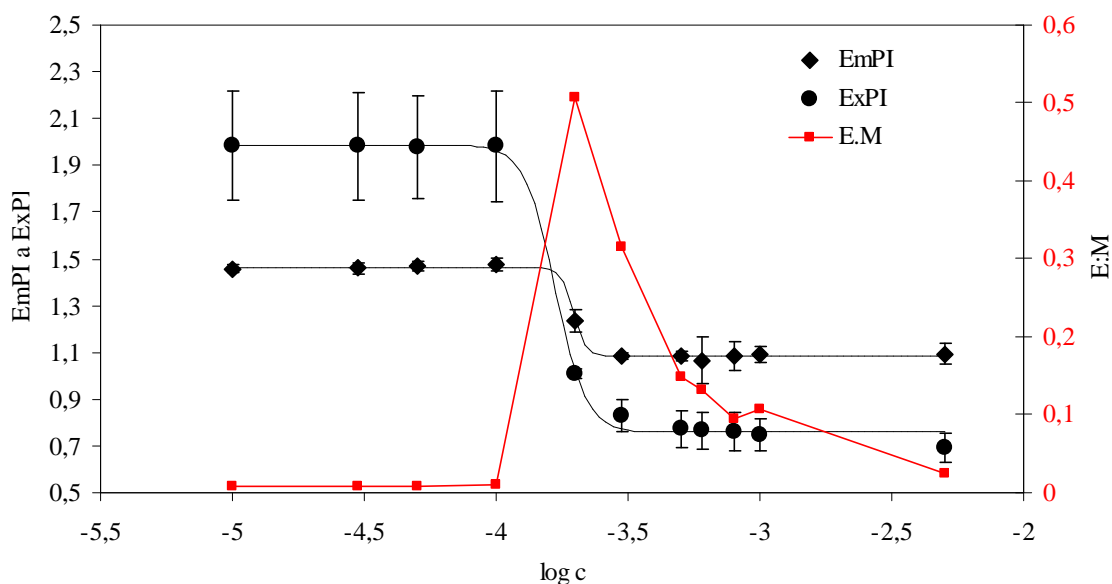
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Pokud chceme léčit nemoci, které mají pH různé od normálních hodnot pH v lidském těle, je nutné znát vliv pH na použité léčivo. V našem případě uvažujeme o léčbě pomocí cílených nosičů, ve kterých je uloženo léčivo. Jako cílený nosič uvažujeme systém složený z hyaluronanu a tenzidu, z tohoto důvodu je nutné zjistit kritickou micelární koncentraci tenzidu v přítomnosti a bez přítomnosti hyaluronanu při různých hodnotách pH, následně je nutné zjistit jaký vliv má pH na agregáty hyaluronan-tenzid při měnícím se pH.

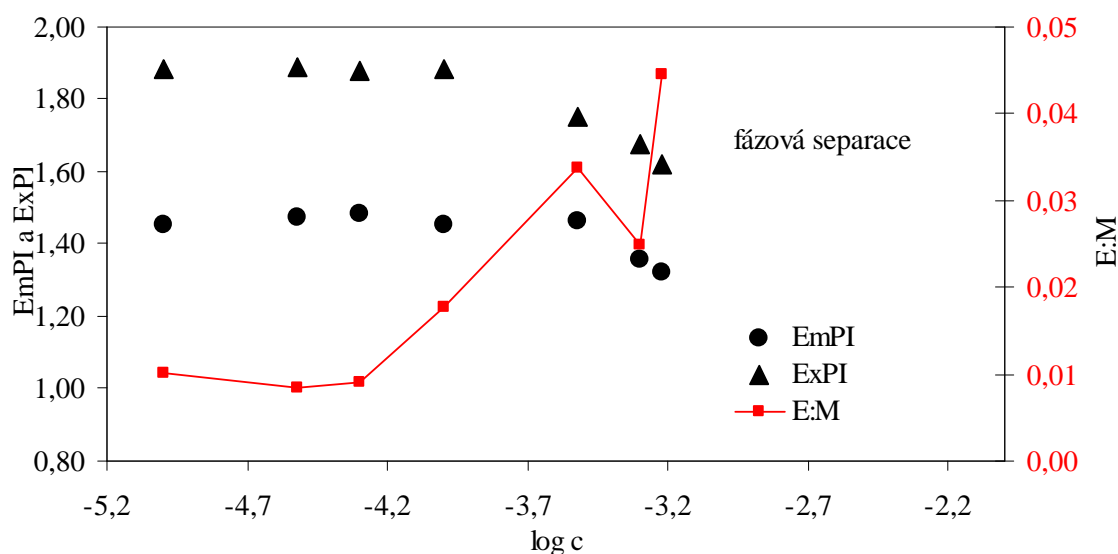
V experimentální části byla nejdříve navržena koncentrační řada a byla stanovena kritická micelární koncentrace tenzidu CTAB (resp. TWEEN) v pufrch při pH 4,6 a při pH 10 v přítomnosti a bez přítomnosti HyA. Následně byly určeny 2 koncentrace tenzidů, při kterých byl měřen vliv pH. Koncentrace tenzidů byly určeny tak, aby jedna koncentrace byla blízká CMC a druhá koncentrace byla stonásobkem CMC. Koncentrace blízká hodnotě CMC byla volena proto, aby bylo zjištěno, jaký je vliv pH na agregaci, jestli micel ubývá nebo přibývá, což by bylo vidět změnou velikosti hodnoty intenzity fluorescence excimeru, a hodnota stonásobku CMC tenzidu, byla volena proto, aby bylo zjištěno jaký vliv má pH na samotný systém. Předpokládá se, že v blízkosti hodnoty CMC je v systému nejvíce agregátů. Systémy, ve kterých koncentrace tenzidu několikanásobně překračuje hodnotu CMC, obsahují kromě agregátů také volné micely.

Závislosti $EmPI$ a $ExPI$ byly prokládány Boltzmanovou sigmoidní křivkou, ze které následně byla zjištěna hodnota CMC. Závislost $E:M$ nemůže být proložena žádnou funkcí, protože tato závislost nebyla dosud matematicky popsána, hodnota CMC byla určena z maxima poměru excimeru ku monomeru. Takto určená hodnota CMC je pouze orientační.

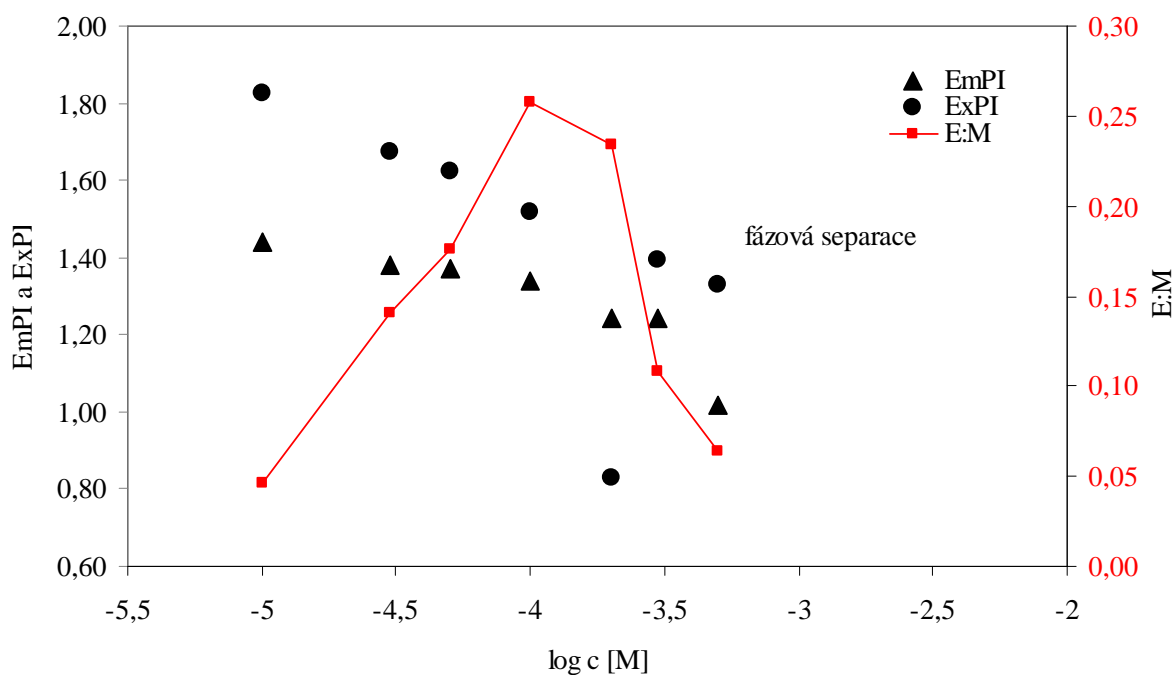
5.1. Hodnoty CMC CTAB



Graf 1: Graf závislosti $EmPI$, $ExPI$ a $E:M$ na logaritmu koncentrace CTAB v pufru při pH 4,6



Graf 2: Graf závislosti $EmPI$, $ExPI$ a $E:M$ na logaritmu koncentrace CTAB v přítomnosti HyA 106 kDa a koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v pufru při pH 4,6



Graf 3: Graf závislosti $EmPI$, $ExPI$ a $E:M$ na logaritmu koncentrace CTAB v přítomnosti HyA 1,36 MDa a koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v pufru při pH 4,6

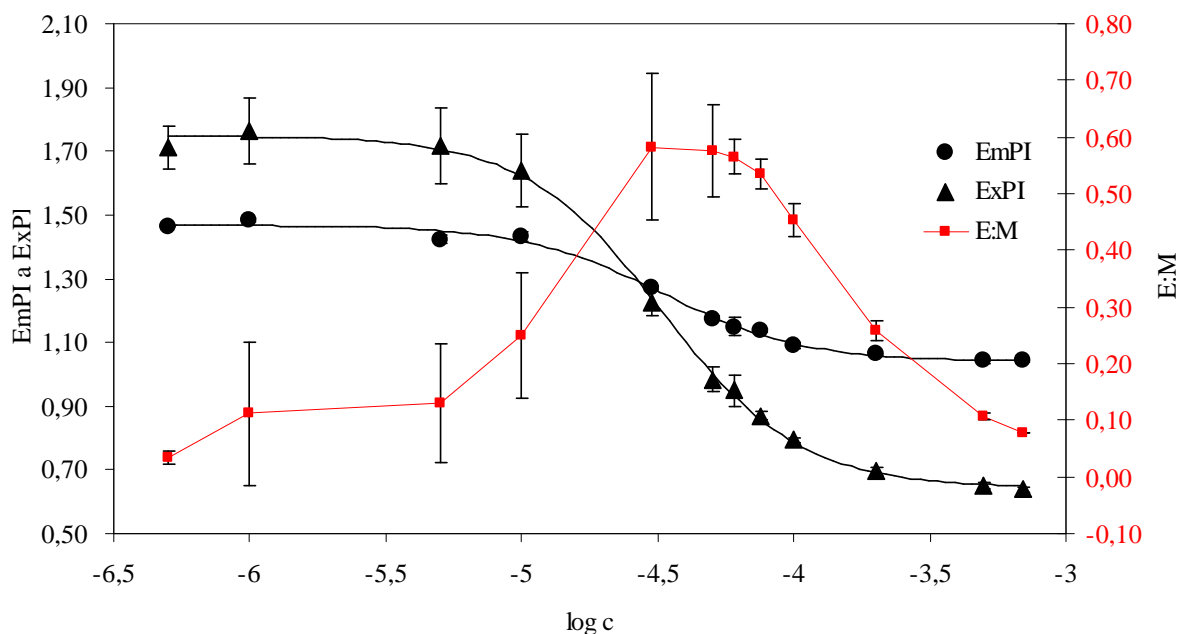
V grafech 1-3 jsou uvedeny závislosti hodnot $EmPI$, $ExPI$ a $E:M$ na logaritmu koncentrace CTAB při pH 4,6. Z grafů vyplývá, že po přidání hyaluronanu dochází od určitých koncentrací ionogenního kationaktivního tenzidu CTAB k fázové separaci. Z roztoků se na mezifázovém rozhraní vytváří gely. K fázové separaci dochází při hodnotě pH 4,6 a 10 a také k ní dochází v přítomnosti hyaluronanu o molekulové hmotnosti 106 kDa i 1,36 MDa. Všechny naměřené hodnoty CMC CTAB byly uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Hodnoty CMC CTAB v pufru při pH 4,6 a 10

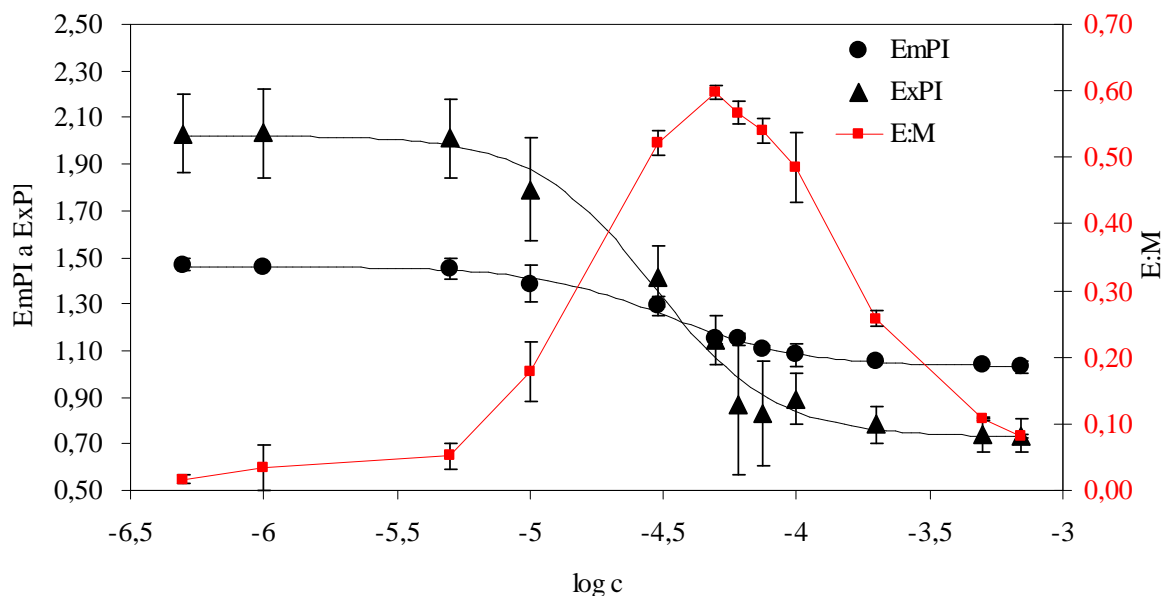
pH	systém	CMC (mM)		
		EmPI	ExPI	E:M
4,6	CTAB/pufr	0,195	0,167	0,2
10	CTAB/pufr	0,2892	0,2991	0,3
koncentrace fázové separace (mM)				
4,6	CTAB+HyA 106 kDa/pufr		0,3	
	CTAB+HyA 1,36 MDa/pufr		0,3	
10	CTAB+HyA 106 kDa/pufr		0,05	
	CTAB+HyA 1,36 MDa/pufr		0,05	

Z naměřených hodnot CMC CTAB uvedených v Tabulce 1, je vidět rozdílné chování CTAB v pufru v přítomnosti a bez přítomnosti hyaluronanu při pH 4,6 a 10. Je zajímavé, že hodnota CMC CTAB v pufru bez přítomnosti hyaluronanu je nižší při pH 4,6 než při hodnotě pH 10. U systému CTAB v pufru v přítomnosti hyaluronanu docházelo k fázové separaci dříve, než mohla být stanovena hodnota CMC. Při pH 10 docházelo k fázové separaci dříve než při pH 4,6.

5.2. Hodnoty CMC TWEEN



Graf 4: Graf závislosti $EmPI$, $ExPI$ a $E:M$ na logaritmu koncentrace TWEEN v přítomnosti HyA 106 kDa a koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v pufru při pH 4,6



Graf 5: Graf závislosti $EmPI$, $ExPI$ a $E:M$ na logaritmu koncentrace TWEEN v přítomnosti HyA 1,36MDa a koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v pufru při pH 4,6

V grafech 4 a 5 jsou uvedeny závislosti $EmPI$, $ExPI$ a $E:M$ na logaritmu koncentrace TWEEN v pufru při pH 4,6. Při měřeních nedocházelo k fázovým separacím po přidání hyaluronanu jak tomu bylo u tenzidu CTAB. Bylo to pravděpodobně způsobeno tím, že TWEEN je neionogenní tenzid a jako takový reaguje s hyaluronanem na základě vodíkových můstků nebo hydrofobních interakcí, kdežto CTAB reaguje s hyaluronanem iontově. Všechny hodnoty CMC TWEEN byly zaznamenány v Tabulce 2.

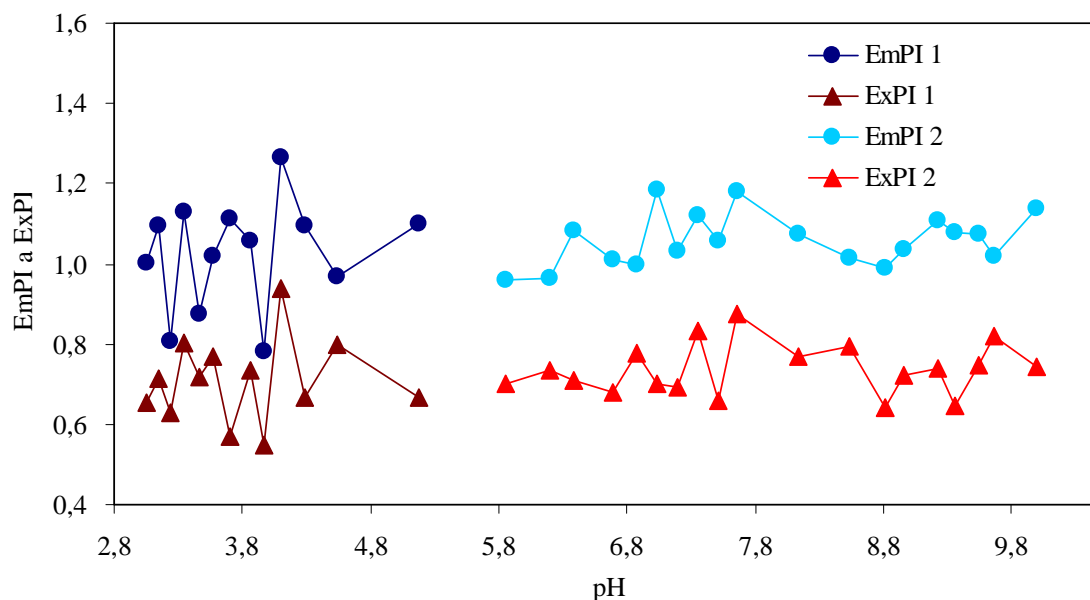
Tabulka 2. Hodnoty CMC TWEEN v pufru při pH 4,6 a 10

pH	systém	CMC (μM)		
		EmPI	ExPI	E:M
4,6	TWEEN/pufr	19,8	22,8	30-75
	TWEEN+HyA 106 kDa/pufr	31,5	28,6	30-60
	TWEEN+HyA 1,36 MDa/pufr	33,1	29,1	50
10	TWEEN/pufr	37,0	31,1	60
	TWEEN+HyA 106 kDa/pufr	34,3	29,7	75
	TWEEN+HyA 1,36 MDa/pufr	32,1	29,1	60

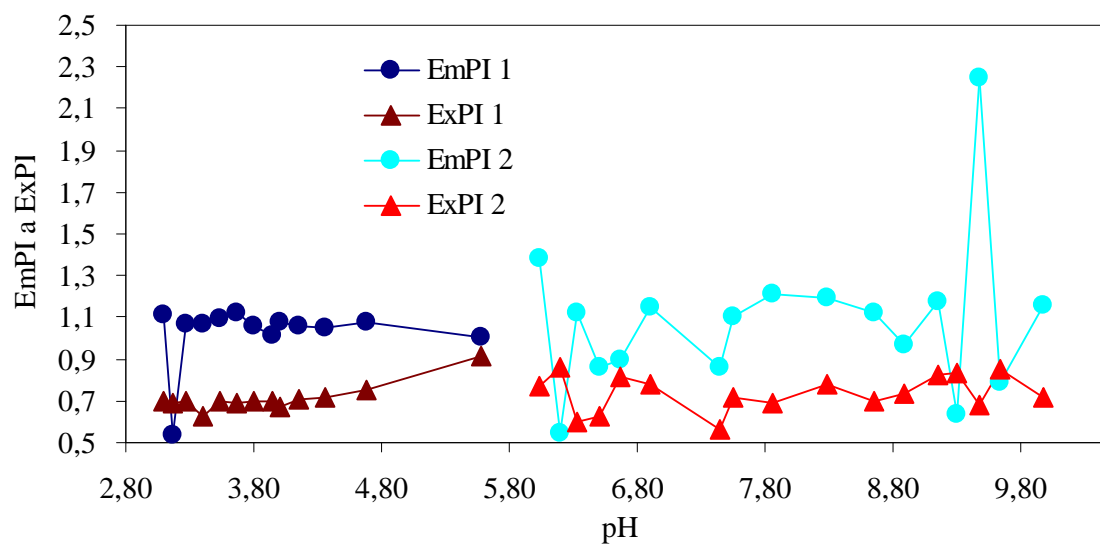
Z Tabulky 2. můžeme vyčíst, že hodnoty CMC TWEEN jsou si ve všech případech velmi podobné. Výjimku tvoří pouze měření CMC TWEEN v pufru při pH 4,6. Je zajímavé, že hodnoty CMC zjištěné pomocí poměru $E:M$ jsou dvojnásobkem hodnoty CMC zjištěné z emisního a excitačního polaritního indexu. Hodnoty poměru $E:M$ byly odečítány z grafů, pokud v grafu nebylo možné určit maximum poměru $E:M$, byl poměr určen jako rozsah hodnot, ve kterých se maximum dané závislosti nachází.

5.3. Vliv pH na agregáty CTAB a HyA

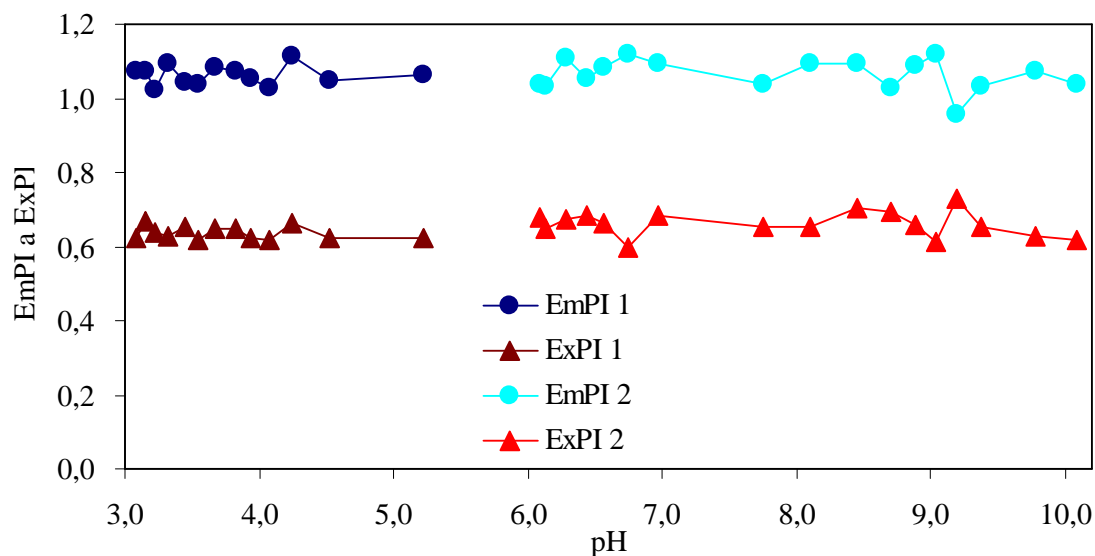
Pro každé měření vlivu pH musely být namíchány 2 vzorky, k jednomu se přidávala HCl a pH se posouvalo do kyselé oblasti a ke druhému se přidával roztok NaOH a pH bylo měněno do alkalické oblasti. Dva výchozí roztoky vzorků musely být voleny také proto, že výchozí hodnota pH byla 5-6.



Graf 6: Graf závislosti EmPI a ExPI na pH pro CTAB o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M v přítomnosti HyA 106 kDa o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v NaCl



Graf 7: Graf závislosti EmPI a ExPI na pH pro CTAB o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M v přítomnosti HyA 1,36 MDa o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v NaCl

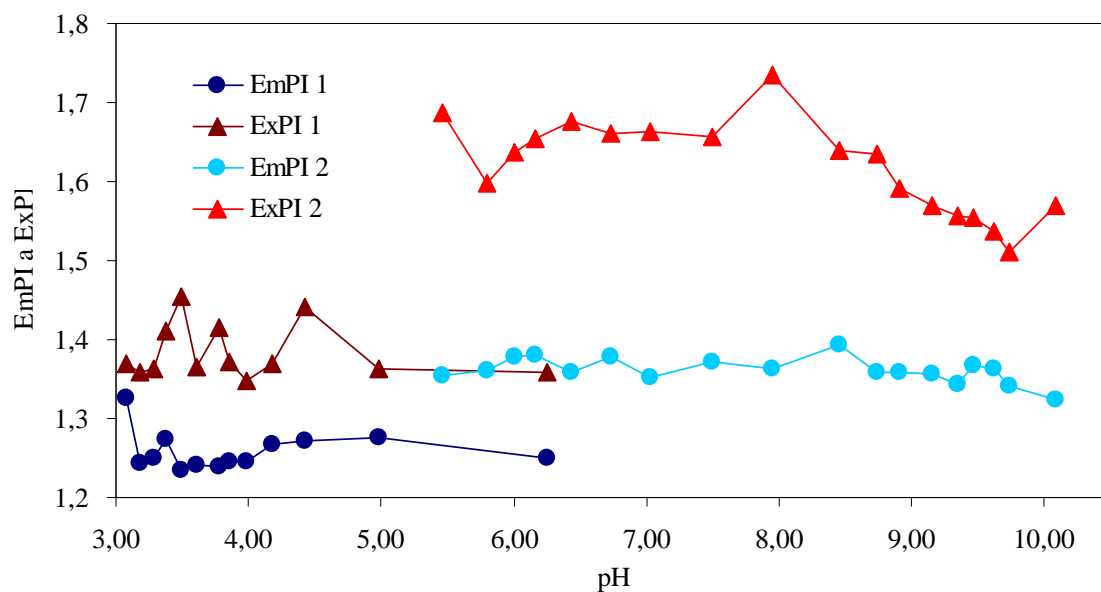


Graf 8: Graf závislosti EmPI a ExPI na pH pro CTAB o koncentraci 0,05 M v přítomnosti HyA 106 kDa o koncentraci 1 g·l⁻¹ v NaCl

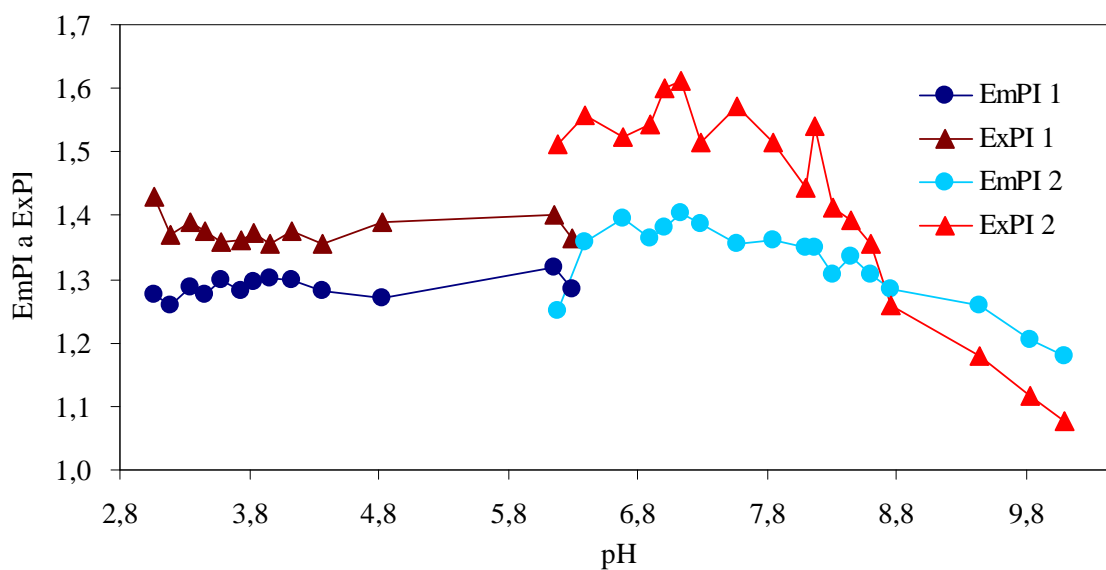
Stanovení vlivu pH na agregaci CTAB o koncentraci 0,05 M v přítomnosti HyA 1,36 MDa bylo prováděno vizuálně, protože došlo k fázové separaci a vyloučení gelu na mezifázovém rozhraní. Fluorimetrické měření může být prováděno pouze s roztoky, ve kterých je přítomen nějaký fluorofor, v tomto případě pyren. Pyren byl rozpuštěn v gelu, který se vyloučil ze vzorků, tudíž při měření nedocházelo k dostatečné odezvě intenzity fluorescence ani po zvětšení citlivosti měření. Vizuálně bylo zjištěno, že změna pH má minimální vliv na zkoumaný roztok. Snížením pH na hodnotu 3 se gel stal čirým a nepatrně se rozpustil, což je způsobeno degradací hyaluronanu. Zvýšením pH na hodnotu 10 gelu nepatrně ubylo. V obou případech byl roztok nad gelem čirý.

V grafech 6-8 je vynesena závislost EmPI a ExPI na pH roztoku. Z grafů je patrné, že vliv pH na agregaci hyaluronan-CTAB není výrazný. I když grafy vykazují různé charakteristiky, tak po bližším prozkoumání je patrné, že hodnoty poměrů se liší řádově v desetínách (v jednom případě) v ostatních případech je rozmezí do 5 desetín hodnot poměrů.

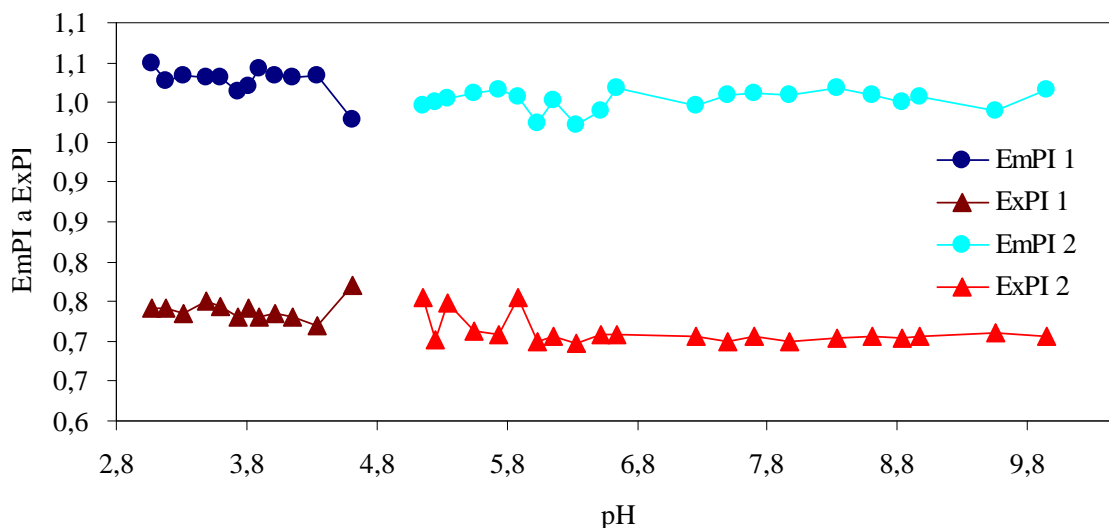
5.4. Vliv pH na agregáty TWEEN a HyA



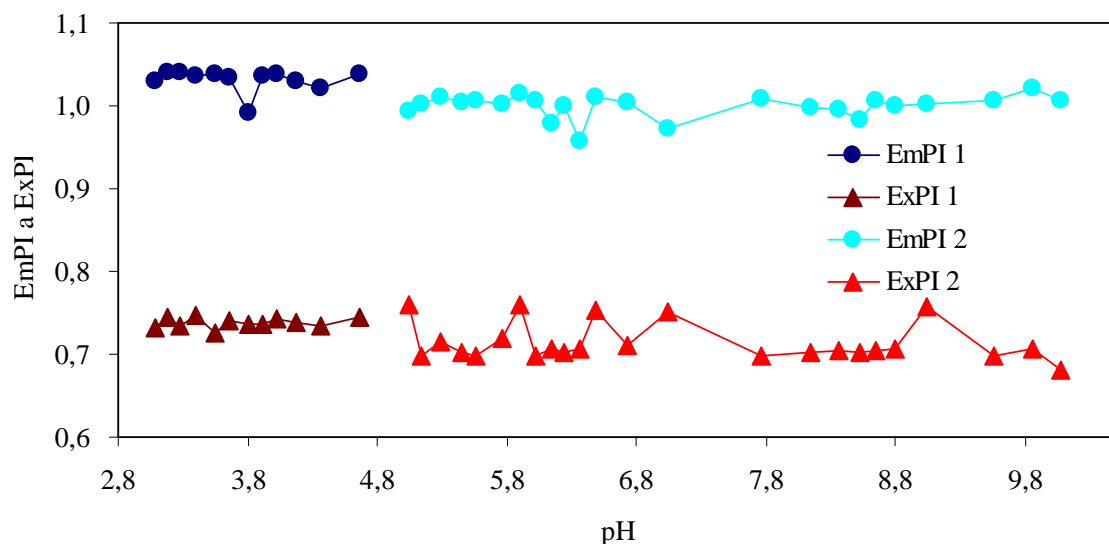
Graf 9: Graf závislosti EmPI a ExPI na pH pro TWEEN o koncentraci $4 \cdot 10^{-5} M$ v přítomnosti HyA 106 kDa o koncentraci $1 g \cdot l^{-1}$ v NaCl



Graf 10: Graf závislosti EmPI a ExPI na pH pro TWEEN o koncentraci $4 \cdot 10^{-5} M$ v přítomnosti HyA 1,36 MDa o koncentraci $1 g \cdot l^{-1}$ v NaCl



Graf 11: Graf závislosti EmPI a ExPI na pH pro TWEEN o koncentraci $4 \cdot 10^{-3} M$ v přítomnosti HyA 106 kDa o koncentraci $1 g \cdot l^{-1}$ v NaCl



Graf 12: Graf závislosti EmPI a ExPI na pH pro TWEEN o koncentraci $4 \cdot 10^{-3} M$ v přítomnosti HyA 1,36 MDa o koncentraci $1 g \cdot l^{-1}$ v NaCl

V grafech 9-12 jsou vyneseny závislosti EmPI a ExPI na pH roztoku. V grafech 9 a 10 byla koncentrace TWEEN blízká hodnotě CMC, kdežto v grafech 11 a 12 byla koncentrace TWEEN stonásobkem hodnoty CMC. V grafech 9 a 10 na sebe závislosti EmPI a ExPI pro kyselou a alkalickou oblast nenavazují a hodnoty poměrů EmPI a ExPI jsou v širším rozsahu hodnot než je tomu v grafech 11 a 12. V grafech, ve kterých je koncentrace neionogenního tenzidu TWEEN blízká hodnotě CMC, jsou závislosti EmPI a ExPI na pH pro alkalickou oblast o dvě desetiny vyšší než pro kyselou oblast.

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na sledování vlivu pH na systémy polyelektrolyt-tenzid. Cílem práce bylo zpracovat literární rešerši na téma sledování vlivu pH na systém polyelektrolyt-tenzid a v rozsahu pH odpovídajícím fyziologickým podmínkám. Z těchto literárních poznatků měla být navržena vhodná metodika pro sledování těchto systémů. V této bakalářské práci byly sledovány dva systémy, v obou systémech byl jako vhodný elektrolyt zvolen nativní hyaluronan. V prvním systému byl jako tenzid zvolen ionogenní kationaktivní tenzid cetyltrimethylamonium bromid, ve druhém systému byl zvolen neionogenní tenzid TWEEN 20.

Systémy polyelektrolyt-tenzid byly sledovány pomocí fluorescenční spektroskopie, za použití fluorescenční sondy – pyrenu. Systém byl sledován dvěma způsoby. Nejprve byly navrženy koncentrační řady, ve kterých se měnila koncentrace tenzidu ve vzorku. Pomocí těchto koncentračních řad byla zjištěna kritická micelární koncentrace jednotlivých tenzidů při pH 4,5 a 10 v prostředí pufru a poté i za přítomnosti hyaluronanu. Při měřeních byly použity dvě molekulové hmotnosti hyaluronanu a to 106 kDa a 1,36 MDa, ve všech měřeních byl hyaluronan o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Bylo zjištěno, že hodnoty CMC CTAB v pufru bez přítomnosti HyA jsou při pH 4,5 nižší než při pH 10. Zajímavé je, že po přidání HyA, ať už o molekulové hmotnosti 106 kDa nebo 1,36 MDa, se začal ve vzorcích tvořit gel při hodnotě pH 10 při nižší koncentraci tenzidu než při hodnotě pH 4,6. Vzorky s přídavkem hyaluronanu nemohly být proměřeny, protože pyren, na jehož základě je měření založeno, byl absorbován v gelu a ne rozptýlen v roztoku, tudíž nedocházelo k dostatečné intenzitě fluorescence. Tvorba gelu po přidání hyaluronanu může být způsobeno tím, že CTAB je ionogenní kationaktivní tenzid a jako takový nese kladný náboj. Hyaluronan neboli sodná sůl kyseliny hyaluronové, nese záporný náboj. CTAB nese opačný náboj než hyaluronan a díky tomu by se dala předpokládat silnější interakce, než je tomu například při interakci hyaluronanu s neionogenním tenzidem TWEEN.

Hodnoty CMC TWEEN v jednotlivých prostředích se od sebe příliš nelišily, výjimku tvoří pouze hodnota CMC TWEEN v pufru při pH 4,5, která byla asi poloviční oproti ostatním hodnotám CMC. Zajímavé je, že hodnoty CMC TWEEN zjištěné pomocí poměru intenzity excimeru ku monomeru jsou asi dvojnásobkem hodnot CMC zjištěných z poměrů emisního i excitačního polaritního indexu.

Po zjištění hodnot CMC tenzidů mohl být sledován vliv pH. Vliv pH na agregáty hyaluronan-tenzid byl sledován na vzorcích o objemu 100 cm^3 . Objem vzorků musel být tak veliký, aby nedocházelo ke zředování roztoků přídavkem činidla pro snižování nebo zvyšování pH. Snižování pH bylo prováděno pomocí HCl a zvyšování pomocí NaOH. Byly použity dvě koncentrace tenzidů a to koncentrace blízká CMC a její stonásobná hodnota, u hyaluronanu byly opět použity dvě molekulové hmotnosti, 106 kDa a 1,36 MDa, koncentrace hyaluronanu v roztoku byla $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Z měření je patrné, že pH nemá příliš velký vliv na agregáty hyaluronan-tenzid. V kyselé oblasti nebyl prokázán žádný vliv, ať už se jednalo o ionogenní kationaktivní tenzid CTAB nebo neionogenní tenzid TWEEN. V alkalické oblasti už to tak jasné není. U vzorků CTAB je zřejmé že pH vliv na agregáty nemá, kdybychom závislosti EmPI a ExPI na pH pro kyselou a alkalickou oblast proložily rovnoběžkami s osou x , tak bychom zjistili, že tyto rovnoběžky na sebe navazují.

Protože vzorek o vyšší koncentraci CTAB a vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu hned po namíchání vytvořil gel, byla závislost pH na tyto agregáty studována pouze vizuálně. Vizuálním pozorováním nebyly zjištěny žádné změny oproti výchozím roztokům. Pokud má pH vliv na tento systém, pak není tento vliv dostatečně veliký na to, aby byl spatřen pouhým okem.

Vzorky TWEEN o koncentraci blízké CMC a hyaluronanu obou molekulových hmotností, jsou zajímavé tím, že hodnoty EmPI a ExPI jsou v alkalické oblasti posunuty o jednu až dvě desetiny nad hodnoty EmPI a ExPI v kyselé oblasti. Při vyšší koncentraci TWEEN již na sebe hodnoty EmPI a ExPI navazují. Pokud zanedbáme fakt, že se hodnoty EmPI a ExPI vzájemně liší, můžeme prohlásit, že pH nemá výrazný vliv na agregáty hyaluronan-TWEEN.

V této bakalářské práci bylo dosaženo všech stanovených cílů. Bylo zjištěno, že pH nemá vliv na agregáty hyaluronan-tenzid. Bylo také zjištěno, že výchozí pH těchto systémů není okolo hodnoty 7, jak by se dalo předpokládat, ale je mírně kyselé, okolo hodnoty 5-6. Z tohoto důvodu by bylo vhodné změřit agregační číslo při konkrétních hodnotách pH.

7. REFERENCE

- [1] Sommer, L. a kolektiv: Základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s., ISBN 80-214-1742-0
- [2] Grossweiner, L. I.: Singlet oxygen: generation and preparation [online]. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW.: <www.google.com>
- [3] Principy fluorescenční spektroskopie. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.pdf>>
- [4] Optical Molecular Imaging: Fluorescence [online]. Dostupný z WWW: <www.art.ca>
- [5] Otyepkova, E., Otyepka, M.: Základy fyzikálně chemických metod [online]. 2010. Dostupný z WWW: <<http://fch.upol.cz>>
- [6] Fluorimeter Schéma [online]. Dostupný z WWW: <www.commonswikimedia.org>
- [7] Fluorofory v biomedicína [online]. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>>
- [8] Baleár, B. Molecular Fluorescence: Principles and Application. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. ISBN 3-527-29919-X
- [9] Wolszczak, M., Miller, J.: Characterization of non-ionic surfactant aggregates by fluorometric techniques. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry [online]. 2002, vol. 147, pp. 45-54. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [10] Kakehi, K., Kinoshita, M., Yasueda, S.: Hyaluronic acid: separation and biological implications. Journal of chromatography B [online]. 2003, vol. 797, pp. 347-355. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [11] Mlčochová, P., et al.: Preparation and characterization of biodegradable alkyl ether derivatives of hyaluronan. Carbohydrate Polymers [online]. 2007, vol. 69, pp. 344-352. [cit. 8.4.2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [12] Benda, V., a kolektiv: Biologie I. vyd. 7., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1996, 316 s., ISBN 80-7080-269-3
- [13] Pouchlý, J.: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. vyd. 2., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. 198 s., ISBN 80-7080-422-X
- [14] Martovská, L., Šišková, M. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/obsah.html>
- [15] Müllerová, M., Šváb, M., Moreira Dos Santos, M.: Měření kritické micelární koncentrace tenzidů ve vodných roztocích [online]. Chemické listy 101. 2007. 509-514 [cit. 8.4.2011]. Dostupný z WWW: <www.google.com>
- [16] Rudge, S., et al.: Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC). Journal of Controlled Release [online]. 2001, vol 74, pp. 335-340. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [17] Kang, B., et al.: Radiation synthesis and magnetic properties of novel Co_{0.7}Fe_{0.3}/Chitosan compound nanoparticles for targeted drug carrier. Radiation Physics and Chemistry [online]. 2007, vol 76, pp. 968-973. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [18] Pope-Harman, A., et al.: Biomedical nanotechnology for cancer. Medical clinics of north America [online]. 2007, vol 91, pp. 899-927. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>

- [19] Jones, M. Ch., Perouc, J. Ch.: Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 1999, vol 48, pp. 101-111. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [20] Wang, Y., et al.: Materializing sequential killing of tumor vasculature and tumor cells via targeted polymeric micelle system. *Journal of controlled release* [online]. 2011, vol 149, pp. 299-306. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [21] Kedar, U., et al.: Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2010, vol. 6, pp. 714-729. [cit. 8. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [22] Nyström, B., et al.: Characterization of polyelectrolyte features in polysaccharide systems and mucin. *Journal Advances in Cykloid and Interface Science* [online]. 2010, vol. 158, pp. 108-118. [cit. 12. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [23] Schreml, S., et al.: Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2010, vol. 63, pp. 866-881, [cit. 14. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [24] Signy, B., Pal, L.: Development of Sterculia gum based wound dressings for use in drug delivery [online]. 2008, vol. 44, pp. 3222-3230, [cit. 14. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <www.sciencedirect.com>
- [25] Gerweck, L. E., et al.: Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2006, s. 1275-1279. [cit. 12. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://mct.aacrjournals.org/>>

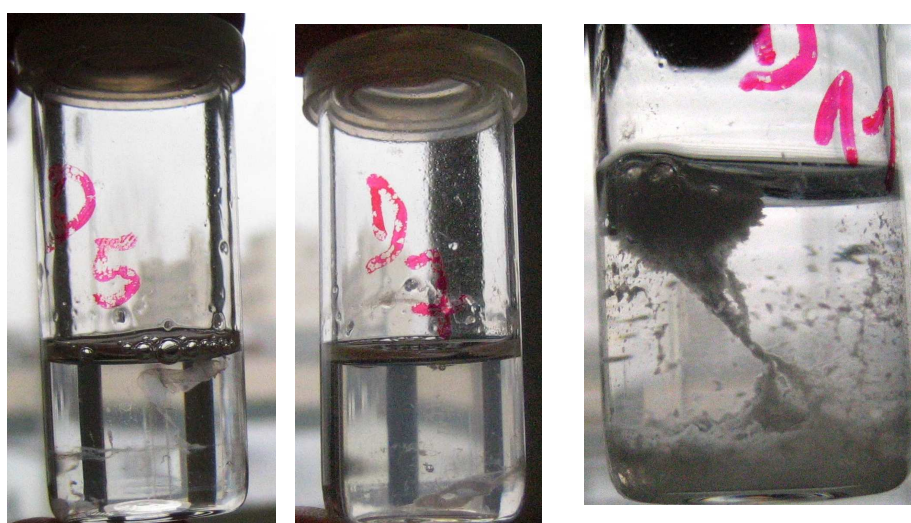
8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CMC	kritická micelární koncentrace
HyA	hyaluronic Acid – kyselina hyaluronová
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
TWEEN	polyoxyethylen
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitační polaritní index
E:M	excimer ku monomer
M	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Da	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, jednotka, která se používá zejména v biochemii
CPC	cetylpyridium chlorid
PAL	povrchově aktivní látky
NMR	nukleární magnetická resonance
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra

9. PŘÍLOHY



Příloha 1. Vyloučený gel na mezifázovém rozhraní vzorku obsahující 0,05; 0,5 a 1 mM CTAB a 106 kDa HyA při pH 10



Příloha 2. Vyloučený gel na mezifázovém rozhraní a v roztoku vzorku obsahující 0,2; 0,5 a 5 mM CTAB a 1,36 MDa HyA při pH 10