



**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

**NOVÉ AMFIFILNÍ IONTOVÉ PÁRY PRO PŘÍPRAVU  
VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ**

NEW AMPHIPHILIC ION PAIRS FOR THE PREPARATION OF VESICULAR SYSTEMS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Martina Strnadová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1670/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Martina Strnadová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Nové amfifilní iontové páry pro přípravu vezikulárních systémů

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na používané složky iontových amfifilních párů pro přípravu vezikulárních systémů s přehledem vlastností, výhod a metod studia.
- 2) Na základě rešerše zvolit metody studia amfifilního páru Septonex–SDS a prostudovat možnosti přípravy vezikul na bázi tohoto systému.
- 3) Zhodnotit a porovnat získané parametry daného systému s rešerší.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

-----  
Martina Strnadová  
student(ka)

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

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

V Brně dne 1.2.2021

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

## **ABSTRAKT**

Táto práca sa zaoberá prípravou novo vytvorených vezikulárnych systémov. Cieľom práce je vytvorenie čo najstabilnejšieho systému a nájsť najoptimálnejší pracovný postup pri jeho výrobe. Parametre ktoré sa porovnávali, boli energia použitá na dispergáciu, molárne percento pridaného cholesterolu a druh použitého dvojreťazcového kladne nabitého tenzidu. Celý systém bol tvorený záporne nabitým tenzidom dodecylsulfátom sodným a kladne nabitým tenzidom septonexom. Každý systém bol porovnávaný v čase na určenie stability na základe veľkosti častíc, zeta potenciálu a zakalenia roztoku. Metódou dynamického rozptylu svetla boli získané hodnoty hovoriace o veľkosti častíc a koeficientu polydisperzity, hodnoty zeta potenciálu boli získané za pomoci elektroforetického rozptylu svetla. Výsledky práce prezentujú najvhodnejšie parametre ultrazvukovej dispergácie, molárneho zastúpenia cholesterolu a použitého kataniónového tenzidu. Na základe týchto parametrov je možné vytvoriť systém, ktorý je dlhodobo fyzikálne stabilný, vďaka čomu sa môže takýto systém využiť v budúcnosti pre ďalšie aplikácie.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Kataniónové vezikuly, septonex, cholesterol, stabilita, ultrazvuková dispergácia, dynamický rozptyl svetla, zeta potenciál, koeficient polydisperzity

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis is focused on the preparation of the new vesicular systems. The aim of this work is to create the most stable system and find out the most optimal working method for its production. The compared parameters were the energy used for dispersion, the molar percentage of cholesterol added, and the type of double-stranded positively charged surfactant. The whole system consisted of negatively charged surfactant sodium dodecyl sulfate and positively charged surfactant septonex. Each system was compared over time to determine stability based on the size of the particle, zeta potential, and turbidity of the solution. By the method of dynamic light scattering, particle size and polydispersity coefficient were measured. On the other hand, the zeta potential was determined by electrophoretic light scattering. The result of the thesis presents the most suitable parameters of ultrasonic dispersion, the molar proportion of cholesterol, and the use of cationic surfactant. Based on these parameters, it is possible to create a physically stable system for a long period of time, thanks to which such a system can be used in the future for other applications.

## **KEY WORDS**

Catanionic vesicles, septonex, cholesterol, stability, ultrasonic dispersion, dynamic light scattering, zeta potential, polydispersity index

STRNADOVÁ, Martina. *Nové amfifilní iontové páry pro přípravu vezikulárních systémů* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131411>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

## **PREHLÁSENIE**

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

.....  
podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Na tomto mieste by som rada poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce doc. Ing. Filipovi Mravcovi, PhD. za možnosť vypracovať prácu pod jeho vedením a za ochotu a čas, ktorý mi venoval pri konzultáciách. Veľké ďakujem patri Ing. Martine Havlíkové za jej strávený čas a pomoc pri práci v laboratóriu, ako aj pri spracovávaní bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať rodine a priateľom za ich podporu pri štúdiu.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>8</b>
2.1 Tenzidy.....	8
2.1.1 Septonex.....	8
2.1.2 Dodecylsulfát sodný (SDS).....	9
2.1.3 Kladne nabité dvojreťazcové tenzidy .....	9
2.2 Micelárne koloidy .....	11
2.2.1 Solubilizácia.....	11
2.3 Vezikuly .....	12
2.3.1 Kataniónové vezikulárne systémy .....	13
2.3.2 Stabilizácia vezikúl .....	14
2.4 Ultrazvuková dispergácia.....	15
2.5 Dynamický rozptyl svetla .....	15
2.6 Elektroforetický rozptyl svetla (ELS) .....	16
<b>3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>18</b>
3.1 Príprava katiónových vezikul s kladne nabitým surfaktantom .....	18
3.2 Charakterizácia katiónových vezikúl .....	19
<b>4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>22</b>
4.1 Chemikálie .....	22
4.2 Zhrnutie cieľov práce .....	22
4.3 Príprava vezikulárnych systémov .....	23
4.3.1 Príprava zásobného prášku IPA .....	23
4.3.2 Príprava kladne nabitých kataniónových vezikul .....	23
4.4 Použité metódy.....	23
4.4.1 Ultrazvuková dispergácia.....	23
4.4.2 Stanovenie veľkosti častíc a zeta potenciál.....	24
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSIA</b> .....	<b>25</b>
5.1 Vplyv energie dispergácie na stabilitu systému .....	25
5.2 Vplyv cholesterolu na stabilitu systému .....	29
5.3 Vplyv dĺžky dvojreťazcového tenzidu .....	32
<b>6 ZÁVER</b> .....	<b>36</b>
<b>7 LITERATÚRA</b> .....	<b>38</b>
<b>8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV</b> .....	<b>42</b>
<b>9 PRÍLOHA</b> .....	<b>43</b>
9.1 Výsledky vplyvu dispergácie na stabilitu systému .....	43
9.2 Výsledky vplyvu cholesterolu na stabilitu systému .....	44

# 1 ÚVOD

Vezikula sa dá definovať ako štruktúra jednej alebo viacerých membrán. Každá takáto membrána tvorí akúsi hranicu medzi dvoma kvapalnými fázami. Zloženie membrány môže byť rôznorodé. V dnešnej dobe sa využívajú na prípravu membrán hlavne lipidy, avšak, pomaly sa do popredia dostávajú aj rôzne polyméry či tenzidy. Prostredie, v ktorom sa nachádzajú, je väčšinou vodné a preto aj jednotlivé časti vezikuly rozdeľujeme podľa afinity prostredia na hydrofilné a hydrofóbne. Keďže príprava vezikúl z lipidov je pomerne finančne náročná, v posledných rokoch sa pozornosť začína opierať o stále nové a nové možnosti. Jednou z nich sú práve *kataniónové vezikulárne systémy*. Tieto systémy sú tvorené z kationovej a aniónovej časti povrchovo aktívnych látok. Časti sú pri sebe držané prostredníctvom elektrostatických interakcií medzi polárnymi skupinami. Táto sila znižuje voľnú energiu systému a po odstránení protiónov vzniká amfifilný ionónový pár IPA (z anglického *ion pair amphiphile*).

Zatiaľ najviac preskúmanou a preštudovanou kombináciou IPA je spojenie tenzidov HTMA-DS. Podľa poznatkov o tejto kombinácii tenzidov môžeme predpokladať, že kombináciou podobných tenzidov dostaneme požadované výsledky. Táto práca sa zameriava na vytvorenie nového systému, ktorý doposiaľ nie je preskúmaný. Našou snahou bolo vytvoriť stabilný systém v kombinácii dvoch opačne nabitých tenzidov, a to z kladne nabitého septonexu a záporne nabitého SDS.

Cieľom práce bolo stanoviť krátkodobú a dlhodobú stabilitu nami vytvorených kataniónových vezikulárnych systémov. Vďaka meniacim sa parametrom ako je rôzna hodnota dispergačnej energie, molárne zastúpenie cholesterolu a rozličná dĺžka kladne nabitého dvojreťazcového tenzidu, sme boli schopní optimalizovať podmienky pre prípravu stabilného vezikulárneho systému. Ako metóda na zisťovanie stability bol použitý dynamický rozptyl svetla a elektroforetický rozptyl svetla. Pri časovom rozpätí sme sledovali a porovnávali, ako sa mení veľkosť častíc a zeta potenciál. Tieto hodnoty vypovedali o tom, či je systém polydisperzný alebo homodisperzný a teda, aká je jeho stabilita v čase.

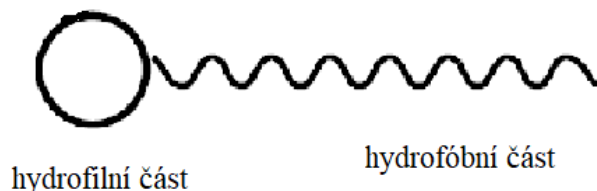
## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Tenzidy

Tenzidy (povrchovo aktívne látky, PAL) sú látky organického pôvodu, ktoré sa už pri nízkej koncentrácii hromadia na fázovom rozhraní. Pod pojmom rozhranie rozumieme hranicu medzi dvoma nemiesiteľnými fázami. Vďaka tomuto hromadeniu sa znižuje celková energia sústavy [1]. U tenzidov vieme rozlíšiť dve časti. Hydrofilnú, polárnu hlavičku a hydrofóbnou, nepolárnu časť, ktorá obsahuje dlhý uhl'ovodíkový reťazec (Obr. 1). V polárnom prostredí bude hydrofilná časť smerovať vždy k rozpúšťadlu a naopak hydrofóbná časť sa bude snažiť o čo najmenší kontakt s týmto prostredím [2]. Vďaka tejto vlastnosti môžeme tenzidy deliť podľa ich hydrofilnej časti na neiónové a iónové. Iónové ďalej rozdeľujeme na aniónové (napríklad mydlá, soli mastných kyselín alebo dodecylsírán sodný), kationové (napríklad súčasť ošetrovacích prostriedkov) a amfotérne (napríklad dimetylalkylamin) [2].

Najstarší a zároveň najpoužívanejší zástupca aniónových tenzidov je mydlo; sodná soľ vyšších karboxylových kyselín. V bežnom živote ho najčastejšie nachádzame v toaletných a práškových mydlách, ale v malom množstve sa vyskytuje aj v práškových pracích prostriedkoch, kde má funkciu odpeňovača. Ďalšie významné aniónové tenzidy sú napríklad sulfosukcináty, isothionáty, tauridy a pod [2].

Kationové tenzidy sa vyskytujú v avivážnych prostriedkoch, majú výrazný mikrobicídny efekt a uplatňujú sa ďalej v kondicionerových prípravkoch do vlasov. Sú ťažšie biologicky rozložiteľné oproti aniónovým tenzidom. Ak dochádza k vzájomnému kombinovaniu kationových a aniónových tenzidov, molekula obsahuje iónické a neiónické časti. Pričom zaistiť rozpustnosť aglomerátu vo vodnom prostredí je hlavnou úlohou neiónickej časti [2].



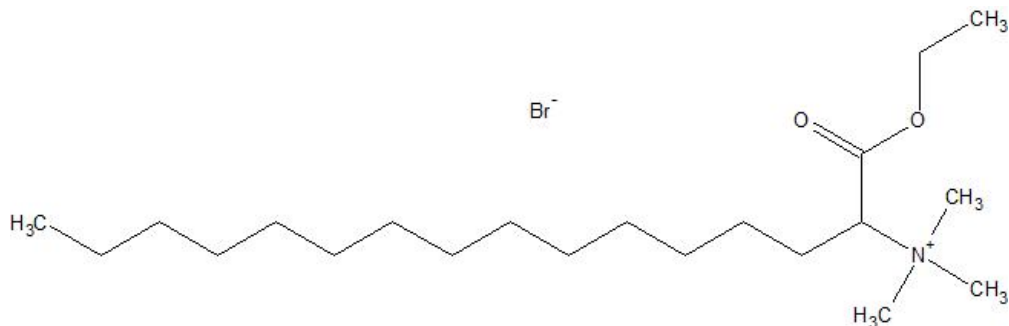
Obr. 1: Základná štruktúra tenzidu.

#### 2.1.1 Septonex

Karbetopendecinium bromid (septonex) je biely kryštalický prášok, ktorý sa dobre rozpúšťa vo vode a organických rozpúšťadlách [3]. Septonex je tvorený hydrofóbnou časťou, uhlíkovým reťazcom a hydrofilnou hlavou, ktorá je tvorená kvartérnym amínom (viz. Obr. 2). Je to kationový tenzid, vo vode má kladný náboj. Jeho molekulárna hmotnosť predstavuje 422,5 g/mol [4].

Septonex obsahuje povrchovo aktívnu dezinfekčnú látku - bromid karbetopendecín. Má výrazne baktericídny účinok na gram pozitívne baktérie, avšak jeho účinok sa neprejavuje na samotné spóry. Jeho účinnosť je najvyššia v neutrálnych alebo slabo alkalických roztokoch. Používa sa na dezinfekciu drobných kožných poranení, alebo ako dezinfekcia pooperačných jaziev. Ophthalmo-septonex nachádza svoje využitie ako dezinfekčný prostriedok pri akútnych

a chronických nehnisavých a hnisavých zápaloch spojoviek a pri niektorých formách povrchových zápaloch rohovky [3].

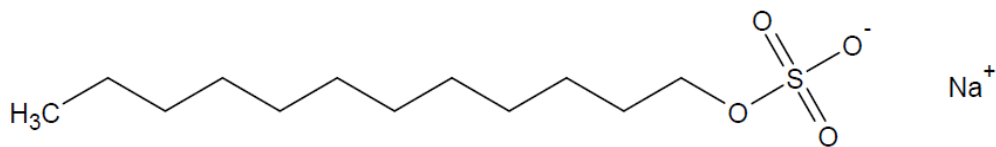


Obr. 2: Štruktúra septonexu.

### 2.1.2 Dodecylsulfát sodný (SDS)

Dodecylsulfát sodný, alebo laurylsulfát sodný, je jeden z najlepšie preskúmaných a najviac používaných aniónových tenzidov. Hydrofóbná časť sa skladá z 12 uhlíkového reťazca a hydrofóbná hlavička, ktorá je záporne nabitá, vďaka sulfátovej skupine. Molárna hmotnosť SDS je 288,372 g/mol [5]. Štruktúra SDS je zobrazená na Obr. 3.

Väčšinou sa vyskytuje vo forme bieleho prášku. Vo veľkej miere našiel svoje uplatnenie ako agent čistiacich prostriedkov a produktov pre domácnosť, kde sa môžu uplatniť jeho detergentné vlastnosti [6].



Obr. 3: Štruktúra SDS.

### 2.1.3 Kladne nabité dvojreťazcové tenzidy

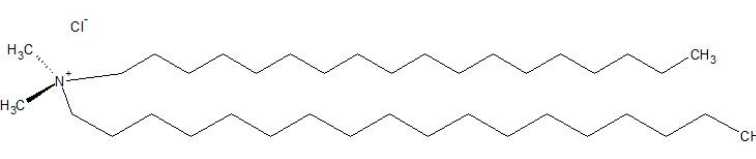
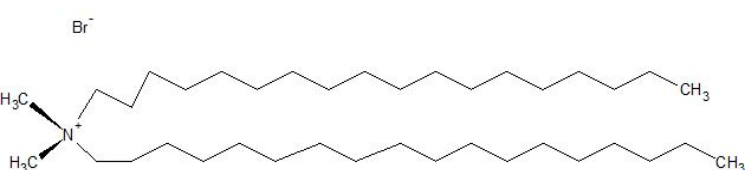
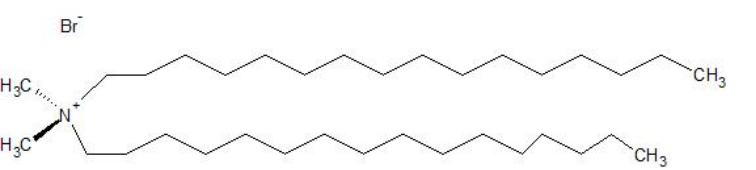
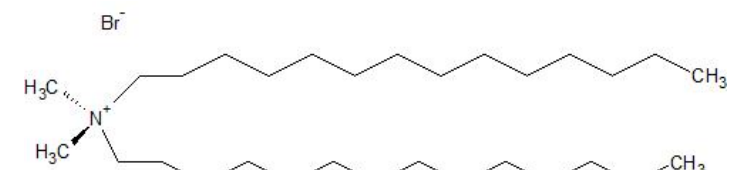
Samotná kombinácia dvoch opačne nabitých tenzidov tvorí systém, ktorý sám o sebe nie je úplne stabilný. Jedným zo spôsobov ako zvýšiť stabilitu vezikulárneho systému je prídanie aditíva, najčastejšie kladne nabitého dvojreťazcového tenzidu. Jedným z najpoužívanejších kladne nabitých dvojreťazcových tenzidov je dimetyldioctadecylamónium chlorid (C18-C18Cl) [8].

Dioktadecyldimethylamonium chlorid, skrátene DODAC, je dvojreťazcová kladne nabitá povrchovo aktívna látka. Jej molekulárna hmotnosť je 586,502 g/mol [7]. Štruktúra DODAC je zobrazená na Obr. 4. Vo vode tvorí dvojmembránové vezikulárne obaly. Vo väčšine prípadov sa pridáva do roztokov tenzidov, kde vďaka svojim vlastnostiam zvyšuje stabilitu samotného roztoku [8]. Vyznačuje sa svojimi detergentnými účinkami. Vďaka tomu nachádza svoje využitie v kozmetike, vo vlasových prípravkoch alebo ako aviváž [7].

Ďalším využívaným tenzidom je dimetyldioctadecylamónium bromid (C18-C18Br). Ten sa od C18-C18Cl líši naviazaným záporným iónom, ktorý je v tomto prípade bromid (viz. Obr. 5). Jeho molekulárna hmotnosť je 630,97 g/mol. Využíva sa ako aditívum pri vytváraní vezikulárnych systémov ku zvyšovaniu ich stability [9].

Svoje využitie nachádzajú aj tenzidy, ktoré sa od seba líšia dĺžkou uhlíkového reťazca. Takýto tenzid je napríklad dimetyldipalmitylamónium bromid (C16-C16Br) s molekulárnou hmotnosťou 574,86 g/mol, ktorý má uhlíkatý reťazec tvorený 16 uhlíkmi (viz. Obr. 6) [10]. Ďalej nachádza svoje uplatnenie aj dimetyldimyristylamónium bromid (C14-C14Br) s uhlíkatým reťazcom tvoreným z 14 uhlíkov a molekulárnou hmotnosťou 518,75 g/mol (viz. Obr. 7), pričom oba tieto tenzidy sa uplatňujú ako aditíva na zvyšovanie stability vezikulárnych systémov [11].

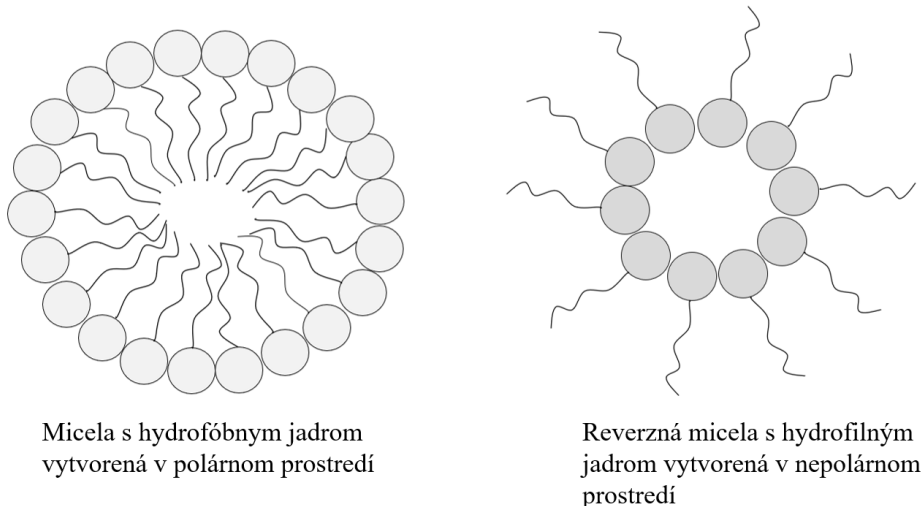
Tab. 1: Porovnanie štruktúry rôznych kataniónových tenzidov

<p>Dimetyldioctadecylamónium chlorid (C18-C18Cl)</p>	 <p>Obr. 4: Štruktúra C18-C18Cl.</p>
<p>Dimetyldioctadecylamónium bromid (C18-C18Br)</p>	 <p>Obr. 5: Štruktúra C18-C18Br.</p>
<p>Dimetyldipalmitylamónium bromid (C16-C16Br)</p>	 <p>Obr. 6: Štruktúra C16-C16Br.</p>
<p>Dimetyldimyristylamónium bromid (C14-C14Br)</p>	 <p>Obr. 7: Štruktúra C14-C14Br.</p>

## 2.2 Micelárne koloidy

Vlastnosti veľmi zriedených nízko molekulárnych látok, ktoré sú umiestnené vo vhodnom rozpúšťadle, odpovedajú pravým roztokom. S rastúcou koncentráciou sa vlastnosti látok menia a dochádza k asociácii častíc do tej miery, že sa začínajú vytvárať micely; agregáty koloidných rozmerov [12]. Koncentrácia pri ktorej začína dochádzať ku tvorbe micel sa nazýva kritická micelárna koncentrácia (CMC) z anglického *critical micellar concentration*. Asociatívne koloidy teda vznikajú samovoľným rozpúšťaním disperzného podielu vo vhodnom rozpúšťadle. Takto vytvorené micely nemusia byť stabilizované umelo. Ich koncentrácia a fyzikálne vlastnosti sú určené okamžitými stavovými veličinami [13].

Usporiadanie, teda aj samotná štruktúra micely v roztoku, závisí na charakteru použitého rozpúšťadla. V polárnom prostredí je najčastejší tvar micel guľovitý. Avšak, existujú aj iné micelárne štruktúry, napríklad laminárna alebo valcovitá. Oproti tomu v nepolárnom prostredí vznikajú takzvané reverzibilné (obrátené) micely. Polárne hlavičky potom smerujú do stredu micely, vďaka čomu vytvárajú hydrofilné jadro. Hydrofóbne uhlíkaté reťazce sú oproti tomu nasmerované do nepolárneho rozpúšťadla [14].



Obr. 8: Usporiadanie micelárnych štruktúr v závislosti od prostredia [13].

### 2.2.1 Solubilizácia

Solubilizácia je metóda, ktorá sa inak nazýva aj nepravé rozpúšťanie látok. Látka, ktorá je za normálnych okolností takmer nerozpustná, sa pomocou vhodných tenzidov rozpúšťa za vzniku koloidného roztoku. Proces solubilizácie môže byť rôzny. Nepolárne látky sa najprv dostanú do jadra micely a následne až tam dochádza k ich rozpusteniu. Polárne látky sa naopak nemusia dostať do vnútra micely, k rozpúšťaniu takýchto látok dochádza na povrchu micely, alebo v jej tesnej blízkosti [16].

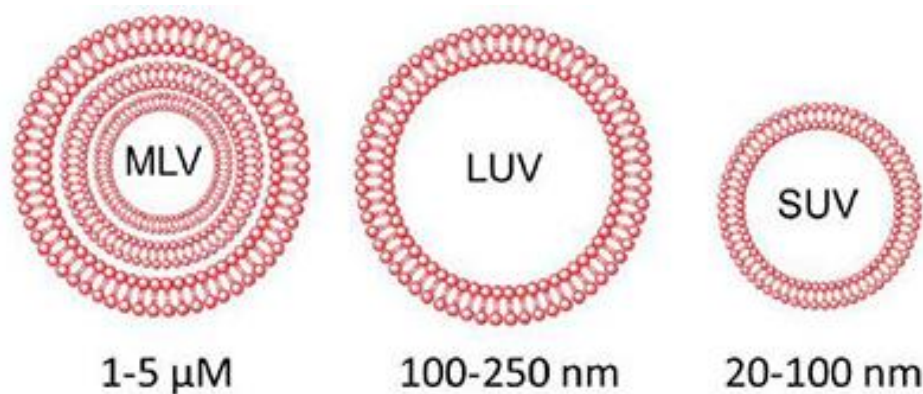
Tento proces našiel v dnešnej dobe široké uplatnenie. Vo farmaceutickom priemysle sa používa pri výrobe rôznych liečiv, v kozmetickom priemysle ako aplikácia pri výrobe kozmetických produktov. V neposlednom rade ho vieme nájsť v každodennom živote, napríklad pri praní bielizne [17].

## 2.3 Vezikuly

Vezikula je štruktúra tvorená jednou alebo viacerými dvojvrstvovými membránami. Tieto membrány tvoria akúsi hranicu medzi dvoma kvapalnými fázami. Táto hranica môže byť tvorená rôznymi zlúčeninami. Najčastejšími látkami sú lipidy, ale aj povrchovo aktívne látky (tenzidy) alebo rôzne polyméry [18].

Stavba vezikuly sa podobá na dutú guľičku a je tvorená z troch častí. Pri vzniku samotnej vezikuly dochádza k tomu, že vo vnútri uviazne voda a teda táto časť vezikuly je hydrofilná. Druhá časť je tvorená hydrofóbnymi uhlíkovými reťazcami tenzidov a tvorí celkovú membránu vezikuly. Posledná, tretia časť je hydrofilný povrch tvorený hlavičkami tenzidov [18].

Pri rôznych podmienkach existujú rôzne rozmery a štruktúry vezikúl. Podľa počtu vrstiev delíme vezikuly na unilamelárne až multilamelárne. Toto rozdelenie je znázornené na Obr.6. Multilamelárne vezikuly MLV (z angl. *Multilamellar vesicles*) obsahujú viac dvojvrstiev a veľkosť takejto vezikuly sa pohybuje v rozsahu 0,1–0,3 μm. Naopak unilamelárne vezikuly sú tvorené iba jednu vrstvu a delíme ich na LUV (*Large unilamellar vesicles*) s veľkosťou 0,1–10 μm a SUV (*Small unilamellar vesicles*) s veľkosťou ≤ 0,1 μm [19].



Obr. 9: Rozličné rozmery a štruktúry vezikul [19].

Vzťah molekulárnej štruktúry k možným supramolekulárnym nanoštruktúram a následnom vytvorení vezikuly môže byť popísaný v parametri balenia surfaktantu. Parameter balenia alebo z anglického *packing parameter* je definovaný ako objem, ktorý zaujíma hydrofóbný reťazec ( $v_0$ ) na dĺžku chvostu povrchovo aktívnej látky ( $l$ ) a  $a$  ako plocha povrchu hydrofóbného jadra agregátu vyjadrená na molekulu v agregáte [18].

$$P = \frac{v_0}{l \cdot a} \quad (1)$$

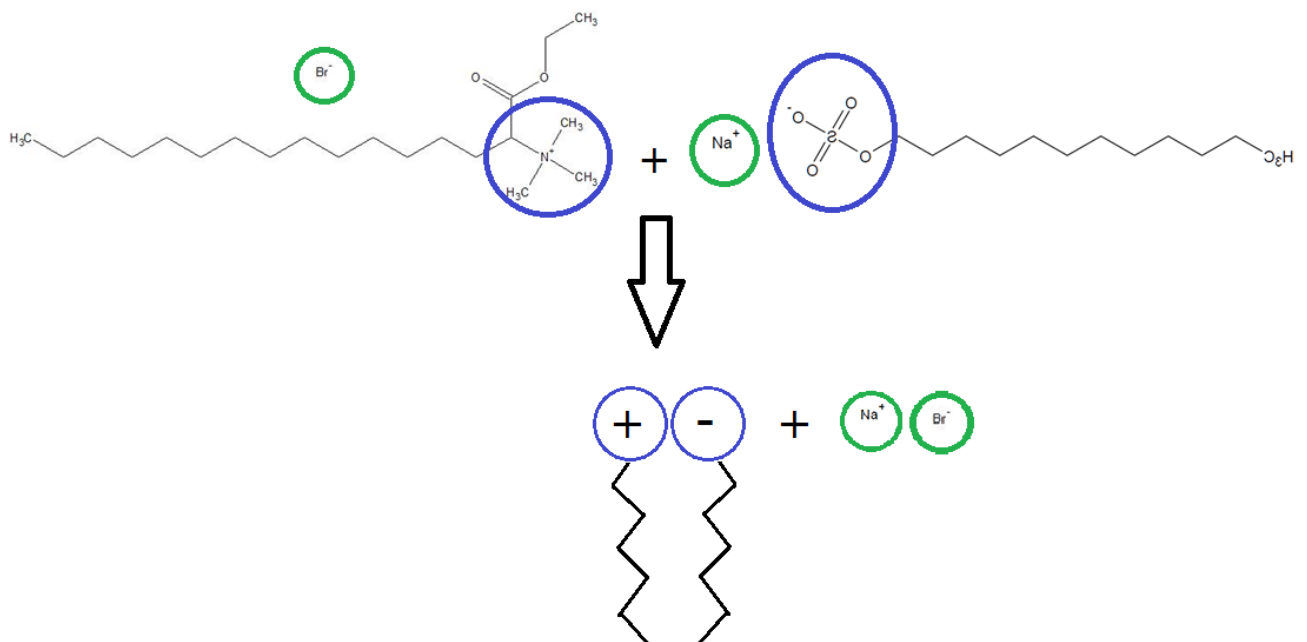
Rôzne typy vezikúl majú odlišnú funkciu a uplatnenie pri biologických procesoch. Vezikuly slúžia prevažne na transport rozličných organických látok. Sú nevyhnutnou súčasťou biologických systémov a procesov. Vďaka tomu našli svoje uplatnenie aj vo viacerých medicínskych oboroch a to hlavne ako perspektívne nosiče liečiv [20].

### 2.3.1 Kataniónové vezikulárne systémy

Vezikulárny systém, ktorý je možný vytvoriť z cholesterolu a prírodných netoxických fosfolipidov sa nazýva lipozóm. Jednotlivé vlastnosti ako veľkosť, povrchový náboj a spôsob prípravy sa líšia od použitého lipidu. Kvôli svojej veľkosti a charakteru povahy, ktorá je hydrofilná aj hydrofóbna, je tento systém sľubným riešením prepravu liečiv v dnešnej dobe, aj napriek pomerne vysokým nákladom na samotnú výrobu. Napriek tomu, že sa lipozómy ako vezikulárne systémy pripravujú a komerčne využívajú, je snaha vyvinúť podobný systém, ktorý bude ale menej finančne náročný. Ako jednou z možností sú napríklad kataniónové vezikuly [21].

Pojem kataniónové vezikuly sa v súčasnosti bežne používa pri popise vezikulárnych systémov vytvorených zmiešaním kationových a aniónových povrchovo aktívnych látok. Látky medzi sebou interagujú prostredníctvom elektrostatických interakcií medzi svojimi polárnymi skupinami (hydrofilnými hlavičkami). Interakcie, ktoré vznikajú, spôsobujú zníženie voľnej energie [22]. Dochádza k odstráneniu protiónov a výsledná molekula má neutrálny náboj a môže sa považovať za pseudo-dvojreťazcovú povrchovo aktívnu látku. Takto vytvorený systém sa nazýva amfifilný iónový pár, skrátene IPA z anglického *ion-pair amphiphile* (viz. Obr. 10) [24].

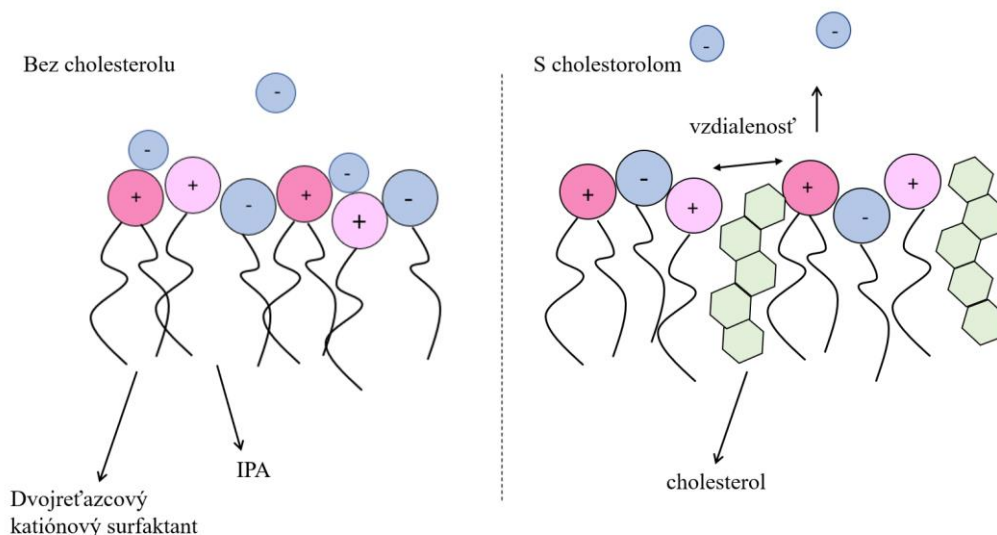
V dnešnej dobe sa už samotné lipozómy využívajú hlavne pri transporte látok. Je to možné vďaka ich pomerne dobrej stabilite a charakteru povahy, ktorá im umožňuje prenášať rôzne druhy liečiv. Náboj, ktorý je možný im priradiť, môže fungovať ako nosič DNA. Do budúca finančne menej náročné a ako nádejnou alternatívou sa javia byť tenzidy avšak, výskum v tejto oblasti sa ešte len rozbieha [25].



Obr. 10: Vznik IPA s použitím tenzidov septonex a SDS [21].

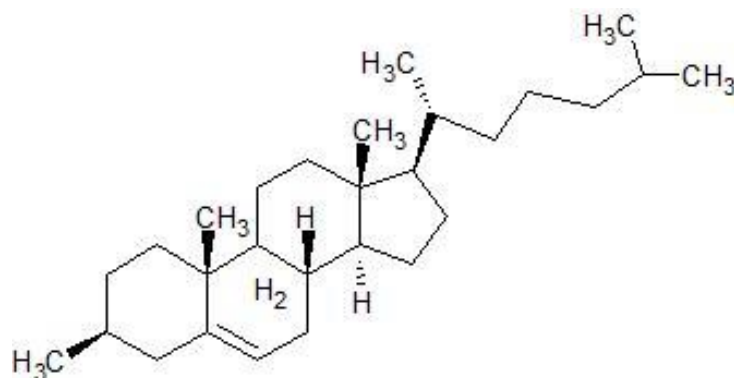
### 2.3.2 Stabilizácia vezikúl

IPA komplexy sa vyznačujú pomerne nízkou stabilitou. Na zvýšenie celkovej stability sa preto do systému pridávajú rôzne aditíva. Pod pojmom aditíva sa rozumejú napríklad povrchovo aktívne látky, cholesterol alebo rôzne alkoholy. Na Obr. 11 je možno vidieť ako sa mení stavba a samotná stabilita IPA komplexu po pridaní cholesterolu. V závislosti na type IPA komplexu a typu aditíva sa mení pomer ich koncentrácií [26].



Obr. 11: Štruktúra dvojvrstvy bez prítomnosti a s prítomnosťou cholesterolu [28].

Najpoužívanejším aditívom je cholesterol. Cholesterol je organická molekula steroidnej povahy, tvorí dôležitú stavebnú zložku bunkových membrán, u človeka ho nachádzame v každej bunke. Vďaka svojej prítomnosti zabezpečuje správnu priepustnosť a tekutosť membrány. Taktiež slúži ako prekursor biosyntézy steroidných hormónov, žlčových kyselín a vitamínu D [27].



Obr. 12: Štruktúra cholesterolu.

Ak sa do systému pridá cholesterol, pri určitej koncentrácii dokáže vďaka svojim vlastnostiam zvýšiť vzdialenosť medzi nabitými hlavnými skupinami molekúl, ktoré tvoria vezikulu. Zároveň zníži schopnosť protiiónového viazania sa, čo má za následok výraznejší nábojový charakter vezikuly. Sterolový kruh, ktorý cholesterol tvorí zasa maximalizuje svoj kontakt so susednými uhlíkovými reťazcami, čo sa prejaví v zlepšení mechanickej pevnosti vezikulovej dvojvrstvy (Obr. 12). Vďaka týmto vlastnostiam cholesterol nielen

zlepšuje intervezikulárnu elektrostatickú odpudivosť, avšak je schopný upravovať intramolekulové balenie, čo má za následok zlepšenie celkovej fyzikálnej stability vezikúl [28].

Ďalším spôsobom ako zvýšiť stabilitu systému je pridanie výhodnejšieho dvojreťazcového kataniónového tenzidu. Rôzne tenzidy majú rôzne dlhé reťazce a práve ich veľkosť hovorí o tom, ako sa na systém budú viazať a ako budú následne ovplyvňovať jeho stabilitu. Dá sa predpokladať, že na väčšie molekuly sa budú lepšie viazať také tenzidy, ktoré majú kratšie reťazce a naopak. Kvôli týmto poznatkom sme schopní upraviť pracovný postup tak, aby mal výsledný systém najlepšiu stabilitu [39].

## 2.4 Ultrazvuková dispergácia

Jedná sa o metódu, ktorá slúži k dezintegrácii buniek, homogenizácii systému, dispergácii vzoriek a k samotnému ultrazvukovému čisteniu. Ultrazvuková dispergácia sa dá nájsť aj pod inými názvami ako napríklad ultrazvuková homogenizácia alebo sonifikácia. Metóda funguje na princípe vytvorenia ultrazvukového poľa o vysokej intenzite a amplitúde, ktoré sa sondou prenáša do roztoku. Dochádza k redukcii častíc, čo má za následok väčšiu rôznorodosť systému a lepšiu stabilitu vzoriek [29].

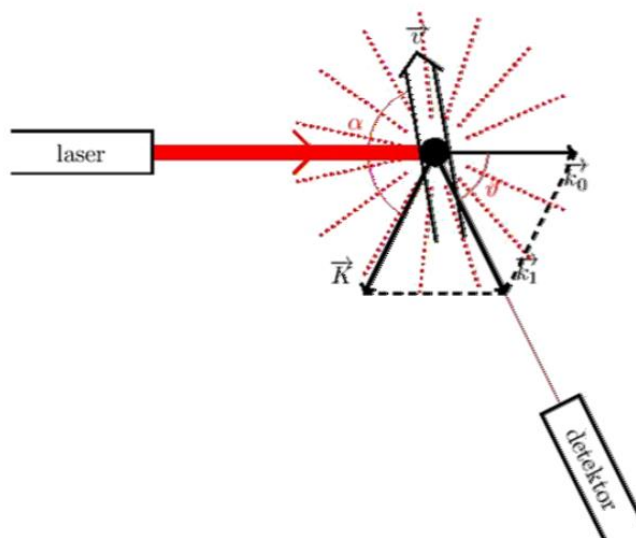
Ultrazvuková dispergácia má široké uplatnenie. Využíva sa najmä k narušeniu bunecných membrán a k uvoľneniu obsahu z bunky. Pri vezikulárnych systémoch sa použitím ultrazvukovej energie menia multilamerálne vezikuly (MLV) na unilamerálne (SUV) [30].

## 2.5 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (Dynamic Light Scattering), taktiež DLS, je neinvazívna metóda. Rýchlosť pohybu častice závisí na jej veľkosti. Každá častica prijme rovnaké množstvo tepelnej energie, ktorú premení na kinetickú energiu. Čím je častica väčšia, potrebuje na svoj pohyb viac energie a preto nedosahuje rovnakú rýchlosť, ako častica s menším polomerom. Vďaka tomuto javu sme schopní určiť profil distribúcie veľkosti častíc v polymerných roztokoch a suspenziách [31].

Táto metóda nie je náročná na inštrumentáciu. Na začiatku je monochromatický svetelný zdroj (laser) smerovaný cez polarizátor na vzorku. Svetlo, ktoré sa pri prechode laseru rozptýli, prechádza cez sekundárny polarizátor, kde sa zbiera na fotonásobiči. Výsledný obraz je prenesený na obrazovku a záznam sa ukazuje v počítači [32].

Molekuly vzorky po zasiahnutí žiarením rozptýlia svetlo na všetky rôzne smery (viz. Obr. 13). Pri tomto jave sa pozorujú dve interferencie: konštruktívne (viditeľné oblasti) a deštruktívne (tmavé oblasti). Meranie prebieha v krátkych časových intervaloch a výsledná sada škvŕn sa analyzuje, porovnáva sa intenzita svetla na rôznych miestach v určitom časovom horizonte [32].



Obr. 13: Princíp DLS metódy [32]

DLS metóda sa v súčasnosti využíva na charakterizáciu častíc ako sú proteíny, polyméry, micely, vezikuly, gély a pod. Ak nie je systém rozptýlený podľa veľkosti, je možné vypočítať efektívny priemer častíc. Samotné meranie je závislé na veľkosti povrchových štruktúr, koncentrácii častíc v roztoku, type iónov v médiu, ale aj na veľkosti jadra častice. Taktiež sa dá určiť difúzny koeficient častice vďaka meraniu kolísania intenzity rozptýleného svetla. Podľa počtu populácií ktoré sa v systéme nachádzajú, rozdeľujeme ich na monodisperzné (jedna populácia) a polydisperzné (viac ako jedna) [31].

Určovanie stability systému je jedna z ďalších vlastností, ktoré sa dajú vďaka tejto metóde zmerať. Meranie častíc v závislosti na čase môže ukázať, či tieto častice v priebehu nejakého časového intervalu agregujú, mení sa hydrodynamický pomer častice. Niektoré zariadenia sú schopné zistiť stabilitu aj iným spôsobom, napr. v závislosti na teplote [31].

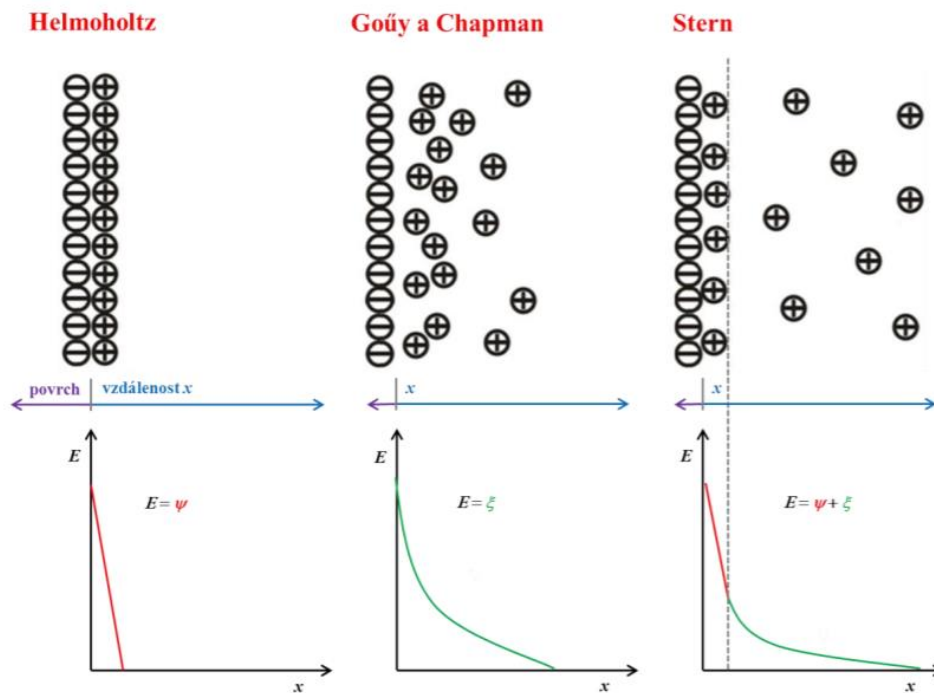
## 2.6 Elektroforetický rozptyl svetla (ELS)

Keď sa nachádzajú v roztoku častice ktoré majú náboj, postupne sa k nim približujú opačne nabití ióny, aby celkový náboj vyrovnali. Vďaka tomuto procesu sa vytvára takzvaná elektrická dvojvrstva. To ako taká dvojvrstva vyzerá a aké má rozloženie náboja, nám ukazujú tri modely[33].

Prvý model navrhol v roku 1879 Hermann von Helmholtz. Tento model bol jednoduchý a skladal sa z dvoch pevne nehybných vrstiev. Prvá vrstva je nabitý povrch, druhá vrstva je tvorená opačne nabitými iónmi z roztoku. Tento model ale nebol správny, pretože celkový náboj takto vytvorenej dvojvrstvy, respektíve častice obalenej dvojvrstvou by bol nula. S nulovým nábojom by sa častice nepohybovali v elektrickom poli. Čo však ale neplatí, častice v roztoku vykonávajú Brownov pohyb [34].

Druhý model bol zostrojený podľa Gouy-Chapmannovej teórie v roku 1913. Model vychádza z predpokladu ustanovenia rovnováhy medzi príťažlivými elektrostatickými silami prvej vrstvy a Brownovým (tepelným) pohybom. Počíta teda s existenciou difúznej vrstvy. Častice sú nabité a v elektrickom poli sa pohybujú [34].

Tretí a najviac realistický model bol zostrojený v roku 1924 Ottom Sternom. Vo svojom modeli sa mu podarilo odstrániť nedostatky difúzneho modelu. Vedľa elektrostatických síl a Brownovho pohybu zobral do úvahy aj sily adsorpčné a skombinoval vlastne dva predchádzajúce modely. Niektoré protióny sú pútané k pevnej vrstve elektrostatickými aj adsorpčnými silami (Helmholtzov model). Keď sa dá častica do pohybu, v elektrickom poli sa s časticou pohybuje iba pevná vrstva a teda iba časť protiónov a celkový náboj je menší ako celková veľkosť náboja na povrchu [34].



Obr. 14: Porovnanie 3 modelov a ich závislosť intenzity na vzdialenosti [33].

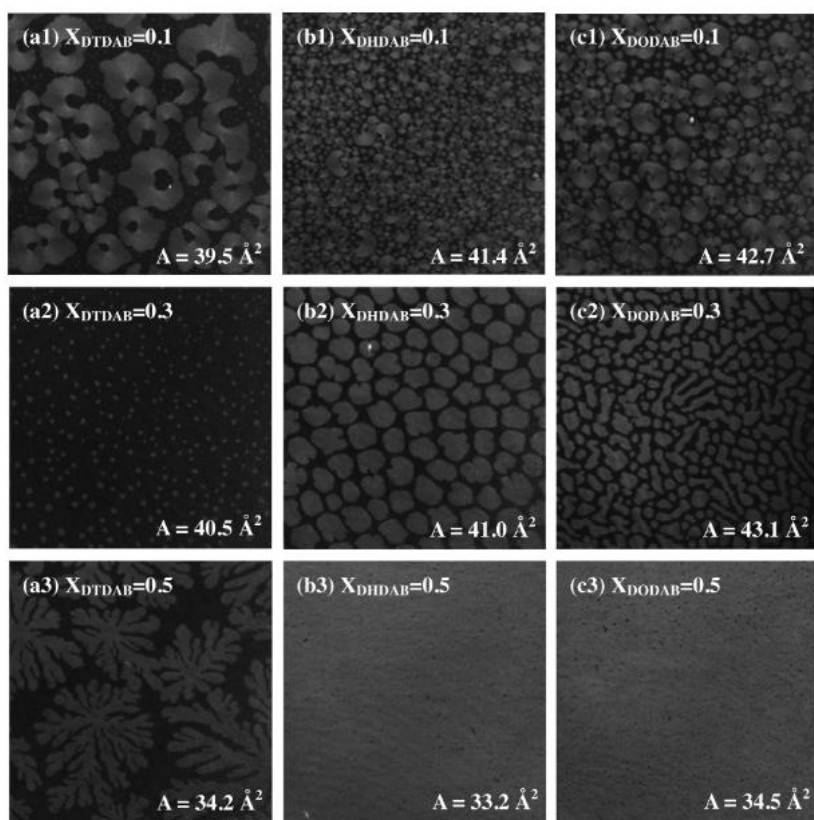
Elektrokinetický potenciál v koloidných roztokoch sa nazýva zeta potenciál. Potenciál pôsobí na rozhraní častice s kvapalinou. Charakterizuje sa ako náboj, ktorý vzniká na povrchu častice, ktorá sa dostane do kontaktu s vodným roztokom. V roztoku sa nachádzajú voľné ióny, ktoré majú tendenciu sa viazať na časticu s nenulovým nábojom. Môžeme teda povedať, že zeta potenciál závisí hlavne na pH roztoku a na použitom rozpúšťadle. Pretože je štruktúra a hrúbka dvojvrstvy ovplyvnená koncentráciou iónov, do značnej miery závisí aj na samostatnej iónovej sile roztoku. Keď do roztoku pridáme elektrolyt, dôjde k zmene koncentrácie iónov a to zapríčini zmrštenie difúznej vrstvy. Nameraný zeta potenciál by sa mal v tomto prípade blížiť k nule, čo znamená, že častica je skoro bez náboja a pomaly nastáva agregácia [35].

Zeta potenciál rovný 0 mV hovorí o ustálení adsorbčnej rovnováhy medzi  $H^+$  a  $OH^-$  ióny (izoelektrický bod). Avšak, keď roztok začneme riediť, hrúbka difúznej vrstvy sa zväčší, zrastie aj zeta potenciál. To má za následok menšiu tendenciu častíc sa zhlukovať [35].

### 3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Príprava katiónových vezikul s kladne nabitým surfaktantom

**Chien-Hsiang Changa a spol.**, sa zaoberali prípravou IPA vezikul. Amfifilný iónový pár sa skladal z kladne nabitého HTMAB a záporne nabitého SDS. Kladne nabitý amfifilný iónový pár (cIPA) vznikol po dodatočnom pridaní cholesterolu a kladne nabitého surfaktantu. Na začiatku boli pripravené dva roztoky opačne nabitých tenzidov HTMAB a SDS o rovnakom objeme a koncentrácií 20 mM. Roztoky boli zmiešané v ekvimolárnom pomere a ponechané deň na vyzrážanie. Vzniknutá zrazenina sa vymyla deionizovanou vodou, aby sa odstránili voľné ióny ( $\text{Br}^-$  a  $\text{Na}^+$ ). Elementárnou analýzou bola dokázaná prítomnosť IPA zostavenej z katiónových a aniónových povrchovo aktívnych látok o molárnom pomere 1:1. Zrazenina sa následne oddelila od vodnej fázy pomocou centrifúgy a odfiltrovala sa. Filtrát sa nechal vysušiť v sušiarňi 3 dni. Ku vzniknutému tuhému prášku IPA boli potom v pomere 9:1 pridané rôzne dvojreťazové katiónové surfaktanty o rôznej koncentrácii (DXDAB) za vzniku cIPA. Po pridaní chloroformu sa cIPA rozpustila. Po rozpustení nasledovalo vyparenie chloroformu a do zmesi boli pridané sklenené guľičky za vzniku tenkého filmu. Film sa znovu hydratoval deionizovanou vodou a sonifikoval sa. Výsledkom bol vznik rôznych cIPA (HTMA-DS/DTDAB, HTMA-DS/DHDAB a HTMA-DS/DODAB). Takto pripravené vezikuly boli zobrazované za pomoci BAM (Brewster uhlový mikroskop) [36].



Obr. 15: Porovnanie rôznych cIPA pripravených vezikúl na základe rozličnej koncentrácie za pomoci BAM [36].

### 3.2 Charakterizácia katiónových vezikúl

**Havlíková M. a spol.**, sa zaoberali stabilitou vezikulárnych systémov tvorených z HTMA-DS pri laboratórnej teplote. Ku takto vytvoreným časticiam bol v pomere 9:1 pridaný aj dvojreťazcový kladne nabitý tenzid C18-C18Cl a cholesterol v rôznych množstvách. Prídavky cholesterolu sa pohybovali od 0 mol.% až po 73 mol.%. Vzniknuté častice sa pozorovali technikami dynamického a elektroforetického rozptylu svetla. Obe metódy boli merané na prístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Techniky, ktoré sa používali boli doplnené o výsledky z fluorescenčnej spektrometrie a ultrasonifikácie, ktorá prebiehala pri amplitúde 50 % a sonifikačnej energii 25 kJ. Meranie prebiehalo po dobu 36 dní. Výsledky ukázali, že vzorky obsahujúce zastúpenie cholesterolu 0 až 23 mol.% sa vyznačujú nestabilitou systému. Ich polydisperzný koeficient bol väčší ako 0,3, čo hovorí o polydisperzite systému. Nestabilita týchto vzoriek sa potvrdila aj hodnotou zeta potenciálu, ktorá bola nízka a pohybovala sa pri hranici nestability. Naopak vzorky, ktoré obsahovali 33 až 53 mol.% sa vyznačovali menšími veľkosťami a vyšším zeta potenciálom, čo svedčilo o ich stabilite. Pri prídavku cholesterol viac ako 63 mol.%, naopak stabilita klesala, čo mohlo byť spôsobené až príliš veľkým zastúpením cholesterolu v systéme. Toto vysoké množstvo mohlo spôsobiť kryštalizáciu uhlíkových reťazcov a teda ich destabilizáciu. Článok poukázal na to, že najlepšie hodnoty pri krátkodobej stabilite dosahovali vzorky so zastúpeným cholesterolu 43 a 53 mol.%. Hodnoty veľkosti častíc pri tomto percentuálnom zastúpení cholesterolu a ich hodnota zeta potenciálu sa počas rôznych dní merania výrazne nemenili [38].

Výskumom toho, ako dĺžka uhlíkového reťazca ovplyvňuje stabilitu vezikúl, sa zaoberal **tím Amiya K. Panda**. Pri príprave samostatných vezikúl bolo kvantitatívne množstvo malých unilamelárných vezikúl (SUV) skladajúcich sa z HTMA-DS, kladne nabitého uhlíkového dvojreťazcového tenzidu (DHDAB) a cholesterolu rozpustené v roztoku chloroformu:metanolu (7:3). Boli použité rôzne dvojreťazcové kladne nabité tenzidy s dĺžkou reťazca od 12 po 18 uhlíkov. Následne došlo k odpareniu rozpúšťadla a vzniku tenkého filmu, ktorý bol rehydratáciou sonifikovaný, zmrazený a ďalej rozpustený. Tento postup sa opakoval štyrikrát. Vezikuly s obsahom Px (piroxicam) boli získané zmiešaním vhodného liečiva lipidovej zmesi pred vytvorením tenkého filmu (lipid:liečivo; 200:1). Celková koncentrácia výsledného roztoku bola 2 mM. Pre meranie metódou DLS bol použitý prístroj Zetasizer Nano ZS90 ZEN 3690, Malvern Instrument Ltd., U.K. Hodnoty namerané touto metódou ukazujú, že veľkosť vezikúl sa výrazne nemenila v závislosti od dĺžky použitého uhlíkového reťazca. Hodnota zeta potenciálu narastala s dĺžkou reťazca. Predpokladá sa, že dĺžka reťazca zvyšuje indukčný účinok tenzidu, čo ďalej vyvoláva separáciu náboja medzi protiónmi, ktoré sa nachádzajú na polárnom povrchu. Tento jav následne vyvolá celkový zvýšený zeta potenciál. Bolo dokázané, že prídavok kladne nabitého dvojreťazcového tenzidu o ľubovolnej dĺžke uhlíkového reťazca zvyšuje stabilitu systému a čím je jeho dĺžka reťazca väčšia, tým je aj samotný zeta potenciál väčší, čo hovorí o dobrej stabilite [39].

**Tím Wataru Shinoda** sa zaoberal fyzikálnou stabilitou kataniónových vezikúl pre vývoj nových liečiv a nosičov DNA. V tomto experimente sa ako technika použila simulácia molekulárnej dynamiky (MD), ktorá bola schopná ukázať zmenu kataniónovej vrstvy podľa použitých chemikálií. Na začiatku bola vytvorená molekulárna štruktúra dodecylsulfátu sodného (SDS), chloridu hexadecyltrimetylamónneho (HTMAC) a chloridu ditetradecyltrimetylamónneho (DTDAC) vďaka programu Discovery Studio 3.1. Ako prvé sa vyniesla správna vzdialenosť medzi molekulami SDS a HTMAC za vzniku HTMA-DS a následne boli do správnej vzdialenosti umiestnené aj molekuly DTDAC. Toto spojenie vytvorilo výsledný systém HTMA-DS/DTDAC. Takýchto systémov bolo vytvorených viacej, každý systém sa ale líšil danou koncentráciou DTDAC. Jednotlivé vrstvy systému boli tvorené 128 surfaktantami a 3464 molekulami vody. Po celú dobu trvania experimentu bola teplota aj tlak konštantný. Pred začatím samotnej simulácie bolo potrebné odstrániť protióny. Po tomto kroku sa uskutočnila séria simulácií molekulárnej dynamiky na skúmanie štruktúry membrán. Výsledky ukázali, že HTMA-DS dvojvrstva obsahuje v membráne pevne zabalené reťazce vykazujúce hlavne gélovité štruktúrne vlastnosti. Tieto vlastnosti sa vyskytujú v dôsledku prevahy elektrostatických síl medzi HTMA a DS. Usporiadaná štruktúra dvojvrstvy HTMA-DS/DTDAC bola hraničná pri koncentrácii do 0,5 mM. Na druhej strane molekuly DTDAC spôsobujú narušenie obalu týchto hydrofóbných reťazcov vďaka elektrostatickému odpudzovaniu, ktoré nastáva medzi nabitými hlavičkami reťazcov. Pri koncentrácii DTDAC vyššej ako 0,5 mM sa preto vlastnosti celého systému menia z gélovitých na kvapalnú a celý systém stráca svoju pôvodnú štruktúru [40].

**K. Maiti a spol.**, skúmali interakcie medzi kationovým povrchovo aktívnym činidlom cetylpyridinium chlorid (CPC) a aniónovým povrchovo aktívnym činidlom dodecylsulfátom sodným (SDS). Bolo pripravených 5 vzoriek o piatich rozličných molárnych pomeroch CPC:SDS vo vodnom roztoku. V tejto práci boli použité viaceré metódy ako fluorescenčná mikroskopia, infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou, konduktometrická titrácia, a iné. Vďaka metóde konduktometrickej titrácie bola dokázaná tvorba rozličných fáz v roztoku. Pri pomerne malom prídavku bol roztok zakalený, avšak, pri jeho navyšovaní sa zkal vytrácal. Touto metódou bolo indikované, že pre vznik koacervátu je najlepšie dodržiavať pomer CPC:SDS, 1:1. Pri dodržaní tohoto pomeru ukazovali výsledky z FTIR zmeny v polohách píkov v oblasti oboch skupín, kde sa nachádzali hlavičky tenzidov. Vďaka zmenám polohy, veľkosti častíc a rozdielnym hustotám náboja bola preukázaná tvorba iónovej väzby medzi tenzidmi. Dôležité je dodať, že kataniónový koacervát dokáže v roztoku vytvárať micely, ako aj vezikuly. V tomto prípade pri spojení tenzidov  $CP^+$  a  $SD^-$  nebola preukázaná tvorba vezikúl pri roztokoch, ktorých koncentrácia bola vyššia ako CMC, čo potvrdilo vo vode rozpustné farbivo (bromfenolová modrá) [41].

Prípravou polymerizovaných amfifilných iónových párov (PIPA) sa zaoberal **Myung-Hoon Chung a spol.** PIPA pripravovaná v tejto publikácii obsahovala 2 karboxylové skupiny na aniónovej strane hlavovej časti tenzidu. Zmes na prípravu obsahovala 12-hydroxydodecyl bromid, dihydropyran a kyselinu p-toluénsulfonovú. Tieto zlúčeniny boli zmiešané s 20 ml tetrahydrofuranu (THF). Takto pripravený roztok sa nechal miešať 24 hodín, kedy po uplynutí času došlo k odpareniu rozpúšťadla, ktoré bolo odstránené rotačnou odparkou. Zvyšková

kvapalina sa ďalej prečistila stĺpcovou chromatografiou na silikageli. Nasledovala polymerizácia, ktorá prebehla vďaka otvoreniu ditiolového kruhu kyseliny lipoovej, ktoré bolo iniciované pri neutrálnom pH. Týmto pracovným postupom bolo dosiahnuté vytvorenie 2 rôznych PIPA. Prvá obsahovala jeden amónny a druhý bikarboxylátový reťazec a druhá dva amónne a jeden bikarboxylátový reťazec. Stabilita vytvorených PIPA bola skúmaná metódami UV spektrometrie, tenkovrstvej chromatografie (TLC) a mnoho ďalších. Výsledky z meraní ukázali, že takto pripravená PIPA bola schopná zvýšiť interakcie medzi kationovými a aniónovými reťazcami. Obe pripravené PIPA dosahovali vysoké hodnoty zeta potenciálu, čo hovorí o dobrej stabilite systému. Zákal sa vo vzorkách nevytvoril ani po 3 mesiacoch a veľkosť ich častíc ( $\pm 170$  nm) zostala takmer konštantná počas celého merania [42].

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Chemikálie

#### *Dodecylsulfát sodný*

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

#### *Dimetyldioctadecylamónium chlorid (C18-C18Cl)*

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

#### *Cholesterol*

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

#### *Dimetyldimyristylamónium bromid (C14-C14Br)*

$M_w = 518,75$  g/mol, CAS 68105-02-2, TCI CO., LTD

#### *Dimetyldipalmitylamónium bromid (C16-C16Br)*

$M_w = 574,86$  g/mol, CAS 70755-47-4, TCI CO., LTD

#### *Dimetyldioctadecylamónium bromid (C18-C18Br)*

$M_w = 630,97$  g/mol, CAS 3700-67-2, TCI CO., LTD

#### *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 článkov z ktorých bola vypracovaná rešerš, na danú problematiku v kapitole 3 a na základe spolupráce s prof. Changom z National Cheng Kung University na Taiwane, bol optimalizovaný postup práce pre vytváranie vezikulárnych systémov. Výskum, ktorý doteraz prebiehal bol predovšetkým zameraný na preštudovanie systému HTMA-DS-DODAC a cholesterolu. V tejto bol použitý nový systém IPA zložený zo septonexu a SDS. Keďže sa jedná o nový systém, bolo skúmané ako veľmi ovplyvní zmena ďalšieho zloženia (pridanie aditív) stabilitu systému a bol sledovaný aj vplyv dispergácie na prípravu vezikúl atď. Cieľom práce bolo zistiť stabilitu nami vytvorených vezikúl, ktoré sa líšili či už dispergačnou energiou, použitým katiónovým tenzidom, alebo percentuálnym zastúpením cholesterolu. Základnými parametrami bol zvolený pomer IPA (SEPT-DS) ku katiónovému tenzidu 9:1, objem 60 ml a energia 25 kJ. Pomer medzi jednotlivými tenzidmi zostal počas celého experimentu konštantný a menila sa dispergačná energia, ktorá nadobúdala hodnoty 10, 15, 20 a 25 kJ. Ďalším meniacim sa parametrom bol rôzny prídavok cholesterolu a to 0, 20, 40 a 60 mol%. Cieľom práce bolo aj skúmanie stability pri prídavku rozličných katiónových tenzidov, ktoré sa použili C18-C18Cl, C18-C18Br, C16-C16Br a C14-C14Br. Ako metóda na zistenie stability a teda aj veľkosti systému, zeta potenciálu a koeficientu polydisperzity jednotlivých vzoriek bol použitý dynamický a elektroforetický rozptyl svetla.

## 4.3 Príprava vezikulárnych systémov

### 4.3.1 Príprava zásobného prášku IPA

Rozpuštením Septonexu v deionizovanej vode a SDS taktiež v deionizovanej vode, boli pripravené vodné roztoky tenzidov o výslednej koncentrácii 20 mM. Oba roztoky boli miešané na magnetickej miešačke 24 hodín pri laboratórnej teplote. Po uplynutí času boli roztoky zmiešané v ekvimolárnom pomere 1:1 a boli opätovne ponechané na magnetickej miešačke pri laboratórnej teplote približne 48 hodín pre lepšiu precipitáciu tenzidov.

Do roztoku bol po vyžrážaní postupne pridávaný chloroform v pomere 1:1 a nasledovalo vytrepávanie, ktoré malo za úlohu oddeliť protiióny od zvyšku molekúl. Pretože je IPA vo vode nerozpustná na rozdiel od protiiónov vznikli dve fázy, chloroformová s iónovými pármami SEPT-DS a vodná, v ktorej sa nachádzali protiióny. Došlo k odstráneniu chloroformu z chloroformovej fázy a následne bol už vzniknutý biely prášok kvantitatívne prevedený do suchej vialky, v ktorej bol skladovaný pri laboratórnej teplote.

### 4.3.2 Príprava kladne nabitých kataniónových vezikul

Na prípravu všetkých vzoriek sa použil rovnaký postup. 900  $\mu$ l nami pripraveného roztoku IPA (SEPT-DS) v chloroforme o koncentrácii 0,12 M bolo zmiešaných so 100  $\mu$ l zásobného roztoku kladne nabitého dvojreťazového tenzidu v chloroforme o rovnakej koncentrácii. Vznikol nám 1 ml roztoku kladne nabitého kataniónového vezikulárneho systému (cIPA). Objemy zásobných roztokov boli zvolené tak, aby bol dodržaný pomer 9:1 (IPA:DXDAC), ktorý vyšiel z rešeršnej časti najoptimálnejšie. Kvôli ďalšej stabilizácii nami vytvoreného systému je treba pridať ako aditívum cholesterol. Pre zistenie optimálneho zastúpenia cholesterolu boli pripravené vzorky o rôznom zastúpení a to 0, 20, 40 a 60 mol.%.

Roztok cIPA a príslušné množstvo cholesterolu boli zmiešané v sklenenej nádobe do ktorej sa pridali sklenené guľičky, ktoré tvorili asi 2 až 3 vrstvy. Chloroform sa potom následne nechal odparovať do ďalšieho dňa. Sklenené guľičky slúžili na zväčšenie povrchu, ktorý tvorí tenký film po odparení chloroformu.

## 4.4 Použité metódy

### 4.4.1 Ultrazvuková dispergácia

Po odparení zvyškového chloroformu bol na druhý deň do nádoby so sklenenými guľičkami pridaný príslušný objem deionizovanej vody kvôli rehydratácii. Nasledovne boli vzorky zvortexované pre lepšie premiešanie výsledného roztoku. Dispergácia prebiehala pomocou ultrazvukového homogenizátora Bandelin SONOPULS UW 3200 so sondou VS 70 T. Sonda s priemerom 13 mm bola ponorená po rýsku do roztoku a sonifikácia bola vykonávaná pri parametroch dispergácie navrhnutých na základe literárneho rešerša, ktorá je uvedená v kapitole 3. Všetky vzorky boli sonifikované amplitúdou 50 % za dosiahnutia rôznych energií, a to 10, 15, 20 a 25 kJ. Sonifikovali sa vzorky, ktoré mali rovnaký objem vody použitej k rehydratácii, rovnakú amplitúdu a líšili sa dosiahnutou energiou dodanou do vzorky počas ultrazvukovej dispergácie.

#### 4.4.2 Stanovenie veľkosti častíc a zeta potenciál

Hlavným cieľom práce bolo zistiť stabilitu nami vytvorených vezikulárnych systémov. Na zistenie parametrov bola použitá technika dynamického rozptylu svetla a k meraniu veľkosti častíc bol použitý prístroj ZetaSizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments, UK s použitím 10 mW He-Ne laserového zdroja o vlnovej dĺžke 630 nm. Ako režim pri meraní bol použitý *size*, meralo sa v sklenených kyvetách ,do ktorých bola časť vzorku (cca 1 ml) prevedená. Boli nastavené jednotlivé parametre ako typ rozpúšťadla (v našom prípade sa jednalo o vodu), teplota a jednotlivé počty opakovaní a meraní. Vzorka sa na začiatku musela vytemperovať na 25 °C a meralo sa po troch sériách, po 10 opakovaníach, pričom každé opakovanie trvalo 10 sekúnd.

Po dokončení merania sa z 3 sérií dát vytvoril priemer. Celkovým výsledkom merania bol graf závislosti intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc. Na základe tohto grafu a počte pík, ktoré sa v ňom nachádzajú vieme určiť, či je naša vzorka monodisperzá alebo polydisperzná. Výsledkom merania bola aj korelačná krivka, ktorá zobrazuje priebeh merania. Pri vzorkách, ktoré sú monodisperzné je koeficient polydisperzity (PdI) menší alebo rovný hodnote 0,3. Ak takúto hodnotu koeficient nadobúdal, za strednú veľkosť častíc sme uvažovali ich strednú hodnotu (Z-Average). Vzorky, ktoré dosahovali PdI väčšie ako 0,3 sa považovali za polydisperzné systémy a ich strednú hodnotu sme nemohli použiť. V takýchto vzorkách sa nachádzali častice o veľmi malých alebo veľmi veľkých rozmeroch a tým pádom ich veľkosť strednej hodnoty bola chybná [43].

Zeta potenciál bol meraní na rovnakom prístroji ako dynamický rozptyl svetla, ZetaSizer Nano ZS, s použitím metódy elektroforetického rozptylu svetla. Do vzorky v sklenenej kyvete bola ponorená dip cela s mernou elektródou, ktorá do systému vkladá napätie a sleduje sa fázová odozva na tomto vloženom napätí. Na prístroji sa v tomto prípade nastavil režim *zeta* a hodnota zeta potenciálu bola počítaná za pomoci Smulochowského modelu, ktorý sa používa na meranie zeta potenciálu v polárnom prostredí (voda). Vzorka sa opätovne nechala vytemperovať na 25 °C a meralo sa po piatich sériách po 10 opakovaníach pričom každé opakovanie trvalo 15 sekúnd.

Častice sa prvýkrát merali v deň, keď bola vykonaná sonifikácia a následne po 3, 7, 14, 21 a 28 dňoch. Po každom meraní boli porovnávané veľkosti častíc a hodnota zeta potenciálu, ktorý informoval o stabilite systému.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

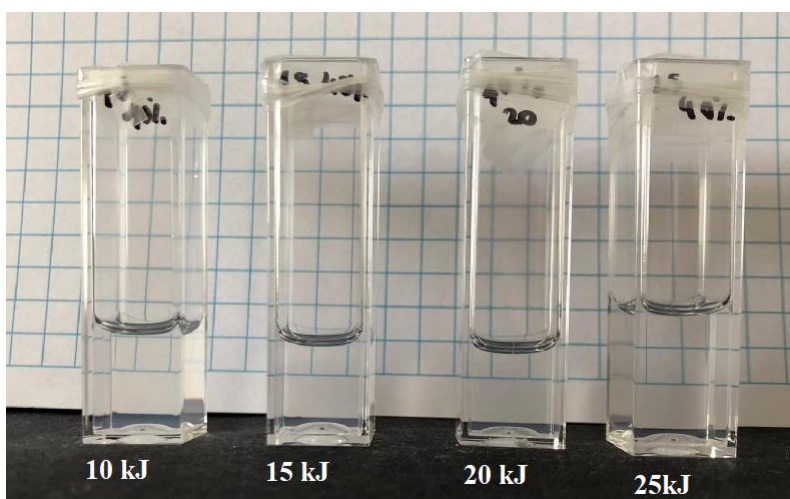
### 5.1 Vplyv energie dispergácie na stabilitu systému

V publikáciách prof. Changa z National Cheng Kung University na Taiwane sa uvádza postup prípravy vezikulárnych systémov s použitím kladne a záporne nabitého tenzidu. Na zvýšenie stability sa ako aditívum používa kataniónový tenzid s príslušnou dĺžkou reťazca a molárny prídavok cholesterolu [36]. V tejto práci sa snažíme o vytvorenie nového systému, a preto sme si ako podporný pracovný postup zvolili práve tieto hodnoty a opierali sme sa o výsledky z týchto publikácií.

V tomto pracovnom postupe sa používa ako kataniónový tenzid C18-C18Cl a 40 mol.% cholesterolu. Keďže je IPA zložená z iných látok aké sú v rešerši použité, potrebovali sme optimalizovať všetky podmienky. Prvou z týchto podmienok bola dispergačná energia.

Bol pripravený zásobný roztok IPA (SEPT-DS), do ktorého sa na základe rešerše z kapitoly 3 pridal kataniónový dvojreťazcový tenzid C18-C18Cl, vďaka čomu vznikol komplex cIPA. Ako ďalšou zložkou, ktorá má zvyšovať stabilitu systému, bolo do systému pridaných 40 mol.% cholesterolu. Vytvorený roztok bol dispergovaný hodnotami energie 10, 15, 20 a 25 kJ. Stabilita vzoriek sa stanovovala pomocou metódy DLS a ELS hneď po dispergácii a následne po 3, 7, 14, 21 a 28 dňoch od doby prípravy.

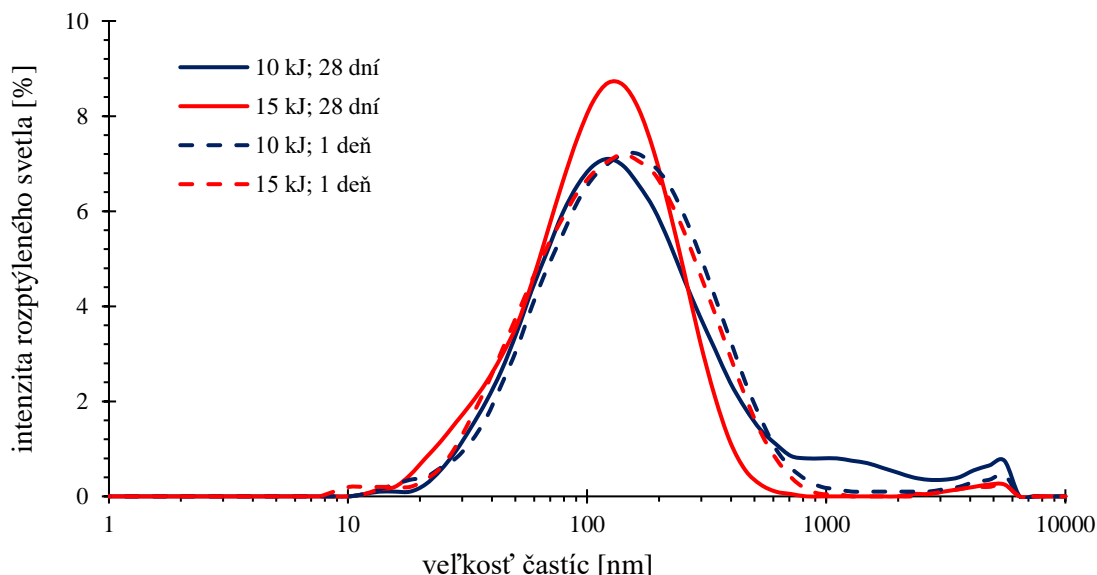
Vzorky boli následne vždy po meraní odfotené a sledovala sa prítomnosť zákalu. Počas celej dĺžky experimentu sa v žiadnej vzorke nevytvoril zákal. Neprítomnosť zákalu je možné sledovať na obr. 16, kde sa nachádzajú vzorky obsahujúce SEPT-DS a C18-C18Cl v pomere 9:1 a 40 mol.% cholesterolu po 28 dňoch od sonifikácie rôznymi hodnotami energie.



Obr. 16: Skupina vzoriek obsahujúca SEPT-DS: C18-C18Cl 9:1, 40 mol.% cholesterol, po 28 dňoch od sonifikácie.

Veľkosti vzniknutých vzoriek boli pozorované pomocou metódy DLS a ELS, kde nám koeficient polydisperzity, stredná veľkosť častíc a zeta potenciál hovorili o veľkosti a stabilite systému. Na Obr. 17 je znázornená závislosť intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc. Prerušovanou čiarou sú do grafu vynesené hodnoty namerané v prvý deň po dispergácii a spojitou čiarou hodnoty 28 dní od dispergácie.

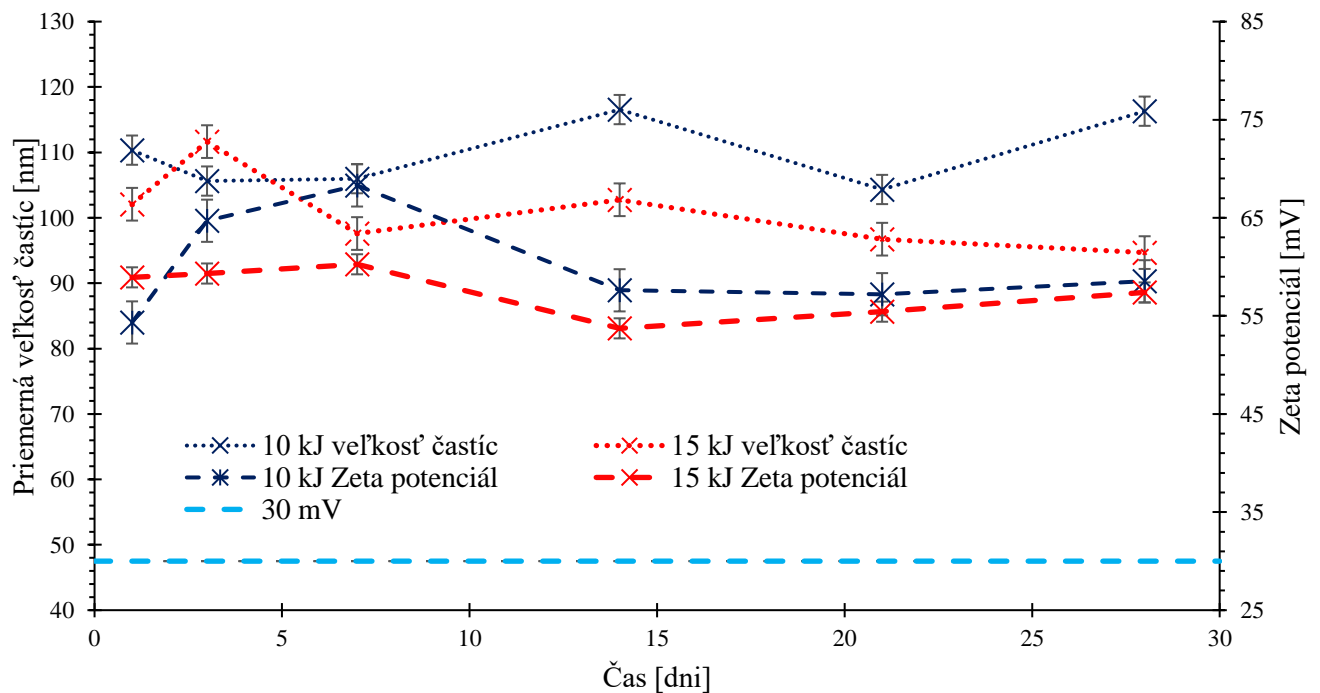
Graf (viz. Obr. 17) ukazuje, že medzi hodnotami nameranými v prvý a 28 deň od sonifikácie sa pre vzorky sonifikované energiou 10 kJ distribučné krivky veľmi nelíšia. Naopak pre energiu 15 kJ má distribučná krivka po 28 dňoch oveľa strmší priebeh a výrazne sa odlišuje od hodnôt nameraných v prvý deň. Distribučné krivky pre vzorky sonifikované energiou 20 a 25 kJ sa medzi sebou počas 1 a 28 dňa od sonifikácie nerozlišovali, pri oboch hodnotách majú distribučné krivky podobný priebeh. Graf intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc pre hodnoty 20 a 25 kJ je uvedený na Obr. 27., v kapitole 9.1., PRÍLOHA.



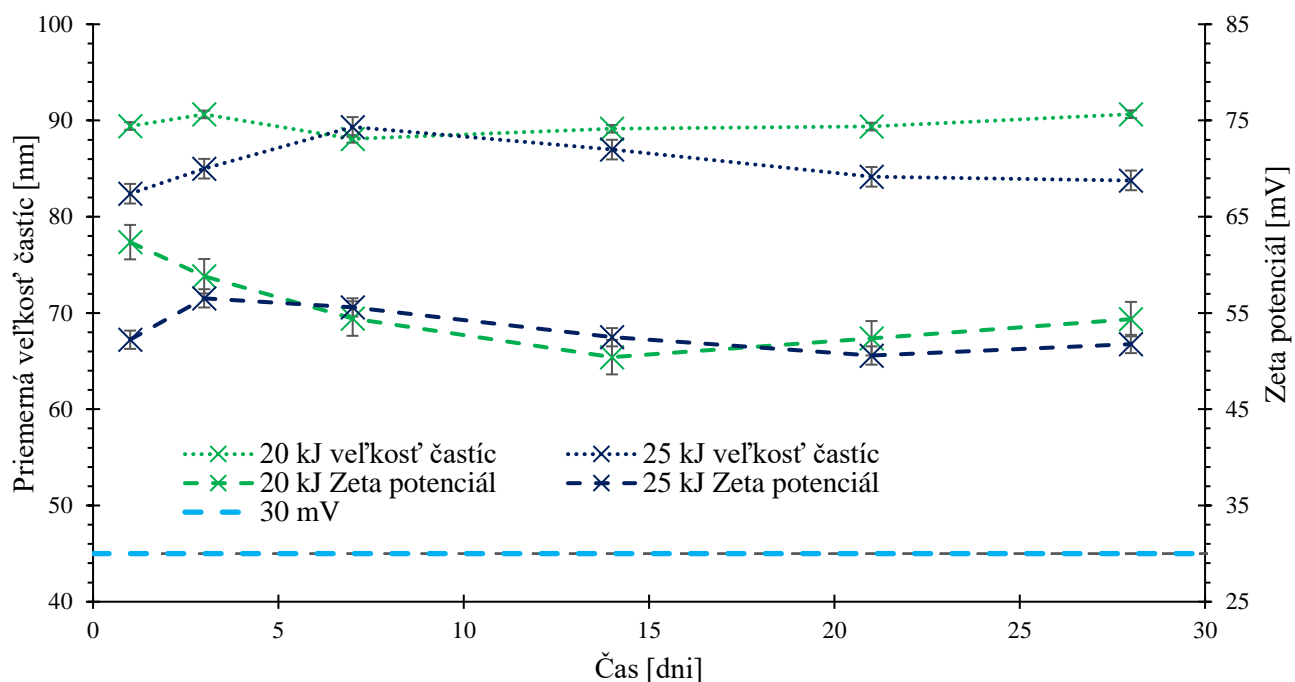
Obr. 17: Graf veľkosti častíc vzoriek SEPT-DS, 9:1 IPA:C18-C18Cl, 40 mol.% cholesterolu, 1 deň a 28 dní od sonifikácie pre hodnoty dispergačnej energie 10 a 15 kJ.

Významným kritériom pri stanovovaní stability systému je koeficient polydisperzity a zeta potenciál. Prvý deň po dispergácii dosahovala vzorka dispergovaná energiou 25 kJ najnižšiu hodnotu PdI a to  $0,302 \pm 0,008$ , čo sa nachádza v oblasti monodisperzných častíc. Naopak najvyššiu hodnotu dosahovala vzorka dispergovaná najnižšou energiou (10 kJ) a to  $0,433 \pm 0,010$ . Hodnoty zeta potenciálu sa pohybovali v rozmedzí 52–62 mV. Všetky tieto hodnoty sa nachádzajú v stabilnej oblasti. Najvyššiu hodnotu zeta potenciálu mala vzorka dispergovaná energiou 20 kJ, 62,3 mV. Podrobná tabuľka veľkosti častíc, koeficientu polydisperzity a zeta potenciálu pre prvý deň merania je uvedená v Tab. 5, kapitole 9.1., PRÍLOHA.

Všetky vzorky boli následne merané po dobu niekoľkých dní od ich prípravy. Výsledkami meraní bola sledovaná dlhodobá stabilita vzoriek. Namerané hodnoty priemernej veľkosti častíc a zeta potenciálu po dobu 28 dní sú vynesené do grafu na Obr. 18 a Obr. 19. Hodnota zeta potenciálu mierne kolísala u všetkých vzoriek (50–70 mV), avšak, stále sa nachádzala v stabilnej oblasti. Modrou prerušovanou čiarou je znázornená oblasť veľkosti zeta potenciálu (30 mV), pod ktorou sa nachádza nestabilná oblasť. Priemerná veľkosť častíc sa pohybovala v rozmedzí 80–120 nm. Najväčšie výkyvy hodnôt zeta potenciálu ako aj priemernej veľkosti častíc boli namerané pri energii dispergácie 10 kJ. Tieto zmeny hodnôt nie sú veľké, ale v porovnaní so zvyšnými energiami sa môžu považovať za zásadné. Kvôli týmto hodnotám môžeme považovať hodnotu dispergačnej energie 10 kJ za príliš nízku na to, aby dokázala vytvoriť stabilný systém pri dlhodobom pozorovaní.



Obr. 18: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o dispergačnej energii 10 a 15 kJ znázorňujúci zmenu hodnôt počas 28 dní.



Obr. 19: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek o dispergačnej energii 20 a 25 kJ znázorňujúci zmenu hodnôt počas 28 dní.

V Tab. 2 vidíme hodnoty priemernej veľkosti častíc, koeficientu polydisperzity a zeta potenciálu po 28 dňoch od merania, zobrazené spolu s ich smerodajnými odchýlkami. Vzorky sonifikované energiami 15 a 20 kJ dosahujú po 28 dňoch najnižšie hodnoty PdI ( $\pm 0,330$ ). Hodnoty zeta potenciálu aj s jeho smerodajnými odchýlkami považujeme za konštantné a pohybujú sa okolo hodnoty 55 mV. Môžeme vyčítať podľa hodnôt, že najstabilnejšie vzorky sú tie, ktoré boli dispergované energiami 15, 20 a 25 kJ. Rozdiely medzi týmito hodnotami sú malé a na výslednú stabilitu nemajú zásadný vplyv. Kvôli týmto faktom a publikáciám z rešerše v kapitole 3. sme rozhodli pre ďalší pracovný postup, používať hodnotu 25 kJ a teda považovať ju za najoptimálnejšiu hodnotu pre naše ďalšie merania.

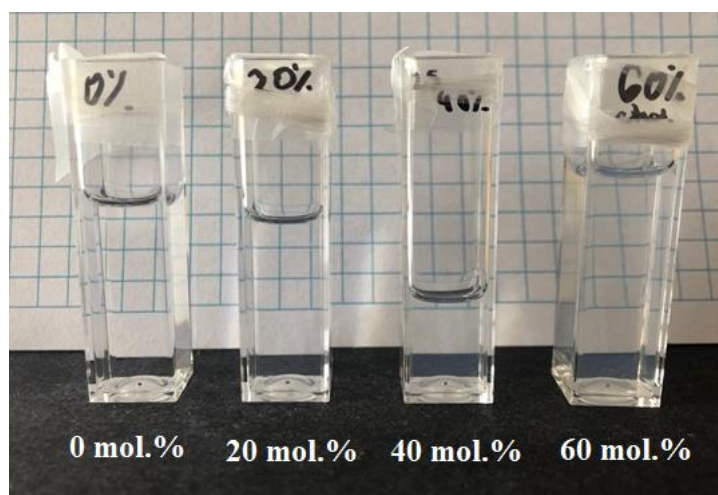
Tab. 2 Namerané priemerné hodnoty vzoriek SEPT-DS, 9:1 IPA: C18-C18Cl, 40 mol.% cholesterolu, 28 dní po dispergácii

	Priemerná veľkosť častíc [nm]	PdI [-]	Zeta potenciál [mV]
10 kJ	$116 \pm 5$	$0,404 \pm 0,047$	$59 \pm 7$
15 kJ	$95 \pm 6$	$0,331 \pm 0,031$	$57 \pm 2$
20 kJ	$91 \pm 7$	$0,330 \pm 0,042$	$54 \pm 3$
25 kJ	$84 \pm 2$	$0,348 \pm 0,067$	$52 \pm 3$

## 5.2 Vplyv cholesterolu na stabilitu systému

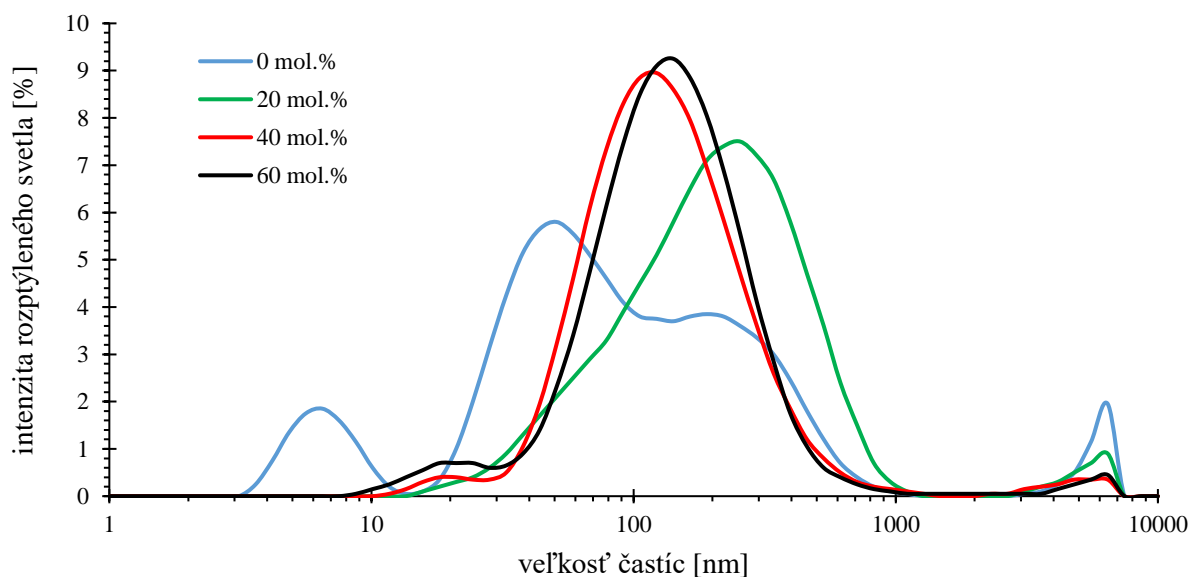
Ďalšou podmienkou, ktorú bolo treba optimalizovať pri vytváraní pracovného postupu pre stabilný vezikulárny systém tvorený SEPT-DS, bolo nájsť najvýhodnejšie percentuálne zastúpenie cholesterolu. Vzorky pre túto radu boli pripravené obdobne ako rada v kapitole 5.1. Tentokrát sa jednotlivé vzorky medzi sebou líšili molárnym zastúpením cholesterolu v ich objeme. Boli pripravené vzorky o koncentrácii 0, 20, 40 a 60 mol.%. Pomer medzi SEPT-DS a C18-C18Cl bol ponechaný (9:1). Po príprave vzorku nasledovala ultrazvuková dispergácia a všetky vzorky boli sonifikované energiou 25 kJ.

Rovnako ako vzorky s rozličnými energiami pri sonifikácii, aj vzorky s rozdielnym obsahom cholesterolu boli pozorované a fotené na prítomnosť zákalu vždy po meraní po dobu 28 dní. Ako je na Obr. 20 viditeľné, všetky vzorky ostali počas celej doby pozorovania nezakalené. Avšak, po bližšom skúmaní sa vzorka s obsahom cholesterolu 60 mol.% javila ľahko zakalená.



Obr. 20: Vzorky cholesterovej rady po 28 dňoch od sonifikácie.

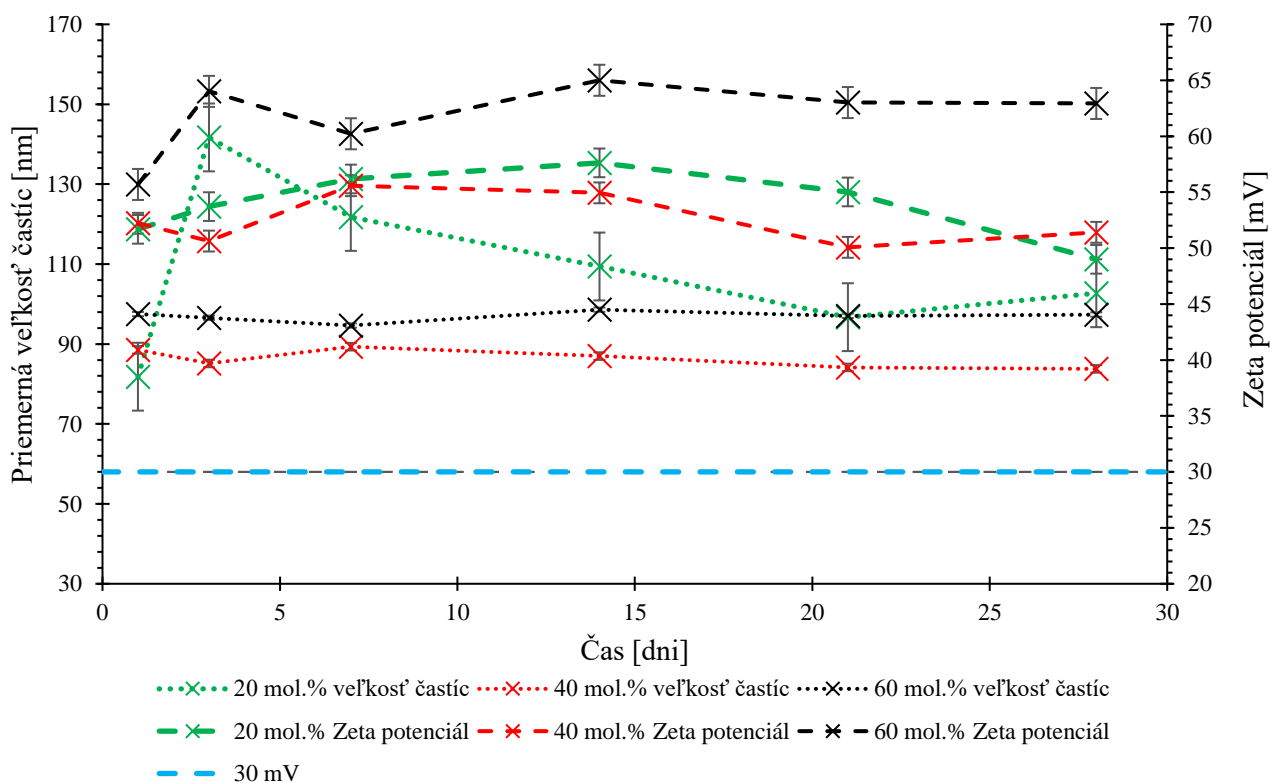
Už od prvého dňa dispergácie (viz. Obr. 28., kapitola 9.2., PRÍLOHA) bolo možné pozorovať, že vzorka s obsahom cholesterolu 0 mol.% obsahuje polydisperzné, nestabilné častice. Graf na Obr. 21 znázorňuje závislosť intenzity rozptýleného svetla na veľkosti vzniknutých vezikúl pre vzorky obsahujúce rôzne percentuálne zastúpenie cholesterolu po 7 dňoch od dispergácie. Pozorujeme, že distribučná krivka vzorky 0 mol.% vytvára viacero pík, čo znamená, že v systéme sa nachádza široké zastúpenie častíc rôznych veľkostí. Na druhú stranu, vzorky s percentuálnym zastúpeným cholesterolu väčším ako 20 mol.% tvoria iba jeden súvislý pík, čo hovorí o monodisperznom systéme.



Obr. 21: Graf distribúcie častíc o rôznom percentuálnom zastúpení cholesterolu 7 deň od sonifikácie.

Graf, ktorý porovnáva distribučné krivky vzoriek so zastúpením cholesterolu 20, 40 a 60 mol.% namerané v 1. a 28. deň od dispergácie ukazuje, že distribučné krivky sa počas dní menili iba málo a nie je medzi nimi vidieť výrazné rozdiely v závislosti na čase (viz. Obr. 29, kapitola 9.2., PRÍLOHA).

Priebeh toho, ako sa menila priemerná veľkosť častíc a zeta potenciál môžeme pozorovať na Obr. 22. V tomto grafe nie sú zahrnuté výsledky vzorky so zastúpením cholesterolu 0 mol.%, pretože tento systém bol nevyhovujúci pre naše pozorovanie kvôli svojej polydisperzivite. Priemerná veľkosť častíc a zeta potenciál vzoriek obsahujúcich zastúpenie cholesterolu 40 a 60 mol.% sa počas celej doby merania menili iba minimálne. Ich zeta potenciál sa počas celej doby pohyboval nad hodnotou stability a preto dokážeme tieto vzorky považovať za stabilné. Väčšie rozdiely v priemernej veľkosti častíc môžeme pozorovať u vzorky obsahujúcej 20 mol.% cholesterolu, kde sa veľkosť počas 28 dní mení v rozsahu od 80 po 140 nm. Zeta potenciál tejto vzorky má taktiež klesajúcu tendenciu, čo nám hovorí o tom, že postupom času sa vzorka stáva menej stabilná. Avšak, je potrebné dodať, že aj v tomto prípade sa stále pohybujeme v oblasti stability.



Obr. 22: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek s rozličným zastúpením cholesterolu znázorňujúci zmenu hodnôt počas 28 dní.

Hodnoty v Tab. 3. nám hovoria o priemernej veľkosti častíc, hodnote polydisperzného koeficientu a zeta potenciálu po 28. dňoch od dispergácie. Z tabuľky pozorujeme, že z pohľadu dlhodobej stability častíc, hodnoty PdI pre vzorky 0 a 20 mol.% sú vysoké, čo hovorí o tom, že v systéme sa nachádzajú častice rôznych veľkostí a systém ako celok je polydisperzný. Najnižšiu hodnotu polydisperzného koeficientu (0,348) dosahuje vzorka obsahujúca 40 mol.% cholesterolu. Zeta potenciál je u všetkých vzorkách nad úrovňou nestability a pohybuje sa v rozmedzí 48 až 63 mV. Najvyššiu hodnotu zeta potenciálu (62,9 mV) dosahuje vzorka so zastúpením cholesterolu 60 mol.%.

Tab. 3 Hodnoty cholesterolovej rady po 28. dňoch od dispergácie

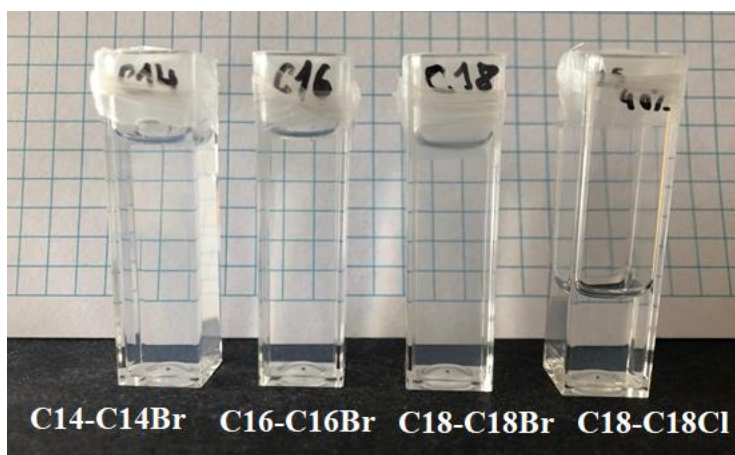
	Priemerná veľkosť častíc [nm]	PdI [-]	Zeta potenciál [mV]
0 mol.%	77 ± 2	0,661 ± 0,043	48 ± 2
20 mol.%	103 ± 6	0,491 ± 0,029	49 ± 3
40 mol.%	84 ± 2	0,348 ± 0,071	51 ± 3
60 mol.%	97 ± 7	0,374 ± 0,004	63 ± 7

Na základe nameraných hodnôt a výsledkov z meraní môžeme konštatovať, že s pribúdajúcim zastúpením cholesterolu vo vzorke stúpa zeta potenciál, čo hovorí o zvyšovaní stability systému. U vzorky, ktorá neobsahovala žiaden prídavok cholesterolu sa po niekoľkých dňoch vytvoril polydisperzný systém a teda vzorka bola nestabilná. Vzorky s hodnotami 40 a 60 mol.% sa v rámci odchýliek približne zhodovali. Množstvo cholesterolu 40 mol.% sa používa aj v literárnej rešerši a preto bol tento prídavok aplikovaný aj pri ďalších meraniach [38].

### 5.3 Vplyv dĺžky dvojreťazcového tenzidu

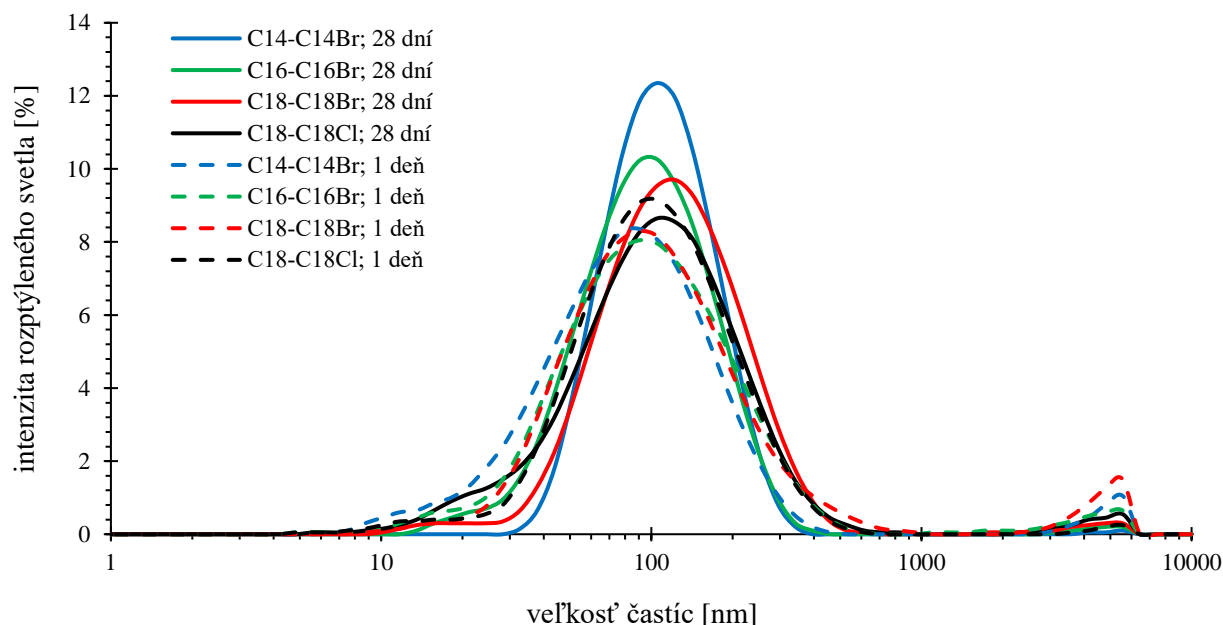
Ako posledný parameter, ktorým sme chceli optimalizovať pracovný postup pri príprave vezikulárneho systému bol správny výber dvojreťazcového kladne nabitého tenzidu. Pracovný postup pri príprave poslednej rady zostal nezmenený a postupovali sme rovnako ako pri príprave v kapitole 5.1. Ako molárne zastúpenie cholesterolu sa zvolila hodnota 40 mol.% a jediná menená konštanta bolo použitie rôznych dvojreťazcových kladne nabitých tenzidov. Boli vybrané tenzidy o dĺžke reťazca 14, 16 a 18 uhlíkov, ktoré mali ako svoj protiión bróm a 18 uhlíkový tenzid, ktorý mal ako protiión naviazaný chlór. Kvôli informáciám z rešerše, kde sa ako IPA používa CTA-DS so spojeným katiónovým tenzidom C18-C18Cl, čo je menšia molekula ako nami vytvorená IPA (SEPT-DS) bolo našou úlohou zistiť, ktorý nami vybraný tenzid bude pre stabilizáciu systému najvhodnejší a či nebude práve tenzid s najkratším uhlíkovým reťazcom najlepší kandidát. [38].

Ako aj v predchádzajúcich meraniach, tieto vzorky boli pozorované počas celej dĺžky 28 dní. Obr. 23 ukazuje, že pri vzorkách z tejto rady nevznikol žiaden zrážal ani po 28 dňoch od dispergácie.



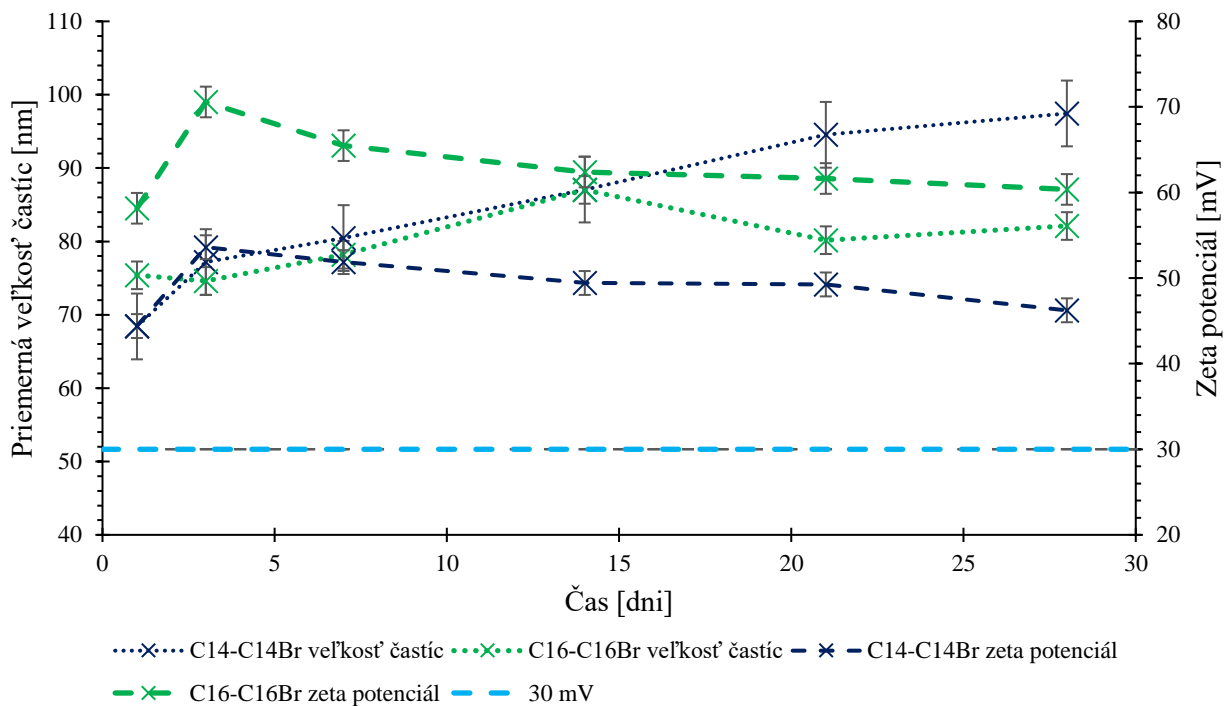
Obr. 23: Vzorky obsahujúce rôzne dvojreťazcové katiónové tenzidy o rôznych dĺžkach reťazcov 28. deň po sonifikácii.

Na Obr. 24 sa nachádza graf, ktorý popisuje závislosť intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc, kde sa porovnávajú hodnoty z prvého a 28. dňa. Ako je možné z grafu vyčítať, veľkosť častíc sa behom merania výrazne nemenili. Menila sa iba intenzita a teda výška jednotlivých píkav a to k väčším hodnotám. Najväčšia zmena intenzity rozptýleného svetla sa dá pozorovať u vzorky, ktorá obsahuje najkratší tenzid, C14-C14Br.

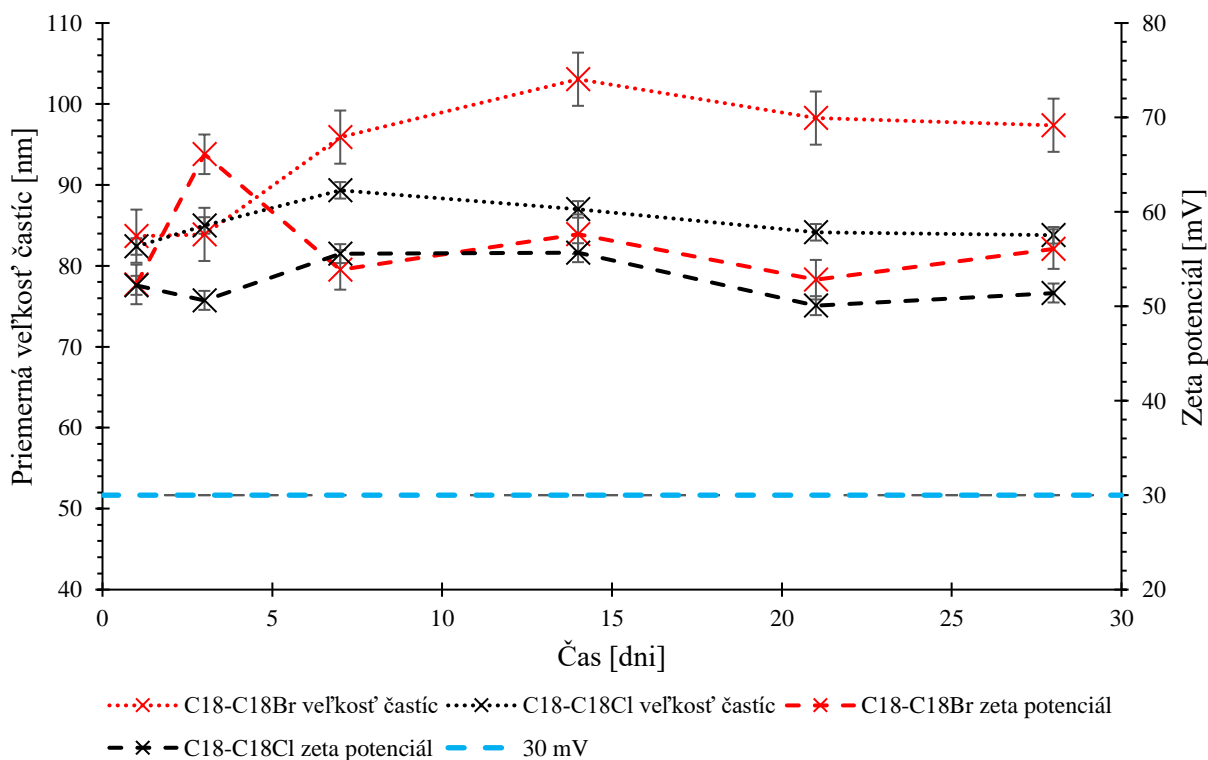


Obr. 24: Graf distribúcie veľkosti častíc vzoriek rôznych tenzidov v prvý a 28 deň od dispergácie.

Grafy na Obr. 25 a Obr. 26 znázorňujú zmenu priemernej veľkosti častíc a zeta potenciál po celú dobu merania vzoriek (28 dní). Podľa hodnôt v oboch grafoch je zrejme, že rozdiely medzi jednotlivými vzorkami počas celej doby merania sú malé a preto ich sa dajú považovať za zanedbateľné. Zeta potenciál ostával počas jednotlivých dní takmer konštantný. Priemerná veľkosť častíc sa s narastajúcim časom zväčšovala iba pozvoľna. Ako bolo spomenuté už v predchádzajúcich meraniach, mierne odchýlky hodnôt mohli byť spôsobené aj samotnou chybou prístroja.



Obr. 25: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek s použitými kataniónovými tenzidmi C14-C14Br a C16-C16Br, znázorňujúci zmenu hodnôt počas 28 dní



Obr. 26: Graf veľkosti častíc a zeta potenciálu vzoriek s použitými kataniónovými tenzidmi C18-C18Br a C18-C18Cl, znázorňujúci zmenu hodnôt počas 28 dní.

V Tab. 4 sa nachádzajú dáta priemernej veľkosti častíc, PdI a zeta potenciálu vzoriek rôznych tenzidov 28 dní po dispergácii. Podľa hodnôt z tabuľky vyplýva, že všetky vzorky majú vysokú stabilitu, čo vyplýva z ich veľkosti zeta potenciálu, ktorý dosahuje hodnoty vyššie ako 30 mV. Najnižšiu hodnotu polydisperzného koeficientu nadobúda vzorka obsahujúca tenzid s najkratším uhlíkovým reťazcom ( $0,171 \pm 0,026$ ), C14-C14Br. Najvyšší zeta potenciál (60,4 mV) dosahuje vzorka s tenzidom C16-C16Br. Rozdiely medzi jednotlivými kataniónovými tenzidmi sú malé a preto ich môžeme zanedbať. Z výsledkov vyplýva, že pre prípravu stabilného systému je možné použiť všetky kladne nabité kataniónové tenzidy bez ohľadu na dĺžku uhlíkového reťazca alebo použitého protiiónu.

*Tab. 4 Hodnoty vzoriek rôznych tenzidov 28 dní po dispergácii*

	Priemerná veľkosť častíc [nm]	PdI [-]	Zeta potenciál [mV]
C14-C14Br	$97 \pm 4$	$0,171 \pm 0,026$	$46 \pm 7$
C16-C16Br	$82 \pm 1$	$0,245 \pm 0,023$	$60 \pm 2$
C18-C18Br	$97 \pm 3$	$0,296 \pm 0,037$	$56 \pm 2$
C18-C18Cl	$84 \pm 2$	$0,348 \pm 0,071$	$51 \pm 3$

## 6 ZÁVER

Táto bakalárska práca sa zameriava na určenie stability vezikulárnych systémov vytvorených z tenzidov, ktorá bola stanovená metódou dynamického rozptylu svetla po 1., 3., 7., 14., 21. a 28. dňoch od ich prípravy. Dôležitou súčasťou tohto experimentu bola aj optimalizácia pracovného postupu prípravy vezikulárnych systémov zložených zo septonexu a SDS.

Zvolenie a optimalizácia pracovného postupu, zlúčenín z čoho bude systém zložený, je veľmi komplexný celok. Cieľom je vytvoriť stabilný systém, ktorý má pomerne konštantnú veľkosť častíc, s hodnotou PdI pod 0,3 a zeta potenciálom nad 30 mV. Ak systém spĺňa tieto podmienky, môžeme ho považovať za stabilný.

Na základe literárnej rešerše a teoretických poznatkov boli pripravené jednotlivé vzorky, ktoré sa od seba líšili v závislosti od použitej dispergačnej energie, molárneho zastúpenia cholesterolu a použitého kladne nabitého dvojreťazcového tenzidu. Vo všetkých vzorkách sa dodržala koncentrácia 20 mM. K sledovaniu stability systému boli použité dve metódy, a to dynamický rozptyl svetla, vďaka ktorému sme zisťovali veľkosť častíc v systéme a elektroforetický rozptyl svetla, kde sme z hodnoty zeta potenciálu určovali stabilitu vezikúl.

Ako prvý krok pri optimalizácii pracovného postupu sme zvolili výber dispergačnej energie. Vzorky boli sonifikované energiami 10, 15, 20 a 25 kJ. Vďaka hodnotám, ktoré boli namerané sa za najoptimálnejšie hodnoty dispergácie dajú považovať hodnoty energií 15, 20 a 25 kJ. Kvôli ďalšej optimalizácii postupu bola v nasledujúcich meraniach používaná dispergačná energia 25 kJ.

Druhým krokom bola optimalizácia percentuálneho zastúpenia cholesterolu. Boli pripravené vzorky s obsahom cholesterolu 0, 20, 40 a 60 mol.%. Už počas prvých dní bolo vidieť, že vo vzorke, ktorá neobsahovala cholesterol (0 mol.%) sa nachádzali častice s rozličnými veľkosťami, tzn. systém bol polydisperzný. S narastajúcim zastúpením cholesterolu vo vzorkách sa zvyšovala stabilita systému. Za vzorku s najoptimálnejším zastúpením cholesterolu môžeme považovať tú s hodnotou 40 mol.%. Aj keď ostatné vzorky spĺňali hodnoty odpovedajúce stabilite, rozhodli sme sa použiť toto zastúpenie, ktoré je používané aj v literárnej rešerši, pre ďalšie meranie.

Posledným krokom bolo zistiť, ktorý kladne nabitý dvojreťazcový kataniónový tenzid najlepšie zvyšuje stabilitu systému. Boli použité tenzidy rôznych dĺžok uhlíkových reťazcov a to C14-C14Br, C16-C16Br, C18-C18Br a C18-C18Cl. Počas pozorovania v priebehu 28 dní sa hodnoty rôznych tenzidov medzi sebou líšili iba zanedbateľne. Vďaka tomu sa dá konštatovať, že prídavok dvojreťazcového tenzidu zvyšuje stabilitu systému a nezáleží na dĺžke uhlíkového reťazca alebo použitého protiiónu.

Výsledky z meraní a informácie, ktoré nám poskytla literárna rešerš nám ukázali, že za najvýhodnejšiu hodnotu energie potrebnú na dispergáciu je 25 kJ. Táto hodnota sa najčastejšie používa aj pri príprave iných vezikulárnych systémoch v rôznych publikáciách, ako aj hodnota pre percentuálne zastúpenie cholesterolu 40 mol.%, ktorú sme zvolili s výsledkov merania ako najideálnejšiu. Napriek tomu, že aj iné hodnoty percentuálneho zastúpenia dokazovali stabilitu systému. Bolo taktiež dokázané, že prídavok dvojreťazcového kladne nabitého tenzidu

(nezávislého na dĺžke uhlíkového reťazca) zvyšuje celkovú stabilitu systému. V porovnaní s najviac preskúmaným systémom kataniónových vezikul, CTA-DS sa nami vytvorený nový systém SEPT-DS chová viac stabilne a to aj pri rozličnej zmene zloženia. Tento fakt nám hovorí o tom, že takýto vezikulárny systém má veľký potenciál do budúcnosti. Stabilita tohto systému môže byť ďalej podrobená zmenám iónovej sily a taktiež môže byť sledovaný vplyv tejto sily na prípadnú destabilizáciu. Ďalej sa dá pokračovať pri skúmaní tohto systému s niektorými biopolymermi, ktoré by mohli zvyšovať jeho biokompatibilitu a podporiť tak aj stabilitu systému ako takého.

## 7 LITERATÚRA

- [1] Structure of micelles. J. SHAW, Duncan. Introduction to colloid and surface chemistry. 4. Great Britain: MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall, 1991, s. 79-80. ISBN 0 7506 1182 0.
- [2] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes: Chemické listy. Praha, 1999, (93)421-427.
- [3] ARCHIVUS MEDICUS, 2003. Bratislava: vydavateľská spoločnosť TPEQ, s. 85, ISBN 80-968766-2-7.
- [4] MOHAMED, Gehad G., M. F. EL-SHAHAT, A. M. AL-SABAGH, M. A. MIGAHED a Tamer Awad ALI. Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations. The Analyst [online]. 2011, 136(7), 1488- [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1039/c0an00662a. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00662a>
- [5] Paul TJ, Taylor T, Babu R S A. Sodium lauryl sulphate. Br Dent J. 2019 Dec;227(12):1012. doi: 10.1038/s41415-019-1108-7. PMID: 31873237.
- [6] Bhattarai, Ajaya & Niraula, Tulasi & Chatterjee, Sujeet. (2014). Sodium dodecyl sulphate: A very useful surfactant for Scientific Investigations. The Journal of Knowledge and Innovation. 2. 111-113
- [7] National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 7879, Dimethyldioctadecylammonium chloride. Retrieved November 23, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyldioctadecylammonium-chloride>.
- [8] Lan Liu, Robert Pansu, Jacques Roncin, Jean Faure, Tatsuo Arai, Katsumi Tokumaru, Molecular organization in DODAC membrane fragments, Journal of Colloid and Interface Science, Volume 148, Issue 1, 1992, Pages 118-128, ISSN 0021-9797, [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(92\)90119-7](https://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90119-7).
- [9] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 77293, Dimethyldioctadecylammonium bromide. Retrieved June 26, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyldioctadecylammonium-bromide>.
- [10] Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. [cit. 27.06.2021]. Dostupné z: <https://www.tcichemicals.com/KR/ko/p/D2354>
- [11] Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. [cit. 27.06.2021]. Dostupné z: <https://www.tcichemicals.com/AU/en/p/D2355>
- [12] ŠIMEK, Lubomír, Josef HRNČIŘÍK a Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fyzikální chemie II: (koloidní a makromolekulární systémy). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. p. 9. ISBN 80-7318-325-0. Available also from: <https://dnnt.mzk.cz/uuid/uuid:aef6bbe0-d3ac-11e6-8f29-5ef3fc9ae867>
- [13] 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/)
- [14] 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.
- [15] 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.

- [16] Tharwat F. Tadros, Surfactants, Industrial Applications, Editor(s): Robert A. Meyers, Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition), Academic Press, 2003, Pages 423-438, ISBN 9780122274107.
- [17] Chem. Rev. 1950, 47, 1, 1–74 Publication Date: August 1, 1950 <https://doi.org/10.1021/cr60146a001>
- [18] Jacob N. Israelachvili, 20 - Soft and Biological Structures, Editor(s): Jacob N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces (Third Edition), Academic Press, 2011, Pages 535-576, ISBN 9780123751829, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375182-9.10020-X>.
- [19] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013 Feb 22;8(1):102. doi: 10.1186/1556-276X-8-102. PMID: 23432972; PMCID: PMC3599573.
- [20] Vesicles: What are they? Types, structure, and function. Medical and health information [online]. Copyright © 2004 [cit. 26.12.2020]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/vesicle>
- [21] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8, 102 (2013). <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- [22] KUO, An-Tsung a Chien-Hsiang CHANG. Recent strategies in the Development of Catanionic Vesicles. *Journal of Oleo Science. Japan*, 2016, 5(65), 377-384. DOI: 10.5650/jos.ess.15249
- [23] Ion-Pair Amphiphile: A Neoteric Substitute That Modulates the Physicochemical Properties of Biomimetic Membranes Pritam Guha, Biplab Roy, Gourab Karmakar, Prasant Nahak, Suraj Koirala, Manish Sapkota, Takeshi Misono, Kanjiro Torigoe, and Amiya Kumar Panda *The Journal of Physical Chemistry B* 2015 119 (11), 4251-4262. DOI: 10.1021/jp512212u
- [24] Lee, Wei-Han and Tang, Yi-Li and Chiu, Tzu-Chin and Yang, Yu-Min; Synthesis of Ion-Pair Amphiphiles and Calorimetric Study on the Gel to Liquid-Crystalline Phase Transition Behavior of Their Bilayers; *Journal of Chemical & Engineering Data*; 2015; Volume 60; Number 4; 1119-1125; doi:10.1021/je501079n
- [25] Pritam Guha, Biplab Roy, Gourab Karmakar, Prasant Nahak, Suraj Koirala, Manish Sapkota, Takeshi Misono, Kanjiro Torigoe, and Amiya Kumar Panda Ion-Pair Amphiphile: A Neoteric Substitute That Modulates the Physicochemical Properties of Biomimetic Membranes; *The Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119 (11), 4251-4262 DOI: 10.1021/jp512212u
- [26] Jung, H. T., Coldren, B., Zasadzinski, J. A., Iampietro, D. J., & Kaler, E. W. (2001). The origins of stability of spontaneous vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1353–1357, <https://doi.org/10.1073/pnas.041420998>
- [27] Jacek W. Morzycki, Recent advances in cholesterol chemistry, *Steroids*, Volume 83, 2014, Pages 62-79, ISSN 0039-128X, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.02.001>
- [28] An-Tsung Kuo, Cheng-Lin Tu, Yu-Min Yang, Chien-Hsiang Chang, Enhanced physical stability of positively charged catanionic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Volume 92, 2018, Pages 29-35, ISSN 1876-1070, <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.02.013>

- [29] 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-homogenizatorybandelin-sonopuls/>
- [30] 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.
- [31] Kruppa B., Straub J. (1994) Dynamic Light Scattering. In: Mayinger F. (eds) *Optical Measurements*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-02967-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-662-02967-1_11)
- [32] Berne, Bruce, J., 1940- Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics. In: Dover Publications. Inc..New York: Wiley, c1976. ISBN 0-486-41155-9  
[https://books.google.sk/books?hl=sk&lr=&id=vBB54ABhmuEC&oi=fnd&pg=PA1&ots=L7jDD6ofsd&sig=IE8IDDeEQw4SWzqdQuVMgY5ijX0&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.sk/books?hl=sk&lr=&id=vBB54ABhmuEC&oi=fnd&pg=PA1&ots=L7jDD6ofsd&sig=IE8IDDeEQw4SWzqdQuVMgY5ijX0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [33] PROSSER V., a kolektiv (1989); *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha. ISBN 80-200-0059-3.
- [34] Prof. Ing. Josef Novák, CSc. a kolektiv (2008). *Fyzikální chemie bakalářský a magisterský kurz*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013, s. 352-353
- [35] COSGROVE, T. *Colloid science: principles, methods and applications*. 2nd ed. Chichester, West Sussex: Wiley, 2010, xiv, 375 p. ISBN 978-144-4320-206.
- [36] An-Tsung Kuo, Wei-Ta Li, Chia-Yao Tseng, Fang-Wei Hsiao, Chien-Hsiang Chang, Probing the alkyl chain length effects on molecular packing characteristics of mixed ion pair amphiphile/double-chained cationic surfactant vesicular bilayers with the Langmuir monolayer approach, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 454, 2014, Pages 23-31, ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.04.013>.
- [37] C.-L. Chien, S.-J. Yeh, Y.-M. Yang, C.-H. Chang, J.-R. Maa, Formation and encapsulation of catanionic vesicles, *J. Chin. Colloid Interface Soc.* 24 (2002) 31-45
- [38] Martina Havlíková, Jana Szabová, Adam Jugl, Ludmila Mravcová, Chien-Hsiang Chang, Po-Sung Huang, Miloslav Pekař, Filip Mravec, Study of cholesterol's effect on the properties of catanionic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 607, 2020, 125526, ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125526>.
- [39] Pritam Guha, Biplab Roy, Prasant Nahak, Gourab Karmakar, Chien H. Chang, Alexey G. Bikov, Alexander B. Akentiev, Boris A. Noskov, Amit K. Mandal, Anoop Kumar, P.A. Hassan, V.K. Aswal, Takeshi Misono, Kanjiro Torigoe, 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*, Volume 546, 2018, Pages 334-345, ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.03.025>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775718302012>)
- [40] Kuo, A. T., Chang, C. H., & Shinoda, W. (2012). Molecular dynamics study of catanionic bilayers composed of ion pair amphiphile with double-tailed cationic surfactant. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 28(21), 8156–8164. <https://doi.org/10.1021/la300651u>
- [41] K. Maiti, S.C. Bhattacharya, S.P. Moulik, A.K. Panda, Physicochemistry of the binary interacting mixtures of cetylpyridinium chloride (CPC) and sodium dodecylsulfate (SDS) with

special reference to the catanionic ion-pair (coacervate) behavior, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 355, Issues 1–3, 2010, Pages 88-98, ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.11.039>

[42] Myung-Hoon Chung, Myung-Ju Park, Byoung Chul Chun, Yong-Chan Chung, Encapsulation and permeation properties of the polymerized ion pair amphiphile vesicle that has an additional carboxyl group on anionic chain, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 28, Issues 2–3, 2003, Pages 83-93, ISSN 0927-7765, [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00138-8)

[43] Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

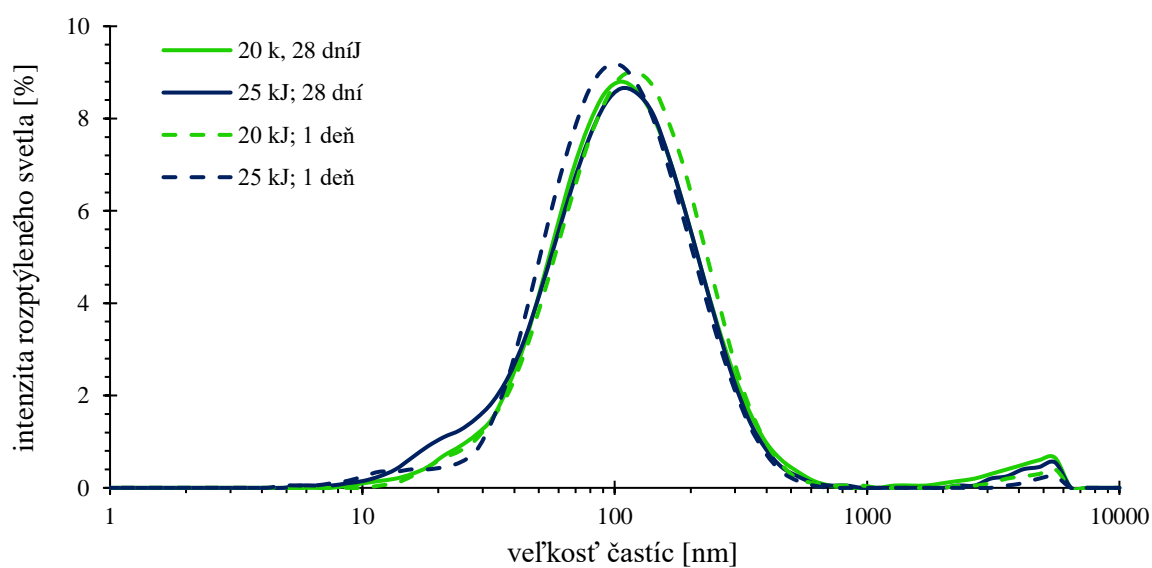
Skratka	Význam skratky
<i>a</i>	Plocha povrchu hydrofóbného jadra agregátu
BAM	Brewster uhlový mikroskop
CMC	Kritická micelárna koncentrácia
cIPA	Kataniónový amfifilný pár
C14-C14Br	Dimetyldimyristylamónium bromid
C16-C16Br	Dimetyldipalmitylamónium bromid
C18-C18Br	Dimetyldioctadecylamónium bromid
C18-C18Cl	Dimetyldioctadecylamónium chlorid
DLS	Dynamický rozptyl svetla
ELS	Elektroforetický rozptyl svetla
HTMAB	Hexadecyltrimetylamónium bromid
IPA	Amfifilný iónový pár
<i>l</i>	Dĺžka chvostu povrchovo aktívnej látky
LUV	Veľké unilamelárne vezikuly
MD	Molekulárna dynamika
MLV	Multilamelárne vezikuly
<i>P</i>	Baliaci parameter
PAL	Povrchovo aktívna látka
PdI	Koeficient polydisperzity
SDS	Sódium dodecyl sulfát
SUV	Malé unilamelárne vezikuly
$v_0$	Objem hydrofóbného reťazca
Z-average	Stredná veľkosť častíc

## 9 PRÍLOHA

### 9.1 Výsledky vplyvu dispergácie na stabilitu systému

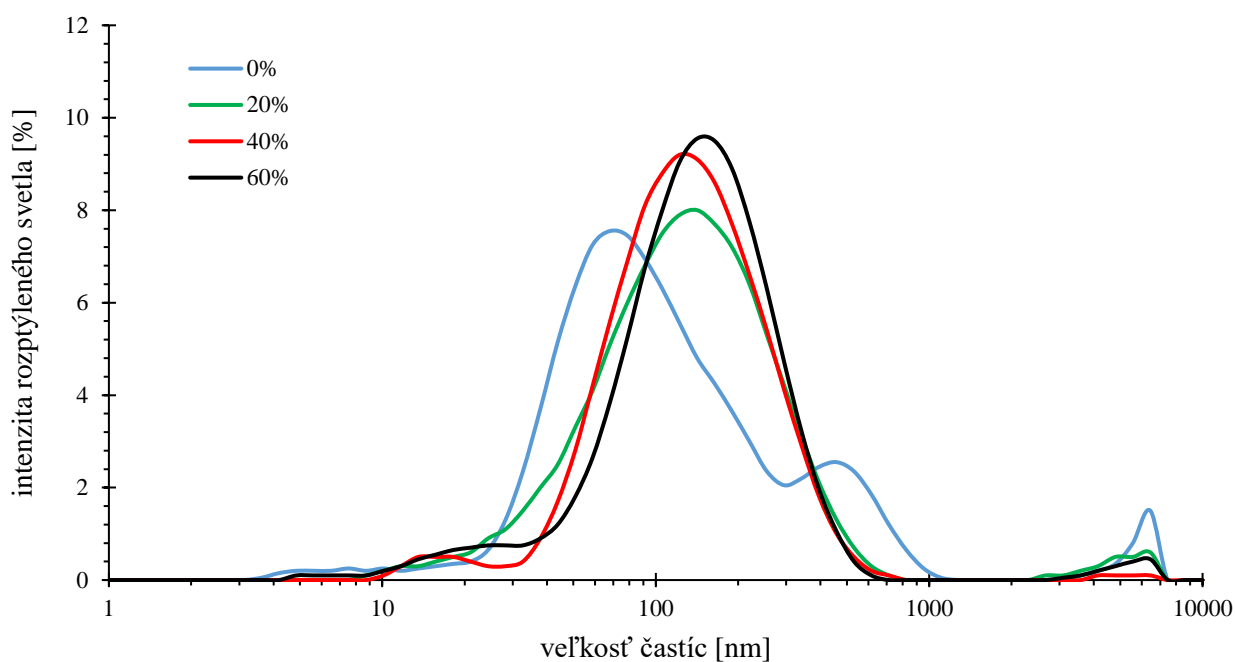
Tab. 5: Namerané hodnoty vzoriek SEPT-DS, 9:1 IPA: C18-C18Cl, 40 mol.% chol., po 1 dni od dispergácie.

	Priemerná veľkosť častíc [nm]	PdI [-]	Zeta potenciál [mV]
10kJ	110 ± 15	0,433 ± 0,010	54 ± 16
15kJ	102 ± 15	0,372 ± 0,066	59 ± 4
20kJ	89 ± 9	0,361 ± 0,047	62 ± 6
25kJ	82 ± 7	0,302 ± 0,008	52 ± 2

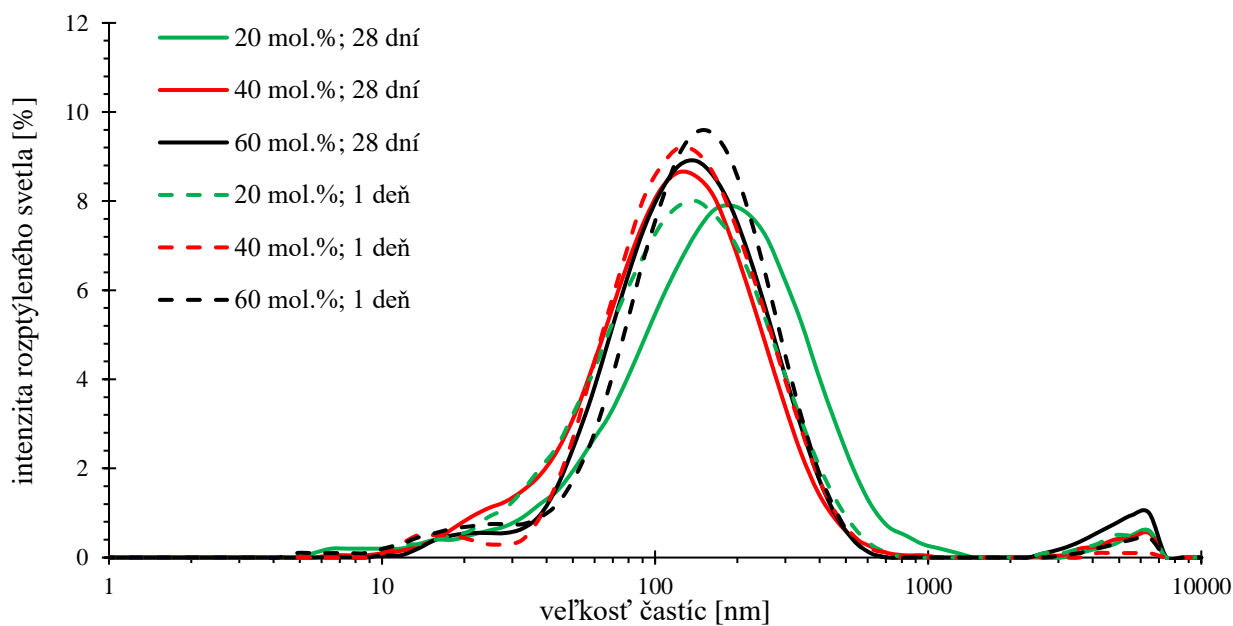


Obr. 27: Graf intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc vzoriek SEPT-DS, 9:1 IPA:C18-C18Cl, 40 mol.% chol, 1 deň a 28 dní od sonifikácie pre hodnoty disperčacej energie 20 a 25 kJ.

## 9.2 Výsledky vplyvu cholesterolu na stabilitu systému



Obr. 28: Graf intenzity rozptýleného svetla na veľkosti častíc vzoriek cholesterolovej rady merané prvý deň po dispergácii.



Obr. 29: Graf distribúcie častíc o rôznom percentuálnom zastúpení cholesterolu 1 a 28 deň od sonifikácie.