



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# VLIV IONTOVÉ SÍLY NA VLASTNOSTI IONTOVÝCH AMFIFILNÍCH PÁRŮ

INFLUENCE OF IONIC STRENGTH ON THE PROPERTIES OF IONIC AMPHIPHILIC PAIRS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lenka Filipová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1585/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Lenka Filipová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Vliv iontové síly na vlastnosti iontových amfifilních párů

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše zahrnující vliv iontové síly na vezikulární systémy s přihlédnutím k systémům na bázi iontových amfifilních párů. Součástí rešerše bude i přehled použitelných technik pro dané studium.
- 2) Na základě rešerše zvolit vhodnou metodu pro studium vlivu iontové síly na vezikuly iontového amfifilního páru HTMA–DS.
- 3) Zhodnotit vliv iontové síly na stabilitu a vlastnosti daného iontového amfifilního páru.

### 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.

---

Lenka Filipová  
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

Tato bakalářská práce se zabývá kataniontovými vezikulárními systémy tvořených z iontových amfifilních párů (IPA) a jejich vlastnostmi v přítomnosti iontové síly. Iontové amfifilní páry byly vytvořeny z jednořetězcových tenzidů – kationaktivního tenzidu HTMAB (hexadecyltrimethylamonium bromid) a anionaktivního tenzidu SDS (dodecylsírán sodný). Následně byl přidán dvouřetězcový kationaktivní tenzid DODAC (dioktadecyldimethylamonium chlorid), díky němuž jsou vezikulární systémy kladně nabitě a elektrostaticky stabilizované. Další stabilizace tohoto vezikulárního systému byla podpořena přidavkem cholesterolu. Systém vykazuje poměrně dobrou stabilitu, jestliže je tvořen z 90 % IPA a 10 % DODAC a přidavek cholesterolu v membráně dosahuje 43 mol.%. Tato stabilita lze narušit podmínkami okolního prostředí, jako je např. iontová síla. Ta byla vytvořena pomocí řady roztoků NaCl o koncentracích 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 50,0; 100,0; 150,0 a 300,0 mM. Změna vlastností vezikulárního systému vlivem působení iontové síly byla analyzována pomocí elektroforetického a dynamického rozptylu světla, fluorescenční anizotropie a generalizované polarizace. Měřením elektroforetického rozptylu světla byl získán  $\zeta$ -potenciál, s jehož pomocí byla určována stabilita systému. Dynamickým rozptylem světla byla určena velikost vezikul. Metodou fluorescenční anizotropie byla určována tekutost vezikulárních membrán, a to s pomocí sondy DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien). Generalizovanou polarizací s využitím sondy Laurdan (6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen) byl pozorován hydratační obal vezikul. Bylo zjištěno, že při použití nízké iontové síly (0,5 až 2,0 mM) klesá velikost vezikul a při použití vysoké iontové síly (50,0 až 300,0 mM) velikost roste.  $\zeta$ -potenciál vykazoval stejný trend pro celou koncentrační řadu, kde s rostoucí iontovou silou rapidně klesala jeho hodnota. Nestabilní vzorky jsou dle  $\zeta$ -potenciálu vzorky s obsahem soli 50,0 až 300,0 mM. Fluorescenční anizotropie klesá s rostoucí teplotou a s rostoucí iontovou silou. Z toho vyplývá, že s rostoucí koncentrací soli a teplotou roste fluidita membrány. Hodnota generalizované polarizace klesá s rostoucí teplotou, čímž roste solvatace membrány vezikul. Při vyšších koncentracích chloridu sodného (50,0 až 300,0 mM) byly hodnoty generalizované polarizace nejvyšší, což znamená, že membrána je méně hydratovaná, a tedy více uspořádaná.

## KLÍČOVÁ SLOVA:

Kataniontové vezikuly, iontový amfifilní pár, iontová síla,  $\zeta$ -potenciál, dynamický rozptyl světla, fluorescenční anizotropie, generalizovaná polarizace, fluidita, solvatace, DPH, Laurdan

## **ABSTRACT**

The Bachelor thesis studies catanionic vesicle systems consisting of ion pair amphiphile (IPA) and their properties in the presence of ionic strength. Ion pair amphiphile was prepared from single-chained surfactants: cationic surfactant HTMAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) and anionic surfactant SDS (sodium lauryl sulfate). Cationic double-chained surfactant DDAC (dimethyldioctadecylammonium chloride) was added in order to stabilize the vesicle system and make it positively charged. Cholesterol was also added to further stabilize the vesicle system. The system is considered to be relatively stable when consisting of 90 % IPA and 10 % DDAC with 43 mol.% cholesterol in a membrane. The stability of the system can be disrupted by external factors such as ionic strength. The Ionic strength was induced by NaCl solutions of varying concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 50.0, 100.0, 150.0 and 300.0 mM). The change of properties of a vesicle system, which was induced by ionic strength, was analyzed by electrophoretic and dynamic light scattering, fluorescence anisotropy, and generalized polarization.  $\zeta$ -potential was obtained by electrophoretic light scattering analysis which determines the stability of the system. Dynamic light scattering measurement resulted in the determination of the size of vesicles. The fluidity of vesicles' membranes was examined by fluorescence anisotropy with DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) as a probe. The hydration shell of vesicles was observed by generalized polarization with Laurdan (2-(dimethylamino)-6-dodecanoylnaphthalene) as a probe. As a result, it was found out that low ionic strength (0.5 to 2.0 mM) causes a decrease in the size of vesicles and high ionic strength (50.0 to 300.0 mM) causes vesicles to grow in size.  $\zeta$ -potential showed a consistent trend for the whole concentration series – its value rapidly decreasing with increasing ionic strength. The samples with the concentrations of salt 50.0 to 300.0 mM were considered unstable according to the  $\zeta$ -potential data. Fluorescence anisotropy decreases with increasing temperature and increasing ionic strength. The value of generalized polarization decreases with increasing temperature; hence there is more solvation of a vesicle membrane. The highest value of generalized polarization was measured when the concentration of sodium chloride was relatively high (from 50.0 to 300.0 mM), as a result of which the membrane was less hydrated and therefore, more organized.

## **KEY WORDS:**

Catanionic vesicles, ion pair amphiphile (IPA), ionic strength,  $\zeta$ -potential, dynamic light scattering, fluorescence anisotropy, generalized polarization, fluidity, solvation, DPH, Laurdan

FILIPOVÁ, Lenka. *Vliv iontové síly na vlastnosti iontových amfifilních párů* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-20]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131401>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

## PROHLÁŠENÍ

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

---

podpis studenta

### *Poděkování*

*Ráda bych poděkovala docentu Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D za jeho vedení, odborné rady a v neposlední řadě i za jeho čas. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Martině Havlíkové za její pomoc, vstřícnost a nekonečnou trpělivost v laboratoři, za její cenné rady, obětavost a věcné připomínky při konzultacích a za její čas, který mi věnovala při zpracování bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za neustálou podporu při studiu.*

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>9</b>
2.1	Tenzidy	9
2.1.1	Kationaktivní tenzidy	10
2.1.2	Anionaktivní tenzidy	11
2.2	Asociativní koloidy	11
2.2.1	Tvorba micel	12
2.2.2	Tvary asociativních koloidů a kritický sbalovací parametr	13
2.2.3	Použití asociativních koloidů	13
2.3	Iontový amfifilní pár (IPA)	14
2.3.1	Kataniontové vezikulární systémy	15
2.4	Iontová síla	17
2.5	Používané metody pro určení vlastností kataniontových vezikul	18
2.5.1	Dynamický rozptyl světla	18
2.5.2	Elektroforetický rozptyl světla	20
2.5.3	Fluorescence a metody na ní založené	21
<b>3</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b>	<b>26</b>
3.1	Příprava kataniontových vezikulárních systémů a elektrostatická stabilizace	26
3.2	Podpora stability kataniontových vezikulárních systémů pomocí cholesterolu a sledování jeho vlivu na membránové vlastnosti	26
3.3	Parametry ovlivňující tvorbu vezikulárních systémů	28
3.4	Vliv iontové síly na vezikulární systémy	29
3.4.1	Vliv iontové síly na velikost a stabilitu vezikul a tuhost jejich membrány	29
3.4.2	Vliv iontové síly na $\zeta$ -potenciál	30
3.4.3	Vliv iontové síly na autoagregaci, mezifázové a termodynamické vlastnosti	31
<b>4</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>34</b>
4.1	Použité chemikálie	34
4.2	Příprava roztoků	34
4.2.1	Příprava zásobního prášku IPA	34
4.2.2	Příprava zásobního roztoku IPA a DODAC v chloroformu	34
4.2.3	Příprava roztoku cIPA a přidavek cholesterolu	34
4.2.4	Příprava roztoků solí NaCl	35
4.2.5	Příprava roztoků tenzidů HTMAB a SDS	35
4.2.6	Příprava roztoků pro elektroforetický a dynamický rozptyl světla	35
4.2.7	Příprava roztoků pro fluorescenční anizotropii a generalizovanou polarizaci	35
4.3	Měření vzorků	36

4.3.1	Měření elektroforetického a dynamického rozptylu světla.....	36
4.3.2	Měření fluorescenční anizotropie a generalizované polarizace .....	36
<b>5</b>	<b>Diskuse a výsledky .....</b>	<b>38</b>
5.1	Výsledky měření za konstantní teploty .....	38
5.1.1	Dynamický a elektroforetický rozptyl světla při 25 °C .....	38
5.1.2	Fluorescenční anizotropie při 25 °C .....	40
5.1.3	Generalizovaná polarizace při 25 °C .....	41
5.2	Výsledky měření s měnící se teplotou .....	42
5.2.1	Fluorescenční anizotropie .....	42
5.2.2	Generalizovaná polarizace.....	44
5.3	Výsledky vizuálního pozorování stability vzorků po přidavku soli v čase.....	45
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografie.....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>55</b>
8.1	Korelační křivky .....	55
8.2	Závislost $\zeta$ -potenciálu na logaritmické koncentraci soli NaCl.....	55
8.3	Vizuální pozorování.....	56
8.4	Souhrnné tabulky výsledků.....	58

# 1 ÚVOD

V této práci jsem se zabývala iontovými amfifilními páry, což jsou v podstatě systémy tvořené dvěma tenzidy. Používané tenzidy pro tvorbu iontových amfifilních párů disponují navzájem opačným nábojem na jejich funkčních skupinách. Nejvíce používaný a prostudovaný systém je vytvořen z kationaktivního tenzidu HTMAB (hexadecyltrimethylamonium bromid) a anionaktivního tenzidu SDS (dodecylsírán sodný). Typicky jsou tyto tenzidy jednořetězcové a jejich spojením vzniká pseudo-dvouřetězcový tenzidový systém nazývaný jako iontový amfifilní pár (z ang. *IPA*). Vzájemná interakce tenzidů je způsobena elektrostatickým působením mezi funkčními skupinami a hydrofobními interakcemi mezi uhlovodíkovými řetězci. Takto vzniklý iontový amfifilní pár je neutrální a vlivem své amfifilní povahy má tendenci ve vodném prostředí vytvářet koloidní struktury, konkrétně vezikuly. Běžně se takto vytvořené koloidní systémy z iontových amfifilních párů označují jako tzv. kataniontové vezikuly. Jedná se o útvary kulovitěho dutého charakteru, jejichž membrána je v tomto případě tvořena dvojvrstvou z iontových amfifilních párů. Stabilita těchto vytvořených kataniontových vezikulárních systémů není příliš dobrá. Z tohoto důvodu je do systému přidán cholesterol nebo další ionogenní tenzid, které plní funkci stabilizačních činidel. Ionogenní tenzid stabilizuje systém elektrostaticky. Tedy přidáním nabitého tenzidu do těchto systémů dochází k nabití membrán kataniontových vezikul, což způsobuje, že vezikuly nemají tendenci agregovat a následně sedimentovat kvůli převládajícím repulzním silám. Co se týče cholesterolu, ten stabilizuje vezikuly obdobnými mechanismy, jako působí v lipozomech a jiných lipidových systémech – snižuje fluiditu membrány. Velmi často dochází ke spojení obou forem stabilizace, aby byl získán co nejstabilnější systém.

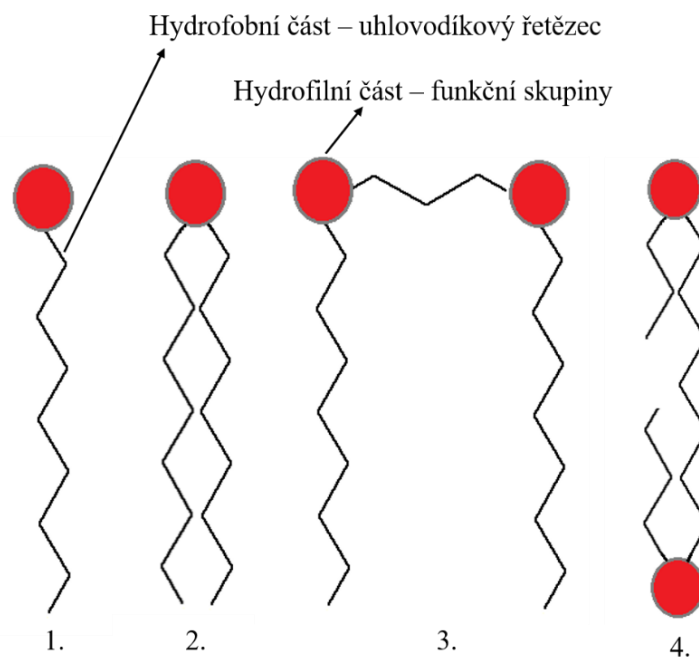
Iontové amfifilní páry jsou v dnešní době poměrně probírané téma, které stále nabývá na významu. Především je sledován jejich vývoj a potencionální využití v oboru farmaceutickém, biologickém i medicínském. Toto možné využití vychází z chemické podstaty iontových amfifilních párů, a to konkrétně, že *IPA* obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní části. Vlivem této struktury vytváří ve vodném prostředí kataniontové vezikuly, a tím umožňují např. enkapsulaci různých látek, jako jsou léčiva, vitamíny či jiné biologicky aktivní látky. Obdobnou vlastností disponují i liposomy tvořené z fosfolipidů. Liposomy lze označit jakožto fungující a biokompatibilní model, ke kterému se tvorbou kataniontových vezikulárních systémů z iontových amfifilních párů chceme v budoucnu co nejvíce přiblížit. Toto připodobnění se může týkat jak jejich stability, chování ve fyziologickém prostředí, tak i jejich možným využitím v praxi. Důvodem, proč se snažíme vytvořit napodobeninu již fungujícího systému, jsou nízké náklady na jejich tvorbu, což nelze říct o fosfolipidech jakožto stavebních kamenech pro liposomy.

Cílem této bakalářské práce je zjistit vliv proměnlivé iontové síly vytvořené z roztoku NaCl na vlastnosti takto vytvořených kataniontových vezikulárních systémů. Zejména byly sledovány vlastnosti jako je velikost,  $\zeta$ -potenciál, mikroviskozita membrány a její solvatace ve vnější části. Charakterizace a kvantifikace těchto vlastností nastala pomocí nejvíce využívaných metod, které byly vybrány na základě literární rešerše. Konkrétně se jedná o metody elektroforetický a dynamický rozptyl světla, fluorescenční anizotropie (s využitím sondy DPH) a generalizovaná polarizace (s fluorescenční sondou Laurdan).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tenzidy

Tenzidy jsou látky, nejčastěji organického charakteru, které se při nižších koncentracích hromadí na povrchu neboli mezifázovém rozhraní mezi vzájemně nemísitelnými tekutinami. Tento jev způsobuje, že tyto látky snižují hodnotu mezifázové energie, a z tohoto důvodu jsou taktéž označovány za povrchově aktivní látky (PAL). Molekuly tenzidů jsou teoreticky složeny ze dvou částí (Obr. 1): hydrofobní a hydrofilní, omezíme-li se na vodné prostředí. Hydrofobní složka PAL je obvykle tvořena dlouhým uhlovodíkovým řetězcem (běžně šestnáct a více uhlíků), který nejčastěji není nikterak větven. Mnohdy je tento úsek molekuly označován jako tzv. hydrofobní ocas. Jak už napovídá název, tato část s vodou téměř vůbec neinteraguje. Naopak hydrofilní část s vodou interaguje velmi ochotně, a to z důvodu chemické struktury tohoto podílu molekuly tenzidu. Hydrofilní část, tzv. hlava, je tvořena především různými polárními funkčními skupinami. Typickým příkladem jsou funkční skupiny na bázi dusíku (amidy, aminy, amoniové soli) nebo sulfáty, fosfáty atd. Vlastnosti tenzidů jsou ovlivněny jak délkou hydrofobního řetězce, tak typem funkční skupiny. V důsledku chemické struktury tenzidů dochází k „samoorganizaci“ tenzidů (z ang. *self-assembly*) ve vodném prostředí. Samotná formace do různých útvarů je poháněna snahou dosáhnout co nejmenší Gibbsovy volné energie, a lze ji tedy označit za důsledek druhé věty termodynamiky (viz v kapitole Tvorba micel) [1; 2; 3].



Obr. 1: Vybrané tenzidy s rozlišením hydrofilní a hydrofobní části. 1. jednořetězcový tenzid, 2. dvouřetězcový tenzid, 3. Gemini tenzid, 4. Bolaform tenzid [3].

Dle schopnosti hydrofilní hlavy disociovat ve vodném prostředí je možné rozlišovat dvě základní skupiny tenzidů: neionogenní a ionogenní tenzidy [1; 3]. Neionogenní tenzidy nepodléhají disociaci – jsou neutrální. Tento typ tenzidů má tendenci udržovat si fyziologické pH nebo hodnoty tomuto pH blízké. Tato vlastnost může v budoucnosti souviset s potencionálním využitím niosomů (vezikul vytvořených z neionogenních PAL) ve farmaceutickém nebo biologickém průmyslu (transport léčiv ve formě peptidů, proteinů, antigenů...) [4]. Ionogenní PAL jsou následně rozlišeny podle schopnosti surfaktantu získat různý typ náboje na kationaktivní (viz v kapitole Kationaktivní tenzidy), anionaktivní (viz v kapitole Anionaktivní tenzidy) a amfoterní [1; 3]. Amfoterní tenzidy (tzv. zwitterionické) mají jak kladné, tak záporné centrum na polární části molekuly, tudíž náboj tohoto tenzidu je ovlivněn pH hodnotou prostředí. Tyto tenzidy jsou velmi často používány k analytické separaci, jako například v kapilární elektroforéze, v iontové chromatografii nebo i v micelární elektrokinetické

chromatografii [5]. Obecně existuje více možností dělení (některé tyto typy jsou schematicky uvedeny na Obr. 1) například podle počtu hydrofilních řetězců, kterými jednotlivé tenzidy disponují (jednořetězcové, dvouřetězcové, víceřetězcové a další), podle počtu polárních skupin (například z ang. *gemini*) nebo další speciální typy (například z ang. *bolaform*) [3].

### 2.1.1 Kationaktivní tenzidy

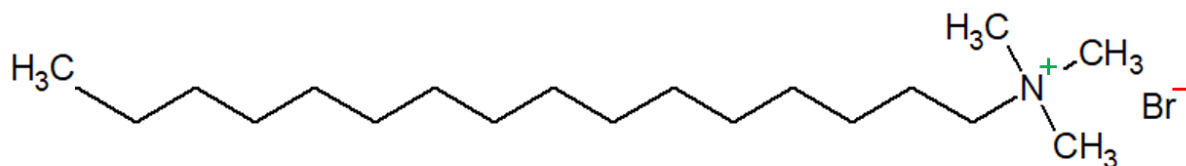
Kationaktivní tenzidy ve vodném prostředí nesou pozitivní náboj na disociované funkční skupině po odštěpení záporně nabitého protiiontu [2]. To, jak snadno bude vytvořen kationaktivní tenzid v disociačním mechanismu, závisí na mnoha faktorech jako například na samotné struktuře tenzidu, na počtu polárních skupin, na typu protiiontu nebo i na hodnotě disociační konstanty [6]. Polární funkční skupinu velmi často u těchto tenzidů tvoří amonné soli a protiionty jsou obvykle zastoupeny ve formě halogenidových iontů. Jako typický příklad těchto surfaktantů lze uvést hexadecyltrimethylamonium halogenid (HTMAX) – HTMAC nebo HTMAB [2; 6].

Kationaktivních tenzidů je poměrně velké množství, nicméně jejich použití je často omežováno vysokou cytotoxicitou. Cytotoxické mechanismy, kterými tyto tenzidy disponují, jsou osmotická lýza a solubilizační mechanismus. Přesto lze najít i kationaktivní tenzidy, které jsou v praxi velmi používané díky jejich antibakteriálním účinkům. Tyto tenzidy obvykle obsahují skupiny, které zvyšují biokompatibilitu tenzidu, typicky to jsou amidy, amidové kyseliny, estery a další. Tyto tenzidy mohou být následně použity i v potravinářském nebo zdravotnickém průmyslu [6].

#### *Hexadecyltrimethylamonium bromid (HTMAB)*

Jedná se o kationaktivní tenzid, který je známý i pod jinými názvy, například cetrimonium-bromid nebo cetyltrimethylamonium bromid neboli CTAB. Z hlediska organické chemie se jedná o kvartérní amonnou sůl (Obr. 2), a zároveň je to jednořetězcová povrchově aktivní látka [7], jejíž hodnota kritické micelární koncentrace odpovídá  $0,92 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . K tvorbě micel dochází při dosažení Krafftovy teploty, která pro HTMAB odpovídá hodnotě 298 K. Při vytvoření micel se bromidové ionty zdržují v blízkosti kladně nabitých micely [8].

Co se týče samotného hexadecyltrimethylamonia, ať už s jeho bromidovým nebo chloridovým aniontem, je využíván díky jeho dobrým antibakteriálním účinkům nebo antiseptickým účinkům proti houbám. Aplikace jsou obvykle zaměřeny na biologickou nebo nanočásticovou sféru. Z biologického hlediska má poměrně široké využití ve spojení s izolací DNA. Slouží obvykle jako pufr při buněčné lýze, protože dokáže udržovat jednotnost DNA v procesu izolace. Z hlediska nanočástic je používán jako růstové činidlo a stabilizátor při tvorbě kovových nanočástic [8]. Jeho využití z hlediska průmyslu je orientováno do vlasové kosmetiky, a to pouze na vybrané produkty z důvodu poměrně vysoké ceny v porovnání s ostatními tenzidy [1].



Obr. 2: Chemická struktura HTMAB [7].

#### *Dioktadecyldimethylamonium chlorid (DODAC)*

Tento kationaktivní tenzid je povrchově aktivní látka organického původu. Opět se jedná, obdobně jako u HTMAB, o kvartérní amoniovou sůl. Nicméně tento surfaktant disponuje dvěma dlouhými uhlovodíkovými řetězci (Obr. 3) [9].

Z hlediska jeho aplikací býval používán jako přídatek do aviváže. Nicméně z důvodu nízké schopnosti biodegradace se dnes nevyužívá v takové míře jako v minulosti. I přes jeho horší biologickou rozložitelnost je stále využíván v kosmetickém průmyslu, a to díky jeho dobrým povrchově aktivním vlastnostem [10]. Další využití DODAC souvisí s organickou syntézou, kde působí jako katalyzátor [11].



Obr. 3: Chemická struktura DODAC dle [1].

### 2.1.2 Anionaktivní tenzidy

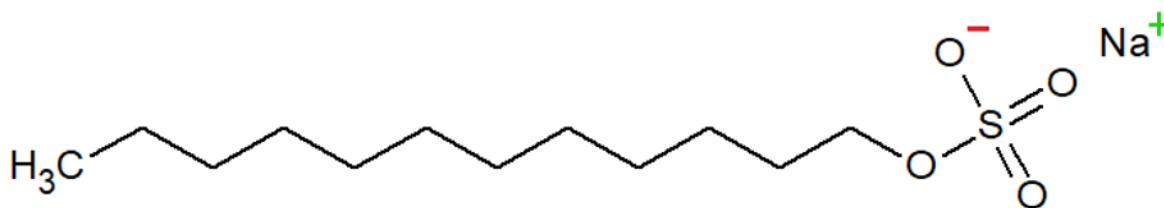
Anionaktivní tenzidy jsou opatřeny záporným nábojem na polární části molekuly PAL. V procesu disociace dojde k tomu, že kladný iont se odštěpí a molekula se nabije záporně [2; 3]. Funkční skupiny tvořící hydrofilní části tenzidů jsou především sírany, fosfáty, siřičitany apod [2]. Jedná se o nejvíce zastoupené přírodní surfaktanty, které mají široké využití v kosmetickém průmyslu a hygienických potřebách (mýdla, sprchové gely, vlasové šampóny a další) [3].

Tento typ tenzidů má i širokou návaznost na biologické látky. Dokážou se elektrostaticky navázat na peptidy, proteiny i enzymy [3; 12]. Vytvořením této nekovalentní vazby mohou způsobit změnu v jejich procesu balení a formování vyšších struktur, což samozřejmě může mít dopad na funkci těchto látek. Změna funkce proteinů, popř. peptidů může mít i blahodárné následky v antivirovém boji proti HIV [12].

#### *Dodecylsírany sodný (SDS)*

Dodecylsírany sodný je jednořetězcový anionaktivní tenzid [13]. Vzhledem k jeho chemické struktuře (Obr. 4) se jedná o typický detergent, tedy o povrchovou aktivní látku s čisticími schopnostmi [14]. Jeho kritická micelární koncentrace při laboratorní teplotě (25 °C) se pohybuje v rozmezí 7 až 10 mM. V případě, že se roztok dodecylsírany sodného zchladí na nízkou teplotu, dojde k jeho vysrážení, především v přítomnosti draselné soli [15].

SDS, jako typický anionaktivní surfaktant s krystalickou strukturou, je využíván jako modelový příklad pro experimentální i teoretické studie [13]. Z laboratorního hlediska je aplikován při buněčné lýze v průběhu extrakce RNA nebo DNA. Tento tenzid je také součástí gelové elektroforézy, konkrétně tzv. SDS-PAGE. Tato metoda využívá SDS jako maskovací činidlo náboje proteinu [15]. Z průmyslového hlediska je SDS využíván v hygienických přípravcích, v kosmetickém průmyslu, ale i v potravinářském průmyslu jako přísada [14].



Obr. 4: Chemická struktura SDS [7].

## 2.2 Asociativní koloidy

Asociativní koloidy jsou specifickou skupinou koloidních disperzních soustav. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 1 nm do 1 μm, což je také jedna z vlastností, kterou se liší od pravých roztoků (analytických disperzí) [16]. Asociativní koloidy jsou tvořeny povrchově aktivními látkami, které se

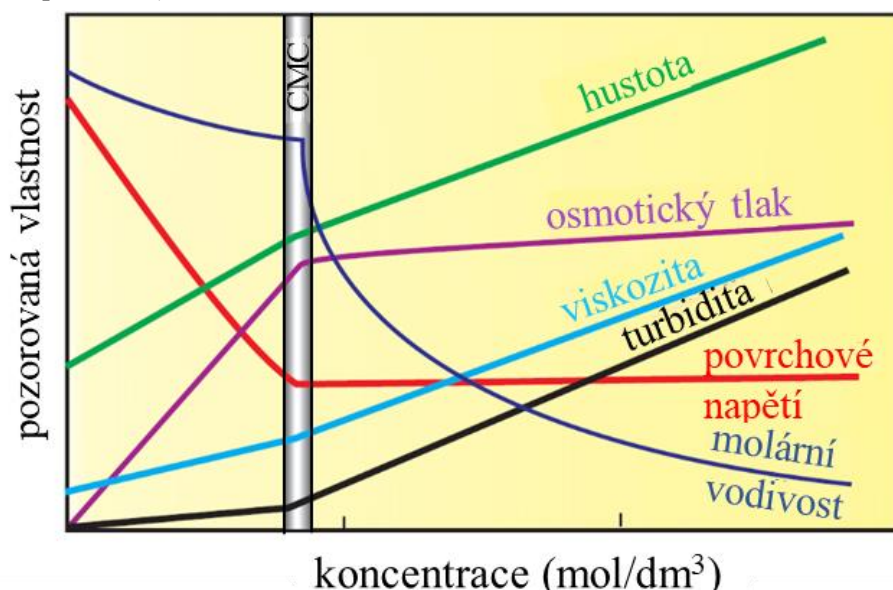
mohou shlukovat do celků různých tvarů nebo velikostí [17]. Jedním z těchto útvarů jsou micely, a právě proto jsou tyto koloidní soustavy často označovány i jako tzv. micelární koloidy. Micely nepřetržitě podléhají strukturním změnám, ve smyslu neustálé výměny PAL z micel do roztoku a naopak [18].

### 2.2.1 Tvorba micel

Tvorba sférických micel a dalších útvarů je založená na chemické struktuře tenzidů a na podstatě jejich charakteristického chování v roztocích. V průběhu tohoto procesu se hydrofobní části molekul surfaktantů shlukují k sobě a vytváří tak centrální části micel [3]. Cílem je tedy minimalizovat kontakt nepolárních úseků molekul PAL s vodou, resp. snížit Gibbsovou volnou energii na co nejnižší možnou hodnotu. Vodné prostředí má totiž vysokou hodnotu kohéznicích sil, kterým nedokážou konkurovat ostatní síly působící mezi hydrofobními řetězci nebo síly působící mezi vodou a hydrofobními řetězci [17]. Na druhou stranu se hydrofilní části orientují směrem k vodnému prostředí [3]. Micely mohou být neutrální nebo nabité. Micely s nábojem vznikají z ionogenních tenzidů a po odstranění protiiontů z roztoku. Neutrální micely vznikají z neionogenních tenzidů nebo ionogenních tenzidů, u nichž je nabitá micela obklopena jejich protiionty, které tak vytváří elektrickou dvovrstvu [17].

K samotnému vzniku micel dochází až v bodě, kdy je v roztoku dostatek tenzidů, resp. když je dosaženo tzv. kritické micelární koncentrace (CMC, z ang. *critical micellar concentration*) [3; 17]. Hodnota CMC se u velkého množství tenzidů vyskytuje v rozmezí desítek  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  až jednotek  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  [17]. Jedna z důležitých charakteristik PAL pro jejich agregaci je jejich rozpustnost v daném prostředí. Aby tedy vůbec došlo k tvorbě micel, musí nejprve dojít k rozpuštění tenzidů v daném prostředí. Zároveň u většiny PAL platí, že jejich rozpustnost klesá s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce. Z tohoto důvodu je v některých případech nutno podpořit rozpouštění dodáním energie. Dodaná energie způsobí zvýšení teploty, která obvykle podporuje rozpouštění. Specifická teplota pro tvorbu micel je označovaná jako tzv. Krafftova teplota [18].

Při dosažení CMC dojde ke skokové změně u některých veličin (Obr. 5). Výrazné zlomy se vyskytují například u molární vodivosti, povrchového napětí, osmotického tlaku a turbiditě, zatímco nepatrné zlomy lze nalézt u hustoty nebo viskozity. Jednotně jsou tyto změny přisuzovány přechodu analytických disperzí (mající částice disperzního podílu menší než 1 nm) na koloidní. Poměrně charakteristické je znázornění klesající hodnoty povrchového napětí do bodu dosažení kritické micelární koncentrace. To je způsobeno přítomností tenzidů v roztoku, které touto vlastností disponují. Za hodnotou CMC se následně povrchové napětí téměř nemění, a to z toho důvodu, že je skoro veškeré množství PAL v roztoku (i to přidávané) okamžitě vázáno do micel a dalších celků [17; 18].



Obr. 5: Schematické znázornění některých veličin na koncentraci a jejich změna v trendu při CMC [17].

## 2.2.2 Tvary asociativních koloidů a kritický sbalovací parametr

Tvary asociativních koloidů jsou dány veličinou tzv. kritickým sbalovacím parametrem  $p$ , který je definovaný následující rovnicí:

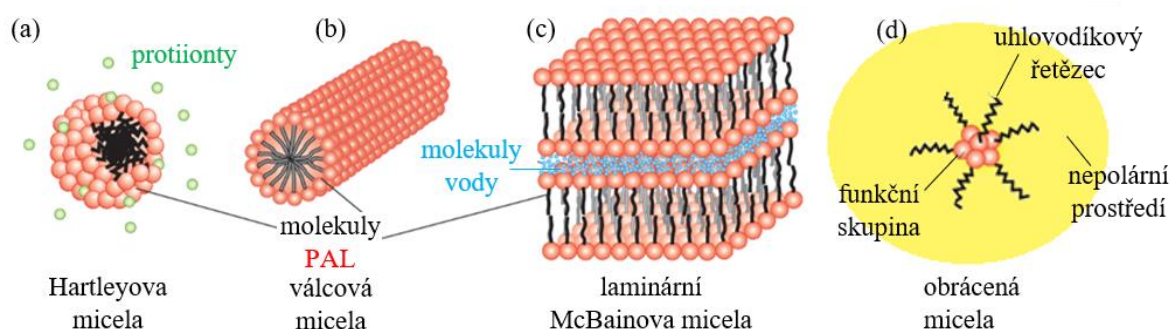
$$p = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}, \quad (1)$$

kde  $v$  je objem hydrofobního řetězce tenzidu,  $l_c$  je délka uhlovodíkového řetězce a  $a_0$  je efektivní plocha funkční skupiny. Na základě výsledné hodnoty tohoto bezrozměrného parametru  $p$  lze předpovědět, jaké tvary v daném prostředí z tenzidů při koncentraci odpovídající CMC vzniknou [19; 20; 21].

Jestliže kritický sbalovací parametr má hodnotu  $0 < p \leq 1/3$ , pak vznikají micely [19; 20; 22]. Jak již bylo dříve zmíněno, micely jsou kulovité plné útvary tvořené z tenzidů. A pokud se tyto PAL vyskytují ve vodném prostředí, tak centrální část micely tvoří uhlovodíkové řetězce, zatímco na povrchu jsou polární funkční skupiny [17; 18]. Micely vznikající při CMC nebo její blízkosti jsou poměrně malé a tvořené nejvýše 150 PAL. Někdy bývají označeny jako tzv. Hartleyovy micely (Obr. 6a) [17].

V nevodném prostředí by toto uskupení bylo přesně naopak. Vnitřní část by byla tvořena funkčními skupinami a vnější část hydrofobními řetězci. Micely tvořené v nevodném médiu jsou někdy označovány jako tzv. obrácené micely (Obr. 6d). Nicméně tento druh micel se nevyskytuje v takové míře jako micely utvářející se v prostředí vodném. Je zde například problém s určením kritické micelární koncentrace [17]. Hodnota kritického sbalovacího parametru je v tomto případě větší než 1 [21].

V případě, že nadále dodáváme tenzidy do roztoku, může dojít k deformaci Hartleyových micel, resp. dochází k jejich růstu. Mohou se tak vytvářet elipsovité struktury, vezikuly, cylindrické, vláknité (Obr. 6b) nebo vrstevnaté struktury [18]. Aby došlo k tvorbě vezikul, musí se hodnota kritického sbalovacího parametru pohybovat v rozmezí  $0,5 < p < 1$  [21; 22]. Vezikula je na rozdíl od micely dutý kulovitý útvar tvořený dvěma vrstvami PAL, který může do svého středu pohltit různé látky [17]. Vrstevnaté struktury vznikají při vyšších koncentracích surfaktantů v roztoku a hodnota kritického sbalovacího parametru je rovna 1 [21]. McBainovy micely (Obr. 6c) jsou tvořeny dvěma vrstvami, kde se uhlovodíkové řetězce tenzidů orientují k sobě navzájem, zatímco polární skupiny se jako obvykle orientují směrem do vodného prostředí. V případě, že se i nadále přidává množství tenzidů do roztoku, McBainovy micely se začínají skládat tzv. na sebe. Polární skupiny se orientují k sobě a mezi nimi se mohou vyskytovat i molekuly vody. Při velmi vysoké koncentraci PAL v roztoku přechází koloidní disperzní soustavy v gel vlivem charakteristického uspořádání laminárních struktur v roztoku [17].



Obr. 6: Charakteristické strukturální tvary micel vznikající ve vodném prostředí (a–c) a obrácená micela v nevodném prostředí (d) [17].

## 2.2.3 Použití asociativních koloidů

Využití micel je poměrně rozsáhlé – například mohou micelární koloidy ovlivnit rychlost chemické reakce. Tento proces je poté nazýván jako tzv. micelární katalýza, kde micely působí jako

katalyzátory [18]. Další využití micel souvisí s polymerací pomocí emulzí, dochází tak k tvorbě latexů. Významné je využití v kosmetickém průmyslu nebo potravinářském průmyslu [17].

Nicméně nejvýznamnější úlohu zastávají v procesech čištění. Díky tomu, že micely obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní části molekul, mohou existovat v obou typech prostředí (vodném i nevodném) a zároveň se v nich formovat ve vyšší struktury. Nečistoty jsou obvykle látky hydrofobní povahy, tudíž ve vodě nejsou rozpustné. Po přidavku PAL do roztoku dojde k adsorpci tenzidů na nečistoty jejich hydrofobními částmi. Tím dojde ke snížení povrchového napětí, jehož důsledkem je lepší interakce nečistoty a okolního média. Nečistota se tak začíná odpoutávat od znečištěné látky do roztoku, kde je obalována surfaktanty a vytváří se micely, popř. vezikuly, v jejichž centrální části je uschována hydrofobní nečistota. Obalením nečistoty pomocí tenzidů dojde ke změně charakteru původní nečistoty, stává se tak hydrofilním útvarům. Vzniklá micela je v použitém rozpouštědle stabilní. Celý výše popsaný způsob je v podstatě založený na procesu solubilizace a detergence. Z tohoto důvodu jsou tenzidy často označovány za detergenty, protože majoritní část z nich využívá proces solubilizace k čištění a praní [17; 18].

### 2.3 Iontový amfifilní pár (IPA)

V dnešní době velmi používaný termín iontových amfifilních párů (IPA, z ang. *ion pair amphiphile*) byl studován již v roce 1987, kdy byl definován první kataniontový tenzid. Na tuto problematiku následně navázalo mnoho studií zabývajících se různými typy iontových amfifilních párů, resp. kataniontových tenzidů. IPA lze definovat jako tenzidový systém vytvořený minimálně ze dvou ionogenních tenzidů. Při procesu formace tohoto systému je obvykle používána iontová ekvivalence (popř. ekvimolární poměr v případě rovnocenného zastoupení funkčních skupin na tenzidech) kationaktivních a anionaktivních tenzidů, což způsobuje tvorbu nenabitých tenzidových systémů [23]. Kationaktivní a anionaktivní tenzidy jsou spojeny pomocí elektrostatických (nekovalentních) interakcí mezi disociovanými funkčními skupinami ionogenních tenzidů a pomocí hydrofobního působení mezi uhlovodíkovými řetězci [24]. Obecně lze charakterizovat čtyři typy iontových amfifilních párů podle typů aplikovaných tenzidů, resp. podle počtu uhlovodíkových řetězců a funkčních skupin, kterými disponují tyto použité tenzidy [23].

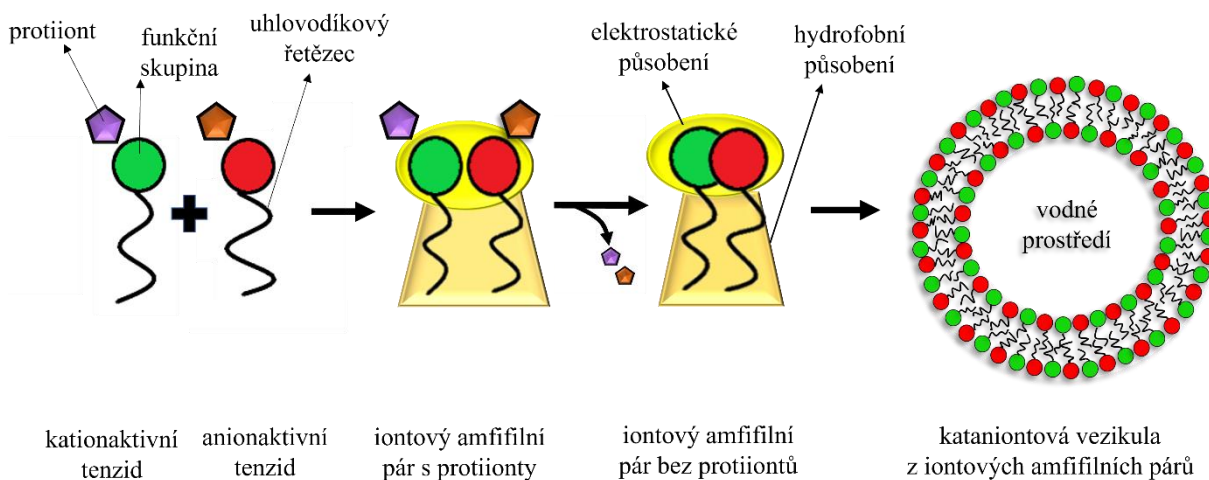
Nejvíce používaný typ iontových amfifilních párů je vytvořen pomocí jednořetězcových kationaktivních a anionaktivních tenzidů, každý z nich disponující jednou funkční skupinou [24; 25; 26]. Spojením těchto typů tenzidů se vytvoří, jak již bylo výše zmíněno, neutrální útvar [23; 25]. Tento tenzidový systém je obvykle vytvářen ve vodném prostředí a při použití ekvimolárního poměru [24]. Zároveň je v procesu formulace iontových amfifilních párů běžné, že se při tomto procesu odstraňují jejich protiionty z roztoku a vytváří se tak čistá IPA. Rozdíly ve vlastnostech mezi iontovými amfifilními páry, které obsahují protiionty, a těmi, které je neobsahují, se velmi těžko posuzují. Ke zjištění těchto rozdílů by musely být nastavené stejné podmínky měření jako například zamezení dalšího přidavku soli, elektrolytu nebo pufu [27]. Nicméně obecně lze říct, že vlastnosti IPA jsou negativně ovlivněny přítomností jejich protiiontů v roztoku [23].

Struktura tohoto tzv. pseudo-dvouřetězcového tenzidového systému velmi připomíná strukturu samotných fosfolipidů. Nicméně podstatný rozdíl mezi lipidy a IPA je jejich ekonomická stránka, která se přiklání na stranu IPA, protože tenzidy jsou mnohem lépe ekonomicky dostupné [26].

Příprava samotného IPA je obvykle zcela spontánní proces [26]. Základní způsoby přípravy kataniontových tenzidů jsou obvykle založeny na srážecích či extrakčních metodách, odpařování nebo metodách výměny iontů. Precipitační metoda je nejvíce využívanou metodou přípravy iontových amfifilních párů, přičemž existují dva používané postupy této metody [23]. První metoda je založená na smíchání dostatečného množství kationaktivního a anionaktivního tenzidu ve vodném prostředí. Následuje filtrace, která umožní odstranění protiiontů od vytvořeného systému IPA. Poslední fáze

tohoto procesu přípravy IPA je vysušení vzniklé sraženiny IPA [23; 25; 28]. Touto metodou dochází k vytvoření čistého systému IPA na rozdíl od druhé metody. Druhý typ precipitační metody je založený na srážení anionaktivního tenzidu obsahující  $\text{Li}^+$  nebo  $\text{Na}^+$  kationty ve vodném prostředí, ve kterém jsou rozptýleny  $\text{Ag}^+$  ionty. Následuje purifikace a rozpuštění ve směsi organického a vodného prostředí. V této fázi je možné přidat příslušné množství kationaktivního tenzidu obsahující halogenidový iont, obvykle chloridový nebo bromidový [23]. Další často využívaná metoda přípravy je metoda založená na iontové výměně. Tato metoda je založená na přeměně kationaktivních tenzidů na jejich hydroxidové formy, zatímco anionaktivní PAL jsou protonovány pomocí iontoměničových pryskyřic. Takto vzniklé roztoky jsou následně smíchány a podléhají klasické acidobazické reakci za tvorby výsledného produktu kataniontových vezikul [23; 24].

Vyskytují-li se iontové amfifilní páry ve vodném prostředí a je jich tam dostatek, formují se do vezikul (Obr. 7) [25]. Předpoklad, že se budou tvořit právě vezikulární systémy, souvisí s kritickým sbalovacím parametrem, který je charakterizovaný vlastnostmi tenzidů tvořící IPA. Konkrétně se jedná o objem a délku hydrofobních řetězců a efektivní plochu funkčních skupin. Plocha, kterou zaobírají elektrostaticky spojené funkční skupiny, je menší, než když jsou zvlášť. Jedná se právě o důsledek elektrostatického působení. Kritický sbalovací parametr tedy v tomto případě odpovídá hodnotě od 0,5 do 1, který se vztahuje k tvorbě vezikul [22; 25]. Nicméně tvorba vezikulárního systému není závislá jen na kritickém sbalovacím parametru, je ovlivněna i teplotou, přítomnými solemi nebo alkoholy v roztoku [22]. Celkově vzato lze říct, že iontové amfifilní páry velmi ochotně vytvářejí vezikulární systémy, které se v tomto případě nazývají kataniontové vezikulární systémy [23].



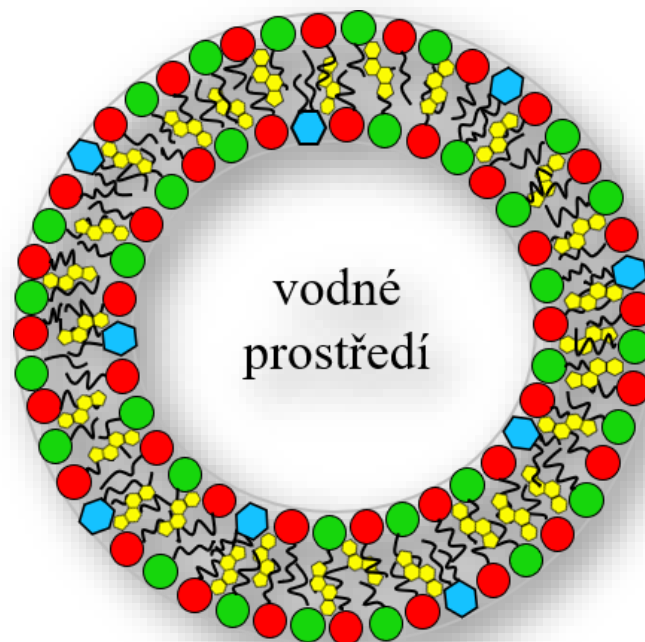
Obr. 7: Schematické znázornění tvorby kataniontových vezikul z IPA dle [23].

### 2.3.1 Kataniontové vezikulární systémy

Vznik kataniontových vezikulárních systémů je poháněn (jako u samotných tenzidů) snahou vytvořit systém, který bude mít v daném prostředí minimální energii. Tudiž úsilí vytvářet vezikuly souvisí s cílem omezit kontakt hydrofobních řetězců s vodou [3; 17]. Samotná příprava vezikulárních systémů z iontových amfifilních párů (jak již bylo dříve zmíněno) je obvykle spontánní proces [23]. Při nastavení správné teploty prostředí a koncentrace použitých tenzidů lze rovnou vytvářet tzv. unilamelární vezikuly, tedy vezikuly s jednou membránou [22]. Nicméně v některých případech je možné využít pro přípravu kataniontových vezikul i částečně spontánní či mechanickou metodu, popř. i evaporací reverzní fázi [23]. Při samotné přípravě kataniontového systému lze navíc kontrolovat i velikosti vzniklých vezikul zvolením počáteční molární koncentrace tenzidů [29].

Fyzikální i chemická stabilita kataniontových vezikulárních systémů vytvořených z IPA je velmi nízká [23; 28; 30]. Fyzikální nestabilita se projevuje spojováním vzniklých vezikul a nemožností si uchovat svou velikost po delší dobu [26]. Tento typ stability kataniontových vezikul lze obecně zvýšit dvěma

způsoby, které lze dohromady kombinovat. První způsob stabilizace je pomocí elektrostatického působení, kdy je do vezikul začleněn další disociovaný ionogenní tenzid. Tento surfaktant se zakomponuje do membrány vezikul, což způsobí, že vezikuly získají náboj. Stejně nabité vezikuly se v roztoku odpuzují a zabraňují tudíž tzv. koalescenci (srůstání a deformace vezikul). Druhý způsob stabilizace souvisí s přidavkem cholesterolu (popřípadě lze místo cholesterolu využít i mastné alkoholy), který se včleňuje sterolovým kruhem do membrány obdobným způsobem jako tenzidy. Cholesterol v kataniontových vezikulách zajišťuje identickou funkci jako v liposomech nebo jiných lipidových systémech, tedy omezuje fluiditu membrány a zabraňuje tak destabilizaci vezikulárního systému [23; 26; 28]. Samotný přídavek cholesterolu neovlivňuje pouze fyzikální stabilitu systému, ale také do určité míry ustaluje nábojový charakter vezikul. Respektive jeho přítomnost snižuje elektrostatické odpuzivé síly a van der Waalsovy interakce mezi jednotlivými vezikulami. Na druhou stranu příliš velké množství cholesterolu může způsobit i krystalizaci hydrofobních částí tenzidů a tím i celkovou destabilizaci vezikul [31]. Tedy v souhrnu, stabilizovaný vezikulární systém obsahuje cholesterol i disociovaný ionogenní tenzid (Obr. 8).



Obr. 8: Kataniontová vezikula z iontových amfifilních párů (červené a zelené struktury) stabilizovaná cholesterolem (žluté struktury) a ionogenním tenzidem DODAC (modré struktury) dle [31].

IPA ve vezikulách se v závislosti na teplotě vyskytuje ve dvou možných formách stejně tak, jako je to u lipidového systému [22; 30]. Tyto stavy mohou v daném systému vzájemně koexistovat a s měnící se teplotou mohou přecházet jeden na druhý. Obě formy popisují charakteristické uspořádání hydrofobních řetězců ve dvojvrstvě vezikul. Gelová fáze, označovaná jako tzv. S-fáze (z ang. *solid phase*), má alkylové řetězce pravidelně zarovnané ve dvojvrstvě. Přídavek cholesterolu způsobí mírné narušení této rigidní struktury. Zatímco fluidní fáze, tzv. L-fáze (z ang. *liquid phase*), má uhlovodíkové části molekuly více neuspořádané v příčném směru dvojvrstvy a přídavek cholesterolu zvyšuje uspořádanost i rigiditu. Tyto jevy jsou známé u lipidových dvojvrstev a byly prokázány i u vezikulárních systému typu IPA. Tento jev je i jedním z mnoha faktorů, které podporují předpoklad, že kataniontové vezikuly mají obdobné vlastnosti, charakter, ale i užití jako liposomy [32].

Kataniontové vezikulární systémy, jak již bylo dříve zmíněno, vykazují podobné vlastnosti jako liposomy, což je dáno i podobnou strukturou iontových amfifilních párů s fosfolipidy. Nicméně samotná obdobná struktura IPA není jedinou podobností mezi těmito systémy [22]. Ukázalo se, že kataniontové vezikulární systémy tvořené z IPA jsou netoxické pro běžné buněčné struktury, ale pro rakovinné buňky

si tyto systémy zachovávají svou cytotoxicitu [22; 29]. Zároveň kataniontové vezikulární systémy disponují poměrně dobrou biologickou rozložitelností [33]. Všechny tyto zmíněné vlastnosti kataniontových systémů ovlivňují předpokládané využití těchto systémů v praxi. A obecně otázka jejich využití je velmi probírané téma ve vědecké obci a v následující části jsou zmíněna jen témata, která se ve vědecké společnosti setkala s největším přijetím. Jedním z nejvíce diskutovaných témat je otázka možného využití kataniontových vezikulárních systémů jako nosičů léčivých látek nebo látek biologicky aktivních [22; 23; 29; 30; 33]. Toto poměrně atraktivní využití je spojené s unikátní vlastností tohoto vezikulárního systému do sebe pohlcovat látky, čímž může vezikulární systém například snížit toxicitu pohlcené látky. Zároveň může tento systém cíleně transportovat v živých systémech absorbovanou složku do potřebné oblasti [22; 23]. Další z možných oblastí využití těchto systémů v medicíně se zabývá otázkou léčení nádorových onemocnění, rakoviny nebo i dermálních onemocnění pomocí těchto systémů [22]. Ve výsledku nosičové vlastnosti kataniontových vezikulárních systémů nemusí být zaměřeny jen na pohlcení bioaktivních složek, ale mohou pohlcovat například i fluorescenční sondy, což umožňuje snadnější a lepší charakterizaci vezikulárního systému [23]. Další potenciální využití souvisí s možností využít vezikuly jako nosiče DNA [23; 33] a použít je tak ke genové terapii jak *in vitro*, tak *in vivo* [22]. Další možnost využití se zaměřuje na spojitost s rychle se rozvíjejícím se odvětvím nano-vědy [22; 23; 33].

## 2.4 Iontová síla

Iontová síla, označovaná písmenem  $I$ , je charakteristická bezrozměrná veličina neideálních roztoků, která je definovaná pomocí následující rovnice:

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum c_i \cdot z_i^2, \quad (2)$$

kde  $I$  je tedy iontová síla,  $c_i$  je hodnota koncentrace daného iontu  $i$  v roztoku a  $z_i$  je hodnota náboje příslušného iontu  $i$  v roztoku. Neideální roztoky jsou roztoky, ve kterých se nabitě částice navzájem ovlivňují. Toto ovlivňování je způsobeno nedostatečnou vzdáleností mezi příslušnými ionty nebo nabitými částicemi, tudíž nejsou tyto částice obklopeny pouze rozpouštědlem, jako je tomu u ideálních roztoků. Z tohoto důvodu nelze v reálných roztocích předpokládat proces, ve kterém by došlo k nahrazení veličiny aktivity za koncentraci. Obecně lze iontovou sílu označit jako veličinu, která způsobuje v reálných roztocích děje, které ovlivňují další procesy, a proto ji není možné zanedbat [34; 35].

V případě, že samotná iontová síla nabývá v roztoku poměrně nízkých hodnot, lze využít zjednodušený model Debye–Hückelovy teorie. Tato teorie pracuje s předpokladem, že existuje centrální iont (popřípadě i centrální částice s nábojem), který je obklopený velkým množstvím opačně nabitých iontů, které tvoří tzv. iontovou atmosféru. Iontová atmosféra do určité míry neutralizuje náboj na centrálním iontu. Dle Debye–Hückelovy teorie iontová síla ovlivňuje určitým způsobem i hodnotu aktivního koeficientu, a tedy i hodnotu aktivity daného neideálního roztoku. Tato výše zmíněná souvislost aktivního koeficientu a iontové síly je charakterizována následující rovnicí [34]:

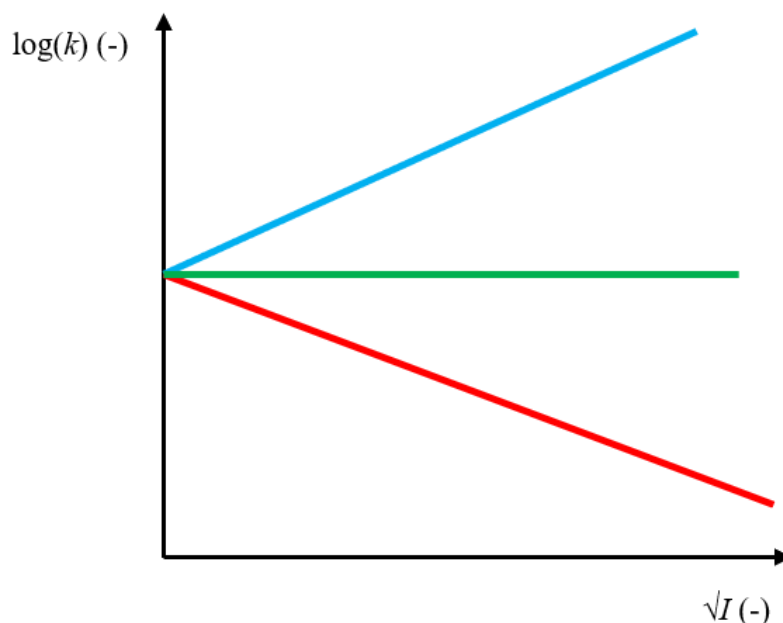
$$\log \gamma = -A \cdot z_i^2 \cdot \sqrt{I}, \quad (3)$$

kde  $\gamma$  je aktivní koeficient,  $A$  je parametr závislý na teplotě a typu prostředí (konstanta) a  $z_i$  je hodnota náboje příslušného iontu [34].

Iontová síla ovlivňuje rychlost chemické reakce v roztocích, tedy v systémech, u nichž se nepředpokládá ideální chování. Tento jev se nazývá primární solný efekt a je popsán Brønsted–Bjerrumovou rovnicí [34], která následuje:

$$\log k = \log k_0 + z_A \cdot z_B \cdot \sqrt{I}, \quad (4)$$

kde  $k$  je rychlostní konstanta,  $k_0$  je rychlostní konstanta při nekonečném zředění (ideálních roztoků),  $z_A$  a  $z_B$  jsou hodnoty nábojů iontů A nebo B, a  $I$  je iontová síla roztoku [35]. To, zdali iontová síla danou rychlost urychluje nebo zpomaluje, závisí na typu použitých iontů (Obr. 9). V případě dvou stejně nabitých iontů (oba kladné, nebo oba záporné), způsobí zvýšení rychlosti chemické reakce. Naopak při použití dvou opačně nabitých iontů (jeden kladný a jeden záporný) se sníží rychlost chemické reakce. V případě, že jedna z reagujících látek není opatřena nábojem (respektive její náboj je nulový, neutrální částice), rychlost reakce teoreticky není ovlivněna iontovou silou. Nicméně pokud reaguje neutrální částice za acidobazické katalýzy, uplatňuje se tzv. sekundární solný efekt, tudíž i v tomto speciálním případě dochází k mírnému ovlivnění rychlostní konstanty [34; 35].



Obr. 9: Schematický graf závislosti  $\log(k)=f(\sqrt{I})$  pro různé kombinace nabitých částic, popř. i nenabitých částic, kde  $k$  značí rychlostní konstantu a  $I$  iontovou sílu. Pro dvě kladné nebo dvě záporné částice platí modrá přímka, pro kombinaci jedny kladné a jedny záporné částice platí červená přímka a pro neutrální a nabitou částici je charakteristická zelená přímka [34].

## 2.5 Používané metody pro určení vlastností kataniontových vezikul

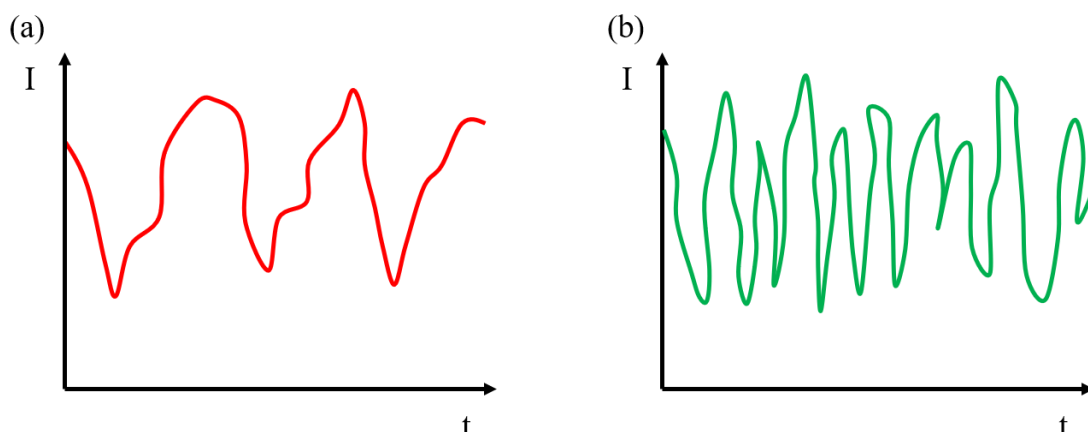
### 2.5.1 Dynamický rozptyl světla

Rozptyl světla je v dnešní době velmi používaná metoda, která má široký rozsah využití. Rozptyl světla lze rozdělit do dvou základních podkategorií. Na základě časového kritéria rozdělujeme statický rozptyl světla a dynamický rozptyl světla. Dynamický rozptyl světla (DLS, z anglického jazyka *Dynamic Light Scattering*) je metoda, která je poměrně velmi využívána v oboru koloidní chemie (např. pro proteiny, vezikuly, liposomy...). Nicméně v dnešní době je DLS využíván i pro průmysl nebo vědu zabývající se nanočásticemi (fullereny, nanotrubičky, kvantové tečky a další) [36; 37].

Jedná se tedy o metodu, která se zabývá malými částicemi, které se v roztoku poměrně rychle pohybují vlivem Brownova pohybu a rozptylují světlo do více směrů [38]. Metoda slouží k určení velikosti těchto pozorovaných částic nebo jejich distribuci v pozorovaném systému. Konkrétně se jedná o časový záznam kolísání rozptýleného světla, které je způsobeno Brownovým pohybem (Obr. 10). Poloměr pozorované částice je následně určen z hodnoty difúzního koeficientu. A to proto, že difúze je proces, který je úzce spojen se samotným Brownovým pohybem [36; 38]. Difúzní koeficient a poloměr částice (za předpokladu kulovité částice) jsou spojeny přes tzv. Stokes–Einsteinův vzorec [38]:

$$r = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (5)$$

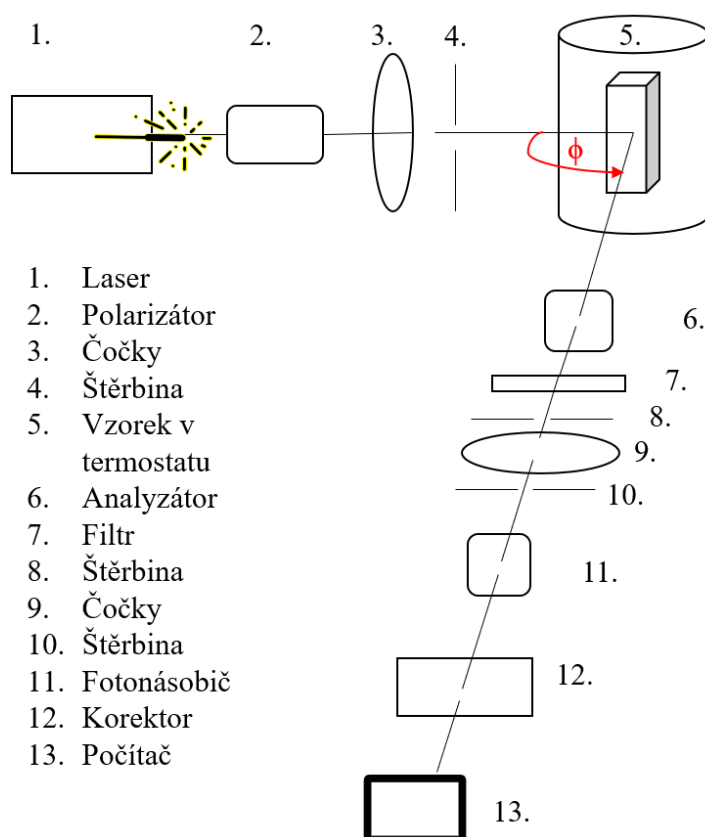
kde  $r$  je poloměr kulovité částice,  $k_B$  je Boltzmanova konstanta,  $T$  je termodynamická teplota,  $\eta$  je dynamická viskozita prostředí a  $D$  je difúzní koeficient [37; 39].



Obr. 10: Schematické průběhy závislosti intenzit rozptýleného světla na časech pro velké (a) a malé částice (b) [38].

Stokes–Einsteinův vztah při měření DLS využívá i Rayleighho aproximaci, která souvisí s průměrem částice a intenzitou rozptýleného světla [37; 38]. Důsledek této aproximace souvisí s nemožností určit velikost částic ve vzorku obsahující velké množství různě velikých částic. Rozsah této metody související s velikostí částic leží v rozmezí 0,5 až 10 000 nm [38].

Co se týče instrumentace metody DLS (Obr. 11), tak zdrojem záření je nejčastěji laserový paprsek koherentního světla. Tento paprsek prochází přes polarizátor, čočku, štěrbinu a dopadá na analyzovaný vzorek. Experiment je sestaven tak, aby laser mířil na vzorek kolmo ve směru rozptylu světla (tento kolmý úhel  $\phi$  je znázorněn červeně na Obr. 11). Výsledný rozptyl je možné snímat pod různými úhly na fotonásobiči, který je následně připojen k počítači [40].



Obr. 11: Podrobné schéma DLS metody [40].

Dnes je tato metoda často spojována s metodami jinými, a to pro větší efektivnost a získávání více informací o analyzovaném vzorku. Pokud je koncentrace roztoku velmi vysoká, dochází k nežádoucímu vícenásobnému rozptylu, pro jehož eliminaci byly vyvinuty další postupy. Naopak pokud existuje velmi zředěný vzorek, nelze klasická DLS metoda použít. A to z důvodu, že je v roztoku nedostatek částic, které by produkovaly rozptyl způsobený Brownovým pohybem, tudíž přístroj analyzuje vlastní vyvolaný signál. [36]

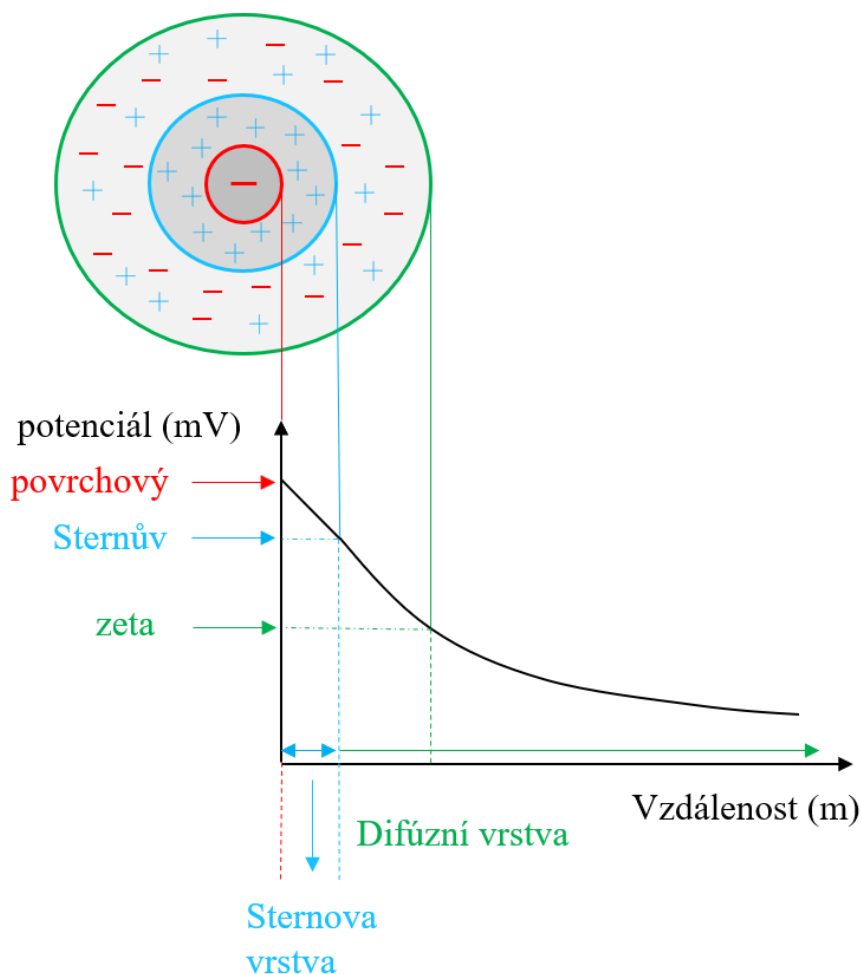
## 2.5.2 Elektroforetický rozptyl světla

Elektroforetický rozptyl světla je metoda, která se využívá k měření  $\zeta$ -potenciálu. Tento potenciál, často označovaný jako tzv. elektrokinetický potenciál, se používá jako veličina, která vypovídá o stabilitě systému [37]. V dnešní době se tento druh měření hojně využívá jako jednoduchá metoda pro určení stability koloidních systémů [37; 41]. Bylo zjištěno, že systém je nestabilní, pokud hodnota  $\zeta$ -potenciálu leží v rozmezí  $-30$  mV do  $+30$  mV. Měření  $\zeta$ -potenciálu se v praxi provádí nepřímo pomocí elektroforetické mobility [41]. Pro zjištění výsledné hodnoty tohoto potenciálu se obvykle využívá rovnice zvaná Henry–Smoluchowski [37; 42]:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \zeta}{\eta}, \quad (6)$$

kde  $\mu_e$  je elektroforetická mobilita,  $\varepsilon_0$  je permitivita vakua,  $\varepsilon_r$  je relativní permitivita,  $\zeta$  je elektrokinetický (zeta) potenciál a  $\eta$  je viskozita prostředí [37; 41].

Elektrokinetický potenciál je veličina, která vychází z teorie o elektrické dvojvrstvě (Obr. 12). Tato teorie předpokládá centrální iont (popř. se může jednat i o nabitou částici), který je umístěn v prostředí obsahující další nabitě ionty. Na tento centrální iont se pevně navazují některé opačně nabitě ionty z roztoku. Ty jsou navázány tak pevně, že pokud se začne centrální iont pohybovat roztokem, tyto ionty se pohybují s ním. Povrchový potenciál této tzv. Sternovy vrstvy se se vzdáleností snižuje lineárně. Následně se kolem centrálního iontu seskupí nabitě částice (jak stejně, tak i opačně nabitě vůči Sternově vrstvě), které jsou v blízkosti tohoto centrálního iontu s pevnou vrstvou drženy pomocí elektrostatických sil, difúzních sil (Brownův pohyb) a adsorpčních sil. Jedná se o slabé interakce, tudíž začne-li se centrální iont pohybovat, tak tato difúzní vrstva zůstane na svém místě, takže se nepohybuje s centrálním iontem. Difúzní vrstva je závislá na koncentraci prostředí, pH prostředí, teplotě a dalších faktorech, tudíž ji nelze označit za statický útvar. Potenciál na povrchu této vrstvy (někdy je označovaná jako rovina kluzu nebo rovina smyku), nazývaný jako  $\zeta$ -potenciál, se s rostoucí vzdáleností snižuje nelineárně.  $\zeta$ -potenciál je tedy součástí této difúzní vrstvy a je ovlivněn i změnou koncentrace prostředí, respektive iontovou silou. Platí, že  $\zeta$ -potenciál klesá u vzorků vyskytujících se ve vodném prostředí se zvyšující iontovou silou (může dokonce dojít i ke zrušení této difúzní vrstvy, pak je  $\zeta = 0$ ). Toto odvození víceméně vyplývá z Guy–Chapmanovy teorie o difúzní vrstvě. Celkový potenciál je tedy dán součtem povrchového potenciálu pevné vrstvy a elektrokinetického (zeta) potenciálu difúzní vrstvy [37; 41; 42].



Obr. 12: Schematické znázornění teorie elektrické dvojvrstvy [41].

### 2.5.3 Fluorescence a metody na ní založené

Fluorescence je typ luminiscence, resp. fotoluminiscence, při níž dochází k emitování proudu fotonů [43]. Jedná se o velmi rychlý proces v řádu přibližně nanosekund, konkrétně se jedná o časové rozmezí  $10^{-10}$  až  $10^{-7}$  sekund [44; 45]. Fluorescenci lze označit jako důsledek absorpce světla, při níž daná molekula přechází do excitovaného stavu. Molekula při tomto excitačním přechodu dodržuje tzv. Frank–Condonův princip. Z hlediska kvantové chemie je fluorescence přechod z první excitované singletové hladiny na hladinu základní (tzv. Kashovo pravidlo) [43; 44].

Samotný průběh procesu fluorescence lze charakterizovat následovně: na začátku máme molekulu, která se nachází v základním stavu a je vystavena proudu fotonů o určité energii a vlnové délce. Tato molekula absorbuje pouze tu část světla (určitou vlnovou délku), která je pro danou molekulu charakteristická. Pohlcení způsobí přechod molekuly do excitovaného stavu na určitou energetickou hladinu, která odpovídá energii pohlcené vlnové délky [43]. Následuje vibrační relaxace, kdy dochází k disipaci energie v teplo [45]. Pokud má dojít k fluorescenci, pak obvykle tato molekula přejde na základní hladinu prvního excitovaného stavu, ze které následuje světelný přechod, fluorescence, na základní energetickou hladinu [43]. Všechny zmíněné procesy přechodů jsou schematicky naznačeny v Perrin–Jabloňského diagramu. Při fluorescenci dochází k uvolnění světla o nižší energii, než mělo světlo absorbované [43; 44]. Rozdíl vlnových délek absorbovaného a emitovaného světla, resp. rozdíl jejich energií, je charakterizován jako tzv. Stokesův posuv [44; 45]. Stokesův posuv je jedním ze základních fluorescenčních pravidel společně s Vavilovým zákonem, pravidlem zrcadlové symetrie a Kashovým pravidlem, které již bylo zmíněno. Vavilův zákon vysvětluje, že výtěžek fluorescence, doba života, tvar fluorescenčního spektra a další veličiny (kromě intenzity fluorescence) nejsou závislé

na absorbované vlnové délce. Pravidlo zrcadlové symetrie definuje, že absorpční a fluorescenční spektrum jsou navzájem zrcadlové obrazy, což je dáno podobným rozložením vibračních hladin [43].

### *Fluorescenční anizotropie*

Termín fluorescenční anizotropie byl poprvé použit v roce 1957, kdy nahradil dříve používaný termín fluorescenční polarizace. Použití a dovysvětlení tohoto termínu následně způsobilo značné zjednodušení původních rovnic běžně využívaných ve fluorescenční polarizaci [46]. V dnešní době se jedná o metodu, která se stanovuje na základě změny orientace pozorované molekuly vůči její molekulové ose během doby života fluorescence (doby života excitovaného stavu). Pro koloidní systémy je tato metoda běžně využívaná ke stanovení tzv. fluidity membrán [47].

Charakterizace fluorescenční anizotropie vychází z původního parametru fluorescenční polarizace, kdy je nutné u anizotropie zohlednit válcovou symetrii měření [46]. Respektive jde o to, že excitační paprsek je vertikálně polarizován, dopadá na vzorek a následně je emitovaný světelný paprsek pozorovaný přes horizontální nebo vertikální polarizátor [46; 48]. Válcová symetrie u fluorescenční anizotropie vychází z charakteru fluorescenčního záření, které má jednu vertikální a dvě horizontální složky [46]. Tudíž fluorescenční parametr polarizace přechází na parametr fluorescenční anizotropie, jak to předepisují následující vztahy:

$$p = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}} \rightarrow r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}} = \frac{\Lambda - 1}{\Lambda + 2}, \quad (7)$$

$$\Lambda = \frac{I_{VV}}{I_{VH}}, \quad (8)$$

kde  $p$  je fluorescenční parametr polarizace,  $I_{VV}$  je intenzita fluorescence ve vertikálním směru,  $I_{VH}$  je intenzita fluorescence v horizontálním směru,  $r$  je fluorescenční anizotropie a  $\Lambda$  je poměr intenzit [46; 49]. Vzhledem k tomu, že parametr fluorescenční anizotropie i parametr polarizace jsou definovány jako poměry intenzit, jedná se o bezrozměrné veličiny. Zároveň tím, že parametr fluorescenční anizotropie byl odvozen z parametru polarizace, lze mezi těmito parametry stanovit přepočtení vztah [50]:

$$r = \frac{2 \cdot p}{3 - p} \quad (9)$$

Při experimentálním měření bývá obvykle výpočet fluorescenční anizotropie korigován pomocí tzv.  $G$  faktoru. Ten se při výpočtu používá pro snížení rozdílů intenzit ve vertikální ( $I_{VV}$ ) a horizontální ( $I_{VH}$ ) rovině při použití vertikálně nebo na sebe kolmo nastavených polarizátorů v průběhu měření. Výpočet fluorescenční anizotropie tedy nově nabývá tvaru [46; 51; 52]:

$$r = \frac{G \cdot I_{VV} - I_{VH}}{G \cdot I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}}, \quad (10)$$

$$G = \frac{I_{HH}}{I_{HV}}, \quad (11)$$

Často jsou pro tuto metodu využívány pomocné látky označované jako fluorofory. Tyto látky se vážou na pozorovaný systém. Při ozáření fluorofory absorbují záření jen v určitém směru vůči molekulové ose. A to, jak moc změní svou polohu nebo úhel od této osy mezi excitovaným a základním stavem, právě vypovídá o hodnotě fluorescenční anizotropie  $r$ , jak již bylo v úvodu této metody zmíněno. Proto je fluorescenční anizotropie někdy označovaná (vzhledem i k historickému pojmenování této metody) jako míra emisní polarizace [47]. Fluorofory ve vodném, a tudíž i málo viskózním prostředí, se mezi excitovaným a základním stavem otáčejí poměrně snadno a rychle. Dokonce rychleji, než je samotný proces fluorescence. Tedy v takových prostředích je metoda fluorescenční anizotropie neúčinná, protože fluorofory se otočí vícekrát kolem své osy, než dojde k záznamu jejich (teď už náhodné) polohy. Fluorescenční anizotropie pro tyto roztoky se blíží téměř nulovým hodnotám. Naopak pokud fluorofory

umístíme do velmi viskózního prostředí, tak odpor prostředí zabráni jejich snadnému otáčení a hodnota fluorescenční anizotropie bude mít hodnotu různou od nuly. Z tohoto důvodu je tato metoda využívána ke stanovení fluidity membrán systémů, jak již bylo v úvodu této kapitoly zmíněno. Pokud je membrána rigidní, fluorofor se nebude moct otáčet a hodnota fluorescenčního parametru anizotropie bude vysoká. Čím více se bude stávat membrána tekutější, tím se bude hodnota anizotropie fluoroforu snižovat vlivem jeho snadnější rotace [47]. Hodnoty fluorescenčního parametru nemohou nabývat jakýkoliv čísel, existuje tzv. fundamentální anizotropie  $r_0$ , což je limitní hodnota fluorescenčního parametru a odpovídá hodnotě 0,4. Tato hodnota nebývá v praxi reálně stanovena, pouze naměřená data se k této hodnotě velmi přibližují. Vysvětlení této hodnoty spočívá v tom, že i v případě, kdy využijeme zmražený systém, ve kterém by mělo docházet k minimálním pohybům a téměř žádnému Brownovu pohybu, přesto dochází k mírné rotaci fluorescenční sondy [46].

Samotná hodnota anizotropie je nezávislá na koncentraci fluoroforu a absolutní intenzitě vzorku [50]. Nicméně měření fluorescenční anizotropie je závislé na vnějších podmínkách. Právě parametr fluorescenční anizotropie a parametry, které charakterizují prostředí, dává do souvislosti následující [49] Perrinova rovnice a její upravený tvar:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \cdot \left( 1 + \frac{R \cdot T}{\eta \cdot V} \cdot \tau \right), \quad (12)$$

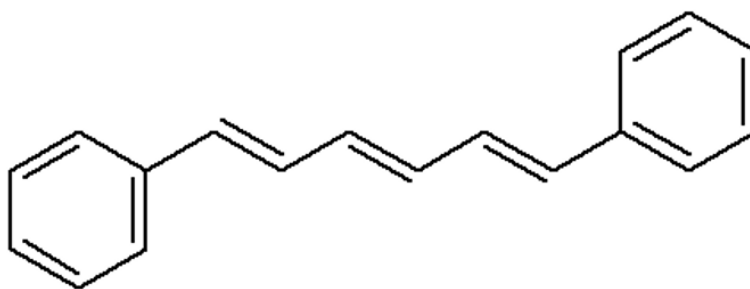
$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \cdot \left( 1 + \frac{\tau}{\theta} \right), \quad (13)$$

$$\theta = \frac{\eta \cdot V}{R \cdot T}, \quad (14)$$

kde  $r$  je parametr fluorescenční anizotropie,  $r_0$  je fundamentální anizotropie,  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  je termodynamická teplota,  $\eta$  je dynamická viskozita prostředí,  $V$  je efektivní objem rotující jednotky,  $\tau$  je doba života fluorescence a  $\theta$  je rotační korelační čas [46; 49]. Tato rovnice vysvětluje, že hodnota fluorescenční anizotropie je ovlivněna interakcemi mezi molekulami a podmínkami dány prostředím. Konkrétně vzájemné interakce (jako například disociace, shlukování...) ovlivňují efektivní objem rotující jednotky, dobu života fluorescence fluoroforu a další [49; 50]. Zatímco ovlivňující podmínky prostředí jsou teplota a viskozita [50]. Nicméně největší podíl na výsledné hodnotě anizotropie má samotná fundamentální anizotropie nebo velikost pozorované molekuly [46].

Fluorescenční anizotropie je poměrně využívaná metoda například v oboru farmacie, biochemické sféře nebo i odvětví zabývající se životním prostředím, a to především díky mnoha výhodám spojenými s touto metodou [50]. Mezi tyto výhody řadíme například vysokou citlivost, nízký požadavek na objem vzorku, dobrou reprodukovatelnost, snadnou a rychlou obsluhu, dokonce i toleranci menších výkyvů intenzit atd [49; 50].

Mezi nejčastěji využívané fluorofory fluorescenční anizotropie s cílem charakterizovat fluiditu membrán patří DPH [47; 48; 53] nebo TMA-DPH [51]. DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien) je hydrofobní fluorescenční sonda, která má tyčinkový tvar (Obr. 13). Tento fluorofor se začleňuje do vnitřní části membránové dvojvrstvy [54]. Charakteristická je jeho nízká fluorescence ve vodném prostředí, která se ale podstatně zvyšuje v nepolárním prostředí [53]. Pro zkoumání dynamiky a organizace membrány jsou mimo DPH často využívány také jeho deriváty například TMA-DPH (1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene). Tyto deriváty obvykle obsahují náboj, díky němuž se dvojvrstva nabije. Náboj, konkrétně u TMA-DPH se jedná o kladný náboj, je umístěn na vnějším povrchu membrány, resp. na rozhraní membrány a prostředí. Toto umístění TMA-DPH ve dvojvrstvě je ovlivněno tím, že TMA-DPH se od DPH strukturně odlišuje. TMA-DPH je totiž amfifilní molekula na rozdíl od čistě hydrofobního DPH a její hydrofilní část je zastoupena trimethylamoniovou skupinou. Právě tato hydrofilní část způsobuje navazování TMA-DPH na fázovém rozhraní, a ne v nitru dvojvrstvy [51; 54].

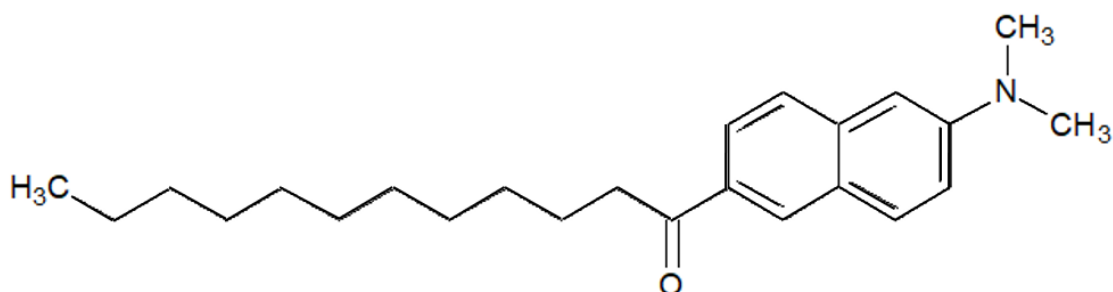


Obr. 13: Chemická struktura fluoroforu DPH [53].

### Generalizovaná polarizace (GP)

Generalizovaná polarizace je častá metoda používaná v koloidní chemii pro studium solvatace membrán a uspořádání molekul, z nichž jsou tyto membrány vytvořené. Tato metoda byla poprvé představena až v 90. letech 20. století, kdy byla využita k charakterizování uspořádanosti lipidů v membránových systémech [55].

Samotná metoda GP je nejčastěji spojovaná s fluorescenční sondou Laurdan [56]. Laurdan (6-dodekanoyl-2-(dimethylamino)naftalen) je amfifilní fluorescenční sonda využívaná ke studiu lipidových membrán [53; 56]. Jeho malá rozpustnost ve vodném prostředí charakterizuje jeho následné použití při měření GP [55]. Toto využití souvisí především s jeho chemickou strukturou (Obr. 14), kdy hydrofobní řetězec této sloučeniny se snadno začleňuje do lipidové membrány. V lipidové dvojvrstvě následně interaguje s dalšími hydrofobními řetězci ostatních tenzidů, příp. lipidů, které touto interakcí udržují sondu v membráně. Naopak chromoforická skupina s navázaným terciárním aminem, která zastupuje hydrofilní část molekuly Laurdanu, zůstává na povrchové části lipidové dvojvrstvy a může proto interagovat s molekulami z vnějšího prostředí vezikul. Tato forma začlenění Laurdanu do membrány je jedním z důvodů, proč je Laurdan považován za citlivou fluorescenční sondu pro studium vnějších částí membrán, a především tedy ke stanovení míry hydratace lipidových membrán nebo membrán jim podobným [56]. Zároveň jeho fluorescenční emise je velmi citlivá na dipolární relaxační procesy. Tato emise je poměrně senzitivní na uspořádanost membrány, kterou lze ovlivnit teplotou, a tím se mění i poloha jeho emisního maxima. Při uspořádané membráně (nízkých teplotách) má Laurdan maximum při 440 nm, při méně uspořádané membráně (vyšších teplotách) při 490 nm. Tyto změny maxim lze poté pozorovat v grafu, kde je vidět charakteristický bathochromní posun Laurdanu v závislosti na rostoucí teplotě a zároveň také dochází k poklesu intenzity emise s rostoucí teplotou [31; 57; 58; 59]. Díky citlivosti Laurdanu (jeho emisních intenzit) na uspořádanost membrány ho lze využít ke stanovení přeměny z gelové uspořádané fáze ( $S_0$ , z ang. *solid ordered*) na fluidní neuspořádanou fázi ( $L_D$ , z ang. *liquid disordered*) a naopak. Tyto fáze lze pozorovat u lipidových systémů, ale i u systémů kataniontových vezikul. [31; 56; 57; 59].



Obr. 14: Chemická struktura Laurdanu [53].

Generalizovaná polarizace je charakterizovaná jako klasická fluorescenční polarizace při zaznamenávání emisních intenzit při dvou různých polarizacích. Emisní polarizace je závislá na

excitaci. Významnou výhodou při použití sondy Laurdan je to, že u této sondy jsou známy vlastnosti polarizace ve dvou různých fázích [57]. Výpočet generalizované polarizace tedy nabývá stavu:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \rightarrow GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}, \quad (15)$$

kde  $I_B$  je intenzita emise v modré oblasti (uspořádanější fázi) a  $I_R$  intenzita emise v červené oblasti (v méně uspořádané fázi), tedy  $I_B$  konkrétně pro Laurdan je při nižších teplotách (v  $S_O$  fázi) a má maximum při 440 nm a  $I_R$  je pro Laurdan při vyšších teplotách (v  $L_D$  fázi) a má maximum při 490 nm [31; 55; 59]. Hodnota GP se pohybuje v rozmezí od  $-1$  do  $+1$ , což je způsobeno tím, že dochází k přeměně jen mezi dvěma stavy [57]. Přesné hodnoty  $-1$  a  $+1$  jsou víceméně teoretické hodnoty, kterých by bylo dosaženo za ideálních podmínek pro ideální vzorky. Hodnota GP  $+1$  odpovídá zcela uspořádané a nehydratované membráně, zatímco hodnota GP  $-1$  je plně neorganizovaná fluidní membrána [51]. Čím je vyšší hodnota generalizované polarizace, tím nižší je fluidita a solvatace vezikul (popř. teplota), případně tím vyšší je koncentrace cholesterolu v membráně a vyšší rigidita (uspořádanost) systému. Naopak čím nižší je hodnota výsledné GP, tím vyšší je fluidita a solvatace vezikuly [31; 55].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Příprava kataniontových vezikulárních systémů a elektrostatická stabilizace

**Chih-Jung Wu a spol.** se zabývali přípravou kataniontových vezikul z iontových amfifilních párů, které jsou pozitivně nabitě vlivem dvouřetězcového tenzidu. Ionový amfifilní pár (IPA) byl vytvořen smícháním jednořetězcových ionogenních tenzidů ve vodném prostředí v ekvimolárním poměru. Jako kationaktivní tenzid byl využit hexadecyltrimethylamonium bromid (HTMAB) a anionaktivní dodecylsírán sodný (SDS). Z takto vytvořeného IPA byly vytvořeny kataniontové vezikuly, které byly doplněny dvouřetězcovými kationaktivními tenzidy s obecným názvem dialkyldimethylamonium bromid (DXDAB). Konkrétně se jednalo o ditetradecyldimethylamonium bromid (DTDAB), dihexadecyldimethylamonium bromid (DHDAB), dioctadecyldimethylamonium bromid (DODAB), jejichž molární poměr se měnil v každém systému od 0,1 do 0,5. Neutrální kataniontové vezikuly z IPA jsou nabitě kladně po začlenění DXDAB do vezikulové membrány. Cílem této práce bylo zjistit, který z použitých DXDAB a v jakém molárním poměru způsobuje nejlepší stabilitu kataniontových vezikulárních systémů. K tomuto posouzení bylo využito měření velikosti vzniklých vezikul, měření  $\zeta$ -potenciálu a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Pomocí  $\zeta$ -potenciálu a délky doby života bylo zjištěno, že bez ohledu na typ použitého dvouřetězcového tenzidu ve vezikulách, jsou vezikuly nestabilní při použití nízkého molárního poměru (konkrétně jeli molární poměr menší než 0,3). V systémech, kde jsou využity vyšší molární koncentrace, konkrétně od 0,3 do 0,5, se začínají uplatňovat rozdíly mezi použitými typy DXDAB. Tyto rozdíly ve stabilitě jsou ovlivněny především délkou uhlovodíkových řetězců v DXDAB. Zároveň bylo pozorováno, že zvyšující se hodnota molárního poměru DXDAB (v rozmezí od 0,3 do 0,5) již nemění hodnotu  $\zeta$ -potenciálu. To je způsobeno disociovanými bromidovými ionty z DXDAB, které se adsorbují na povrch vezikul a snižují tak odpuzování mezi jednotlivými vezikulami, čímž je také stabilizují. Respektive další zvyšování molárního poměru neovlivňuje stabilitu vezikul z hlediska  $\zeta$ -potenciálu. Co se týče délky uhlovodíkového řetězce u DXDAB, bylo zjištěno, že čím delší jsou uhlovodíkové řetězce, tím stabilnější je kataniontový vezikulární systém. Z tohoto důvodu lze označit HTMA-DS/DTDAB vezikuly za méně stabilní než vezikuly HTMA-DS/DHDAB nebo HTMA-DS/DODAB. Další měření se tedy soustředilo na rozdíly mezi HTMA-DS/DHDAB a HTMA-DS/DODAB vezikulárními systémy. Na jejich základě bylo zjištěno, že délka uhlovodíkových řetězců DODAB není zcela kompatibilní s tenzidy tvořící vezikulární systém a může dojít k rozpadu vezikul, resp. vyčlenění DODAB z vezikul. Nicméně k tomuto procesu rozpadu nedochází ihned po vytvoření vezikul, ale až časem. Tudíž systém HTMA-DS/DHDAB lze označit za nejstabilnější systém z vybraných tenzidů, co se týče dlouhodobého hlediska [28].

#### 3.2 Podpora stability kataniontových vezikulárních systémů pomocí cholesterolu a sledování jeho vlivu na membránové vlastnosti

**An-Tsung Kuo a spol.** se zabývali studiem vlivu cholesterolu na stabilitu a molekulární balení kladně nabitých vezikul. Cílem práce bylo zjistit, jestli cholesterol dokáže stabilizovat kataniontový vezikulární systém. Pro tvorbu kataniontového vezikulárního systému byl použit jednořetězcový anionaktivní tenzid SDS a kationaktivní tenzid HTMAB. Následně byl přidán dvouřetězcový tenzid DTDAB, který nabil tento vezikulární systém kladným nábojem. To, jakým způsobem cholesterol ovlivňuje stabilitu těchto systémů, bylo zkoumáno pomocí měření  $\zeta$ -potenciálu, fyzické velikosti vezikul a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Pomocí těchto metod bylo dokázáno, že cholesterol má prospěšný účinek na stabilitu vezikul tvořených HTMA-DS/DTDAB. Tato podpora stability byla vysvětlena díky začlenění cholesterolu, resp. jeho sterolového kruhu, do membrány vezikul, kde podpořil interakci uhlovodíkových řetězců a tím došlo ke zlepšení mechanické pevnosti membrány. Další ovlivnění stability vlivem přidání cholesterolu do membrán vezikul souvisí s oddálením

jednotlivých funkčních skupin tenzidů tvořící IPA nebo DTDAB. Toto zvětšení vzdáleností způsobilo, že se bromidové protiionty z DTDAB nenavazovaly na povrch vezikul tak snadno jako v případě bez použití cholesterolu. Tím, že se bromidové ionty nenavazovaly na povrch vezikul, došlo ke zvýšení náboje, tedy i ke zvýšení  $\zeta$ -potenciálu, který přímo souvisí s charakterizací stability vezikul. Je také nutné poznamenat, že samotný přírůstek cholesterolu k systému HTMA-DS/DTDAB zlepšuje kritický sbalovací parametr. Následně byla sledována i velikost vezikul po začlenění cholesterolu do membrány vezikulárního systému. V tomto případě se již uplatňuje vliv molárního množství cholesterolu v membráně. Výsledky ukazují, že při nízkém molárním poměru ( $x_{\text{chol}} = 0,3$ ) cholesterolu dochází ke snadnější tvorbě malých vezikul, zatímco v případě, kdy se molární poměr zvyšuje, dochází k růstu i samotné velikosti vezikul. Tento jev je způsoben již zmíněným oddálením funkčních skupin v membráně. Nakonec, dle předchozích výsledků, lze shrnout vliv včlenění cholesterolu do membrán HTMA-DS/DTDAB vezikul do dvou důsledků. Zaprvé došlo ke zvětšení odpudivých sil mezi vezikulami navzájem vlivem zvýšení náboje na vezikulách (inter-vezikulární vliv). Zadruhé cholesterol mechanicky zpevnil membránu vezikul (intra-vezikulární vliv) [60].

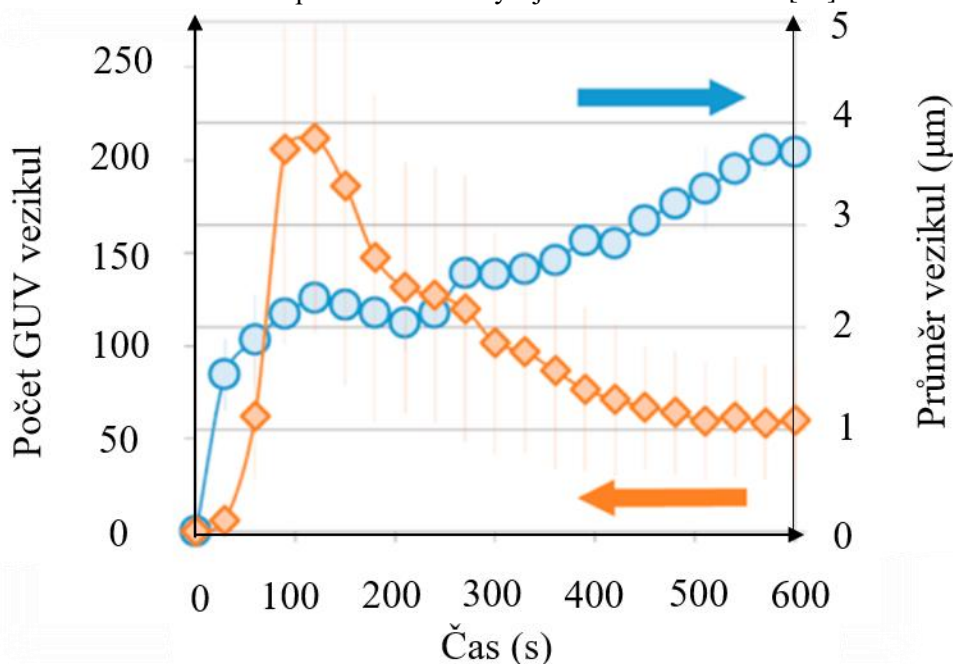
**Martina Havlíková a spol.** se na Vysokém učení technickém, Fakultě chemické, zabývali studiem vlivu cholesterolu na vlastnosti kataniontových vezikulárních systémů při laboratorní teplotě, a to pomocí metod dynamického a elektroforetického rozptylu světla, ultrazvukové a fluorescenční spektroskopie a generalizované polarizace. Iontový amfifilní pár byl vytvořen ekvimolárním zastoupením kationaktivního tenzidu HTMAB a anionaktivního SDS tenzidu za odstranění jejich protiiontů z roztoku. Takto vytvořený iontový amfifilní pár byl smíchán s kationaktivním dvouřetězcovým tenzidem DODAC v roztoku chloroformu, a to konkrétně v poměru HTMA-DS : DODAC 9 : 1. K takto vytvořenému kataniontovému vezikulárnímu systému HTMA-DS/DODAC byl přidán cholesterol. Molární poměr cholesterolu byl zvolen v rozmezí od 0 do 73 mol. %. Systémy, které měly hodnoty obsahu cholesterolu menší nebo rovnu 23 mol. %, byly nestabilní, což bylo zjištěno z hodnot  $\zeta$ -potenciálu a vysokého indexu polydisperzity. Toto zjištění bylo podpořeno i vizuálně, protože tyto vzorky byly poměrně hodně zakalené. V rozmezí obsahu cholesterolu od 33 do 53 mol. % byly systémy dle hodnot  $\zeta$ -potenciálu a velikosti vezikul poměrně stabilní (a zároveň i čiré). Poslední dva vezikulární systémy s vyšším obsahem cholesterolu (63 a 73 mol. %) byly opět méně stabilní a zakalené, což souvisí právě s příliš vysokým molárním poměrem cholesterolu ve vezikulách. V případech, kdy se v systému vyskytuje velké množství cholesterolu, dochází ke krystalizaci hydrofobních řetězců tenzidů, a to způsobuje destabilizaci kataniontového vezikulárního systému. Membránové vlastnosti vezikul byly pozorovány pomocí generalizované polarizace a ultrazvukové spektroskopie. Generalizovanou polarizací byly měřeny vzorky od 23 mol. % cholesterolu a výše, protože vzorky s menší koncentrací cholesterolu byly příliš zakalené, aby je bylo možné proměřit metodou GP. Z měření GP vyplývá, že vzorky obsahující 23, 53, 63 a 73 mol. % cholesterolu mají vyšší hodnotu GP, což vypovídá o nízké fluiditě systému a tedy tzv.  $S_0$  fázi. Systémy obsahující 33 a 43 mol. % cholesterolu měly nejnižší hodnotu GP z měřených vzorků, z čehož lze odvodit, že tyto systémy byly ve fluidní neuspořádané fázi (tzv.  $L_D$  fázi) a měly vyšší solvataci membrány. Všechny provedené měření byly ve shodě s výsledky relativní rychlosti z ultrazvukové spektroskopie. Z hlediska krátkodobé stability, konkrétně po dobu 36 dnů, bylo zjištěno pomocí měření velikosti vezikul,  $\zeta$ -potenciálu a indexu polydisperzity, že systémy obsahující krajní hodnoty cholesterolu (0, 13, 23 a 73 mol. %) vykazují velmi nízkou stabilitu již při jejich vytvoření. Vzorky obsahující 33 a 63 mol. % jsou stabilní pouze po velmi krátkou dobu (u systému s 33 mol. % jen jeden den, u systému s 63 mol. % pouze pět dní). Za nejvíce stabilní vezikuly, které si požadované vlastnosti udržely až po dobu 36 dnů, lze označit systémy obsahující 43 a 53 mol. % Tyto výsledky společně s výsledky DLS, ELS a GP i ultrazvukovou spektroskopií vypovídají o tom, že nejvíce stabilní byl vzorek s 43 mol. % cholesterolu [31].

**Martina Havlíková a spol.** se na Vysokém učení technickém, Fakultě chemické, zabývali studiem vlivu cholesterolu na membránové vlastnosti kataniontových vezikul s měnící se teplotou, a to konkrétně v rozmezí od 10 do 80 °C. Kataniontové vezikuly byly vytvořeny z HTMAB a SDS a s přísadkou 10 mol. % DODAC. K takto vytvořeným vezikulám byl přidáván cholesterol v rozmezí koncentrací 0 až 73 mol. %. V těchto systémech byla proměřována velikostní distribuce, fluidita membrány nebo změna hydratace membrány. Velikost byla měřena pomocí dynamického rozptylu světla, fluidita membrány byla pozorována pomocí fluorescenční anizotropie s využitím dvou fluorescenčních sond: DPH a TMA-DPH. Solvatační vlastnosti vezikulárních systémů byly determinovány pomocí sondy Laurdan při měření generalizované polarizace. Bylo zjištěno, že u stabilních systémů (s přísadkou cholesterolu v rozmezí 23 až 53 mol. %, především stabilní vzorek s 43 mol. % cholesterolu) s unimodální velikostní distribucí a indexem polydisperzity menším než 0,3, nemá teplota příliš velký vliv na velikost vezikulárních systémů. Při pozorování hydratace membrány má teplota na většinu vlastností významný vliv, nicméně tyto změny nemění krátkodobou stabilitu vezikul. Z měření fluorescenční anizotropie bylo zjištěno, že s rostoucí teplotou klesá hodnota fluorescenční anizotropie, a to především u vzorků s nižší koncentrací cholesterolu. Čím je vyšší zastoupení cholesterolu, tím je tento pokles fluorescenční anizotropie menší se zvyšující se teplotou. Z těchto výsledků lze tedy odvodit, že s rostoucí teplotou klesá rigidita membrány a roste fluidita membrány. Také lze odvodit, že při porovnávání vzorků při stejné teplotě bude méně fluidní systém ten, který má vyšší obsah cholesterolu. Z měření generalizované polarizace opět vyplývá, že se zvyšující se teplotou klesá hodnota GP. Čím vzorky obsahují méně cholesterolu, tím je tento pokles markantnější a závislosti mají charakteristické esovitě průběhy. Nicméně čím je obsah cholesterolu vyšší, tím je tento pokles GP nižší a průběhy se blíží klesající přímce. Lze tedy odvodit, že při vyšších teplotách budou vezikuly více solvatovány a budou v tzv.  $L_D$  fázi. Při nižších teplotách budou vezikulární systémy v  $S_0$  fázi a méně hydratované. Zároveň platí, že čím je nižší obsah cholesterolu, tím bude vyšší míra solvatace vnější části vezikulové membrány a tyto systémy budou méně rigidní než systémy s vyšším obsahem cholesterolu [51].

### 3.3 Parametry ovlivňující tvorbu vezikulárních systémů

**Justin Peruzzi a spol.** se zabývali otázkou vlivu parametrů, které ovlivňují tvorbu velkých unilamelárních vezikul (z ang. *GUV*). Parametry, které ovlivňují tuto tvorbu, jsou iontová síla, osmolarita, pH prostředí a agarosová hustota. Použitím neutrálních a různě nabitých lipidů a rehydratačních pufrů byla sledována přímo měnící se dynamika tvorby *GUV* za pomoci hydrogelu. Co se týče použitých lipidů, byly vybrány POPC (fosfatidylcholin), DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propan) a POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol). Z těch byly následně vytvořeny tři typy pozorovaných vezikul: 100% POPC vezikuly (zwitterionické čistě neutrální o pH 7,4), pozitivně nabitě vezikuly z DOTAP : POPC v poměru 1 : 4 (20 % kladně nabitěho tenzidu DOTAP) a negativně nabitě vezikuly z POPG : POPC v poměru 1 : 4 (20 % záporně nabitěho tenzidu POPG). Velikost vzniklých vezikul byla pozorována pomocí fluorescenční mikroskopie s využitím 0,4 mol % ATTO-488-DPPE jako sondy, přičemž časosběrné snímky byly pořizovány každou sekundu po dobu 10 minut. Iontová síla byla vytvořena pomocí PBS pufru o koncentracích 18,5 mM, 185 mM a 925 mM. PBS pufr je směs 137 mM roztoku NaCl, 10 mM roztoku  $PO_4^{3-}$  a 2,7 mM roztoku KCl. Zkoumáním formací *GUV* vezikul byl objasněn vliv náboje, iontové síly, pH, osmolarity a byla demonstrována všestrannost této bio-platformy. V průběhu experimentu bylo zjevné, že na začátku nejprve dochází k formaci menších vezikul, a to ve větším množství (byly pozorovány maxima). Následoval proces, při kterém byl patrný výrazný pokles počtu vezikul (např. oranžová křivka na Obr. 15), protože docházelo ke spojování jednotlivých malých vezikul dohromady (tzv. koalescence) a tvořily se vezikuly větší (například modrá křivka na Obr. 15). Tento trend byl pozorován u všech tří lipidových systémů a všech tří pufrů o různé iontové síle (18,5 mM, 185 mM a 925 mM). Zvyšující se hodnota iontové síly způsobila zvýšení rychlosti srůstání vezikul a tvorbu větších *GUV* vezikul bez

ohledu na jejich náboj. Zvýšení iontové síly vede k Debyeovu screeningu nábojů na lipidech, což usnadňuje koalescenci. Je zde tedy patrná přímá souvislost mezi iontovou silou a velikostí vzniklých vezikul. Zároveň bylo zjištěno, že zvyšující se kyselost pufru měla za následek zvýšenou hodnotu rychlosti formace GUV vezikul, zatímco bazické prostředí tuto rychlost snižovalo. Obecně tedy platí, že ve zkoumaných lipidových systémech se rychlost koalescence GUV zvyšuje s rostoucí iontovou silou PBS pufru, a zároveň rychlost tvorby koreluje s řadou  $v_{\text{DOTAP}} > v_{\text{POPC}} > v_{\text{POPG}}$ . Nejpomalejší rychlost srůstání vezikul u systému obsahující 20 % POPG souvisí s jeho kritickým sbalovacím parametrem. Nejmenší vezikuly byly pozorovány u systému obsahující 20 % DOTAP, následované POPC, a největší byly vezikuly s 20 % POPG. Jak již bylo dříve zmíněno, velikost vezikuly souvisí nepřímo úměrně s počtem vzniklých vezikul. Tudíž největších vezikul s 20 % POPG bylo pozorováno nejméně oproti POPC a 20 % DOTAP vezikulám v prostředích se zvyšující se iontovou silou [61].



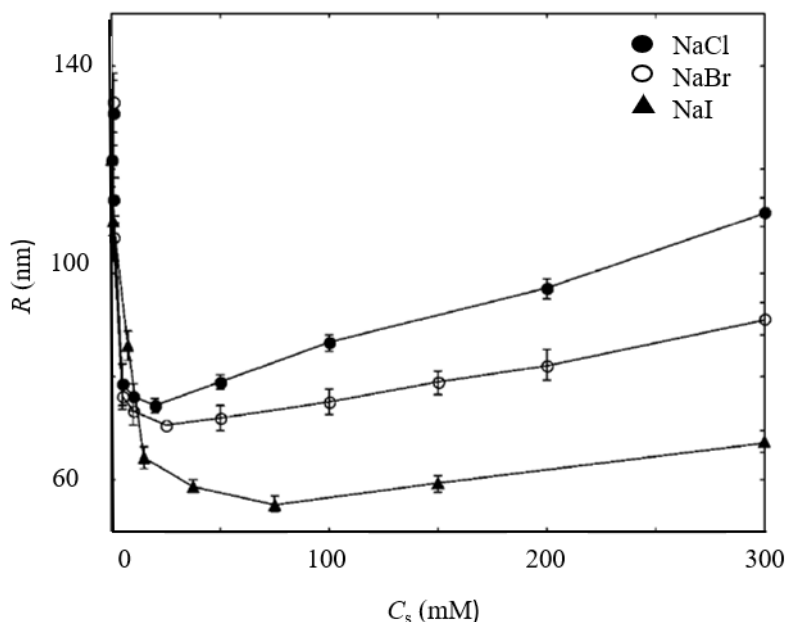
Obr. 15: Graf závislosti množství a poloměru GUV vezikul na čase pro systém s 20 % DOTAP a 925 mM iontové síle PBS [61].

### 3.4 Vliv iontové síly na vezikulární systémy

#### 3.4.1 Vliv iontové síly na velikost a stabilitu vezikul a tuhost jejich membrány

**M. M. A. E. Claessens a spol.** se zabývali vlivem iontové síly na velikost, rigiditu a stabilitu nabitých lipidových vezikul. Lipidové vezikuly o rozmanité velikosti byly připraveny z fosfolipidů DOPG (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoglycerol) a DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholin). Pro následnou transformaci vezikul na jednotnou velikost byl na konci procesu přípravy zařazen proces „zmrazení a rozmrazení“ (z ang. *freeze-thraw process*), který byl opakován v několika cyklech. Bylo zjištěno, že velikosti vezikul z původních GUV a SUV se sobě začínají blížit po zopakování 12. až 15. cyklů tohoto procesu. Iontová síla, kterou bylo následně působeno na vezikuly, byla připravena z roztoků NaCl, NaBr a NaI, jejichž koncentrace byla volena od 0 do 400 mM. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací soli roste polydisperzita vzorků, především při vysokých koncentracích soli (300 až 400 mM). Při těchto koncentracích je dokonce i vizuálně znatelná agregace. Z tohoto důvodu nebyly ani výsledky z DLS pokládány jako průměry velikosti jednotlivých vezikul. Efektivita zvyšovat náboj na polárních skupinách fosfolipidů kopíruje lyotropní řadu a tato schopnost (navyšovat náboj) klesá v řadě:  $I^- > Br^- > Cl^-$ . Naopak hydratace iontů je ovlivněna přesně v opačném pořadí, klesá v řadě:  $Cl^- > Br^- > I^-$ . Chloridy jsou tedy nejméně efektivní pro zvyšování náboje, ale samy jsou nejvíce hydratovány. Právě jev hydratace iontu velmi ovlivňuje výslednou velikost vezikul. A to z toho důvodu, že čím více je samotný iont hydratován, tím více dehydratuje samotnou lipidovou dvojvrstvu. Zároveň platí, že vezikuly jsou

tím menší, čím menší je hustota náboje na povrchu vezikul při vystavení vysoké iontové síle. Na základě těchto jevů bylo odvozeno, že právě chloridové ionty nejvíce ovlivňují velikost vezikul. Při porovnání velikostí vezikul při jedné konstantní koncentraci soli (iontové síle), pak platí, že vždy probíhal růst velikosti v řadě soli:  $\text{NaCl} > \text{NaBr} > \text{NaI}$  (Obr. 16). V případě, že vezikuly byly vystaveny jedné soli o postupně se zvyšující iontové síle (koncentraci), pak u všech solí byly pozorovány dva jevy. Při nízkých koncentracích soli docházelo ke zmenšování velikosti vezikul, a to až do určité hraniční koncentrace, která je závislá na typu použité soli. Tato hraniční koncentrace je tím nižší, čím více bude iont hydratovaný a čím více bude dehydratovat membránu vezikuly ( $C_{\text{max,Cl}} < C_{\text{max,Br}} < C_{\text{max,I}}$  – Obr. 16). Zmenšování velikosti vezikul je způsobeno tím, že malý přírůstek soli ovlivňuje nábojovou hustotu. Dochází ke stlačování el. dvojvrstvy, což vede k bližšímu balení lipidů ve dvojvrstvě. Po překonání této koncentrace bude docházet k druhému jevu, který je charakteristický pro všechny typy použitých solí: další přírůstek soli bude způsobovat růst velikosti vezikul. Nárůst velikosti je vyvolán nabýváním tloušťky lipidové dvojvrstvy. Souhrnně lze tedy předpokládat, že při růstu iontové síle, bude postupně docházet k dehydrataci vnější části membrány, což způsobí těsnější lipidové balení a vytvoření tužší – pevnější části membrány [62].

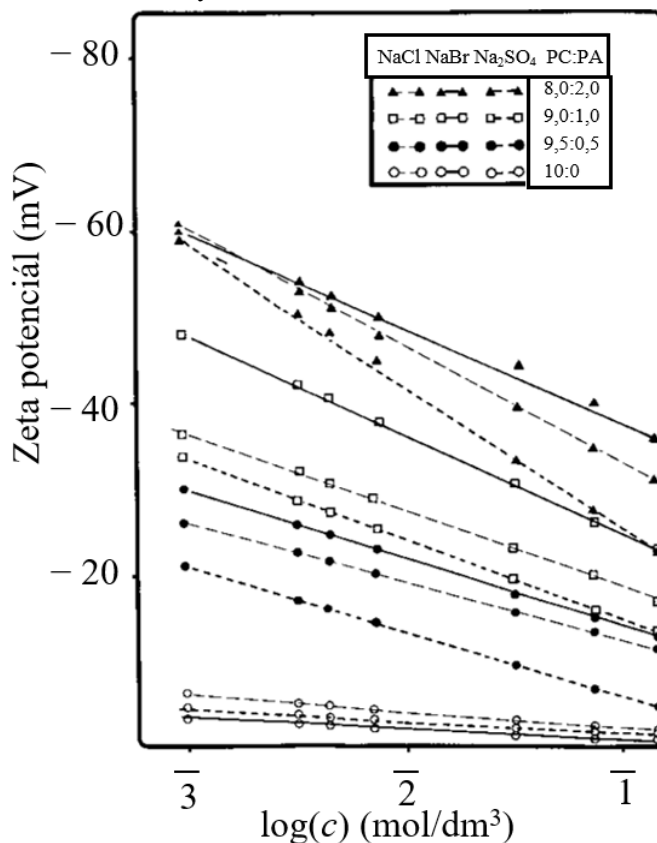


Obr. 16: Graf závislosti velikosti vezikul DOPG na iontové síle pro NaCl, NaBr a NaI [62].

### 3.4.2 Vliv iontové síle na $\zeta$ -potenciál

**F. J. Carrión a spol.** se zabývali vlivem iontové síle na náboj lipidové dvojvrstvy a na stabilitu liposomů. Pomocí evaporace reverzní fázi byly připraveny liposomy jako velké unilamelární vezikuly (tzv. LUV, z ang. *large unilamellar vesicles*) z fosfatidylcholinu (PC) a kyseliny fosfatidové (PA), jejichž poměrné zastoupení se rovnoměrně měnilo pro čtyři systémy od 10 : 0 do 8 : 2. Iontová síla byla vyvolána pomocí roztoků elektrolytů  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , NaCl a NaBr s proměnlivou hodnotou koncentrace od 1 do 150 mM. U každého ze čtyř lipidických systémů byly zkoumány vlastnosti v různých typech elektrolytů o různých koncentracích. F. J. Carrión a spol. se zabývali měřením  $\zeta$ -potenciálu, jehož hodnota sama o sobě souvisí s přítomností kyseliny fosfatidové ve vezikulách, ale je také ovlivněna koncentrací a typem elektrolytů, které vyvolávají různé iontové síly. Při měření  $\zeta$ -potenciálu byly všechny hodnoty záporné, což, jak bylo dříve předesláno, bylo způsobeno přítomností kyseliny fosfatidové, resp. jejím aniontem ve vezikulách. Čím větší podíl kyseliny fosfatidové ve vezikulách, tím nižší hodnota  $\zeta$ -potenciálu (respektive vyšší absolutní hodnota). Měřením bylo zjištěno, že hodnota  $\zeta$ -potenciálu klesá (roste v absolutní hodnotě) s rostoucí hodnotou koncentrace elektrolytů. V případě, že byly všechny koncentrace znázorněny v jejich logaritmickém měřítku, tak tento pokles  $\zeta$ -potenciálu byl lineární (Obr. 17). Zároveň bylo u všech systémů a všech koncentrací elektrolytů pozorováno, že

největší změny  $\zeta$ -potenciálu s rostoucí koncentrací elektrolytu byly naměřeny pro roztoky NaBr a NaCl, naopak nejmenší změny hodnot byly určeny v roztoku  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Tento jev posloupnosti lze vysvětlit i pomocí poloměrů jednotlivých iontů. Obecně platí, že čím menší poloměr daného iontu, tím více dojde k ovlivnění příslušné veličiny, v tomto případě  $\zeta$ -potenciálu. Jedná se v podstatě o souvislost, že zmenšující se hodnota  $\zeta$ -potenciálu, která je způsobena snižující se tloušťkou iontové atmosféry kolem elektrické dvojvrstvy, a snižující se hodnota CMC koreluje s Hofmeisterovou (lyotropní) řadou:  $\frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$ . Fyzikální stabilita liposomů byla také posuzována ve vztahu k agregaci a byla vyjádřena jako závislost času, po který byla zachována velikost vezikul vzhledem k původní hodnotě. Zároveň v tomto sledovaném období nebyla hodnota indexu polydisperzity větší než 0,3. Pro fyzikální stabilitu byl pozorován obdobný trend jako u měření  $\zeta$ -potenciálu. Tedy opět byla zjištěna nejvyšší fyzikální stabilita u NaBr a nejnižší u roztoku  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Roztok NaCl vykazoval při měření pouze nepatrně nižší stabilitu, než byla určena pro roztok NaBr. Při nižších koncentracích elektrolytů i PA v liposomech lze pozorovat souvislost mezi fyzikální stabilitou a povrchovou hustotou náboje. Povrchová hustota náboje totiž přímo souvisí s koncentrací PA a iontovou silou v liposomech. Nicméně tato souvislost zcela neplatí při použití vezikul s vysokým obsahem PA v liposomech, které se vyskytují v prostředí o vysoké hodnotě iontové síly [63].



Obr. 17: Závislosti  $\zeta$ -potenciálu na logaritické koncentraci elektrolytů [63].

### 3.4.3 Vliv iontové síly na autoagregaci, mezifázové a termodynamické vlastnosti

**Sourav Das a spol.** se zabývali autoagregací, mezifázovými a termodynamickými vlastnostmi povrchově aktivní iontové kapaliny na bázi imidazolia ve vodném roztoku. Tyto vlastnosti byly sledovány při měnících se teplotách a v přítomnosti různých solí. Pro toto studium bylo využito velké množství metod, konkrétně se jednalo o konduktometrii, tenziometrii, stacionární fluorescenční spektroskopii, ustálenou fluorescenční anizotropii, časově rozlišenou fluorescenci, izotermickou titrační kalorimetrii, dynamický rozptyl světla a měření  $\zeta$ -potenciálu. Pro tvorbu koloidních struktur byla využita kationaktivní povrchově aktivní látka 1-hexadecyl-3-methylimidazolium chlorid ( $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ ). Iontová síla byla vytvořena pomocí čtyř roztoků: NaCl, NaBr,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (konkrétně jeho

dodekahydrát). Jako fluorescenční sondy byly použity roztoky DPH (v tetrahydrofuranu) a pyrenu (v ethanolu). Kritická micelární koncentrace v nepřítomnosti soli byla stanovena v blízkosti teploty 298,15 K. Tento výsledek byl dosažen pomocí měření více metod, jejichž data byly ve shodě. V případech, kdy došlo k přidávku solí do roztoků C<sub>16</sub>MImCl, tak došlo k posunu CMC vůči systémům, které neobsahovaly žádnou sůl. U všech použitých druhů solí došlo ke změně výsledků CMC k nižším hodnotám. Naopak k opačnému jevu došlo při zkoumání vlivu teploty na hodnotu CMC (došlo ke zvýšení hodnoty CMC s rostoucí teplotou). Zároveň bylo zjištěno, že čím více se bude hodnota koncentrace solí zvyšovat, tím nižší výsledná hodnota CMC bude pozorována. Tento jev lze vysvětlit pomocí teorie o elektrické dvojvrstvě. Prakticky jde o to, že přidávaná sůl, resp. její ionty, způsobují stlačení elektrické dvojvrstvy. To způsobuje snížení elektrostatického odpuzování mezi disociovanými funkčními skupinami C<sub>16</sub>MImCl, tudíž se mohou tyto tenzidy začít dříve shlukovat do koloidních útvarů. Také bylo zjištěno, že pokud dojde k přidávku stejné koncentrace všech sodných solí, tak se hodnota CMC snižuje v pořadí: Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Tedy, že hodnota CMC při použití NaCl bude vyšší (ale zároveň menší než u CMC v čistě vodném prostředí), než při použití roztoku Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Z této řady vychází, že schopnost iontů způsobovat agregaci C<sub>16</sub>MImCl funguje v opačném pořadí, tedy: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup>. Respektive, že síranové ionty způsobují tvorbu koloidních struktur C<sub>16</sub>MImCl již při jeho nižších koncentracích, než je tomu např. u PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Nicméně tato řada zcela nekoreluje s Hofmeisterovou (lyotropní) sérií, jak bylo původně předpokládáno. Lyotropní řada totiž klesá v řadě: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup>. Co se týče iontové síly, tak v případě, že bude dodržena stejná koncentrace pro všechny typy solí, tak iontová síla bude pro každý roztok jiná. Konkrétně se bude měnit v pořadí: PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > Cl<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup>, což je dáno rozdílnými náboji těchto aniontů. Tato řada koreluje i s procesem stlačení elektrické dvojvrstvy a stíněním elektrostatického odpuzování mezi disociovanými funkčními skupinami C<sub>16</sub>MImCl. A z tohoto by mělo vyplývat, že hodnota CMC pro C<sub>16</sub>MImCl by měla být ovlivněna v pořadí Cl<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, což ale nebylo experimentálně zjištěno. Obdobný problém je spojen s procesem hydratace, u kterého se teorie a praktické výsledky také liší. Nesoulad teoretických předpokladů s experimentálně zjištěnými daty je zřejmě způsoben rozdílnými hnačími procesy. Pro tvorbu micel se jedná o elektrostatické účinky společně se snahou hydrofobních řetězců omezit kontakt s vodným prostředím. Zatímco u polymerů a hydrokoloidů je vysolení řízeno procesem dehydratace, pro nějž byla odvozena Hoffmeisterova řada (posloupnost této řady již byla zmíněna výše). Z tohoto důvodu je nutné vzít v úvahu některé procesy, které by mohly ovlivňovat tvorbu micel v přítomnosti solí: 1. interakce protiiontů a specifita tvorby micel, 2. lokálně se měnící dielektrická konstanta, 3. efekt přidávaných iontů na struktury ve vodě. Co se týče specifity ovlivnění tvorby micel v závislosti na typu iontů, tak tento předpoklad nebyl dosud moc dobře pochopen a vysvětlen. Co se týče dielektrické konstanty, tak v průběhu měření a výpočtu bylo počítáno s jednou konstantní hodnotou, která byla stanovena pro rozpouštědlo (vodu). Poslední bod se zabývá otázkou, že přídavek iontů může vytvářet, ničit nebo jinak ovlivňovat koloidní struktury vytvořené z C<sub>16</sub>MImCl. Z hlediska koloidních struktur, které vytváří C<sub>16</sub>MImCl, bylo pomocí kritického sbalovacího parametru zjištěno, že téměř všechny systémy (napříč různými typy koncentrací a všemi čtyřmi typy solí) vytváří micely. Jediná výjimka byla při použití 0,02 mol/kg NaBr, která vytváří tyčinkové útvary. Tento přechod micelární struktury na tyčinkový byl odvozen silnou vazebnou tendencí a menší hydratací bromidového iontu. Bromidový iont účinně snižuje elektrostatické odpuzování mezi funkčními skupinami a stíní náboj na agregátech. Tyto vlastnosti způsobují snížení plochy, kterou zaujímají disociované funkční skupiny, což způsobuje zvýšení kritického sbalovacího parametru nad hodnotu 0,33. Na základě metody fluorescenční anizotropie s využitím sondy DPH byla vyhodnocena CMC pro každý systém tvořený C<sub>16</sub>MImCl a solí o proměnlivé koncentraci. Výsledky těchto hodnot jsou ve shodě s konduktometrií i tenziometrickou metodou, jak bylo v úvodu zmíněno. Všechny vynesené závislosti fluorescenční anizotropie *r* na koncentraci C<sub>16</sub>MImCl mají klesající charakter a inflexní bod těchto křivek je požadovaná hodnota CMC. Na začátku má *r* vysokou hodnotu, protože z chemické struktury DPH (Obr. 13) je patrné, že špatně interaguje s vodou. Z tohoto důvodu zůstanou molekuly DPH ve své blízkosti a není možná jejich rotace. Jakmile se začne přidávat povrchově aktivní látka, tak DPH začíná interagovat s hydrofobními

řetězci  $C_{16}MImCl$  a dochází k uvolnění prostoru pro rotaci DPH. To je v grafu zaznamenané tím, že hodnota  $r$  začíná klesat. V bodě CMC dochází ke zlomu křivky, protože došlo k vytvoření vnitřního hydrofobního prostoru micely, ve kterém je poměrně snadná rotace DPH, což se projevuje nízkou hodnotou fluorescenční anizotropie  $r$ . Následuje téměř konstantní průběh  $r$  se zvyšující se hodnotou koncentrace  $C_{16}MImCl$ , protože další přídavek  $C_{16}MImCl$  již nevytváří lepší nebo horší podmínky pro rotaci molekuly DPH. Co se týče mikropolarity v závislosti na koncentraci přidané soli, tak bylo zjištěno, že mikropolarita klesá se zvyšující se hodnotou koncentrace solí. (Pro toto měření byla využita fluorescenční sonda pyrenu v ethanolu.) Zároveň bylo zjištěno, že tato změna je největší pro roztoky solí  $Na_2SO_4$  a  $Na_3PO_4$  v závislosti na jejich koncentraci. Tedy tvorba micel bude tím více realizovatelná, čím vyšší bude koncentrace těchto solí. Také byl sledován vztah agregačního počtu micel v přítomnosti soli. Tento počet roste dle řady:  $NaCl \approx Na_2SO_4 < NaBr < Na_3PO_4$ . Byla zjištěna lineární závislost mezi agregačním počtem a hydrodynamickými průměry micel v přítomnosti  $NaBr$ ,  $Na_2SO_4$  a  $Na_3PO_4$ , což ale neplatí pro roztok  $NaCl$ . Co se týče měření  $\zeta$ -potenciálu, který úzce souvisí se stabilitou micel, tak tento  $\zeta$ -potenciál pro micely  $C_{16}MImCl$  klesal s každým přídavkem soli. Tento výsledek je v souladu s teorií o elektrické dvojvrstvě, kdy přidávané ionty snižují její tloušťku. Nejvyšší hodnoty  $\zeta$ -potenciálu (a tedy i největší stabilita micel) byly získány pro sůl  $NaCl$ , zatímco nejmenší byly zjištěny pro roztok  $Na_2SO_4$ . Také bylo zjištěno, že dvojmocné a trojmocné anionty způsobují větší pokles  $\zeta$ -potenciálu, což souvisí s efektivnějším snižováním tloušťky elektrické dvojvrstvy. Co se týče velikosti micel, které byly zjišťovány pomocí dynamického rozptylu světla, tak bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací soli dochází ke vzniku větších micel. Největší micely vznikaly v přítomnosti  $NaCl$ , nejmenší v přítomnosti  $Na_2SO_4$ , obecně do určité míry platí řada:  $NaCl > Na_3PO_4 > NaBr > Na_2SO_4$ . [64]

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

Použité chemikálie a jejich specifikace jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1):

Tab. 1: Použité chemikálie pro vytvoření stabilních kationtových vezikul a sůl NaCl:

Název chemikálie (zkratka):	Výrobce:	CAS číslo:	Mr (g/mol)
HTMAB	Sigma-Aldrich	57-09-0	364,45
SDS	Fluka	151-21-3	288,38
DODAC	Alfa Aesar	107-64-2	586,64
cholesterol	Sigma-Aldrich	57-88-5	386,65
chloroform	Penta	67-66-3	119,38
NaCl	Penta	7647-14-5	58,44

### 4.2 Příprava roztoků

#### 4.2.1 Příprava zásobního prášku IPA

Bylo naváženo potřebné množství tenzidů SDS a HTMAB tak, aby po zalití příslušným objemem deionizované vody byla vytvořena výsledná koncentrace roztoků 20 mM. Takto připravené roztoky byly ponechány přes noc míchat na magnetické míchače, aby došlo k jejich úplnému rozpuštění. Další den se tyto roztoky smíchaly v ekvimolárním poměru (1 : 1). Výsledný roztok byl opět ponechán přes noc míchat, ale při udržované teplotě 30 °C. Třetí den byla provedena centrifugace při 3500 ot./min. po dobu 10 minut. Následovala filtrace za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce. Pro filtraci byl využit speciální filtr (Munktell Filter Paper, Grade 391,84 g/m<sup>2</sup>, Ahlstrom-Munksjö), aby nedocházelo k výraznějšímu znečištění filtračního koláče. Vzniklý filtrační koláč – IPA – byl přesunut na Petriho misku a ponechán při 50 °C v sušárně po dobu 3 až 5 dnů. Nakonec byl získaný zásobní prášek IPA uskladněn v suché vialce.

#### 4.2.2 Příprava zásobního roztoku IPA a DODAC v chloroformu

Byl připraven zásobní roztok IPA v chloroformu o výsledné koncentraci 120 mM. Na základě znalosti výsledné koncentrace byla navážena příslušná navážka zásobního prášku IPA a zalita příslušným množstvím chloroformu. Takto připravený roztok byl mírně promíchán, aby se navážka rozpustila.

Zásobní roztok DODAC byl připraven obdobným způsobem jako roztok IPA. Výsledná koncentrace byla opět zvolena na 120 mM pro zjednodušení následujících výpočtů. Navážený DODAC byl zalit chloroformem a ponechán rozpustit.

#### 4.2.3 Příprava roztoku cIPA a přidavek cholesterolu

Bylo určeno, že výsledný poměr IPA a DODAC má být 9 : 1. Při znalosti, že konečný roztok má mít koncentraci 2 mM a objem 60 ml, došlo k přepočtu objemů jednotlivých zásobních roztoků IPA a DODAC. Při rozdělení 60 ml v příslušném poměru pro přípravu 2 mM roztoku cIPA (kladně nabitá IPA neboli HTMA-DS/DODAC) by bylo potřeba 54 ml 2mM roztoku IPA a 6 ml 2mM roztoku DODAC. Tedy při zohlednění 120mM koncentrace zásobních roztoků IPA a DODAC bylo zapotřebí 0,9 ml zásobního roztoku IPA a 0,1 ml zásobního roztoku DODAC.

Bylo naváženo příslušné množství cholesterolu tak, aby jeho výsledná koncentrace v roztoku činila 43 mol. %. Byly přidány příslušné objemy roztoků IPA (0,9 ml) a DODAC (0,1 ml). Po rozpuštění cholesterolu byly k systému přidány skleněné kuličky, aby zakryly dno skleněné nádoby na dvě řady. Roztok cIPA s cholesterolem se společně s kuličkami zvortexoval, aby došlo k obalení kuliček

chloroformovým roztokem a ke zvětšení povrchu k vytvoření tenkého chloroformového filmu. Roztok byl ponechán v digestoři do druhého dne, aby došlo k úplnému odpaření chloroformu. Chloroform může totiž způsobit destabilizaci výsledných vezikul.

Druhý den byly kuličky s cIPA a cholesterolem rehydratovány 60 ml deionizované vody, vzniklý roztok byl opět zvortexován, aby došlo k úplnému rozpuštění. Následně byla tato směs sonifikována tyčovým dispergátorem (ultrazvukový homogenizátor Bandelin SONOPULS UW 3200 s využitím sondy VS 70 T) při 50% amplitudě až do dosažení 25 kJ, aby došlo k vytvoření malých unilamelárních vezikul (tzv. SUV, z ang. *small unilamellar vesicles*). V průběhu sonifikace došlo k odkalení vzorku, což je jeden z ukazatelů, že proces byl proveden správně a výsledkem jsou SUV. Nicméně pro ověření správnosti vytvořených vezikul byla využita metoda DLS, kterou byla změřena velikost vytvořených vezikul. Tato velikost by se měla pohybovat v rozmezí 80–100 nm. Výsledné vezikuly byly skladovány v sušárně při teplotě 30 °C, a to kvůli citlivosti vzorků (zejména tenzidu HTMAB) na teplotu, kdy pod 25 °C dochází k vysrážení roztoku.

#### 4.2.4 Příprava roztoků solí NaCl

Roztok soli NaCl byl připraven rozpuštěním příslušného množství pevné NaCl v deionizované vodě, aby vznikl roztok o výsledné koncentraci 0,60 M. Další roztok této soli byl připraven jako nasycený roztok, který odpovídá koncentraci 5,40 M NaCl. Roztok chloridu sodného o koncentraci 0,60 M byl používán pro vytvoření nižší iontové síly v připravované koncentrační řadě, konkrétně pro roztoky 0,5; 1,0 a 2,0 mM. Roztok nasycené soli byl používán pro zbylé koncentrace – 50,0; 100,0; 150,0 a 300,0 mM.

#### 4.2.5 Příprava roztoků tenzidů HTMAB a SDS

Byly připraveny vzorky HTMAB navážením příslušné navážky tak, aby přidavkem vody vznikl roztok o výsledné koncentraci 5 mM (CMC při lab. teplotě je 0,92 mM [8]). Navážka byla zalita daným množstvím deionizované vody, bylo přidáno míchadlo a vzorek byl ponechán přes noc na magnetické míchačce, aby došlo k úplnému rozpuštění navážky.

Obdobným způsobem proběhla i příprava roztoků SDS, ale navážka byla zvolena tak, aby výsledný roztok měl koncentraci 17 mM. Výsledné koncentrace SDS i HTMAB byly stanoveny tak, aby byly vyšší, než je CMC příslušného tenzidu při laboratorní teplotě. Hodnota CMC pro tenzid SDS odpovídá hodnotě kolem 10 mM [15].

#### 4.2.6 Příprava roztoků pro elektroforetický a dynamický rozptyl světla

Do vialek byly napipetovány příslušné objemy stabilních vezikul připravené z HTMA-DS : DODAC = 9 : 1 s 43 mol. % cholesterolu. Do těchto objemů bylo po malých přídavicích (ideálně po kapkách) přidáváno příslušné množství soli pro vytvoření roztoků o koncentrační řadě soli NaCl 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 50,0; 100,0; 150,0 a 300,0 mM. Takto připravené roztoky byly zvortexovány a ihned měřeny.

#### 4.2.7 Příprava roztoků pro fluorescenční anizotropii a generalizovanou polarizaci

Pro měření fluorescenční anizotropie byly stabilní vezikuly označeny sondou DPH, aby vznikla výsledná koncentrace této sondy ve vzorcích vezikul  $10^{-4}$  M. Pro měření fluorescenční anizotropie byly označeny sondou DPH mimo jiné i roztoky samotných tenzidů HTMAB a SDS. Takto vytvořené vzorky byly ponechány do druhého dne v sušárně při teplotě 30 °C na horizontální třepačce pro účinnější solubilizaci fluorescenční sondy do membrány vezikul. Do takto označených vzorků vezikul (s výjimkou roztoků samotných tenzidů HTMAB a SDS) byly další den přidány příslušné objemy roztoků NaCl (0,60 M nebo 5,40 M). Po přidavku soli byly vzorky zvortexovány a ihned měřeny.

Pro měření generalizované polarizace byl postup přípravy vzorků a koncentrační řada chloridu sodného stejná jako pro měření fluorescenční anizotropie až na typ použité sondy. Pro generalizovanou polarizaci byla využita sonda Laurdan o stejné výsledné koncentraci ve vezikulách, jako tomu bylo u DPH.

V případě roztoků obsahující 300 mM soli NaCl byla používána sonifikace při zvýšené teplotě (do 60 °C) před měřením fluorescenční anizotropie nebo generalizované polarizace tak, aby došlo k odkalení roztoku. Vzorek byl sonifikován z důvodu jeho okamžitého zakalení po přidávku příslušného množství soli.

### 4.3 Měření vzorků

#### 4.3.1 Měření elektroforetického a dynamického rozptylu světla

Pro měření elektroforetického i dynamického rozptylu světla byl využit přístroj ZetaSizer (ZetaSizer Nano Series, Malvern, s He-Ne laserem). U jednotlivých měření byla nejprve měřena velikost a až poté  $\zeta$ -potenciál, aby nedošlo ke znečištění vzorku vlivem vysoké vodivosti u měření ELS. Přístroj pro měření velikosti a  $\zeta$ -potenciálu byl nastaven dle parametrů uvedených v následující tabulce (Tab. 2):

Tab. 2: Nastavení přístroje ZetaSizer pro měření DLS a ELS

Dynamický rozptyl světla – měření velikosti částic			
Prostředí	Voda nebo sůl <sup>1</sup>	Teplota	25 °C
Kyveta	Skleněná (PCS-1115)	Délka stabilizace na teplotu	30 až 60 s
Čas jednoho měření	10 s	Počet měření v jednom opakování	12
Počet opakování	3	Pozice měření v kyvetě	1 nm

Elektroforetický rozptyl světla – měření $\zeta$ -potenciálu			
Prostředí	Voda nebo sůl <sup>1</sup>	Teplota	25 °C
Kyveta	Cela pro zeta	Délka stabilizace na teplotu	10 s
Model	Smoluchowski	Počet měření v jednom opakování	10 až 15
Počet opakování	5		

Výstupem měření velikosti vezikul byl korelogram, distribuční křivky, hodnota průměrné velikosti a index polydisperzity (PDI, z ang. *polydisperze index*). Výstupem měření elektroforetického rozptylu světla byla hodnota  $\zeta$ -potenciálu, která vypovídá o stabilitě vzorku.

#### 4.3.2 Měření fluorescenční anizotropie a generalizované polarizace

Pro měření fluorescenční anizotropie i generalizované polarizace byl využit spektrofluorimetr FS5 (Stacionární spektrofluorimetr FS5, Edinburgh Instrument Ltd, cela SC-25). Připravené vzorky s proměnlivými koncentracemi roztoku NaCl byly měřeny v křemenné kyvetě jak pro fluorescenční anizotropii, tak pro generalizovanou polarizaci. Pro měření fluorescenční anizotropie byly využity vzorky označené sondou DPH s nastavením přístroje pro fluorescenční anizotropii dle následující tabulky (Tab. 3):

<sup>1</sup> Vzorky bez přidávku soli byly změřeny na vodné prostředí. Vzorky s přidávkem soli byly měřeny na prostředí soli o jednotné koncentraci 0,1 M při 25 °C, pro které byly nalezeny odpovídající přepočtové veličiny: dynamická viskozita 0,89832 cP [66], index lomu 1,3352 [67] a permitivita 76,6 [68].

Tab. 3: Nastavení spektrofluorimetru FS5 pro měření fluorescenční anizotropie

Excitační maximum	350 nm	Dwell time	0,4 s
Emisní maximum	430 nm		
Polarizátory	Excitační i emisní	Termometr	Peltier modul
Metoda měření	Emisní anizot. spektrum	Teplota	15 až 75 °C (25 °C)
G – faktor	Měření	Krok u teploty	5 °C
Měřené spektrum	395 až 495 nm	Teplotní mód	Reverzní
Krok vln. délky	4 nm	Stabilizace na teplotu	120 s
Počet opakování	1	Míchání	Zapnuto

Pro měření generalizované polarizace byly využity vzorky vezikul označené sondou Laurdan. Měření probíhalo opět na přístroji FS5 s nastavením pro generalizovanou polarizaci dle následující tabulky (Tab. 4):

Tab. 4: Nastavení spektrofluorimetru FS5 pro měření generalizované polarizace

Excitační maximum	350 nm	Dwell time	0,15 s
Emisní maximum	480 nm při 75–80 °C	Termometr	Peltier modul
Polarizátory	Žádné	Teplota	15 až 75 °C (25 °C)
Metoda měření	Emisní spektrum	Krok u teploty	5 °C
Měřené spektrum	400 až 550 nm	Teplotní mód	Reverzní
Krok vln. délky	1 nm	Stabilizace na teplotu	120 s
Počet opakování	1	Míchání	Zapnuto

## 5 DISKUSE A VÝSLEDKY

Byly měřeny a vyhodnocovány vlastnosti vezikul jako je velikost, stabilita, fluidita nebo solvatace membrány, příp. fáze membrány, a to za konstantní i proměnné teploty. Měření bylo provedeno pro celou koncentrační řadu roztoku chloridu sodného, konkrétně se jednalo o vzorky s obsahem soli NaCl 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 50,0; 100,0; 150,0 a 300,0 mM. Hodnoty koncentrací odpovídají hodnotě iontové síly dle rovnice (2), protože byla vybrána jednomocná sůl obsahující pouze jednomocný kationt  $\text{Na}^+$  a jednomocný aniont  $\text{Cl}^-$ . Z tohoto důvodu nebylo nutné přepočítávat koncentraci na iontovou sílu a zohledňovat možné vzniklé rozdíly mezi těmito veličinami.

Veškeré měření probíhalo na dvou přístrojích ZetaSizer a spektrofluorimetru FS5. ZetaSizer sloužil k určení velikosti a  $\zeta$ -potenciálu, ze kterého byla následně odvozena stabilita kataniontových vezikul. Spektrofluorimetr FS5 byl používán pro metody fluorescenční anizotropie a generalizované polarizace, ze kterých se následně odvodily vlastnosti týkající se membrány. Fluorescenční anizotropie s využitím hydrofobní tyčinkové sondy DPH poskytuje informace o vnitřní části membrány – její fluiditě. Generalizovaná polarizace je metoda, pro kterou byla využita fluorescenční sonda Laurdan, která vlivem svojí amfifilní struktury podává informace o vnější části vezikul – solvataci a typu fáze.

### 5.1 Výsledky měření za konstantní teploty

Měření za konstantní teploty bylo provedeno pro teplotu 25 °C, která víceméně odpovídá teplotě laboratoře za normálních podmínek. Pro měření s jednou neměnnou teplotou byly využity metody DLS, ELS, fluorescenční anizotropie a GP. Souhrnné vyhodnocení výsledků dat při konstantní teplotě se vyskytuje v přílohách v Tab. 6.

#### 5.1.1 Dynamický a elektroforetický rozptyl světla při 25 °C

Měření DLS a ELS probíhalo na přístroji ZetaSizer s nastavením (viz Tab. 2). Měření vždy proběhlo během dvou hodin od přidavku soli, tudíž výsledky podávají téměř okamžité informace o tom, co se stane po konkrétním přidavku soli NaCl o určité koncentraci (iontové síle) s velikostí a stabilitou. Každé měření bylo zopakováno nejméně třikrát (v případě výskytu odlehlých výsledků i vícekrát).

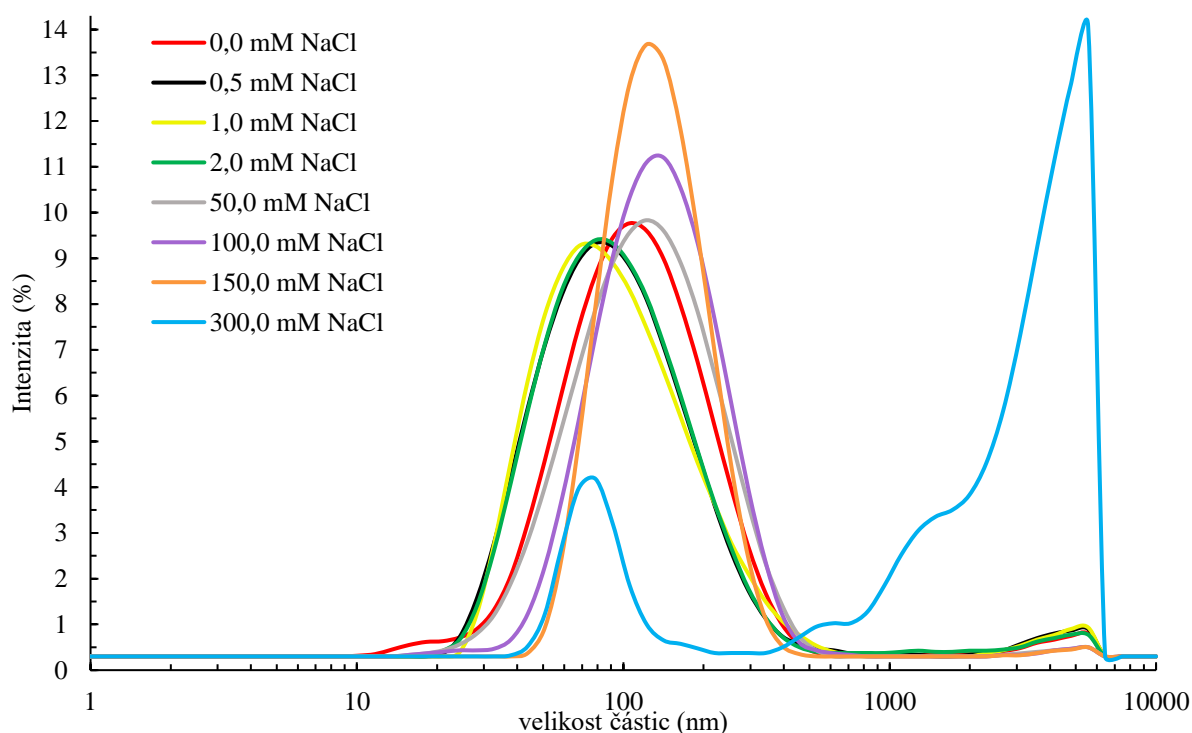
Z výsledků měření velikosti (Tab. 5) vyplývá, že při nízkých přídavních soli od 0,5 do 2,0 mM dochází ke snížení velikosti vezikul oproti vzorku bez soli. Každý vyšší přírůstek soli NaCl (od 50,0 mM a výš) způsobuje nárůst velikosti vezikul. Oba jevy potvrzují teoretické předpoklady (dle kapitoly 3.4.1 – [62]) ohledně změny velikosti v závislosti na zvyšující se iontové síle (Obr. 19). Tedy, že nejprve dochází ke snížení velikosti vezikul po malém přidavku soli (oproti vzorku bez chloridu sodného), což je způsobeno bližším balením tenzidů v membráně. Naopak při vyšší iontové síle dochází k růstu velikosti, což je způsobeno tím, že dochází k nárůstu tloušťky tenzidové dvojvrstvy (respektive tento jev je spojen i s poklesem  $\zeta$ -potenciálu, tudíž se jednotlivé vezikuly postupně přestávají odpuzovat a může dojít k jejich agregaci). V souhrnu velikost vezikul roste v řadě s přidavky soli:  $c_{0,5\text{mM}} \approx c_{1\text{mM}} < c_{2\text{mM}} < c_{0,0\text{mM}} < c_{50\text{mM}} < c_{100\text{mM}} < c_{150\text{mM}} < c_{300\text{mM}}$ .

Všechny vzorky o koncentraci soli NaCl od 0,0 do 150,0 mM mají index polydisperzity (PDI) menší nebo roven hodnotě 0,3. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že distribuce je tzv. unimodální (monodisperzní) [65]. To bylo potvrzeno i znázorněním distribučních křivek pro každý vzorek a pro každé jejich opakování, jejichž hodnoty byly nakonec zprůměrovány (Obr. 18). Vzorek s přidavkem 300,0 mM NaCl měl pro všechna opakování PDI rovnu jedna, z čehož lze usuzovat, že se ve vzorku vyskytovalo větší množství jednotlivých velikostních frakcí nebo je jejich velikost mimo měřící rozsah přístroje. Na základě znázornění distribučních křivek bylo zjištěno, že polydisperzita byla způsobena větším množstvím frakcí (z tohoto důvodu byla Tab. 5 doplněna o velikosti tří nejvíce zastoupených velikostních frakcí). Nicméně i u těchto vzorků platí, že jejich průměr má větší velikost (dokonce mnohonásobně vyšší) než předchozí vzorek (150,0 mM NaCl). Pro všechna provedená měření byly

změřeny a vyneseny korelační křivky závislosti korelačního koeficientu na korelačním čase (Přílohy, Obr. 26). Vzorky s obsahem soli 0,0 až 150,0 mM mají ideální průběh korelačních křivek, které se od sebe téměř neliší. Vzorek s obsahem 300,0 mM NaCl má korelační křivku mírně protáhlejšího tvaru a inflexní bod této křivky je posunut k delším časům. Tento jev potvrzuje i vizuální pozorování, a to že v tomto systému docházelo ke vzniku větších útvarů (sraženin).

Tab. 5: Tabulka velikosti,  $\zeta$ -potenciálu, jejich odchylek a stanovení stability vezikul v závislosti na přídatku NaCl. Vzorek s 300,0 mM NaCl byl v tabulce doplněn o hodnoty jednotlivých peaků z důvodu jeho polydisperzity

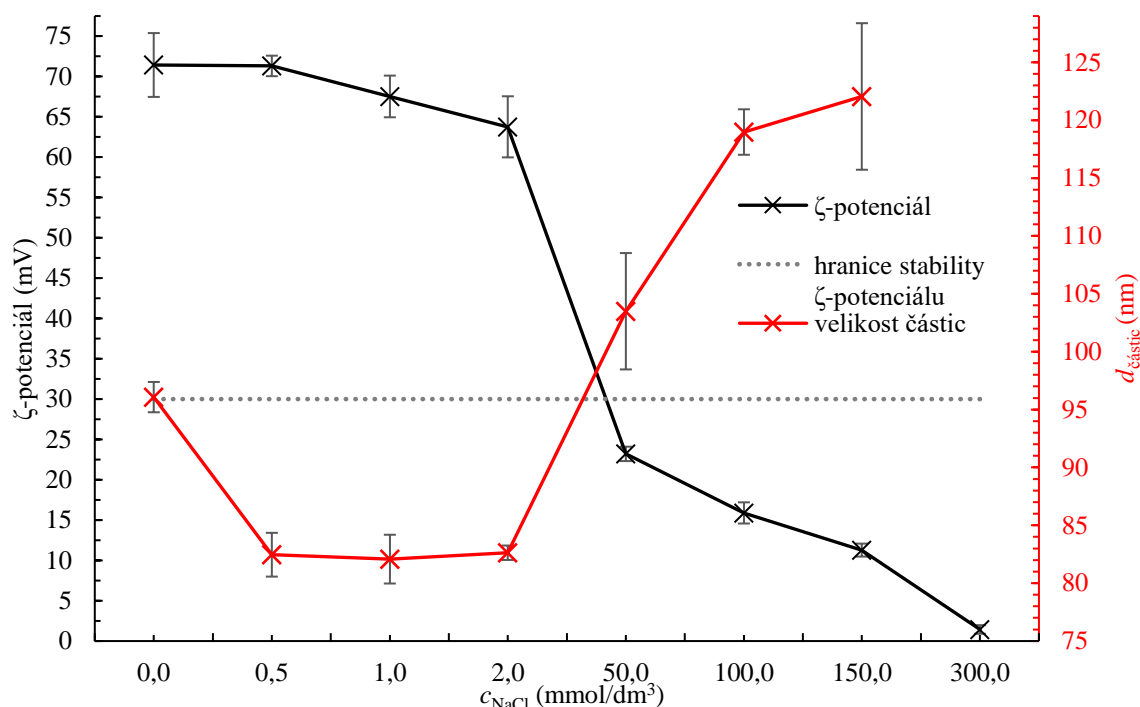
Velikost a $\zeta$ -potenciál částic na základě přídatku NaCl						
$c_{\text{NaCl}}$ (mmol/dm <sup>3</sup> )	$d_{\text{částic}} \pm \Delta d_{\text{částic}}$ (nm)			PDI $\pm \Delta$ PDI (-)	$\zeta_{\text{potenciál}} \pm \Delta \zeta_{\text{potenciál}}$ (mV)	Stabilita
	$d_1$ (nm)	$d_2$ (nm)	$d_3$ (nm)			
0,0		96 $\pm$ 1		0,306 $\pm$ 0,03	71 $\pm$ 4	Stabilní
0,5		82 $\pm$ 2		0,263 $\pm$ 0,01	71 $\pm$ 1	Stabilní
1,0		82 $\pm$ 2		0,269 $\pm$ 0,03	68 $\pm$ 3	Stabilní
2,0		83 $\pm$ 1		0,258 $\pm$ 0,01	64 $\pm$ 4	Stabilní
50,0		103 $\pm$ 5		0,248 $\pm$ 0,01	23 $\pm$ 1	Nestabilní
100,0		119 $\pm$ 2		0,215 $\pm$ 0,03	16 $\pm$ 1	Nestabilní
150,0		122 $\pm$ 6		0,154 $\pm$ 0,03	11 $\pm$ 1	Nestabilní
300,0	78 $\pm$ 5	1039 $\pm$ 164	4215 $\pm$ 428	1,000 $\pm$ 0,00	1 $\pm$ 1	Nestabilní



Obr. 18: Distribuční diagram závislosti intenzity na velikosti částic při různých přídatcích soli NaCl

Měření  $\zeta$ -potenciálu je ovlivněno přídatkem kladného tenzidu DODAC do struktury vezikul. Z tohoto důvodu vzorek s nulovou koncentrací soli má kladnou hodnotu  $\zeta$ -potenciálu a následnými přídatky NaCl dochází k poklesu tohoto  $\zeta$ -potenciálu (Obr. 19 a Tab. 5) až k téměř nulové hodnotě (u celkové koncentrace 300,0 mM v roztoku vezikul). Pokles je způsoben dodáváním elektrolytu (přídavek protiiontů ve vnější vrstvě) k roztoku vezikul a tím dochází ke snižování iontové atmosféry (vnější difúzní vrstvy) v blízkosti vezikul, což potvrzuje teorii k  $\zeta$ -potenciálu (kapitola 2.5.2). V případě, že koncentraci soli zobrazíme v logaritmickém měřítku na základě literární rešerše [63], pak je tento pokles téměř lineární, především od koncentrace soli 2,0 mM a výš (Přílohy, Obr. 27).

Na základě hodnoty  $\zeta$ -potenciálu lze stanovit stabilitu vezikulárních částic. Za stabilní vzorky se považují ty, které mají hodnoty jiné, než je rozmezí  $-30$  až  $+30$  mV [41]. Do této stabilní oblasti byly zahrnuty vzorky s obsahem 0,0; 0,5; 1,0 a 2,0 mM chloridu sodného. Naopak za nestabilní vzorky dle  $\zeta$ -potenciálu lze označit vzorky s 50,0 až 300,0 mM NaCl. Na základě poklesu  $\zeta$ -potenciálu lze i odvodit, proč dochází u vzorků s obsahem soli 50,0 mM a výš k růstu velikosti.  $\zeta$ -potenciál je totiž natolik nízký (příp. skoro ve svém izoelektrickém bodě, kdy je  $\zeta$ -potenciál roven nule), že může docházet k destabilizaci a agregaci vezikul.



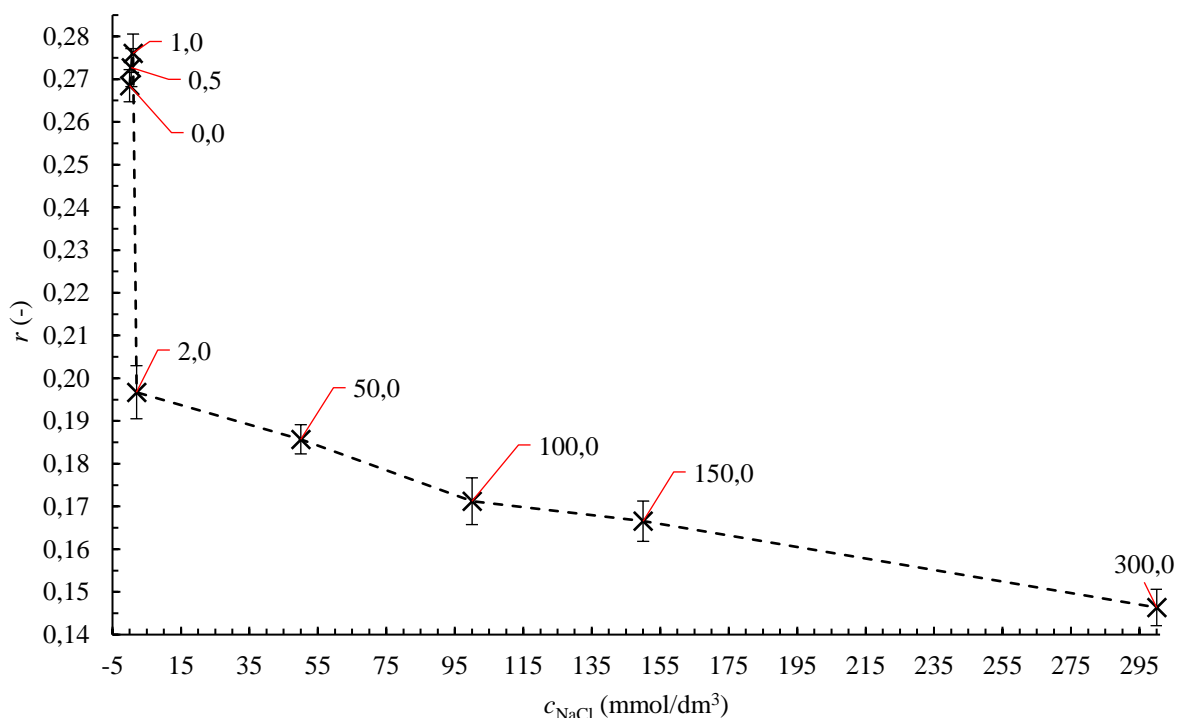
Obr. 19: Graf závislosti velikosti částic a  $\zeta$ -potenciálu na výsledné koncentraci soli. Vzorek s obsahem 300,0 mM NaCl byl z velikostní křivky vynechán z důvodu jeho vysoké polydisperzity a tudíž nízké relevantnosti průměrného výsledku velikosti

### 5.1.2 Fluorescenční anizotropie při 25 °C

Pro měření fluorescenční anizotropie byl využit spektrofluorimetr FS5 s nastavením dle Tab. 3, ale nastavení přístroje bylo upraveno na měření při laboratorní teplotě 25 °C. Vzorky s přidavkem soli a DPH byly proměřovány v ten samý den, co byla přidána sůl k označeným kationtovým vezikulám. Téměř všechny vzorky byly změřeny nejpozději do dvou hodin od přidavku soli. Roztok s obsahem soli 300,0 mM NaCl byl nejprve sonifikován pomocí ultrazvukového sonifikátoru USV300TH firmy VWR za zvýšené teploty, než byl proměřován na FS5. A to z toho důvodu, že okamžitě po přidavku soli došlo k výraznému zakalení vzorku. Sonifikace byla spuštěna v rozmezí teplot 50 až 60 °C po dobu 2 hodin (případně i více). Nicméně ani po dokončení sonifikačního procesu nedošlo k úplnému odkalení vzorku a výsledky tak mohly být zkruseny rozptylem záření na větších částicích. Ostatní vzorky nebylo nutné sonifikovat, jelikož vznikaly opalescentní roztoky.

Všechna měření byla opět alespoň třikrát zopakována. Získané naměřené hodnoty intenzit v různých směrech polarizací byly zpracovány dle vzorců (10) a (11) a výsledné vypočítané hodnoty  $r$  byly zprůměrovány. Takto vypočítané výsledky byly vyneseny do jednotného grafu závislosti fluorescenční anizotropie na koncentraci soli NaCl (Obr. 20).

Z výsledků měření při konstantní teplotě vyplývá, že vzorky s 0,5 a 1,0 mM NaCl mají vyšší hodnoty fluorescenční anizotropie než vzorek s nulovou koncentrací soli. Konkrétně nárůst pokračuje v řadě  $c_{0,0\text{mM}} < c_{0,5\text{mM}} < c_{1,0\text{mM}}$ , tedy že přidavek 0,5 a 1,0 mM soli zvyšuje tuhost membrány oproti vzorku bez přidavku soli. Nicméně tento nárůst oproti vzorku s nulovou koncentrací soli je poměrně malý a v určitých případech (se zohledněním chybové úsečky) lze i zanedbat. Vzorky s obsahem 2,0 až 300,0 mM NaCl mají nižší hodnoty fluorescenční anizotropie, pokles pokračuje v řadě  $c_{2\text{mM}} > c_{50\text{mM}} > c_{100\text{mM}} > c_{150\text{mM}} > c_{300\text{mM}}$ . Čím je nižší hodnota fluorescenční anizotropie, tím více se stává vnitřní část membrány tekutější – nejvíce fluidní je membrána po přidavku 300,0 mM NaCl a nejvíce rigidní je po přidavku 1,0 mM  $\approx$  0,0 mM NaCl. Fluidita tedy roste v řadě soli  $c_{1,0\text{mM}} \leq c_{0,5\text{mM}} \leq c_{0,0\text{mM}} < c_{2,0\text{mM}} < c_{50,0\text{mM}} < c_{100,0\text{mM}} < c_{150,0\text{mM}} < c_{300,0\text{mM}}$ . Ve výsledku lze předpokládat, že většina přidavků soli snižuje účinek cholesterolu ve vnitřní části membrány. Popsané změny fluorescenční anizotropie jsou znázorněny v následujícím grafu (Obr. 20):



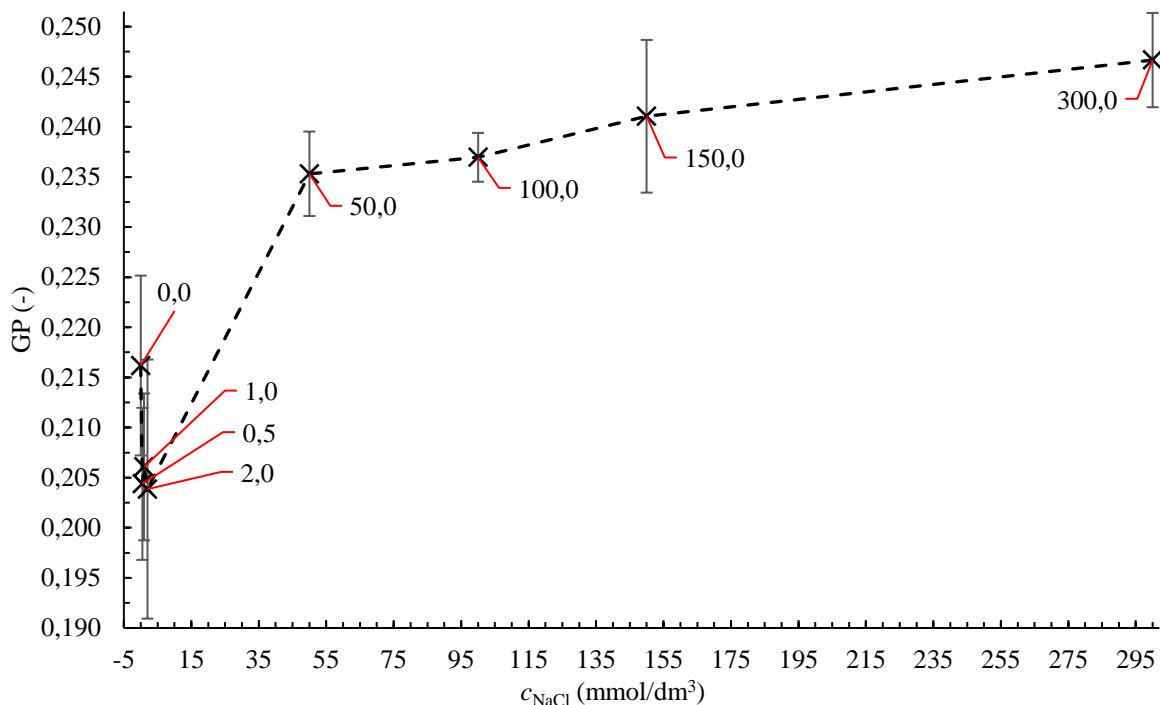
Obr. 20: Graf závislosti fluorescenční anizotropie na koncentraci NaCl při teplotě 25 °C

### 5.1.3 Generalizovaná polarizace při 25 °C

Měření generalizované polarizace proběhlo na spektrofluorimetru FS5 s nastavením dle Tab. 4, ale pouze pro jednu teplotu: 25 °C. Označené vzorky vezikul Laurdanem byly proměřovány opět během dvou až tří hodin po přidavku soli k označeným vezikulám. Další dny proběhla obdobným způsobem další dvě opakování. Podobně jako u měření fluorescenční anizotropie byl vzorek vezikul s NaCl o koncentraci 300,0 mM nejprve sonifikován, než byl vložen do přístroje FS5. Sonifikace probíhala se stejným nastavením jako pro měření fluorescenční anizotropie. Ostatní vzorky opět sonifikovány nebyly (nedošlo k jejich výraznému zakalení po přidavku příslušného množství soli).

Naměřené hodnoty intenzit byly dále zpracovány pomocí vzorce (15) a vyneseny do jednotného grafu závislosti  $GP=f(c_{\text{NaCl}})$ , jak bylo znázorněno na Obr. 21. Z měření generalizované polarizace vyplývá, že při přidavku malého množství soli (0,5; 1,0 a 2,0 mM) dochází k mírnému poklesu hodnoty generalizované polarizace oproti vzorku bez přidavku chloridu sodného. S dalšími přidavky NaCl dochází k postupnému růstu hodnoty generalizované polarizace. V souhrnu dochází k růstu generalizované polarizace v řadě s koncentrací soli:  $c_{0,5\text{mM}} \approx c_{2,0\text{mM}} < c_{1,0\text{mM}} < c_{0,0\text{mM}} < c_{50,0\text{mM}} < c_{100,0\text{mM}} < c_{150,0\text{mM}} < c_{300,0\text{mM}}$ . U generalizované polarizace platí, že čím nižší je její hodnota, tím vyšší je solvatace vezikul. Tedy pro laboratorní teplotu to znamená, že největší hydratační obal mají vezikuly ve vzorcích

s přidavkem 0,5 a 2,0 mM soli NaCl, naopak nejmenší solvatace (až dehydratace) se vyskytuje u 300,0mM vzorku NaCl. Pokles hodnoty GP pro vzorky s 0,5 až 2,0 mM soli a následný růst GP pro přidavky soli 50,0 až 300,0 mM koreluje s velikostí vezikul. Čím je vzorek více dehydratován, tím má větší velikost (platí pro vzorky 50,0 až 300,0 mM NaCl, odvozeno na základě literární rešerše viz v kapitole 3.4.1 – [62]). Naopak čím je nižší GP – vyšší solvatace vezikul, tím klesá jejich velikost.



Obr. 21: Závislost generalizované polarizace na koncentraci přidávaného NaCl k vezikulám při teplotě 25 °C

## 5.2 Výsledky měření s měnící se teplotou

Měření membránových vlastností vezikul bylo provedeno při měnící se teplotě. Konkrétně byl zvolen rozsah 15 °C až 75 °C s krokem 5 °C. Všechna měření proběhla v reverzním módu, aby na začátku měření při nízké teplotě nedošlo k vysrážení tenzidů z vezikul, což by způsobilo znehodnocení měření při vyšších teplotách. Pro tento typ měření byly vybrány metody fluorescenční anizotropie a generalizované polarizace na přístroji spektrofluorimetru FS5. Nastavení tohoto přístroje bylo obdobné jako pro měření za konstantní teploty, jen byl zvolen rozsah teplot 15 až 75 °C oproti jediné teplotě (Tab. 3 pro fluorescenční anizotropii a Tab. 4 pro generalizovanou polarizaci). Obdobně jako u měření s konstantní teplotou byl vzorek s výsledným obsahem soli 300,0 mM NaCl sonifikován, než byl vložen do přístroje FS5. Vyhodnocení změn výsledných vlastností s teplotou, respektive porovnání membránových vlastností při nízké (15 °C) a vysoké (75 °C) teplotě, se vyskytuje v přílohách v Tab. 7.

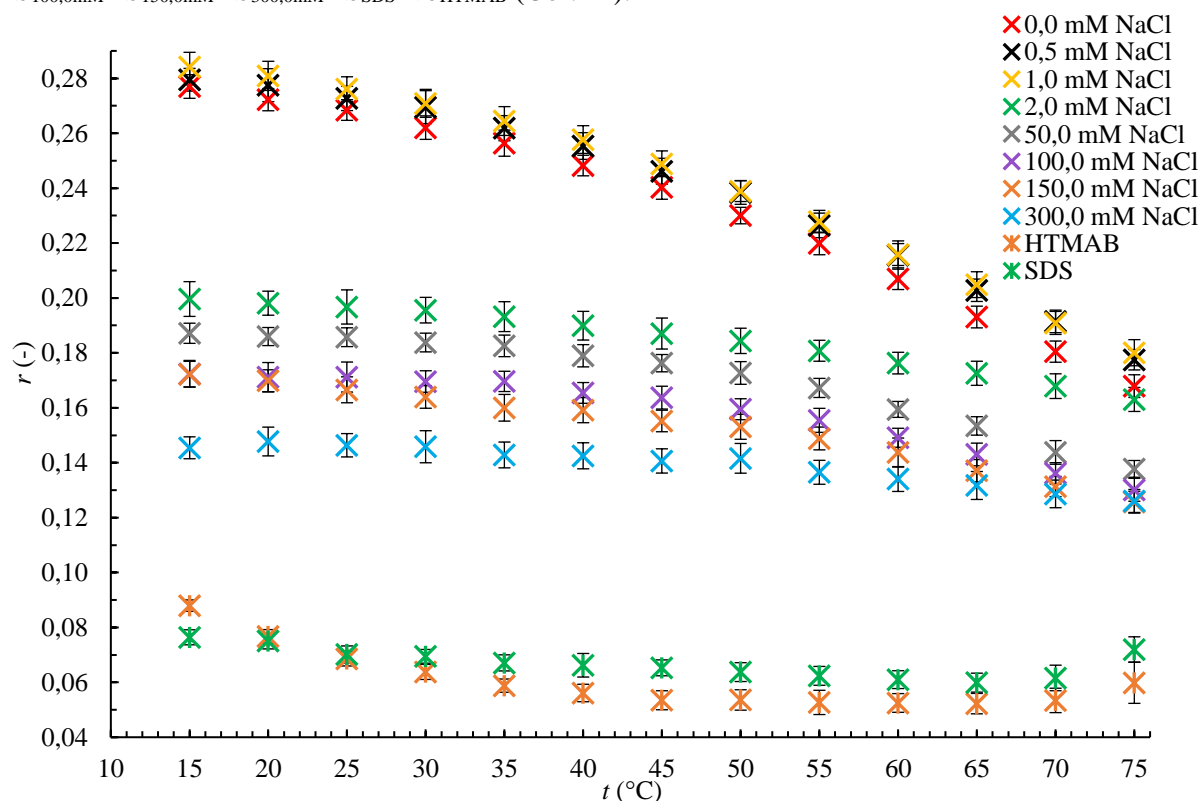
### 5.2.1 Fluorescenční anizotropie

Měření fluorescenční anizotropie s měnící se teplotou bylo provedeno analogickým způsobem jako při konstantní teplotě. Obdobným způsobem byly i zpracovány naměřené intenzity na hodnoty fluorescenční anizotropie dle rovnic (10) a (11).

Bylo zjištěno, že nejvyšší hodnota fluorescenční anizotropie je pro všechny vzorky kataniontových vezikul při nízkých teplotách – při 15 °C. Při nízké teplotě mají tyto vzorky nejnížší fluiditu membrány v rámci jedné koncentrace. Zároveň platí, že nejnížší fluiditu mají vzorky s 1,0 a 0,5 mM NaCl, dokonce mají tuto fluiditu nižší než vzorek bez soli. Z komplexnějšího hlediska lze zhodnotit, že výsledky fluorescenční anizotropie pro vzorky s obsahem soli 0,5 a 1,0 mM se výrazně neliší od nulového přidavku soli. Změřené hodnoty vzorků s tímto malým přidavkem soli se vyskytují v rámci směrodatných odchylek vzorku, do něhož nebyl přidán chlorid sodný. Ostatní vzorky mají vždy fluiditu

membrány vyšší než vzorek s nulovou koncentrací soli. Čím více roste teplota, tím více klesá hodnota fluorescenční anizotropie (roste fluidita membrány) pro všechny měřené vzorky kataniontových vezikul. Největší změna fluorescenční anizotropie mezi nízkou (15 °C) a vysokou (70 až 75 °C) teplotou se vyskytuje u vzorků s obsahem soli 1,0; 0,5 a 0,0 mM. Naopak vzorky s vyšším obsahem soli (2,0 až 300,0 mM) nemají tento pokles (změnu) až tak markantní. Nicméně i při vyšších teplotách platí, že nejnižší hodnotu fluorescenční anizotropie, a tedy i nejvyšší fluiditu, mají nejvíce koncentrované vzorky NaCl ve vezikulách.

Metodou fluorescenční anizotropie byly proměřeny i DPH označené vzorky tenzidů HTMAB a SDS. Tyto vzorky byly měřeny proto, že pokles fluorescenční anizotropie pro vzorky s výslednou koncentrací soli 300,0 mM NaCl byl poměrně markantní oproti vzorku s nulovou koncentrací soli. Tudíž vznikl předpoklad, jestli nedošlo k tak velké destabilizaci vezikul, že by došlo k jejich rozpadu na jednotlivé komponenty – tenzidy. Tenzidy by následně ve vodném prostředí vytvořily micely, do jejichž membrán by se navázala sonda DPH a byla by tak měřena hodnota fluorescenční anizotropie těchto micel. Nicméně změřené hodnoty fluorescenční anizotropie se pro oba vzorky tenzidů poměrně dost liší od vzorků označených kataniontových vezikul, ke kterým byla přidávána sůl. Označené micely HTMAB a SDS mají napříč celým měřeným teplotním spektrem výrazně nižší hodnotu fluorescenční anizotropie oproti vzorkům kataniontových vezikul s přidavkem soli. To vypovídá o nejvyšší fluiditě membrán napříč všemi měřenými vzorky. Tudíž původní předpoklad o rozpadu kataniontových vezikul na micely tenzidů HTMAB a SDS vlivem přidavku soli NaCl nebyl potvrzen. Hodnota fluorescenční anizotropie se u vzorků tenzidů HTMAB a SDS s teplotou extrémně nemění. Respektive u označeného roztoku HTMAB lze pozorovat mírné zvýšení fluorescenční anizotropie při nízkých teplotách, ale označený vzorek SDS má hodnotu fluorescenční anizotropie téměř konstantní. Fluorescenční anizotropie tedy v celém teplotním rozsahu klesá v řadě měřených vzorků:  $c_{1,0\text{mM}} \geq c_{0,5\text{mM}} \geq c_{0,0\text{mM}} > c_{2,0\text{mM}} > c_{50,0\text{mM}} > c_{100,0\text{mM}} > c_{150,0\text{mM}} > c_{300,0\text{mM}} > c_{\text{SDS}} > c_{\text{HTMAB}}$  a fluidita roste v řadě:  $c_{1,0\text{mM}} \leq c_{0,5\text{mM}} \leq c_{0,0\text{mM}} < c_{2,0\text{mM}} < c_{50,0\text{mM}} < c_{100,0\text{mM}} < c_{150,0\text{mM}} < c_{300,0\text{mM}} < c_{\text{SDS}} < c_{\text{HTMAB}}$  (Obr. 22).



Obr. 22: Graf závislosti fluorescenční anizotropie na teplotě pro vzorky vezikul s DPH a s rozdílnými výslednými koncentracemi NaCl a označené vzorky HTMAB a SDS

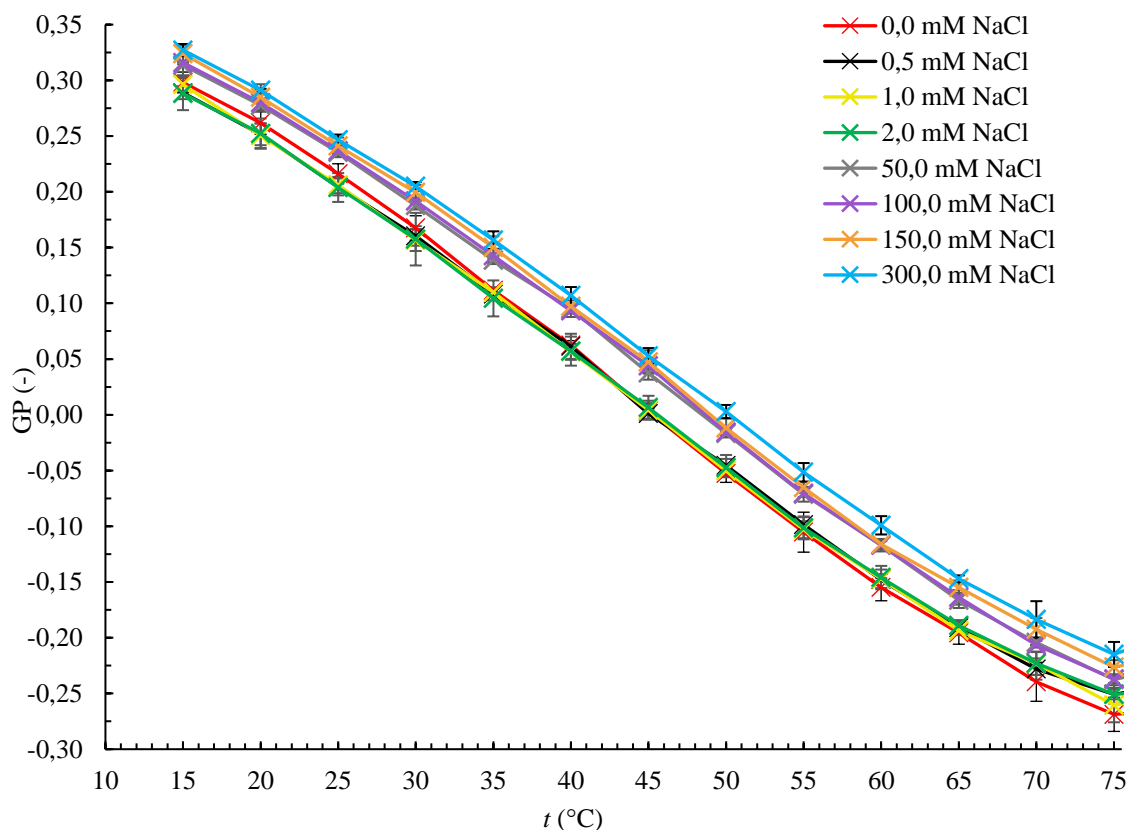
## 5.2.2 Generalizovaná polarizace

Měření generalizované polarizace bylo provedeno na přístroji FS5 s nastavením dle Tab. 4. Postup měření byl obdobný jako pro měření generalizované polarizace při konstantní teplotě, ale nastavení proběhlo pro celý teplotní rozsah. Naměřené hodnoty intenzit byly přepočítány pomocí vzorce (15) pro všechny teploty.

Ze zpracovaných výsledků vyplývá, že při nízké teplotě (okolo 15 °C) mají všechny měřené vzorky vysokou hodnotu generalizované polarizace, která odpovídá nízké hydrataci a vysoké rigiditě vnější části membrány. Jakmile ale docházelo ke zvyšování teploty až k 75 °C, začala hodnota GP klesat, což značí růst solvatace a tekutosti ( $\approx$  neuspořádanosti) vnější části membrány. Zároveň platí, že napříč měřeným teplotním rozsahem byla hodnota GP vždy vyšší u vzorků s vysokou koncentrací soli (50,0 až 300,0 mM) než u vzorků s nízkou koncentrací soli (0,0 až 2,0 mM). Pokles GP víceméně odpovídá řadě:  $C_{0,0\text{mM}} \approx C_{0,5\text{mM}} \approx C_{1,0\text{mM}} \approx C_{2,0\text{mM}} < C_{50,0\text{mM}} < C_{100,0\text{mM}} < C_{150,0\text{mM}} < C_{300,0\text{mM}}$ . Všechny výše zmíněné jevy jsou znatelné na Obr. 23.

V případě, že budeme výsledky generalizované polarizace hodnotit více souhrnně, pak se generalizovaná polarizace rozdělila na dvě oblasti – při nízké a při vysoké iontové síle. Při nízké iontové síle (0,5 až 2,0 mM) se výsledky GP udržují v blízkosti hodnot GP pro vzorek, který neobsahoval žádný přídavek soli. Tyto vzorky jsou vždy více solvátovány a více fluidní z hlediska vnější části membrány než vzorky s vyšší koncentrací soli. Při vyšší iontové síle (50,0 až 300,0 mM) mají měřené vzorky hodnoty GP vyšší (oproti vzorku bez soli), tedy mají menší solvatační obal. Nicméně ani při nejvyšší použité koncentraci soli nedošlo k prudké změně v průběhu hodnot GP v závislosti na teplotě (Obr. 23).

V souhrnu lze říct, že výsledky GP víceméně potvrzují teoretické poznatky, kdy bylo předpokládáno, že při vysoké iontové síle budou pozorované systémy dehydratovány a budou mít tužší membránu (vnější oblast), což je jedním z faktorů, který způsobuje nárůst velikosti vezikul (kapitola 3.4.1 – [62]).

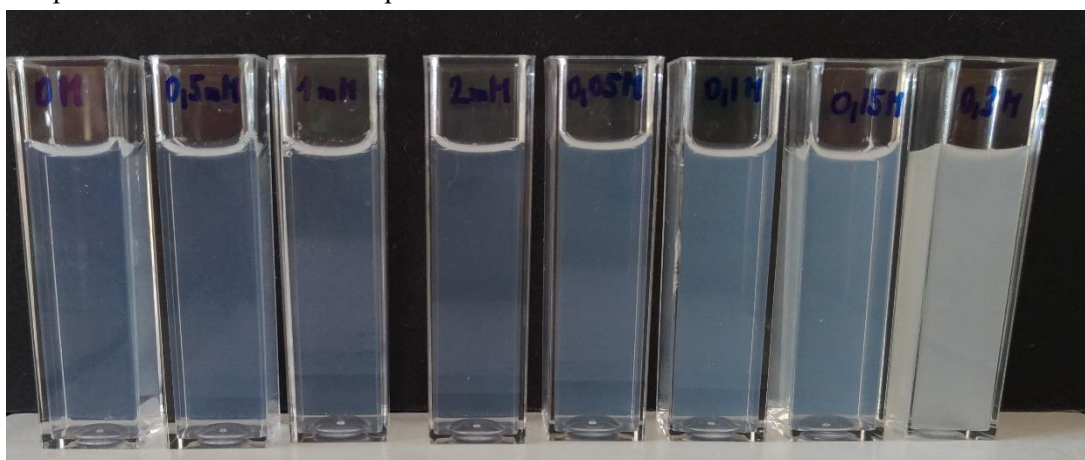


Obr. 23: Závislost generalizované polarizace na teplotě pro označené vzorky s proměnlivými koncentracemi soli NaCl

### 5.3 Výsledky vizuálního pozorování stability vzorků po přidavku soli v čase

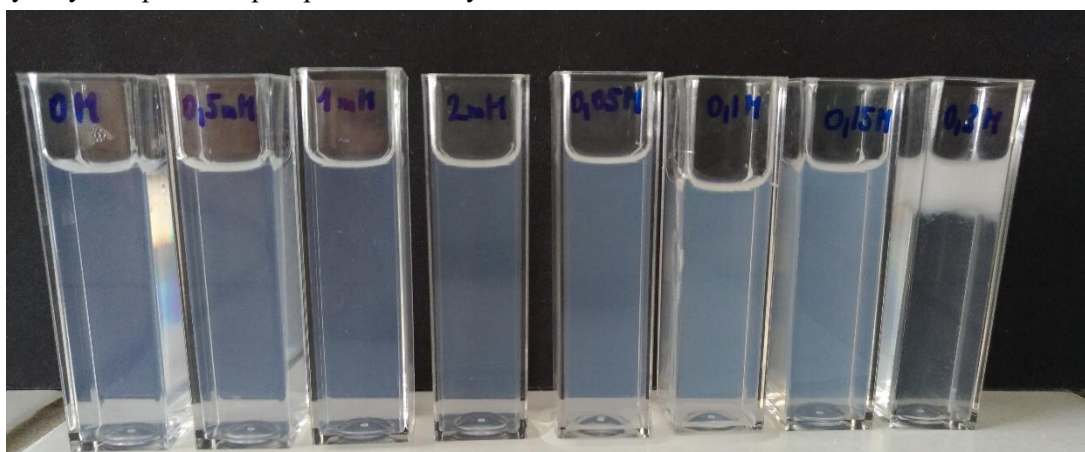
Stabilita vzorků v čase bez přidavku i s přidavkem soli NaCl byla pozorována i vizuálním způsobem. Časové rozmezí bylo zvoleno po dobu 4 týdnů, kdy bylo sledováno, jak budou vzorky v tomto časovém období měnit svůj vzhled. Bylo předpokládáno, že vzorky, které byly dle  $\zeta$ -potenciálu označeny za nestabilní, budou vykazovat i v čase vizuální změny.

Bylo připraveno 8 vzorků s výsledným obsahem soli NaCl 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 50,0; 100,0; 150,0 a 300,0 mM. Všechny vzorky byly nejprve proměřeny na DLS a ELS, aby se vyloučila možnost špatně připravených vzorků. Celá koncentrační řada dle výsledků DLS a ELS vyšla z obou měření podobně, jako předešlé vzorky. Takto připravené vzorky byly vloženy do plastových kyvet, (Obr. 24) zaparafilmovány a vloženy do sušárny při 25 až 30 °C. Ihned po přidavku soli bylo vidět, že 300,0 a 150,0 mM obsah chloridu sodného ve vezikulách způsobuje zakalení vzorku. Vzorky s výsledným obsahem soli 100,0 mM a 50,0 mM byly velmi mírně zakaleny. Vzorky s nižším obsahem soli byly vizuálně podobné vzorku bez soli – opalescentní.



Obr. 24: Vzorky s obsahem soli 0 až 300 mM NaCl ihned po přidavku soli

Druhé pozorování proběhlo již v ten samý den po 6 hodinách od přidavku soli k vezikulám (Obr. 25). Vzorky s obsahem soli 0,0 až 150,0 mM byly v nezměněné podobě od prvního pozorování (ihned po přidavku soli). Nicméně u vzorku s výsledným obsahem soli 300,0 mM došlo k vysrážení při hladině kyvetu a byl tak potvrzen předpoklad získaný z měření ELS o nestabilitě tohoto vzorku.



Obr. 25: Vzorky s obsahem soli 0 až 300 mM po 6 hodinách v sušárně

Třetí pozorování proběhlo po 7 dnech od přidavku soli (Přílohy, Obr. 28). Vzorky s obsahem NaCl 0,0 až 100,0 mM opět nevykazovaly vizuální změny. Vzorek s obsahem soli 150,0 mM vykazoval mírné vysrážení při hladině v kyvetě. Nicméně částice tohoto vzorku byly natolik malé a lehké, že při jakémkoliv pohybu s kyvetou došlo k okamžitému rozvíření a homogenizaci. Z pozorování lze tedy

předpokládat, že i vzorek se 150,0 mM soli není stabilní, jak bylo i potvrzeno z měření ELS. Zároveň lze odvodit, že tento vzorek je mnohem více stabilní než vzorek s výsledným obsahem chloridu sodného 300,0 mM. Vzorek s obsahem soli 300,0 mM nevykazoval významné změny oproti druhému pozorování.

Čtvrté pozorování proběhlo po 14 dnech od přidavku soli (Přílohy, Obr. 29). Bylo zjištěno, že oproti poslednímu pozorování nedošlo k významným změnám. Vysrážení bylo znatelné jen u vzorků s obsahem NaCl 300,0 a 150,0 mM. Částice v 150,0mM vzorku byly opět vysráženy při hladině a při pohybu s kyvetou došlo k promíchání, nicméně tentokrát probíhala homogenizace pomaleji než předešlý týden. Vzorky s nižšími koncentracemi chloridu sodného (pod 150,0 mM NaCl) byly v nezměněné podobě a lze předpokládat, že i v poměrně stabilní formě.

Při pozorování po 3 týdnech (Přílohy, Obr. 30) nebyly zaznamenány markantní změny oproti předešlým týdnům. Vzorky s obsahem soli 150,0 a 300,0 mM byly jediné vysrážené, pouze u vzorku s obsahem 150,0 mM chloridu sodného byl pozorován výraznější zákal než v předešlých týdnech. Obdobné výsledky byly získány i při šestém pozorování po 4 týdnech (Přílohy, Obr. 31).

V souhrnu z vizuálního pozorování vyplývá, že stabilita po dobu 4 týdnů se změnila pouze pro vzorky s nejvyššími koncentracemi chloridu sodného (150,0 a 300,0 mM). A to z toho důvodu, že pouze u těchto dvou vzorků byly pozorovány změny ve vizuální podobě systému – došlo k jejich vysrážení při hladině kyvety. Vzorek s obsahem 300,0 mM NaCl vykazoval rychlé a poměrně vysoké vysrážení již po 6 hodinách od přidavku chloridu sodného. U vzorku s 150,0 mM soli bylo pozorováno malé vysrážení po týdnu od přidavku soli, které se v následujících týdnech postupně zvyrazňovalo. Tyto dva vzorky potvrzují původní předpoklady o nestabilitě těchto systémů získané z metody ELS a tato nestabilita byla znatelná i pouhým okem. Naopak vzorky s výsledným obsahem chloridu sodného 50,0 a 100,0 mM, které dle měření  $\zeta$ -potenciálu vychází také jako nestabilní, překvapivě nevykazovaly žádné vizuální změny v období 4 týdnů. Vzorky s nejnižším obsahem soli (0,0 až 2,0 mM) potvrdily výsledky z měření ELS, kdy nedošlo k vizuální změně těchto systémů, což potvrzuje jejich stabilitu.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zkoumat vliv iontové síly na vlastnosti vezikulárních systémů složených z iontových amfifilních párů, a to teoretickým i praktickým způsobem. Teoretické zkoumání bylo zpracováno formou současně řešené problematiky, kdy byly vyhledány vědecké články, které se zabývaly podobnou tematikou například u liposomů. Praktické zkoumání bylo provedeno experimentálním měřením na kataniontových vezikulách a stanovením jednotlivých vlastností. Jako zkoumané vlastnosti byly vybrány velikost,  $\zeta$ -potenciál, fluidita vnitřní části membrány, hydratační vlastnosti vnější části membrány a případné stanovení uspořádanosti této membrány. Tyto vlastnosti byly vybrány a zvoleny, protože se jedná o jedny z nejvíce využívaných a stanovovaných vlastností u koloidních systémů, jako jsou např. kataniontové vezikuly tvořené z IPA.

$\zeta$ -potenciál je veličina, která charakterizuje stabilitu koloidních částic a měří se pomocí elektroforetického rozptylu světla, který byl stanovován pouze při laboratorní teplotě. Vlivem přidavku kationaktivního tenzidu DODAC do vezikul byl měřený  $\zeta$ -potenciál kladný a nejvyšší pro kataniontové vezikuly bez přidavku soli. Přídavek soli stlačuje difúzní vrstvu a tím pádem dochází k poklesu hodnoty  $\zeta$ -potenciálu. Každý vzorek s vyšší hodnotou iontové síly měl nižší hodnotu  $\zeta$ -potenciálu, než tomu bylo u předešlého vzorku v koncentrační řadě. Vzorek, který obsahoval 300,0 mM NaCl, měl hodnotu  $\zeta$ -potenciálu přibližně jednotkovou, což naznačuje vysokou nestabilitu vzorku a sklon k flokulaci. Vzorky s 0,0 až 2,0 mM NaCl se vyskytují ve stabilní oblasti  $\zeta$ -potenciálu, zatímco vzorky s vyšším obsahem soli (od 50,0 do 300,0 mM NaCl) už podle  $\zeta$ -potenciálu do této stabilní oblasti nepatří.

Výsledky získané z měření dynamického rozptylu světla podávají informace o velikosti stanovovaných systémů. Tento typ měření byl prováděn jen při konstantní hodnotě teploty, a to při 25 °C. Bylo potvrzeno, že vezikuly bez iontové síly mají typickou velikost okolo 95 nm. Jakmile došlo k malému navýšení iontové síly (0,5 mM až 2,0 mM), byl pozorován pokles velikosti vezikul až k hodnotě 80 nm, což bylo způsobeno bližším balením tenzidů ve vezikulové dvojrůstvě. Naopak přídavek vyšší iontové síly (50,0 až 300,0 mM) způsobil navýšení velikosti, protože došlo k nabývání tloušťky tenzidové dvojrůstvy vlivem dehydratace a bližšího balení tenzidů k sobě. Také došlo k poklesu  $\zeta$ -potenciálu, což mohlo podpořit agregaci jednotlivých vezikul.

Fluorescenční anizotropie byla měřena při použití fluorescenční sondy DPH s cílem se dozvědět, jaké uspořádání nabývá vnitřní část membrány, konkrétně se zabývá fluiditou. Toto měření bylo provedeno pro rozsah teplot 15 až 75 °C. Bylo zjištěno, že při nízkých teplotách mají všechny systémy poměrně vysokou hodnotu fluorescenční anizotropie, což vypovídá o vysoce uspořádaném systému a nízké fluiditě. Se zvyšováním teploty docházelo u všech vzorků k postupnému klesání hodnot fluorescenční anizotropie. Při nejvyšší měřené teplotě (75 °C) měly všechny vzorky nejnižší hodnoty fluorescenčních anizotropií, které vypovídají o vysoké fluiditě a nízkém uspořádání každého systému. Při porovnání vzorků s různou iontovou silou při jedné teplotě měly vždy nejvyšší hodnotu fluorescenční anizotropie vzorky s výslednou koncentrací soli 1,0 a 0,5 mM, následoval vzorek bez přidavku soli. Všechny zbylé vzorky měly hodnotu fluorescenční anizotropie nižší, postupně klesala se zvyšující se iontovou silou. Bylo tedy vyhodnoceno, že přidavkem velmi nízké iontové síly (do 1,0 mM) byla zvyšována uspořádanost vnitřní části membrány, naopak při vyšší iontové síle (od 2,0 do 300,0 mM) rostla fluidita vzorku a tím pádem klesala uspořádanost. Z měření roztoků tenzidů HTMAB a SDS bylo zjištěno, že tyto roztoky mají nejnižší hodnoty fluorescenční anizotropie napříč celým teplotním rozsahem. Tudiž ani nejvyšší přídavek chloridu sodného (300,0 mM NaCl) k vezikulám nezpůsobil tak velkou destabilizaci, že by zapříčinil rozpad vezikul na jednotlivé komponenty, které by následně vytvářely micely.

Generalizovaná polarizace byla měřena obdobně jako fluorescenční anizotropie pro teplotní rozsah 15 až 75 °C. Pro tento typ měření byla využita namísto DPH sonda Laurdan, která svou chemickou strukturou umožňuje podávat informace o vnější části membrány. Díky této fluorescenční sondě je

možné zjistit informace o hydratačním obalu vezikul. Bylo zjištěno, že nízké přídavky soli (do 2,0 mM) nezpůsobují znatelné změny v hodnotě generalizované polarizace oproti vzorku s nulovou koncentrací chloridu sodného. Naopak vzorky s vyššími přídavky soli (50,0 až 300,0 mM) způsobují nárůst hodnoty generalizované polarizace vůči vzorku bez soli. Nárůst hodnoty generalizované polarizace vypovídá o snižování solvatačního obalu vezikul. Čím vyšší iontové síle je vzorek vystaven, tím méně je hydratován. V případě, že bude zkoumán vliv teploty, pak vysoká hodnota generalizované polarizace se vyskytuje při nízkých teplotách a nízká hodnota generalizované polarizace nastává při teplotách vysokých. Tedy platí, že čím nižší je teplota, tím nižší je hydratace vnějších částí membrán vezikul. Růst teploty způsobuje nárůst hydratačního obalu vezikul.

Nakonec byl zhodnocen i vizuální charakter vezikul při pozorování v průběhu 4 týdnů. Ihned po přídavku soli došlo k zakalení vzorku s obsahem soli 300,0 mM NaCl. Mírně se zakalil i vzorek s koncentrací 150,0 mM NaCl. Již po několika hodinách v ten samý den od přídavku chloridu sodného k vezikulám byla pozorována sraženina při hladině 300,0mM vzorku. Po týdnu stání v sušárně nedošlo u 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 50,0; 100,0 a 300,0 mM vzorků k vizuální změně, zatímco vzorek s obsahem soli 150,0 mM se mírně odkalil a vysrážel při hladině. Bylo znatelné, že velikost částic vyskytující se v 150,0mM vzorku je malá, protože i při mírném pohybu došlo k rozvíření vzorku a opětovné homogenizaci. Pozorování, které proběhlo po 14 dnech od přídavku soli nepodalo významně odlišné informace od pozorování po 7 dnech od přídavku soli. V následujících dvou týdnech byl pozorován mírně vzrůstající zákal ve vzorku s výsledným obsahem 150,0 mM NaCl. Nicméně ostatní vzorky zůstaly v nezměněné podobě. Tudíž jediná změna ve vizuální podobě (stabilitě) nastala pouze pro vzorky s koncentrací soli 150,0 a 300,0 mM, zbylé vzorky nezměnily svou vizuální podobu ani po měsíci od jejich přípravy. V porovnání s metodou ELS došlo ke shodě pro vzorky obsahující výslednou koncentraci NaCl 0,0 až 2,0 mM – tyto vzorky jsou dle obou metod stabilní. Nestabilita byla potvrzena pomocí ELS i vizuálního pozorování u vzorků s obsahem soli 150,0 a 300,0 mM.

V rámci bakalářské práce byl zkoumán pouze vliv jedné soli – NaCl. Chlorid sodný byl zvolen z toho důvodu, že právě tento druh soli je považován za jednu z nejzákladnějších solí, navíc se jedná o sůl jednomocnou a je součástí i fyziologického roztoku v živých organismech. Nicméně to, čím by bylo možné v této práci pokračovat, je vliv jiných solí. Mohlo by se jednat například o jiné halogenidy, které jsou podobné NaCl. Právě kvůli této menší odlišnosti mezi NaCl a jinými halogenidy, je zde předpoklad, že i výsledky při jejich použití by nemusely způsobovat markantní rozdíly v závěrech měření vůči výsledkům při použití NaCl. Především zajímavé pozorování by mohlo vzniknout při použití soli NaBr, což je sůl, jejíž ionty byly při výrobě IPA odstraněny. Bylo by tedy pozorováno chování systémů po návratu jejich protiiontů, což vytváří dva možné předpoklady výsledků: docházelo by ke zpětnému navazování k původním tenzidům, což by mohlo vyústit i v rychlejší destabilizaci, nebo by NaCl a NaBr měly podobný vliv na kataniontové vezikuly. Pro další měření by mohlo být vhodné použít i vícesytné soli. Ty už svou chemickou podstatou evokují k předpokladům, že výsledky jednotlivých veličin budou velmi odlišné, než je tomu u soli NaCl. Jejich nižší koncentrace by totiž vyvolávaly vyšší iontovou sílu (v tomto případě by pak neplatilo, že iontová síla číselně odpovídá použité koncentraci). Případně by bylo zajímavé zkoumat, jak by se tento systém choval v přítomnosti směsí solí nebo při použití pufrů. Především použití PBS pufru by mohlo podávat důležité výsledky především, pokud je v budoucnosti ambice využívat tyto systémy v medicíně nebo farmakologii.

## 7 BIBLIOGRAFIE

- [1] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy* [online]. 1999, **93**(4), 421-427 [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: [http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_07\\_421-427.pdf](http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf)
- [2] HIRSCH, Marc. Surface Active Agents (Surfactants). *Prospector* [online]. USA [cit. 2020-10-15]. Dostupné z: <https://knowledge.ulprospector.com/3106/pc-surface-active-agents-surfactants/>
- [3] GHOSH, Sampad, Anirban RAY a Nabakumar PRAMANIK. Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry* [online]. 2020, **265** [cit. 2020-10-15]. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2020.106429
- [4] KUMAR, Gannu a Pogaku RAJESHWARRAO. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2011, **1**(4), 208-219 [cit. 2020-10-16]. ISSN 22113835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2011.09.002
- [5] GEROLA, Adriana, Paulo COSTA, Frank QUINA, Haidi FIEDLER a Faruk NOME. *Zwitterionic surfactants in ion binding and catalysis* [online]. 2017, **32**, 39-47 [cit. 2020-10-16]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2017.10.002
- [6] ZHOU, Chengcheng a Yilin WANG. *Structure–activity relationship of cationic surfactants as antimicrobial agents* [online]. 2020, **45**, 28-43 [cit. 2020-10-15]. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2019.11.009
- [7] MAHESH, K., H. MURTHY, B. KUMARASWAMY et al. Synthesis and characterization of organomodified Na-MMT using cation and anion surfactants. *Frontiers of Chemistry in China* [online]. 2011, **6**(2), 153-158 [cit. 2020-11-09]. ISSN 1673-3495. Dostupné z: doi:10.1007/s11458-011-0239-4
- [8] DA SILVA, José, Roberta DIAS, Gabriel DA HORA, Thereza SOARES a Mario MENEGHETTI. Molecular Dynamics Simulations of Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) Micelles and their Interactions with a Gold Surface in Aqueous Solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2017 [cit. 2020-10-18]. ISSN 01035053. Dostupné z: doi:10.21577/0103-5053.20170130
- [9] AKATSUKA, Hidetaka, Yasuhiro OHARA a Yasufumi OTSUBO. Effects of dioctadecyl dimethyl ammonium chloride on the rheological behavior of behenyl trimethyl ammonium chloride/1-hexadecanol/water ternary system. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2006, **302**(1), 341-346 [cit. 2020-11-09]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2006.06.020
- [10] COMBER, S.D.W., K.L. RULE, A.U. CONRAD, S. HÖSS, S.F. WEBB a S. MARSHALL. Bioaccumulation and toxicity of a cationic surfactant (DODMAC) in sediment dwelling freshwater invertebrates. *Environmental Pollution* [online]. 2008, **153**(1), 184-191 [cit. 2020-11-09]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2007.07.032
- [11] SCARPA, Maria, Pedro ARAUJO, Shirley SCHREIER, Antonio SESSO, Anselmo OLIVEIRA, Hernan CHAIMOVICH a Iolanda CUCCOVIA. Effect of Vesicles of Dimethyldioctadecylammonium Chloride and Phospholipids on the Rate of Decarboxylation of 6-Nitrobenzisoazole-3-carboxylate †. *Langmuir* [online]. 2000, **16**(3), 993-999 [cit. 2020-11-09]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la9907477

- [12] CSERHÁTI, Tibor, Esther FORGÁCS a Gyula OROS. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International* [online]. 2002, **28**(5), 337-348 [cit. 2020-10-15]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/S0160-4120(02)00032-6
- [13] ARAY, Yosslen, José PARRA, Ricardo PAREDES, Luis ÁLVAREZ a Antonio DIAZ-BARRIOS. Exploring the nature of the interactions between the molecules of the sodium dodecyl sulfate and water in crystal phases and in the water/vacuum interface. *Heliyon* [online]. 2020, **6**(6) [cit. 2020-10-18]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04199
- [14] CHATURVEDI, Venkatesh a Ashok KUMAR. TOXICITY OF SODIUM DODECYL SULFATE IN FISHES AND ANIMALS.: A REVIEW. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* [online]. 2010, **1**(2), 630-633 [cit. 2020-11-09]. ISSN 0976-4550. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.901.5406&rep=rep1&type=pdf>
- [15] JOHNSON, Mary. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. In: *Materials and Methods* [online]. 2013, [cit. 2020-10-19]. ISSN 2329-5139. Dostupné z: doi:10.13070/mm.en.3.163
- [16] NOVÁK, Josef. Disperzní systémy. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, s. 363 [cit. 2020-11-09]. ISBN 978-80-7080-675-3. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.pdf>
- [17] NOVÁK, Josef. Micelární (asociativní) koloidy. NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz* [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2016, s. 390-394 [cit. 2020-10-17]. ISBN 978-80-7080-675-3. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.pdf>
- [18] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. Asociativní koloidy. KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc, 2007, s. 38-42.
- [19] KHALIL, Rabah a Al-hakam ZARARI. Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates. *Applied Surface Science* [online]. 2014, **318**, 85-89 [cit. 2020-11-09]. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2014.01.046
- [20] NAGARAJAN, R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. *Langmuir* [online]. 2002, **18**(1), 31-38 [cit. 2020-11-09]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la010831y
- [21] MOSLEY, Garrett, Cameron YAMANISHI a Daniel KAMEI. Mathematical Modeling of Vesicle Drug Delivery Systems 1. *Journal of Laboratory Automation* [online]. 2013, **18**(1), 34-45 [cit. 2020-11-09]. ISSN 2211-0682. Dostupné z: doi:10.1177/2211068212457161
- [22] DHAWAN, Vivek a Mangal NAGARSENKER. Catanionic systems in nanotherapeutics – Biophysical aspects and novel trends in drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* [online]. 2017, **266**, 331-345 [cit. 2020-11-12]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.040
- [23] MANNA, Kausik a Amiya KUMAR PANDA. Catanionic Surfactants: Novel Surrogates of Phospholipids. *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set* [online]. Hoboken, NJ, USA, 2016, , 1020-1043 [cit. 2020-10-13]. ISBN 9781119075691. Dostupné z: doi:10.1002/9781119075691.ch83
- [24] LEE, Wei-Han, Yi-Li TANG, Tzu-Chin CHIU a Yu-Min YANG. *Synthesis of Ion-Pair Amphiphiles and Calorimetric Study on the Gel to Liquid-Crystalline Phase Transition Behavior of Their Bilayers* [online]. 2015, **60**(4), 1119-1125 [cit. 2020-11-11]. ISSN 0021-9568. Dostupné z: doi:10.1021/je501079n

- [25] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir* [online]. 2005, **21**(14), 6179-6184 [cit. 2020-10-14]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la047207g
- [26] LI, Wei-Ta, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Langmuir monolayer behavior of an ion pair amphiphile with a double-tailed cationic surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2008, **66**(2), 187-194 [cit. 2020-10-14]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2008.06.009
- [27] TONDRE, Christian a Céline CAILLET. Properties of the amphiphilic films in mixed cationic/anionic vesicles: a comprehensive view from a literature analysis. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2001, **93**(1-3), 115-134 [cit. 2020-10-14]. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(00)00081-6
- [28] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2014, **292**(3), 589-597 [cit. 2020-11-10]. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-013-3104-9
- [29] JIANG, Yue, Feifei LI, Yuxia LUAN, Wenting CAO, Xiaoqing JI, Lanxia ZHAO, Longlong ZHANG a Zhonghao LI. Formation of drug/surfactant catanionic vesicles and their application in sustained drug release. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, **436**(1-2), 806-814 [cit. 2020-10-14]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2012.07.053
- [30] KUO, An-Tsung, Chien-Hsiang CHANG a Wataru SHINODA. Molecular Dynamics Study of Catanionic Bilayers Composed of Ion Pair Amphiphile with Double-Tailed Cationic Surfactant. *Langmuir* [online]. 2012, **28**(21), 8156-8164 [cit. 2020-10-14]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la300651u
- [31] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Adam JUGL, Ludmila MRAVCOVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Po-Sung HUANG, Miloslav PEKAŘ a 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* [online]. 2020, **607** [cit. 2020-10-14]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526
- [32] TIEN, Wu-jhao, Kun-you CHEN, Fong-yin HUANG a Chi-cheng CHIU. Effects of Cholesterol on Water Permittivity of Biomimetic Ion Pair Amphiphile Bilayers: Interplay between Membrane Bending and Molecular Packing. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(13) [cit. 2020-10-14]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20133252
- [33] GONÇALVES LOPES, Raquel, Oscar SILVESTRE, Ana FARIA, M. C. DO VALE, Eduardo MARQUES a Jana NIEDER. Surface charge tunable catanionic vesicles based on serine-derived surfactants as efficient nanocarriers for the delivery of the anticancer drug doxorubicin. *Nanoscale* [online]. 2019, **11**(13), 5932-5941 [cit. 2020-10-14]. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/C8NR06346J
- [34] ARNAUT, Luis, Sebastiao FORMOSINHO a Hugh BURROWS. Elementary Reactions in Solution. *Chemical Kinetics* [online]. Elsevier, 2007, , 223-250 [cit. 2020-10-16]. ISBN 9780444521866. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044452186-6/50009-2
- [35] HAY, Robert W. The Kinetic Background. *Reaction Mechanisms of Metal Complexes* [online]. Elsevier, 2000, , 35-57 [cit. 2020-10-16]. ISBN 9781898563419. Dostupné z: doi:10.1533/9781782420637.35

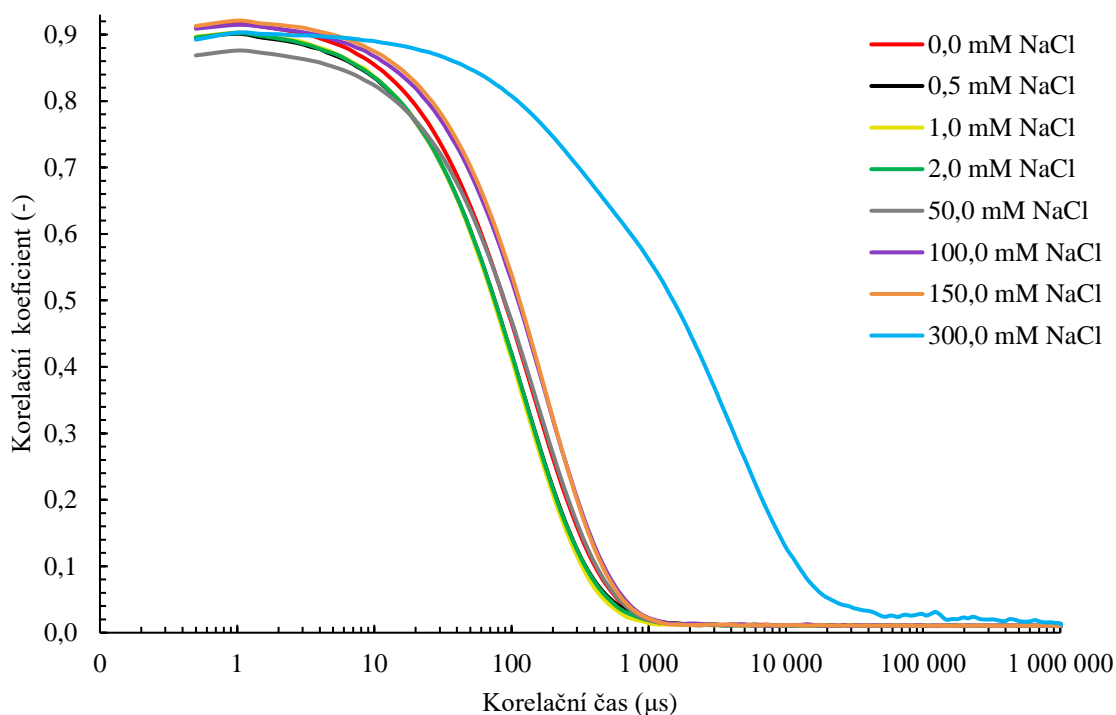
- [36] XU, Renliang. Light scattering: A review of particle characterization applications. *Particuology* [online]. 2015, **18**, 11-21 [cit. 2020-10-24]. ISSN 16742001. Dostupné z: doi:10.1016/j.partic.2014.05.002
- [37] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, **235**, 337-351 [cit. 2020-10-25]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [38] ROZO, Annaïg, Megan COX, Andrew DEVITT, Alice ROTHNIE a Alan GODDARD. Biophysical analysis of lipidic nanoparticles. *Methods* [online]. 2020, **180**, 45-55 [cit. 2020-10-24]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2020.05.001
- [39] MINTON, Allen P. Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences. *Analytical Biochemistry* [online]. 2016, **501**, 4-22 [cit. 2020-10-25]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2016.02.007
- [40] VILLARI, Valentina a Norberto MICALI. Light Scattering as Spectroscopic Tool for the Study of Disperse Systems Useful in Pharmaceutical Sciences. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008, **97**(5), 1703-1730 [cit. 2020-10-25]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21067
- [41] LEWIS, Scott a Lucio PICCIRILLO. Influence of Nanocomposite Materials for Next Generation Nano Lithography. *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites* [online]. InTech, 2011 [cit. 2020-10-25]. ISBN 978-953-307-202-9. Dostupné z: doi:10.5772/15624
- [42] YANG, Fangyuan, Wei WU, Shunli CHEN a Wei GAN. The ionic strength dependent zeta potential at the surface of hexadecane droplets in water and the corresponding interfacial adsorption of surfactants. *Soft Matter* [online]. 2017, **13**(3), 638-646 [cit. 2021-06-21]. ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/C6SM02174C
- [43] LAKOWICZ, Joseph R. Introduction to Fluorescence. LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy* [online]. 3rd ed. New York: Springer, 2006a, s. 1-25 [cit. 2020-11-18]. ISBN 978-0387-31278-1. Dostupné z: <http://nathan.instras.com/MyDocsDB/doc-800.pdf>
- [44] ALEXIEV, Ulrike a David FARRENS. Fluorescence spectroscopy of rhodopsins: Insights and approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2014, **1837**(5), 694-709 [cit. 2020-10-30]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2013.10.008
- [45] STRASBURG, Gale a Richard LUDESCHER. *Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research* [online]. 1995, **6**(3), 69-75 [cit. 2020-10-30]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/S0924-2244(00)88966-9
- [46] VINEGONI, Claudio, Paolo FERUGLIO, Ignacy GRZYCZYNSKI, Ralph MAZITSCHKEK a Ralph WEISSLEDER. Fluorescence anisotropy imaging in drug discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2019, **151-152**, 262-288 [cit. 2020-11-13]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2018.01.019
- [47] MADEIRA, Catarina, Luís LOURA, Maria AIRES-BARROS a Manuel PRIETO. Fluorescence methods for lipoplex characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2011, **1808**(11), 2694-2705 [cit. 2020-11-13]. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.020
- [48] BHARGAVI, N., A. DHATHATHREYAN a K.J. SREERAM. Regulating structural and mechanical properties of pectin reinforced liposomes at fluid/solid interface. *Food Hydrocolloids*

- [online]. 2021, **111** [cit. 2020-11-13]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106225
- [49] ZHAO, Qiang, Jeffrey TAO, Wei FENG, Jagdeesh UPPAL, Hanyong PENG a X. LE. Aptamer binding assays and molecular interaction studies using fluorescence anisotropy - A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2020, **1125**, 267-278 [cit. 2020-11-14]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2020.05.061
- [50] ZHAO, Qiang, Jeffrey TAO, Jagdeesh UPPAL, Hanyong PENG, Hailin WANG a X. LE. Nucleic acid aptamers improving fluorescence anisotropy and fluorescence polarization assays for small molecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **110**, 401-409 [cit. 2020-11-14]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.11.018
- [51] HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Ludmila MRAVCOVÁ, Tereza VENEROVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Miloslav PEKAŘ, Adam JUGL a Filip MRAVEC. Cholesterol Effect on Membrane Properties of Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles at Different Temperatures. *Langmuir*. 2021, **37**(7), 2436-2444. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.0c03504
- [52] MARCELINO, Joana, José L.F.C. LIMA, Salette REIS a Carla MATOS. Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2007, **146**(2), 94-103. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.12.008
- [53] LAKOWICZ, Joseph R. Fluorophores. LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy* [online]. 3rd ed. New York: Springer, 2006b, s. 63-94 [cit. 2020-11-18]. ISBN 978-0387-31278-1. Dostupné z: <http://nathan.instras.com/MyDocsDB/doc-800.pdf>
- [54] ABOUD, Rola, Catherine CHARCOSSET a Hélène GREIGE-GERGES. Biophysical methods: Complementary tools to study the influence of human steroid hormones on the liposome membrane properties. *Biochimie* [online]. 2018, **153**, 13-25 [cit. 2020-11-14]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2018.02.005
- [55] YU, W., P.T. SO, T. FRENCH a E. GRATTON. Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach. *Biophysical Journal*. 1996, **70**(2), 626-636. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(96)79646-7
- [56] CALORI, Italo, Wallace PAZIN, Kellen BRUNALDI, Diogo PELLOSI, Wilker CAETANO, Antonio TEDESCO a Noboru HIOKA. Laurdan as fluorescent probe to determinate the critical micelle temperature of polymers from Pluronic®-coated fluid phase liposomes. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2019, **294** [cit. 2021-06-14]. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2019.111562
- [57] PARASASSI, T., G. DE STASIO, A. D'UBALDO a E. GRATTON. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* [online]. 1990, **57**(6), 1179-1186 [cit. 2021-06-14]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(90)82637-0
- [58] PARASASSI, Tiziana, Ewa KRASNOWSKA, Luis BAGATOLLI a Enrico GRATTON. Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *Journal of Fluorescence* [online]. **8**(4), 365-373 [cit. 2021-06-14]. ISSN 10530509. Dostupné z: doi:10.1023/A:1020528716621
- [59] PARASASSI, T., G. DE STASIO, G. RAVAGNAN, R.M. RUSCH a E. GRATTON. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* [online]. 1991, **60**(1), 179-189 [cit. 2021-06-14]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(91)82041-0

- [60] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a 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* [online]. 2018, **92**, 29-35 [cit. 2020-11-10]. ISSN 18761070. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtice.2018.02.013
- [61] PERUZZI, Justin, M. GUTIERREZ, Kylee MANSFIELD a Noah MALMSTADT. Dynamics of Hydrogel-Assisted Giant Unilamellar Vesicle Formation from Unsaturated Lipid Systems. *Langmuir* [online]. 2016, **32**(48), 12702-12709 [cit. 2020-10-21]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.6b01889
- [62] CLAESSENS, M.M.A.E., B.F. VAN OORT, F.A.M. LEERMAKERS, F.A. HOEKSTRA a M.A. COHEN STUART. Charged Lipid Vesicles: Effects of Salts on Bending Rigidity, Stability, and Size. *Biophysical Journal* [online]. 2004, **87**(6), 3882-3893 [cit. 2021-06-18]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.103.036772
- [63] CARRIÓN, F.J., A. DE LA MAZA a J.L. PARRA. The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1994, **164**(1), 78-87 [cit. 2020-10-20]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1006/jcis.1994.1145
- [64] DAS, Sourav, Nitai PATRA, Arnab BANERJEE, Bijan DAS a Soumen GHOSH. Studies on the self-aggregation, interfacial and thermodynamic properties of a surface active imidazolium-based ionic liquid in aqueous solution: Effects of salt and temperature. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2020, **320** [cit. 2020-11-17]. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2020.114497
- [65] DANAELI, M., M. DEGHANKHOLD, S. ATAELI, F. HASANZADEH DAVARANI, R. JAVANMARD, A. DOKHANI, S. KHORASANI a M. MOZAFARI. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(2) [cit. 2021-07-05]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [66] PHILLIPS, S., H. OZBEK, A. IGBENE a G. LITTON. Table 5. Relative viscosity, vis NaCl/ vis. water. PHILLIPS, S., H. OZBEK, A. IGBENE a G. LITTON. *Viscosity of NaCl and other solutions up to 350 °C and 50 MPa pressures* [online]. Lawrence Berkley Laboratory, University of California, Berkley, CA: Engineering & Technical Service Division, 1980, s. 31 [cit. 2021-06-18]. Dostupné z: <https://www.osti.gov/servlets/purl/6731414/>
- [67] ZHU, Xingyu, Tiancheng MAI a Zilong ZHAO. Relationship between Refractive Index and Molar Concentration of Multi-Component Solutions. *Proceedings of the 2016 4th International Conference on Machinery, Materials and Information Technology Applications* [online]. Paris, France: Atlantis Press, 2017, , - [cit. 2021-06-18]. ISBN 978-94-6252-285-5. Dostupné z: doi:10.2991/icmmita-16.2016.81
- [68] PEYMAN, A., C. GABRIEL a E.H. GRANT. Complex permittivity of sodium chloride solutions at microwave frequencies. *Bioelectromagnetics* [online]. 2007, **28**(4), 264-274 [cit. 2021-06-18]. ISSN 01978462. Dostupné z: doi:10.1002/bem.20271

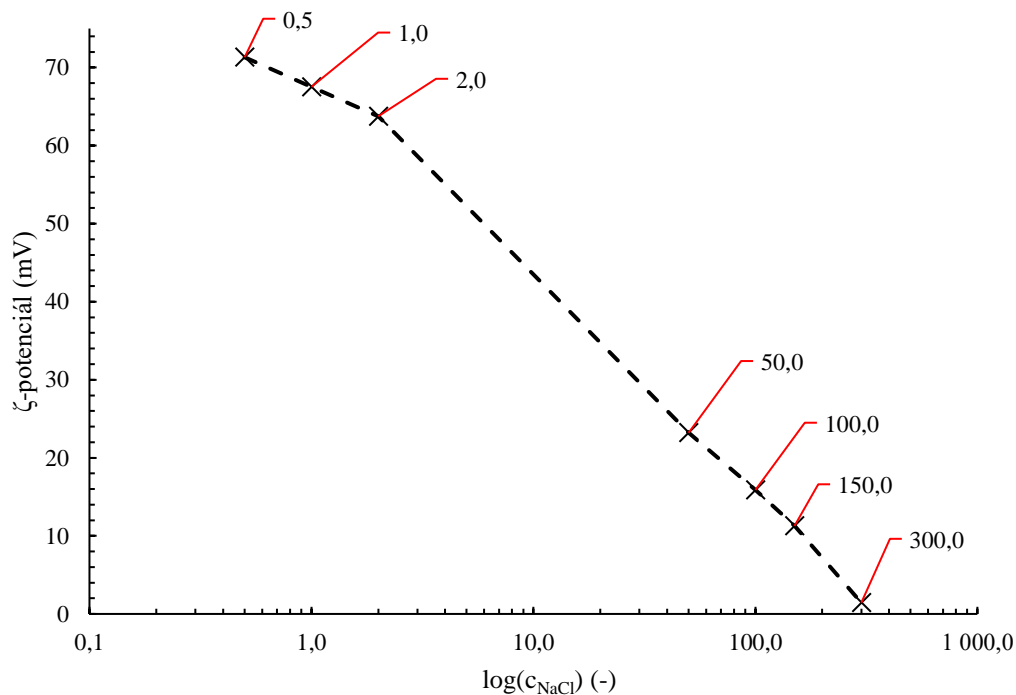
## 8 PŘÍLOHY

### 8.1 Korelační křivky



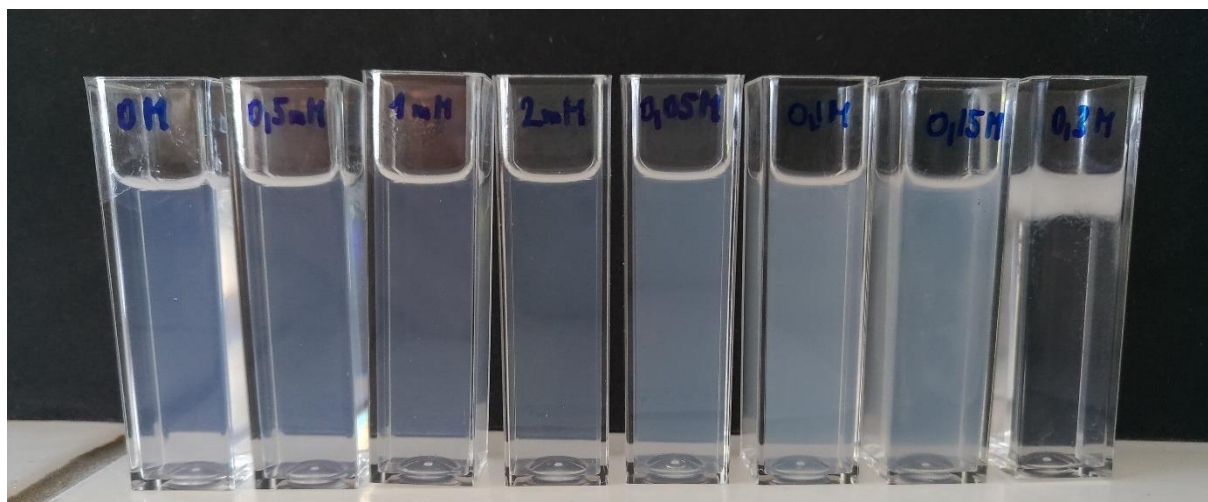
Obr. 26: Korelační koeficient v závislosti na korelačním čase pro jednotlivé vzorky v koncentrační řadě

### 8.2 Závislost $\zeta$ -potenciálu na logaritmické koncentraci soli NaCl

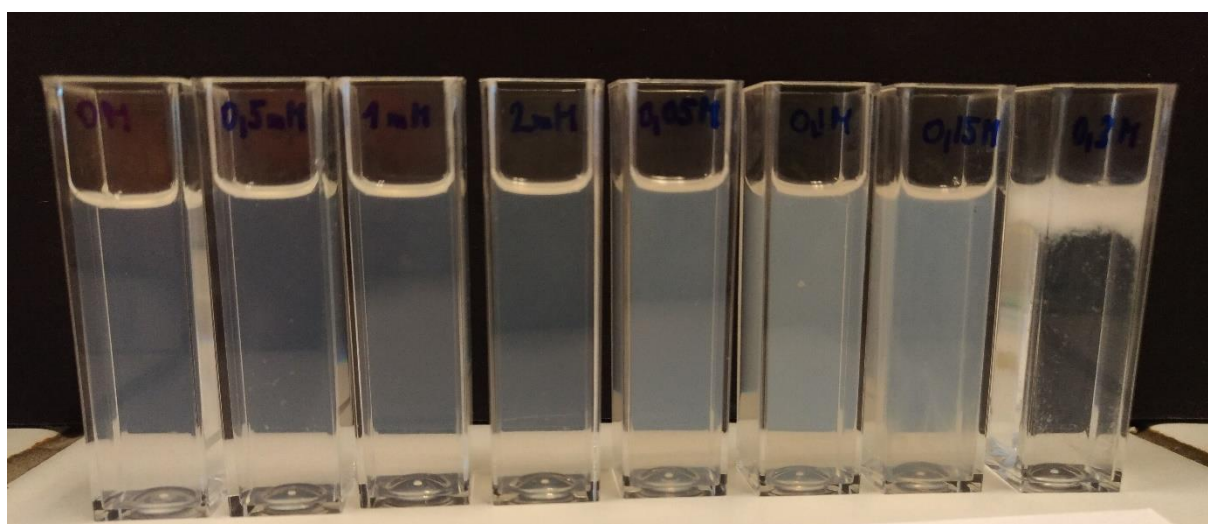


Obr. 27: Závislost  $\zeta$ -potenciálu na logaritmické koncentraci soli NaCl ve vzorcích

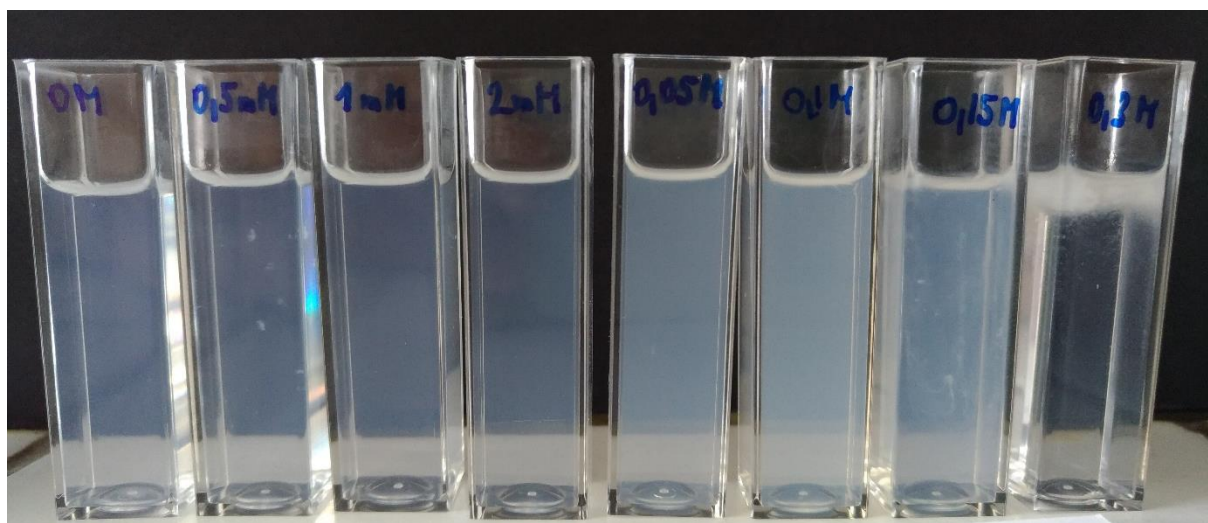
### 8.3 Vizuální pozorování



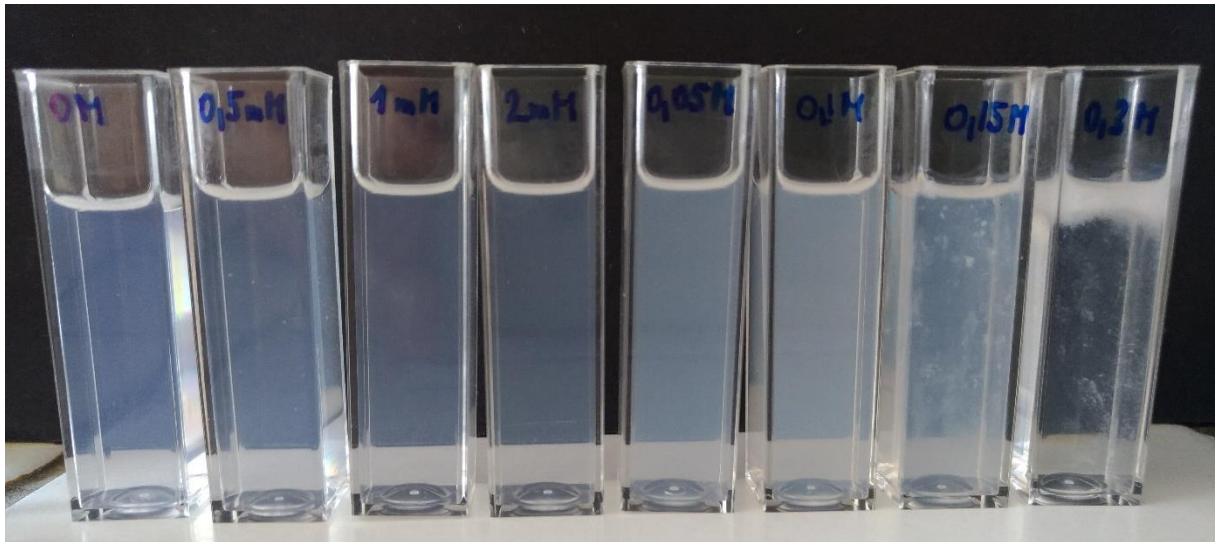
Obr. 28: Vzorky s obsahem soli 0 až 300 mM NaCl po 7 dnech od přidavku soli



Obr. 29: Vzorky s obsahem soli 0 až 300 mM NaCl po 14 dnech od přidavku soli



Obr. 30: Vzorky s obsahem soli 0 až 300 mM NaCl po 3 týdnech od přidavku soli



*Obr. 31: Vzorok s obsahem soli 0 až 300 mM NaCl po 4 týdnech od přidavku soli*

## 8.4 Souhrnné tabulky výsledků

Tab. 6: Tabulka souhrnných výsledků a zhodnocení vlastností při konstantní teplotě

Souhrnná tabulka fyzikálních a membránových vlastností vezikul v závislosti na iontové síle pro konstantní teplotu <sup>2</sup>									
Iontová síla	Koncentrace NaCl	Velikost	$\zeta$ -potenciál	Fluorescenční anizotropie	Vnitřní membrána – fluidita	Vnitřní membrána – uspořádanost	GP	Vnější membrána – solvatace	Vnější membrána – uspořádanost
žádná	0 M	standard	vysoká	vysoká	nízká	vysoká	nízká	vysoká	nízká
nízká	0,5–2 mM	klesá	klesá	0,5 a 1 mM – roste 2 mM – klesá	0,5 a 1 mM – klesá 2 mM – roste	0,5 a 1 mM – roste 2 mM – klesá	nízká	vysoká	nízká
vysoká	50–300 mM	roste	klesá	klesá	roste	klesá	vyšší	klesá	roste

Tab. 7: Tabulka výsledků při měnící se teplotě

Souhrnná tabulka membránových vlastností vezikul v závislosti na iontové síle s rostoucí teplotou							
Teplota	Koncentrace NaCl	Fluorescenční anizotropie	Vnitřní membrána – fluidita	Vnitřní membrána – uspořádanost	GP	Vnější membrána – solvatace	Vnější membrána – uspořádanost
Nízká (15 °C)	0–300 mM	vysoká	nízká	vysoká	vysoká	nízká	vysoká
Vysoká (75 °C)	0–300 mM	nízká	vysoká	nízká	nízká	vysoká	nízká

<sup>2</sup> Veličiny jsou porovnávány, jak se mění vůči vzorku s 0,0 mM NaCl při konstantní teplotě.