



**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

**SOLUBILIZACE V SYSTÉMECH KATANIONTOVÝCH  
TENZIDŮ**

SOLUBILIZATION IN CATIONIC SURFACTANT SYSTEMS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Anna Konečná**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

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

**BRNO 2020**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1515/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Anna Konečná**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Solubilizace v systémech kataniontových tenzidů

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše na techniky stanovení solubilizační kapacity koloidních systémech s přihlédnutím k vezikulárním systémům.
- 2) Navrhnout na základě rešerše vhodné modelové látky pro studium solubilizace v kataniontových systémech na bázi SDS a CTAB.
- 3) Stanovit solubilizační kapacitu vybraných kataniontových vezikulárních systémů.
- 4) Vyhodnotit zvolené postupy a dosažené výsledky z hlediska využití systémů pro cílenou distribuci léčiv.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

-----  
Anna Konečná  
student(ka)

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

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

V Brně dne 31.1.2020

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

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá solubilizací hydrofobních barviv v systémech kladně nabitých kataniontových vezikul. Cílem práce bylo stanovení jejich solubilizační kapacity. Vezikulární systémy byly připraveny z opačně nabitých povrchově aktivních látek CTAB a SDS. Pro zvýšení stability vezikul byl do jejich struktury přidán cholesterol a kladně nabitý dvouřetězcový tenzid DODAC, díky kterému systém získal kladný náboj. Pro stanovení solubilizační kapacity byla použita barviva 1-Naftol, Sudan Red G a Oil Red O a byly použity dva způsoby přípravy vzorků, tzv. spontánní a přímá solubilizace. Měření bylo provedeno po 1, 2, 3 a 7 dnech od přípravy vzorků pomocí UV-VIS spektrofotometrie, kdy byla měřena absorbance, ze které byla následně výpočtem z kalibračních křivek stanovena solubilizační kapacita. Výsledky ukazují, že přímá solubilizace je mírně účinnější než solubilizace spontánní. Ze zvolených barviv se nejlépe solubilizoval 1-Naftol, tedy látka s nejmenší molekulou, kdy pravděpodobně došlo k jeho 100% solubilizaci do systému vezikul.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the solubilization of hydrophobic dyes in systems of positively charged catanionic vesicles. The aim of the work was to determine their solubilization capacity. Vesicular systems were prepared from oppositely charged surfactants CTAB and SDS. To increase the stability of the vesicles, cholesterol and the positively charged double-chain surfactant DODAC were added to their structure. DODAC also gave the system a positive charge. To determine the solubilization capacity, the dyes 1-Naphthol, Sudan Red G and Oil Red O were used. For sample preparation two methods were used, spontaneous and direct solubilization. The measurement was performed after 1, 2, 3 and 7 days from the preparation of the samples by UV-VIS spectrophotometry. The solubilization capacity was determined from the measured absorbance by calculation from the calibration curves. The results indicate that direct solubilization is slightly more effective than spontaneous solubilization. Of the selected dyes, 1-Naphthol is the substance with the smallest molecule, and therefore it seems to be 100% solubilized in the vesicle system.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

kataniontové vezikulární systémy, amfifilní iontový pár, solubilizace, 1-Naftol, Sudan Red G, Oil Red O, UV-VIS spektrofotometrie

## **KEY WORDS:**

catanionic vesicular systems, ion pair amphiphile, solubilization, 1-Naphthol, Sudan Red G, Oil Red O, UV-VIS spectrophotometry

KONEČNÁ, Anna. *Solubilizace v systémech kataniontových tenzidů* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123786>. 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 bakalářské práce a děkana FCH VUT.

---

podpis studenta

## Poděkování

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla moc poděkovat Ing. Martině Havlíkové za její ochotu, trpělivost a pomoc při měření, za cenné rady, připomínky a čas věnovaný konzultacím. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého studia.*

## OBSAH

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1 Úvod.....                                                     | 7  |
| 2 Teoretická část .....                                         | 8  |
| 2.1 Tenzidy .....                                               | 8  |
| 2.1.1 Kationické tenzidy .....                                  | 8  |
| 2.1.2 Anionické tenzidy .....                                   | 9  |
| 2.1.3 Amfoterní tenzidy .....                                   | 10 |
| 2.2 Micely.....                                                 | 10 |
| 2.2.1 Nesférické micely.....                                    | 12 |
| 2.3 Kataniontové vezikulární systémy .....                      | 13 |
| 2.3.1 Vznik kataniontových vezikul.....                         | 13 |
| 2.3.2 Stabilizace .....                                         | 14 |
| 2.3.3 Aplikace .....                                            | 15 |
| 2.4 Solubilizace .....                                          | 15 |
| 2.4.1 Barviva a fluorescenční sondy .....                       | 16 |
| 2.5 UV-VIS Spektrofotometrie .....                              | 18 |
| 2.5.1 Instrumentace .....                                       | 19 |
| 3 Současný stav řešené problematiky .....                       | 21 |
| 3.1 Příprava kataniontových vezikulárních systémů .....         | 21 |
| 3.2 Solubilizace v kataniontových vezikulárních systémech ..... | 21 |
| 4 Experimentální část.....                                      | 25 |
| 4.1 Chemikálie.....                                             | 25 |
| 4.2 Shrnutí cílů práce.....                                     | 25 |
| 4.3 Použité metody .....                                        | 26 |
| 4.3.1 Příprava IPA.....                                         | 26 |
| 4.3.2 Příprava systémů cIPA + cholesterol .....                 | 26 |
| 4.3.3 Příprava kalibrační řady .....                            | 26 |
| 4.3.4 Příprava vzorků pro solubilizaci .....                    | 27 |
| 4.4 UV-VIS Spektrofotometrie .....                              | 27 |
| 5 Výsledky a diskuze .....                                      | 29 |
| 5.1 Příprava IPA.....                                           | 29 |
| 5.2 Příprava cIPA + cholesterol .....                           | 29 |
| 5.3 Kalibrační křivky.....                                      | 29 |

|       |                                                |    |
|-------|------------------------------------------------|----|
| 5.4   | Solubilizační kapacita cIPA + cholesterol..... | 31 |
| 5.4.1 | Spontánní solubilizace .....                   | 31 |
| 5.4.2 | Přímá solubilizace .....                       | 34 |
| 6     | Závěr .....                                    | 37 |
| 7     | Literatura.....                                | 38 |
| 8     | Seznam zkratk a symbolů .....                  | 41 |
| 8.1   | Seznam použitých zkratk.....                   | 41 |
| 8.2   | Seznam použitých symbolů.....                  | 42 |

# 1 ÚVOD

Kataniontové vezikulární systémy jsou duté sférické objekty. Jsou tvořeny jednou nebo více dvojvrstevnými membránami, které vznikají spojením dvou opačně nabitých povrchově aktivních látek. Strukturou tyto systémy připomínají lipozomy, což jsou vezikuly tvořené lipidovou dvojvrstvou. Lipozomy se díky své biologické kompatibilitě a degradabilitě využívají jako nosičové systémy léčiv a DNA. Jejich využití je však značně omezené kvůli jejich vysoké ceně, nízké stabilitě a poměrně krátké životnosti.

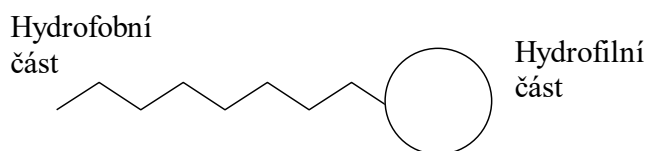
Nosičové systémy léčiv jsou systémy schopné transportovat enkapsulované léčivo na konkrétní místo v těle pacienta. Kvůli již zmiňovaným nevýhodám lipozomů se výzkum v současné době zaměřuje na studium jejich možných alternativ. Cílem je levnější příprava systémů, které budou více stabilní a méně náchylné na degradaci. Jednou ze studovaných možností jsou právě kataniontové vezikulární systémy, které se připravují z běžně dostupných tenzidů. Díky snadné a relativně levné přípravě a dobré stabilitě mají kataniontové vezikuly velký potenciál při využití jako nosičové systémy nebo systémy s řízeným uvolňováním léčiv.

Cílem práce bylo stanovit solubilizační kapacitu kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů. Pro stanovení byly zvoleny tři hydrofobní barviva a dva přístupy. Prvním byla spontánní solubilizace barviv v již hotových systémech vezikul a dalším přímá solubilizace barviv při přípravě vezikulárních systémů. Pro stanovení solubilizační kapacity byla zvolena metoda UV-VIS spektrofotometrie.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Tenzidy

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky (PAL), které se už při nízkých koncentracích hromadí na fázovém rozhraní, čímž snižují povrchové napětí a mezifázovou energii soustavy. Jsou to organické látky tzv. amfifilní struktury – obsahují hydrofobní i hydrofilní část (Obrázek 1). V případě, že je rozpouštědlem voda, platí následující rozdělení. Hydrofobní (nepolární) složku tvoří dlouhé uhlovodíkové řetězce. Řetězce mohou být lineární nebo rozvětvené a jejich délka se obvykle pohybuje mezi 8 a 18 atomy uhlíku. Hydrofilní část je tvořena silně polárními skupinami, např.  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{NR}_3^+$ . Na fázovém rozhraní se molekula orientuje tak, že hydrofobní část směřuje do nepolární fáze, naopak hydrofilní část do fáze polární. Tenzidy dělíme podle ionicity na neionické a ionické, které se dále dělí na kationické, anionické a amfoterní [1-3].



Obrázek 1: Schéma struktury tenzidu.

Neionické tenzidy jsou látky neschopné elektrolytické disociace. Jejich rozpustnost zajišťuje mnoho polárních funkčních skupin (hydroxylové či esterové skupiny) na konci dlouhého uhlovodíkového řetězce. Příkladem jsou oxyethylenáty alifatických alkoholů, které vznikají reakcí vysokomolekulárního alkoholu s molekulami ethylenoxidu. Využívají se především v textilním průmyslu, kosmetice, potravinářství či zemědělství [1,2].

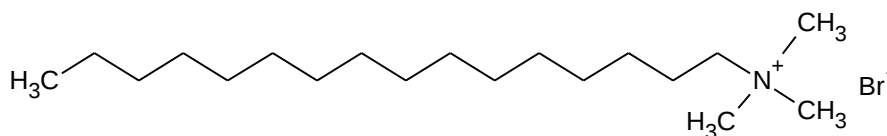
#### 2.1.1 Kationické tenzidy

Kationické tenzidy ve vodném prostředí disociují za vzniku kladně nabitého iontu. Díky tomuto náboji se mohou snadno adsorbovat na pevné povrchy nesoucí záporný náboj. Významné jsou pro své germicidní, antistatické a změkčovací účinky, kterých se využívá především v lékařství, farmacii, kosmetice či textilním průmyslu. Nevýhodami jsou horší biodegradabilita a vyšší cena. Do skupiny katanionických tenzidů se řadí alkylaminy, pyridinové sloučeniny substituované na atomech dusíku či kvartérní amoniové soli [1,3].

Alkylaminy vykazují nízkou povrchovou aktivitu. V alkalickém prostředí navíc dochází k omezení disociace aminoskupiny a tím k dalšímu snížení aktivity. Soli pyrimidinových zásad vykazují naopak poměrně vysokou povrchovou aktivitu i v alkalickém prostředí. Při vhodné délce uhlovodíkového řetězce mohou mít baktericidní účinky. Soli kvartérních amoniových zásad jsou nejpoužívanější skupinou kationických tenzidů. Délka hlavního uhlovodíkového řetězce se pohybuje mezi 12 a 18 uhlíky, ostatní řetězce jsou tvořeny methylovými nebo ethylovými zbytky a protiontem bývá nejčastěji halogenidový iont. Nejznámějším zástupcem je hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB) [2].

### 2.1.1.1 Hexadecyltrimethylamonium bromid

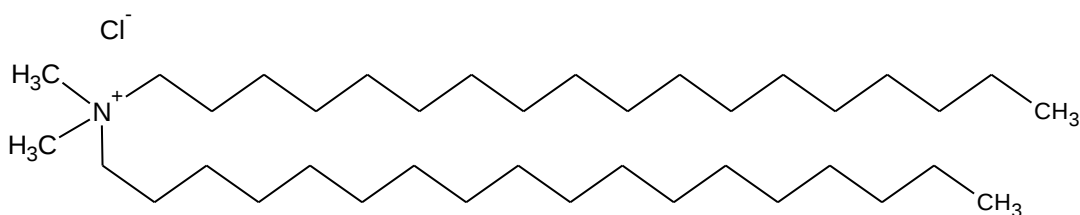
Hexadecyltrimethylamonium bromid někdy nazýván cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) nebo cetrimonium bromid je kvartérní amoniová sůl. Nejdelší uhlovodíkový řetězec je tvořen 16 atomy uhlíku, ostatní řetězce jsou methylové zbytky. Je to bílá pevná látka, která má antibakteriální, antiseptické a další antimikrobiální účinky. Využívá se při extrakci DNA jako součást pufrů, při syntéze zlatých nanočástic a v kosmetice [4,5].



Obrázek 2: Struktura CTAB.

### 2.1.1.2 Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid

Dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid (DODAC) je dvouřetězcový kladně nabitý tenzid. Strukturně se také jedná o kvartérní amoniovou sůl, kterou tvoří dva řetězce o 18 uhlících a dva methylové zbytky. Je to bílá pevná látka obvykle ve formě vloček. Používá se jako antistatické činidlo v kosmetických produktech nebo jako katalyzátor v organické syntéze. Dříve se přidával také do aviváží, ale kvůli své nízké biodegradabilitě byl jeho výskyt v těchto přípravcích omezen [6,7].



Obrázek 3: Struktura DODAC.

## 2.1.2 Anionické tenzidy

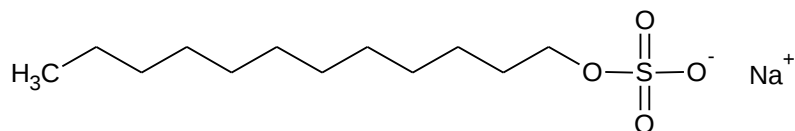
Anionické tenzidy ve vodném prostředí disociují na záporně nabitě organické ionty a kationt kovů. Nejvíce aktivní jsou v mírně alkalickém prostředí, naopak v kyselém prostředí jsou nestálé. Mezi nejvýznamnější zástupce patří soli karboxylových kyselin a alkylsulfáty [2].

Soli karboxylových kyselin jsou strukturně alkalické soli organických monokarboxylových kyselin nebo jejich derivátů. Vykazují středně vysokou povrchovou aktivitou, která se v kyselém prostředí snižuje v důsledku potlačení disociace kyseliny. Při styku s vápenatými nebo hořečnatými ionty vytváří málo rozpustné sraženiny a ztrácí povrchovou aktivitu.

Alkylsulfáty jsou soli alkylesterů kyseliny sírové vykazující vysokou povrchovou aktivitu i v kyselém prostředí. Důvodem je sulfátová skupina na konci řetězce, která snadno podléhá hydrolýze. Výhodami jsou dobrá rozpustnost ve vodě a poměrně dobrá biodegradabilita u látek s lineárním uhlovodíkovým řetězcem. Nejznámějším zástupcem je dodecylsulfát sodný (SDS) [2].

### 2.1.2.1 Dodecylsulfát sodný

Dodecylsulfát sodný (SDS) je sodná sůl organosulfátu, který vznikl esterifikací alkoholu a kyseliny sírové. Tvoří jej řetězec ze 12 uhlíků napojený na záporně nabitou sulfátovou skupinu. Je to bílá krystalická látka velmi dobře rozpustná ve vodě. Díky svým detergentním vlastnostem se využívá jako součást čistících přípravků, v nižších koncentracích se vyskytuje i v šamponech, zubních pastách a kosmetických přípravcích. SDS není karcinogenní, má nízkou toxicitu, ale může způsobit podráždění kůže nebo dýchacích cest [8,9].



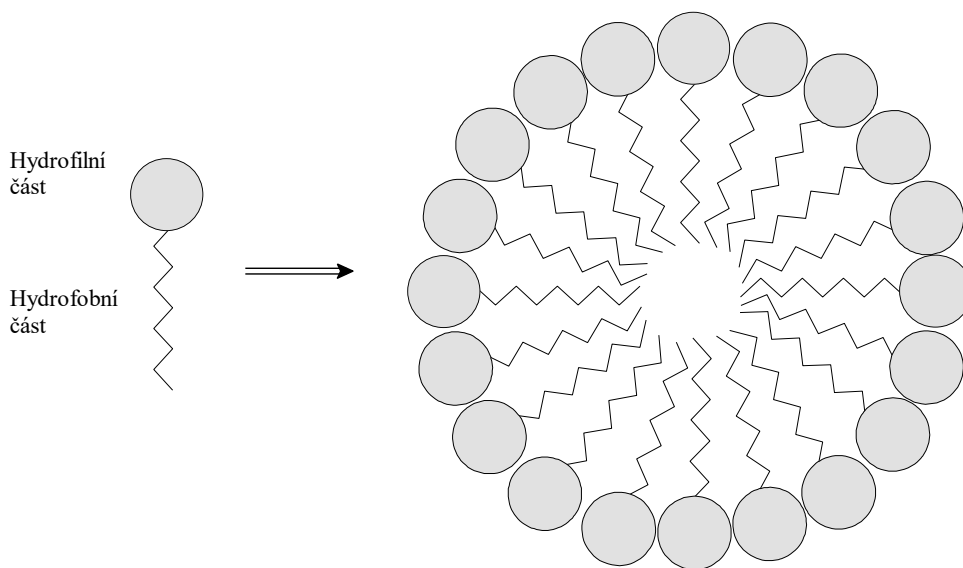
Obrázek 4: Struktura SDS.

### 2.1.3 Amfoterní tenzidy

Amfoterní neboli amfolytické tenzidy obsahují ve své molekule dvě hydrofilní skupiny, kyselinou (záporně nabitou) a zásaditou (kladně nabitou), které způsobují amfoterní charakter molekuly v závislosti na pH prostředí. Díky tomu se dají kombinovat s anionaktivními i kationaktivními tenzidy. Další výhodou je dobrá snášenlivost s pokožkou a sliznicemi, čehož se využívá především v kosmetice. Nevýhodami jsou nerozpustnost v organických rozpouštědlech a drahá výroba [1,2].

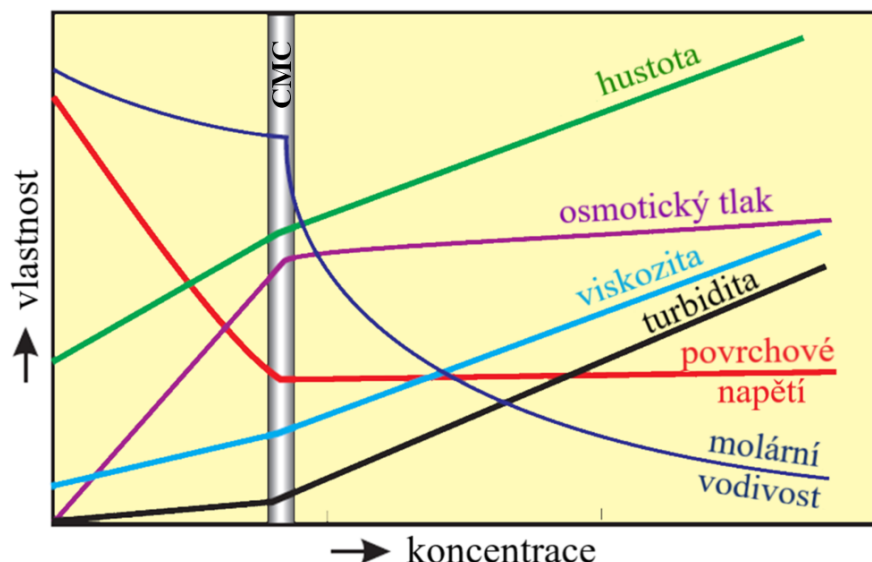
## 2.2 Micely

Některé nízkomolekulární látky ve velkém zředění poskytují pravé roztoky. Při vyšších koncentracích se molekuly látky shlukují a vytvářejí koloidní disperzní částice neboli micely. Molekuly těchto látek mají tzv. amfifilní charakter – obsahují hydrofobní i hydrofilní část. Nejčastěji se jedná o PAL rozpustné ve vodě, které jsou složeny ze silně hydrofilní polární skupiny, která zajišťuje rozpouštění, a hydrofobní nepolární části, kterou tvoří dlouhý uhlovodíkový řetězec (Obrázek 5). Mezi micelární koloidy rozpustné ve vodě se řadí tenzidy, detergenty a mýdla [10].



Obrázek 5: Struktura PAL a micely ve vodním prostředí.

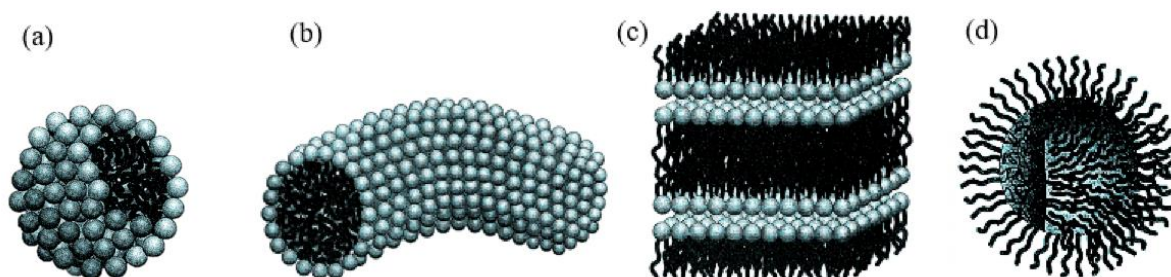
Koncentrace, při které se začínají micely tvořit, se označuje jako *kritická micelární koncentrace* (CMC) a obvykle se pohybuje v rozmezí  $10^{-5}$  až  $10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Při CMC dochází ke změně fyzikálně-chemických vlastností roztoku PAL, např. snížení povrchového napětí a molární vodivosti, naopak nárůst hustoty či viskozity (Obrázek 6). Tvorbu micel ovlivňuje několik faktorů, např. délka a struktura uhlovodíkového řetězce, kdy se zvětšujícím se řetězcem CMC klesá, dále vlastnosti hydrofilní části, teplota, tlak, protiionty a příměsi [3].



Obrázek 6: Závislost fyzikálních vlastností na koncentraci roztoku PAL [10].

Struktura micel je ovlivňována prostředím. V polárních rozpouštědlech je jádro micely tvořeno propletenými uhlovodíkovými řetězci PAL a na povrchu leží poskládané jednotlivé polární hlavy. Tím je zajištěn minimální styk molekul vody s hydrofobními částmi molekuly. V nepolárních rozpouštědlech se tvoří tzv. obrácené micely, jádro obsahuje polární hlavy a vně směřují jednotlivé uhlovodíkové řetězce [3].

Tvar micel je ovlivněn koncentrací roztoku. Ve zředěných roztocích vznikají malé kulovité Hartleyovy micely, kde propletené uhlovodíkové řetězce tvoří jádro a ven směřují polární skupiny. Jsou tvořeny 50–150 molekulami PAL a jejich poloměr přibližně odpovídá délce jedné molekuly PAL. Zvyšováním koncentrace roste poloměr micel a dochází k orientování uhlovodíkových zbytků navzájem rovnoběžně. Tvar se mění přes válcovité na laminární (McBainovy) micely. McBainovy micely jsou složeny ze dvou vrstev PAL, které jsou otočeny nepolárními řetězci k sobě a polární hlavy směřují ven. Tyto micely mají mnohem menší náboj než Hartleyovy micely a spadají do skupiny nesférických micel [10].



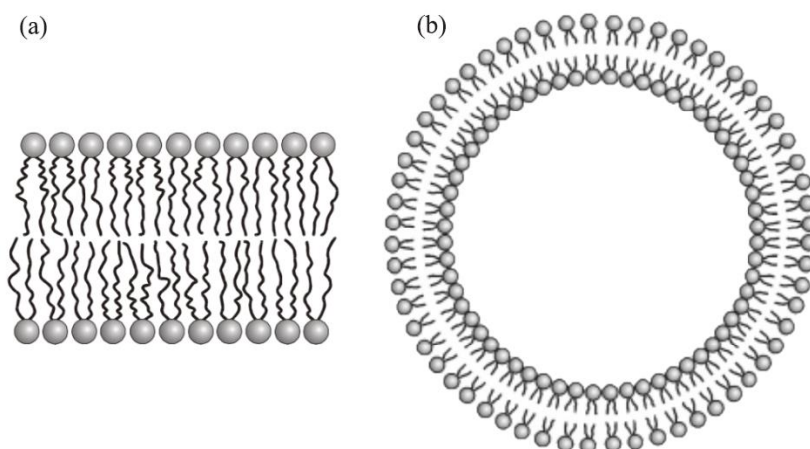
Obrázek 7: Struktura a tvar micel: (a) Hartleyova micela, (b) válcovitá micela, (c) McBainova micela, (d) obrácená micela [11].

### 2.2.1 Nesférické micely

Nesférické micely jsou válcovité (cylindrické) nebo laminární struktury. Válcovité micely jsou micely tyčinkovitého tvaru s kruhovým průřezem, které mají povrch tvořený polárními hlavami a hydrofobní řetězce mají schované uvnitř. Laminární micely mají PAL uspořádané do dvou rovinných vrstev s polárními skupinami na povrchu a nepolárními řetězci směřujícími proti sobě. Pokud amfifilní molekula obsahuje 2 hydrofobní řetězce, mohou vznikat dvojvrstvé membrány, vezikuly nebo obrácené micely. Tvar vznikající micely je závislý na struktuře primární amfifilní molekuly a koncentraci roztoku. Jednotlivé micely jsou znázorněny na Obrázku 7 [12].

Dvojvrstvé membrány jsou složeny ze dvou vrstev amfifilních molekul, které jsou k sobě otočené hydrofobními řetězci. Hydrofilní skupiny jsou orientovány do vody. Na rozdíl od lineárních micel je PAL membrán tvořena jednou hydrofilní skupinou a dvěma hydrofobními řetězci. Typickým zástupcem těchto látek jsou fosfolipidy. Dvojvrstvé membrány existují v rovinné a zakřivené formě. Pokud je membrána zakřivena do kruhu, jedná se o vezikulu.

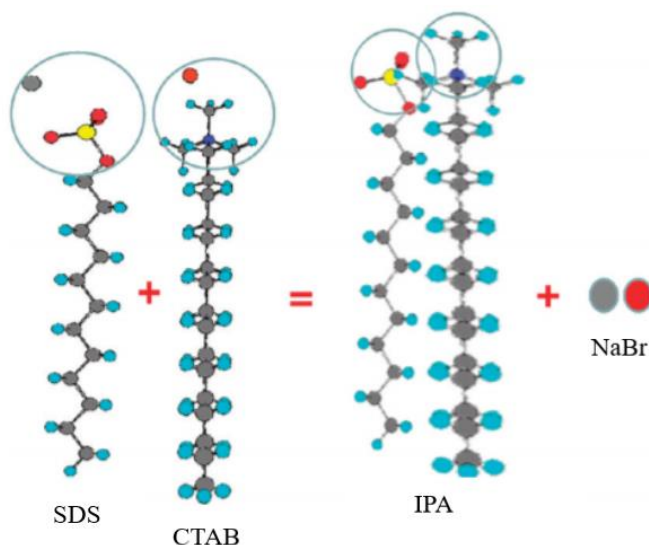
Vezikuly jsou tvořeny jednou nebo více do kruhu zakřivenými dvojvrstvými membránami. Podle počtu dvojvrstev se dělí na unilamelární a multilamelární (soustředné dvojvrstvy). Ve vodném roztoku je vnitřní a vnější část tvořena hydrofilními skupinami, což zajišťuje minimální styk hydrofobních řetězců s vodou. Rozměry vezikul se pohybují v rozmezí desítek nanometrů až desítek mikrometrů. Vezikuly tvořené fosfolipidy se nazývají liposomy [12].



Obrázek 8: Struktura (a) dvojvrstvé membrány, (b) vezikuly [12].

## 2.3 Kataniontové vezikulární systémy

Kataniontové vezikulární systémy jsou tvořené z tzv. amfifilních iontových párů (IPA, z angl. *ion pair amphiphile*), které vznikají spojením dvou opačně nabitých jednořetězcových PAL v ekvimolárním poměru a následným vymytím protiiontů. IPA může být považována za pseudodvouřetězcový tenzid, kdy dochází k elektrostatickému působení mezi polárními skupinami jednotlivých tenzidů, které se k přípravě IPA použily (Obrázek 9). IPA upřednostňují tvorbu vezikul před micelami. Jedná se o spontánní proces popsany kritickým parametrem balení  $P_c$ , který se používá k předpovězení struktury agregátů PAL ve vodném prostředí. IPA mají tento parametr větší než prekurzory pro tvorbu micel díky zmenšení efektivní plochy hlavy, a proto dochází přednostně k tvorbě vezikul [13].



Obrázek 9: Příprava IPA z SDS a CTAB [14].

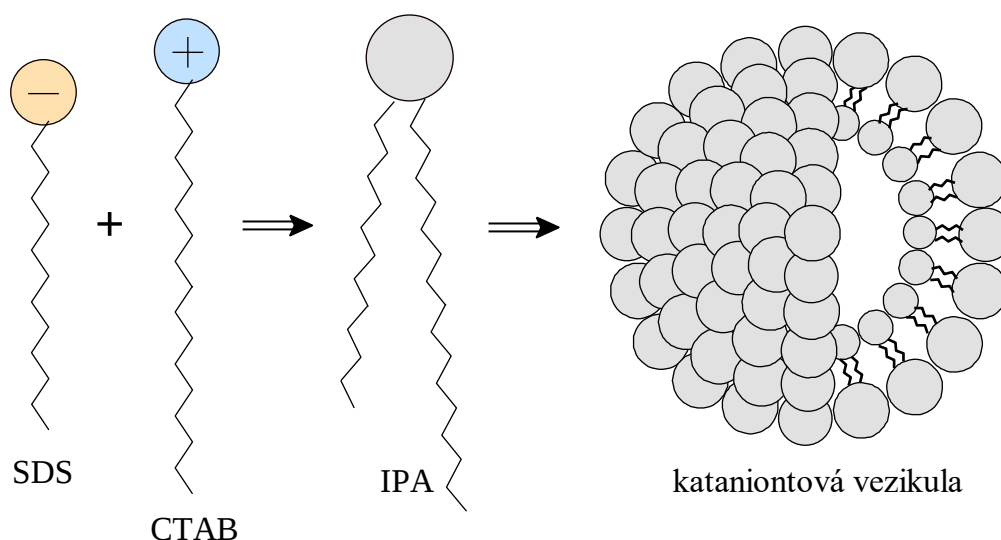
### 2.3.1 Vznik kataniontových vezikul

Kataniontové vezikuly jsou tvořeny nejčastěji z alkylamonium alkylsulfátů nebo sulfonátů. IPA tvořené dvěma symetrickými řetězci o deseti či méně uhlících nebo nesymetrickými řetězci, jedním s minimálně jedenácti a druhým s maximálně devíti uhlíky, jsou prakticky nerozpustné ve vodě. IPA s řetězci kratšími jsou rozpustné ve vodě za tvorby micel [14].

Tvar povrchově aktivní látky hraje velkou roli při tvorbě vezikul. Typ agregátu vznikajícího v systému je závislý na hodnotě kritického parametru balení  $P_c$ :

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

kde  $a_0$  je minimální mezifázová plocha obsazená hlavou,  $v$  je objem a  $l_c$  je maximální délka natáhnutého hydrofobního řetězce. Pokud je  $P_c \leq 0,33$ , bude docházet ke vzniku sférických micel. PAL s parametrem v rozmezí  $0,33 \leq P_c \leq 0,5$  budou vytvářet cylindrické nebo diskovité micely. Pro tvorbu vezikul se parametr balení pohybuje v rozmezí  $0,5-1$  a při  $P_c > 1$  dochází ke vzniku obrácených micel [14].



Obrázek 10: Tvorba kataniontové vezikuly.

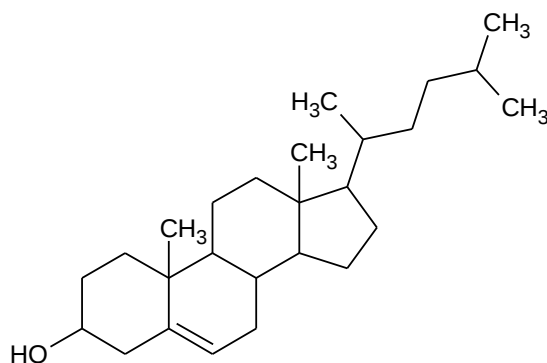
### 2.3.2 Stabilizace

Kataniontové vezikuly vytvořené z IPA ve vodných roztocích vykazují většinou špatnou fyzickou stabilitu. Dochází k vzájemné agregaci a fúzi vezikul, díky čemuž se stále mění jejich velikost a nejsou dlouhodobě skladovatelné. Pro zvýšení stability se do kataniontového systému přidává např. nabitý dvouřetězcový tenzid, který membránu zahušťuje. Náboj polární hlavy tohoto tenzidu také vytváří vazebná místa na povrchu vezikuly pro další možnou interakci s polyelektrolytem jako např. kyselinou hyaluronovou nebo nukleovými kyselinami. Příkladem takového dvouřetězcového tenzidu může být i dioktadecyldimethylamonium chlorid (DODAC), jehož vlastnosti a využití je zmíněno v kapitole 2.1.1.2. Další látkou, která zvyšuje stabilitu kataniontových systémů je cholesterol [15].

#### 2.3.2.1 Cholesterol

Cholesterol je steroidní látka přítomná v buňkách lidského těla, živočichů a některých rostlin. Struktura cholesterolu je zobrazena na Obrázku 11. V těle funguje jako prekurzor vitamínu D, žlučových kyselin a různých steroidních hormonů (progesteron, testosteron aj.). Je to velmi důležitá složka membrán buněk, tvoří asi 30 % látek v nich obsažených. Pomocí vazeb hydroxylových skupin na polární části fosfolipidů a steroidních částí s řetězcí mastných kyselin stabilizuje strukturu membrán. Zajišťuje i jejich permeabilitu (hlavně pro malé molekuly) oddalováním fosfolipidů [16].

V případě vezikul cholesterol funguje podobně jako v buněčných membránách. Jeho začleněním do struktury dochází ke zvětšení vzdálenosti mezi polárními hlavami, což vede ke snížení jejich vzájemného elektrostatického odpuzování. Také se sníží tendence protiiontů vázat se na povrch vezikuly. Přítomnost cholesterolu v systému s kladně nabitým dvouřetězcovým tenzidem vede ke zvýšení elektrostatického odpuzování mezi vezikulami a tedy k tvorbě stabilních vezikul [15].



Obrázek 11: Struktura cholesterolu.

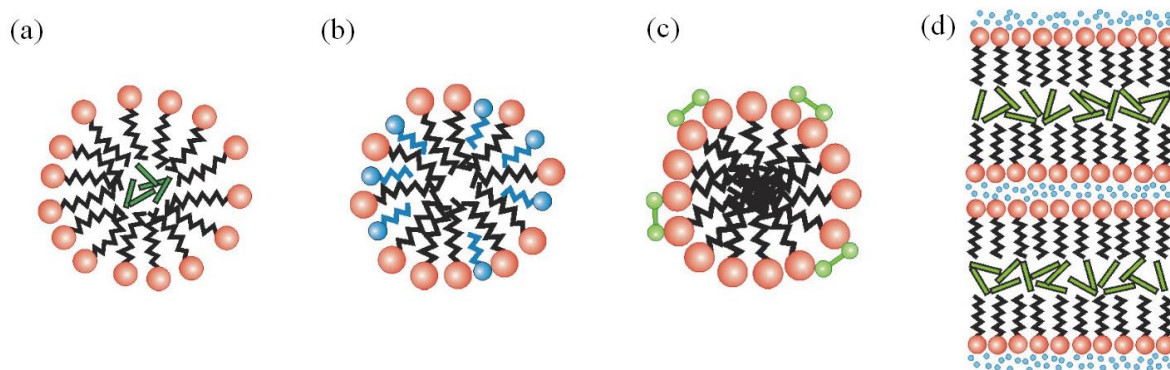
### 2.3.3 Aplikace

Kataniontové vezikulární systémy mohou být použity jako alternativa lipozomů, což jsou vezikuly složené z lipidů, netoxické a rozložitelné *in vivo*. Lipozomy se používají jako nosičové systémy léčiv nebo DNA, ale kvůli své vysoké ceně jsou využívány jen omezeně. Tento problém by mohly vyřešit kataniontové vezikuly, které se připravují z levnějších tenzidů a IPA [13].

Kataniontové vezikuly už byly zkoumány jako nosičové systémy pro enkapsulaci léčiv. Jelikož obsahují hydrofobní i hydrofilní části mohou enkapsulovat hydrofobní i hydrofilní látky. Tato schopnost umožňuje aplikaci kataniontových vezikul jako nosičových systémů nebo systémů s řízeným uvolňováním léčiv [18].

### 2.4 Solubilizace

Solubilizace je vlastnost micelárních koloidů, která jim umožňuje rozpouštět látky nerozpustné nebo jen málo rozpustné ve vodě. Souvisí se strukturou micel a nastává pouze při dosažení či překročení CMC. Během tohoto procesu dochází k začleňování molekul solubilizované látky do micel. Mechanismus solubilizace je závislý na disperzním prostředí. Pokud jím je voda, nepolární látky se rozpouštějí uvnitř micel, polárně-nepolární (amfifilní) látky se začleňují do micel podobně jako samotné tenzidy a polární látky jsou rozpouštěny u povrchu micely. V laminárních micelách dochází k solubilizaci nepolárních látek mezi uhlovodíkové řetězce a tím i k oddalování jednotlivých vrstev [3,10].



Obrázek 12: Solubilizace (a) nepolárních, (b) amfifilních, (c) polárních látek a (d) v laminárních micelách [10].

Procesem solubilizace se zvětšuje hmotnost micel jednak díky molekulám solubilizované látky, které se začleňují do struktury micely, a jednak díky zvětšování objemu hydrofobního jádra, čímž dochází ke zvýšení počtu molekul tvořících micely [3].

Solubilizace má velký význam i při detergentci. Ze zředěného roztoku PAL se nejdříve jednotlivé molekuly adsorbují na povrch nečistoty (olejovité vrstvy), kterou následně postupně sbalují a uvolňují ve formě micel. Dále se solubilizace uplatňuje při výrobě herbicidů, insekticidů, ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu apod. [10].

V nepolárním prostředí, kde vznikají micely s hydrofobním povrchem a hydrofilním jádrem, dochází k tzv. obrácené solubilizaci. Tohoto jevu se využívá především v potravinářském průmyslu [3].

#### **2.4.1 Barviva a fluorescenční sondy**

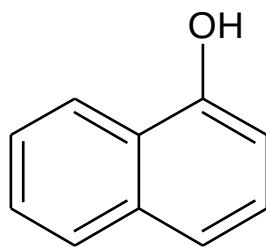
Barviva jsou látky schopné absorbovat a emitovat světlo z viditelné oblasti (380–780 nm). Z chemického hlediska je dělíme na organické a anorganické sloučeniny. Obě skupiny mají přírodní i synteticky vyrobené zástupce. Barviva musí vykazovat afinitu k substrátu, dobrou stabilitu a světlostálost. Primárně nachází využití v textilním průmyslu při barvení vláken. Dále se používají při barvení usní, kaučuku, papíru, plastických hmot, vosků, v potravinářském průmyslu, medicíně či biochemii [19,20].

Nejdůležitější a nejpočetnější skupinou organických barviv jsou azobarviva s odstíny od žluté až po černou. Lze je použít k barvení téměř všech přírodních i syntetických vláken, plastů, papíru, usní a výrobků z pryže. Pro svou jedovatost nejsou použitelné v potravinářství. Mezi zástupce azobarviv patří např. Methylčerven, Sudan Red G a Olejová červen O [21].

Fluorofory jsou většinou organické látky, které mají schopnost fluorescence. Nejčastěji se jedná o sloučeniny s aromatickým jádrem. Lze je rozdělit do dvou tříd. Vnitřní (vlastní) fluorofory, které se vyskytují přirozeně a patří k nim např. proteiny (aromatické aminokyseliny jako tyrosin, tryptofan, fenylalanin), vitamín A, NADH, NADPH a další. Druhou skupinou jsou vnější fluorofory, které se přidávají k látkám bez vlastní fluorescence. Tato skupina se dále dělí na fluorescenční sondy, které se na vzorek váží kovalentně a využívají se např. ke značení proteinů, a na fluorescenční značky, které se váží nekovalentně a často díky této vazbě mění své fluorescenční vlastnosti [22,23].

##### **2.4.1.1 1-Naftol**

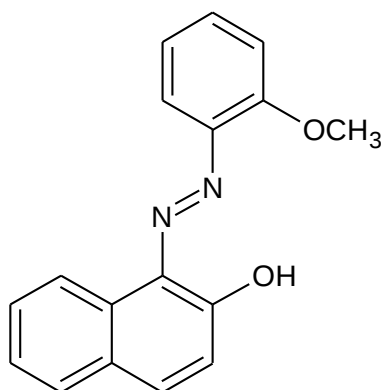
1-Naftol nebo  $\alpha$ -naftol, systematicky naftalen-1-ol, je fluorescenční organická sloučenina s absorpčním maximem při 292 nm. Jedná se o konstituční izomer 2-naftolu, liší se polohou hydroxylové skupiny na naftalenovém jádře. Je to bílá krystalická látka charakteristického zápachu rozpustná v alkoholech, etherech a chloroformu. Využívá se při výrobě barviv, pesticidů a v organické syntéze [24].



Obrázek 13: Struktura 1-Naftolu.

#### 2.4.1.2 Sudan Red G

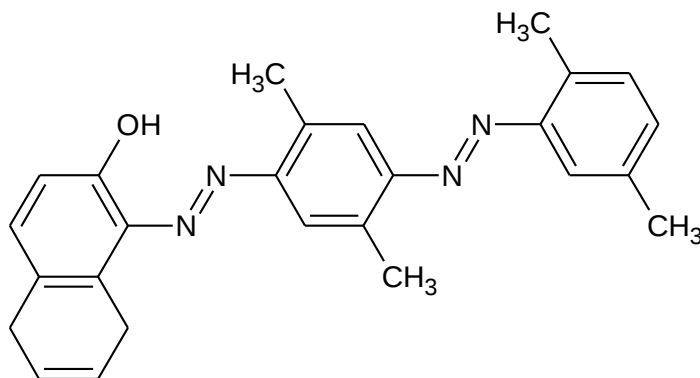
Sudan Red G neboli 1-(2-methoxyfenylazo)-2-naftol je syntetické azobarvivo oranžovo-červené barvy rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (tuky, oleje a vosky). Absorpčního maxima dosahuje kolem 500 nm. Používá se při histologickém značení lipidů, barvení vosků, olejů, plastů a laků. Dříve byl používán jako potravinářské barvivo, dnes je zakázaný kvůli možným genotoxickým a karcinogenním účinkům [25].



Obrázek 14: Struktura Sudanu Red G.

#### 2.4.1.3 Oil Red O

Oil Red O neboli 1-[2,5-dimethyl-4-(2,5-dimethylfenylazo)fenylazo]-2-naftol je lipofilní diazobarvivo červené barvy s absorpčním maximem při 518 nm. Používá se ke značení lipidových komponentů v biologických vzorcích např. při detekci otisků prstů na papíře [26].



Obrázek 15: Struktura Oil Red O.

## 2.5 UV-VIS Spektrofotometrie

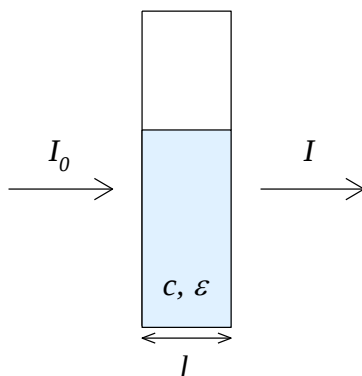
Ultrafialová a viditelná spektrofotometrie je optická spektrální metoda, při které dochází k výměně energie mezi zářením a látkou. Výsledkem měření je spektrum. Jedná se o závislost intenzity záření emitovaného nebo prošlého vzorkem (absorbance) na vlnové délce záření. UV-VIS spektrofotometrie patří mezi absorpční metody, při měření se sleduje absorpce (pohlcování) záření vzorkem, a využívá vlnových délek z různých oblastí spektra elektromagnetického záření [27].

Základním principem UV-VIS spektrofotometrie je absorpce ultrafialového a viditelného záření z rozmezí 200 až 800 nm molekulami zředěných roztoků (Obrázek 16). Dochází k interakci fotonů UV-VIS záření s vazebnými a nevazebnými elektrony molekul. Molekula je za normálních podmínek v základním stavu, její elektrony nejsou excitované a nachází se na základní vibrační hladině. Po interakci s fotonem elektrony přijímají energii, excitují se, přecházejí na excitovanou hladinu a celá molekula přechází na jednu z vibračních či rotačních hladin. Díky těmto přechodům na vibrační a rotační hladiny je molekula schopna absorbovat fotony jen málo lišící se energií, což vede ke vzniku absorpčních čar blízko sebe a jejich následnému splývání v pásy. Výsledkem měření je tedy tzv. pásové spektrum. Každý pás spektra charakterizuje jen jeden typ přechodu elektronů v molekule. Jednotlivé pásy se popisují pomocí vlnové délky jejich maxima ( $\lambda_{max}$ ), která určuje polohu pásu a souvisí s energií orbitalů, mezi kterými probíhá při excitaci přestup elektronu. Největší energetický rozdíl je mezi základní a excitovanou hladinou (až  $10^2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), menší mezi sousedními vibračními hladinami a nejmenší pak mezi hladinami rotačními (přibližně  $10^{-2} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) [27].

V UV-VIS spektrofotometrii se nejčastěji měří absorbance, která je definována jako záporný dekadický logaritmus transmitance. Transmitance udává propustnost měřené látky a je popsána jako poměr zářivého toku prošlého k dopadajícímu:

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0}, \quad (2)$$

kde  $A$  představuje absorbanci,  $T$  je transmitance,  $I$  je zářivý tok prošlý a  $I_0$  je zářivý tok dopadající [27].



Obrázek 16: Znáznornění absorpce při průchodu záření kyvetou se vzorkem.

Absorbanci popisuje i Lambert-Beerův zákon, kde je vyjádřena jako lineární závislost na koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy. Tento zákon platí pouze ve velmi zředěných roztocích (přibližně do  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ):

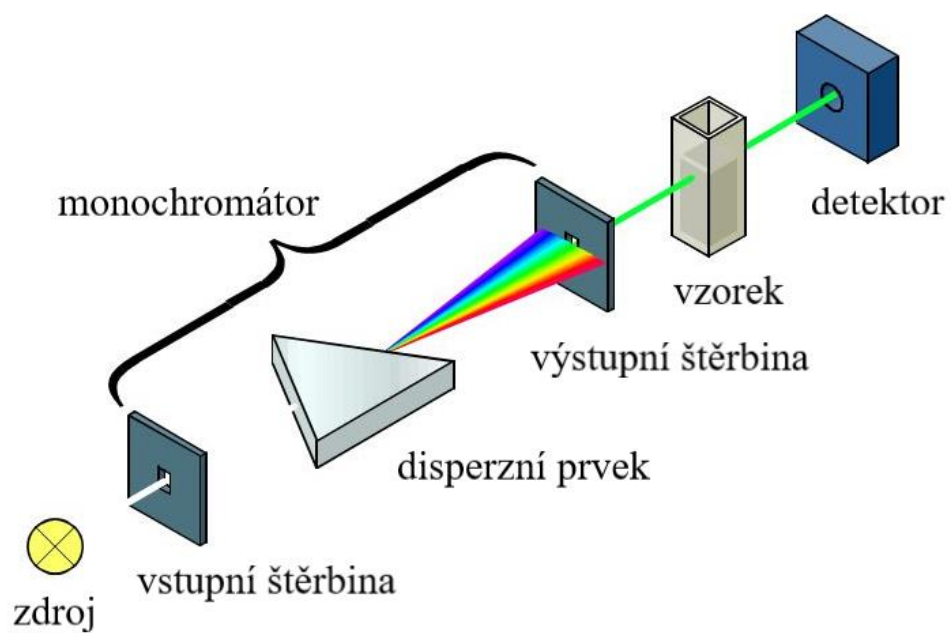
$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c, \quad (3)$$

kde  $A$  představuje absorbanci,  $\varepsilon$  je molární extinkční koeficient,  $l$  je délka optické dráhy (většinou šířka kyvety) a  $c$  je koncentrace absorbující látky. Molární extinkční koeficient je konstanta definovaná pro každou látku za daných podmínek při určité vlnové délce. Absorbance je aditivní veličina, při absorpci záření dané vlnové délky více složkami se celková absorbance rovná součtu absorbancí všech dílčích složek [27].

UV-VIS spektrofotometrie nachází využití především v kvantitativní analýze při stanovování koncentrace chromoforu ve vzorku. Obvykle se koncentrace určuje metodou kalibrační křivky. Nejdříve se sestaví kalibrační přímka proměřením absorbance řady vzorků známého analytu o známých koncentracích. Absorbance by se měla pohybovat v rozmezí od 0,1 do 1, kde by měření mělo být zatížené nejmenší chybou. Po proměření neznámého vzorku se dosadí naměřená hodnota absorbance do Lambert-Beerova zákona, ze kterého se poté určí koncentrace analytu ve vzorku [27].

### 2.5.1 Instrumentace

Obecné schéma UV-VIS spektrofotometru je znázorněno na Obrázku 17. Zdrojem záření se pro viditelnou oblast používá wolframová a halogenová žárovka nebo xenonová výbojka a pro ultrafialovou oblast deuteriová výbojka. Halogenová žárovka je wolframová žárovka s příměsí jodu, má až dvojnásobnou životnost, vyšší účinnost a její spektrum zasahuje až do UV oblasti. V současnosti se velmi používá xenonová výbojka vyzařující bílé světlo, protože má dobrou stabilitu i výkon a dlouhou životnost. Deuteriové výbojky jsou ideálním zdrojem pro UV oblast, emitují záření v rozsahu 160 až 380 nm. Vhodná vlnová délka se vybírá pomocí barevných či interferenčních filtrů nebo monochromátoru. Filtry vymezují poměrně široké pásmo vlnových délek (10 až 100 nm), dnes se častěji používá monochromátor, který rozděluje polychromatické záření a následně vybírá požadovanou vlnovou délku. Obvykle se monochromátor používá v uspořádání Czerny-Turner. Vybrané záření poté prochází kyvetou se vzorkem. Pro viditelnou oblast se používají kyvety skleněné, které propouští záření z rozmezí 350 až 2000 nm, a pro ultrafialovou oblast kyvety křemenné. Kyvety se mohou lišit materiálem, délkou nebo tvarem měrné cely (standartní, pro malý objem, mikrocela apod.), nejčastěji se však používají standartní kyvety s délkou 1 cm. Poslední součástí spektrofotometru je detektor, kterým se měří intenzita záření vzorkem prošlým nebo emitovaným. Detektorem může být např. fotonásobič, který vykazuje vysokou citlivost i při nízkých intenzitách světla. Dnes se nejčastěji používá diodové pole, což je řada diod, která snímá spektrum v celém rozsahu vlnových délek [27,28].



Obrázek 17: Schéma UV-VIS spektrofotometru [29].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Příprava kataniontových vezikulárních systémů

**Chih-Jung WU a kol.** připravovali kladně nabité kataniontové vezikulární systémy s cílem zvýšení jejich stability. Vezikuly CTA–DS s kladně nabitou dvouřetězcovou PAL byly připraveny smícháním roztoků tenzidů CTAB a SDS a přídavkem dialkyldimethylamonium bromidu (DXDAB). Byly použity DXDAB s délkou alkylových řetězců 14, 16 a 18 uhlíků (DTDAB, DHDAB a DODAB) a molárními poměry v rozmezí od 0,1 do 0,5. Stabilita vezikulárních systémů byla sledována měřením zeta potenciálu. Nejvyšší stabilitu vykazovaly vezikuly s molárním poměrem od 0,3 do 0,5. Vezikulární systémy s DXDAB v molárním poměru menším než 0,3 vykazovaly špatnou fyzikální stabilitu, od hodnoty 0,3 pak docházelo ke zvyšování stability vezikul s rostoucím molárním poměrem DXDAB. Hodnoty zeta potenciálu se ale s rostoucím molárním poměrem DXDAB významně neměnily, což nasvědčuje tomu, že elektrostatické působení není hlavním faktorem pro zlepšení stability vezikul. Vliv na stabilitu vezikul by však mohl mít přídavek DXDAB. Předpokládá se, že délka alkylových řetězců hraje roli při změně balení vezikul. U vezikul s přídavkem DTDAB by mohlo DTDAB vytlačit CTAB za vzniku DTDA-DS vezikul a došlo by k vyčnívání hlavových skupin, což by vedlo ke snížení chybného balení. Dále bylo zjištěno, že s rostoucí délkou alkylového řetězce DXDAB dochází ke zvyšování molekulárních interakcí ve dvojvrstvě vezikul, což inhibuje rozpouštění CTAB a zlepšuje se tak stabilita systémů. Na druhou stranu rozdíl v délce hydrofobního řetězce ve vezikulách CTA-DS s DODAB by mohl způsobit rozpad vezikul na dvojvrstvé fragmenty, což vedlo k nestabilitě při dlouhodobém skladování. Proto se jako nejvhodnější dvouřetězcový tenzid ukázal DHDAB, který má stejně dlouhé řetězce jako CTAB a dostatečně silné molekulární interakce [13].

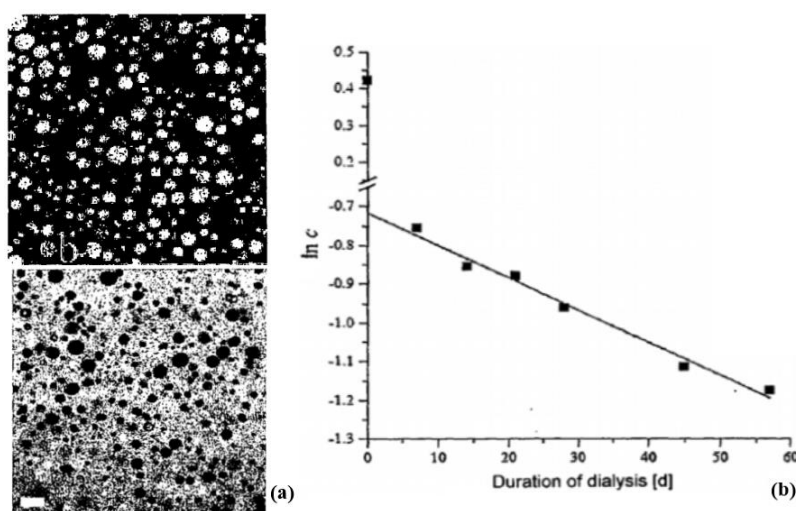
#### 3.2 Solubilizace v kataniontových vezikulárních systémech

**Carrière D. a kol.** studovali solubilizaci různých barviv do kataniontových vezikulárních systémů, které byly připraveny z různých surfaktantů. Solubilizace byla provedena pomocí dvou technik, kdy bylo barvivo přidáváno už během přípravy samotných vezikul nebo až k hotovému roztoku vezikul (spontánní solubilizace). Obecně byl postup přípravy rozdělen do tří fází. V první fázi bylo smícháno určité množství kationického a anionického surfaktantu (případně i barviva) v ultračisté vodě. Koncentrace obou surfaktantů byla zvolena na 1 %, molární zlomek anionického surfaktantu byl nejčastěji 0,6 nebo 0,66. Pokud bylo barvivo přidáváno během přípravy, jeho množství bylo vypočítáno tak, aby jeho výsledná koncentrace byla v rozmezí 30  $\mu$ M až 50 mM. Smícháním látek vznikla suspenze, která byla zahřívána při zvolené teplotě po určitou dobu. Po uplynutí této doby byla provedena dialýza roztoku pro odstranění solí z protiiontů původních surfaktantů, případně zbytků nerozpuštěného barviva. Následně bylo provedeno měření. Pokud nebylo barvivo přidáváno při přípravě, bylo přidáno k roztoku vezikul po dialýze. Po asi 10 minutách míchání byl roztok změřen stejně jako v prvním případě [30].

Použitými látkami byly například kyselina myristová (anionický surfaktant), cetyltrimethylamonium chlorid (CTAC, kationický surfaktant) a Rhodamin 6G (barvivo). Pro solubilizaci během přípravy bylo smícháno 33,8 mg kyseliny myristové, 25,1 mg CTAC a 5,76 g roztoku Rhodaminu 6G o koncentraci 4,5 mM. Suspenze byla míchána při 50 °C po

dobu 72 hodin. Ze vzniklého homogenního roztoku bylo odebráno 1,67 g, ke kterým bylo přidáno 5 g ultračisté vody. Tato směs byla míchána po dobu 30 sekund a poté byly asi 3 ml převedeny do dialyzační kazety s celulóзовou membránou a mezní hodnotou 3500 Da. Kazeta byla ponořena do dialyzační lázně (300 ml ultračisté vody), voda byla měněna po 2 a 5 hodinách, dále pak po 1, 2 a 7 dnech. Bez přerušení dialýzy bylo odebíráno asi 200  $\mu$ l roztoku po 7, 14, 21, 28 a 57 dnech dialýzy. U těchto vzorků byla měřena absorbance při 526 nm pomocí UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 1. Koncentrace Rhodaminu 6G byla vynesena do grafu v závislosti na času dialýzy (viz Obrázek 18). Poloměr vezikul byl stanoven konfokální mikroskopií na 2,5  $\mu$ m, propustnost membrány vezikul pro Rhodamin 6G byla odvozena na  $8,1 \cdot 10^{-12}$  cm/s. Účinnost solubilizace byla stanovena na 30 % [30].

Podobný postup přípravy byl použit i pro spontánní solubilizaci Rhodaminu 6G. Bylo smícháno 33,8 mg kyseliny myristové, 25,1 mg CTAC a 5,76 g ultračisté vody. Další postup byl shodný s předchozím případem pouze s rozdílem v trvání dialýzy. Ta byla ukončena již po 4 dnech. Poté bylo k 20  $\mu$ l roztoku vezikul přidáno 10  $\mu$ l roztoku Rhodaminu 6G o koncentraci 10  $\mu$ M. Měření bylo provedeno po 20 minutách míchání [30].



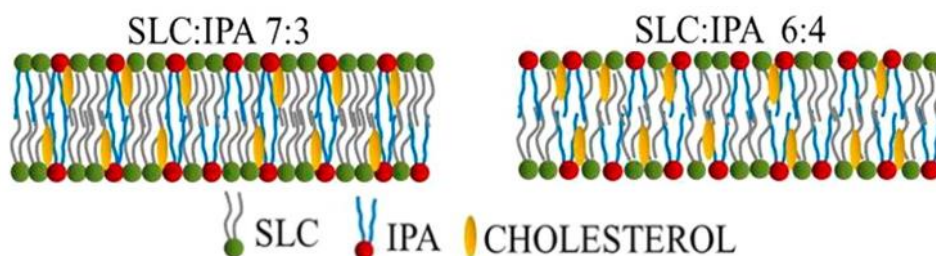
Obrázek 18: (a) Snímky z konfokálního mikroskopu – horní snímek zachycuje vezikuly připravované s Rhodaminem 6G, spodní snímek byl pořízen po 20 minutách spontánní solubilizace. (b) Znárodnění závislosti změny koncentrace Rhodaminu 6G ve vezikulách na čase dialýzy, stanoveno měřením absorbance při 526 nm [30].

**Guha P. a kol.** studovali IPA jako potenciální náhradu běžně se vyskytujícího fosfolipidu – sójového lecitinu (SLC). IPA byla připravena smícháním 0,1 M vodných roztoků hexadecyltrimethylammonium bromidu (CTAB) a dodecylsulfátu sodného (SDS) v ekvimolárních objemech. Vezikuly byly vytvořeny z těchto IPA a SLC v různých poměrech a s přidavkem cholesterolu (30 mol. %). Molární poměry SLC:IPA byly zvoleny 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 a 5:5. Byly zkoumány termodynamické parametry těchto systémů pomocí měření  $\pi$ -A izoterem, dynamického rozptylu světla (DLS), fluorescence a dalších. Z výsledků bylo zjištěno, že systémy obsahující 20 mol. % a 40 mol. % IPA vykazují neobvyklé chování. Jedním z měřených parametrů byla i účinnost zachycení barviva vezikulami. Použitým barvivem byla methylenová modř (MB). Stanovení účinnosti bylo provedeno dispergací vezikul v PBS (pH 7,4) se známým obsahem MB o koncentraci  $4 \cdot 10^{-4}$  M. Následně byly

provedeny tři cykly zmražení a rozmražení, aby koncentrace uvnitř i vně vezikul zůstala stejná. Připravené vzorky byly centrifugovány při 10000 rpm po dobu 2 hodin. Supernatant obsahující volné molekuly MB byl poté analyzován UV-VIS spektrofotometrem, byla zaznamenávána absorbance. Účinnost zachycení ( $EE$ ) byla vypočítána z rovnice:

$$EE(\%) = \frac{T-C}{T} \cdot 100, \quad (4)$$

kde  $T$  je celkové množství barviva přítomného v sedimentu i supernatantu a  $C$  je množství barviva v supernatantu. Hodnoty  $T$  a  $C$  byly určeny kolorimetricky [31].



Obrázek 19: Struktura systémů SLC:IPA s cholesterolem [31].

Bylo zjištěno, že účinnost zachycení závisí na koncentraci IPA. U všech poměrů SLC:IPA byly výsledky uspokojivé (viz Tabulka 1). Nejvyšší účinnost zachycení MB byla pozorována v systému čistého SLC, díky silným elektrostatickým interakcím. Postupné přidání IPA do systémů vedlo k lehkému snížení účinnosti zachycení, ale hodnoty jsou stále přijatelné. U systému s 40 mol. % IPA bylo pozorováno odlišné chování. Účinnost zachycení MB zde byla stanovena na 96,5 %, což bylo pravděpodobně způsobeno disociací IPA na kationt  $CTA^+$  a aniont  $DS^-$ . Přítomnost zwitterionické cholinové skupiny a kataniontového  $CTA^+$  mohla poskytnout nadměrné elektrostatické přitahování, což mohlo vést ke zvýšení hodnoty účinnosti zachycení [31].

Tabulka 1: Účinnost zachycení MB v různých systémech SLC:IPA při 25 °C [31].

| systém SLC:IPA | EE [%]      |
|----------------|-------------|
| 10:0           | 92,5 ± 1,41 |
| 9:1            | 90,0 ± 1,30 |
| 8:2            | 88,7 ± 0,45 |
| 7:3            | 79,2 ± 0,79 |
| 6:4            | 96,5 ± 0,87 |
| 5:5            | 53,9 ± 1,41 |

**Wang X. a kol.** studovali účinnost enkapsuace karboxyfluoresceinu (CF) v kataniontových vezikulárních systémech z cetyltrimethylamonium tosylátu (CTAT) a dodecylbenzosulfonátu sodného (SDBS) ve dvou různých složeních. První roztok byl připraven smícháním roztoků jednotlivých tenzidů v poměru 7:3 (CTAT:SDBS) o celkové koncentraci 1 hm. %. Druhý roztok byl připraven s nadbytkem SDBS také v poměru 7:3 (SDBS:CTAT) a o celkové koncentraci 1 hm. %. Roztoky samotných tenzidů byly připraveny rozpuštěním předem

naváženého množství tenzidu ve vodě a následným mícháním. Pro enkapsulaci barviva byly vezikuly připraveny za použití 1 mM vodného roztoku CF. Vzniklý roztok vezikul s CF byl míchán 15–30 minut a poté byl ponechán ve tmě po dobu alespoň 48 hodin. Tvorba vezikul byla zkontrolována pomocí DLS. Pro oddělení volného barviva od vezikul obsahujících CF byla použita vylučovací chromatografie (SEC). Při dosažení enkapsulace byly na sloupci gelu viditelné pouhým okem nebo pod UV lampou dvě pásma. První pás obsahoval vezikuly s CF, druhý pouze CF. Bylo zjištěno, že tvorba vezikul s nadbytkem CTAT je inhibována při koncentracích CF 5 mM a vyšších. Vezikuly s nadbytkem SDBS mohly být připraveny i s vyššími koncentracemi (až 100 mM), ale enkapsulace byla výrazně nižší než u vezikul s nadbytkem CTAT, v mnoha případech nebylo dosaženo enkapsulace vůbec (nebyly odlišeny pásy při SEC). Metodou DLS bylo zjištěno, že vzorky měly před SEC průměrný hydrodynamický průměr  $76 \pm 5$  nm a po eluci  $90 \pm 5$  nm. Účinnost enkapsulace byla stanovena pomocí UV-VIS spektrofotometrie jako množství enkapsulovaného barviva k celkovému počátečnímu množství. Výsledná hodnota udává procenta barviva enkapsulované do vezikul během přípravy. Enkapsulace barviva probíhá pomocí dvou mechanismů – zařazením do vnitřního prostoru vezikuly a elektrostatickou adsorpcí na nabitou dvojvrstvu. Výsledná účinnost enkapsulace byla u vezikul s nadbytkem CTAT  $21 \pm 2$  % (hodnota zahrnuje enkapsulovanou i adsorbovanou složku). Pro srovnání bylo provedeno obdobné měření v systémech fosfolipidových vezikul připravených z fosfatidylcholinu (EYPC) z vaječného žloutku. Účinnost enkapsulace těchto systémů byla stanovena na  $1,6 \pm 0,2$  %. Z výsledků vyplývá, že kataniontové vezikuly jsou schopné enkapsulovat více CF a zadržet ho po delší dobu než fosfolipidové vezikuly [32].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

#### *Hexadecyltrimethylamonium bromid*

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

#### *Dimethyldi-*n*-octadecylamonium chlorid*

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

#### *Dodecylsulfát sodný*

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

#### *Cholesterol*

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

#### *1-Naftol*

$M_w = 144,17$  g/mol, CAS: 90-15-3, Sigma Aldrich

#### *Sudan Red G*

$M_w = 278,31$  g/mol, CAS: 1229-55-6, Fluka

#### *Oil Red O*

$M_w = 408,49$  g/mol, CAS: 1320-06-5, Sigma Aldrich

#### *Chloroform*

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

#### *Aceton*

CAS: 67-64-1, Lach-Ner s.r.o.

#### *Isopropanol*

CAS: 67-63-0, Lach-Ner s.r.o.

#### *Deionizovaná voda*

system ELGA

### 4.2 Shrnutí cílů práce

Tato bakalářská práce vznikla ve spolupráci Fakulty chemické VUT pod vedením doc. Mravce s prof. Changem z National Cheng Kung University, Taiwan na grantu č. MOST108-2913-E006-MY3, který se zabývá studiem kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů (cIPA). Cílem práce bylo stanovit solubilizační kapacitu systémů

cIPA + cholesterol. Jako vhodné látky pro solubilizaci byly zvoleny hydrofobní barviva 1-Naftol, Sudan Red G a Oil Red O. Stanovení solubilizační kapacity bylo provedeno pomocí dvou metod. První metodou byla spontánní solubilizace barviva v již v hotovém systému a druhou byla přímá solubilizace barviva během přípravy vezikul. Pro měření byla použita UV-VIS spektrofotometrie. Závěrem této práce je porovnání dvou zvolených metod solubilizace a určení solubilizační kapacity kataniontových vezikulárních systémů.

### **4.3 Použité metody**

#### **4.3.1 Příprava IPA**

Byly připraveny 20mM zásobní roztoky tenzidů rozpuštěním 3,667 g CTAB v 500 ml deionizované vody a 2,894 g SDS v 500 ml deionizované vody. Oba roztoky byly ponechány 24 hodin míchat. Následně byly smíchány v poměru 1:1 a výsledný roztok byl ponechán míchat dalších 24 hodin při teplotě 30 °C. Vzniklá sraženina byla z roztoku oddělena centrifugací při 3500 ot/min po dobu 10 min, následně byla zfiltrována a promyta deionizovanou vodou. Filtrační koláč, kterým byl zásobní prášek IPA, byl sušen v sušárně po dobu 3 dnů při 50 °C. Výsledný prášek byl uskladněn v suché vialce.

#### **4.3.2 Příprava systémů cIPA + cholesterol**

Pro přípravu kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů byl připraven roztok IPA a DODAC v chloroformu v poměru 9:1. Nejdříve byl připraven zásobní roztok IPA rozpuštěním potřebného množství prášku IPA v 5 ml chloroformu. Stejně byl připraven i zásobní roztok DODAC. Z těchto roztoků byl pipetován vypočítaný objem, aby byl dodržen poměr 9:1. Tento objem byl pipetován k předem naváženému množství cholesterolu. Obsah cholesterolu byl ve všech vzorcích 43 mol. %. Vzniklý chloroformový roztok byl zvortexován, byly k němu přidány skleněné kuličky a opět zvortexován. Chloroformová fáze byla odpařována po 24 hodin. Po odpaření chloroformu byl vzniklý film na kuličkách rehydratován 60 ml deionizované vody, roztok byl zvortexován a sonifikován tyčovým dispergátorem Bandelin SONOPULS HD 3200 se sondou VS 70T při amplitudě 50 % do energie 25 kJ.

#### **4.3.3 Příprava kalibrační řady**

Byly připraveny zásobní roztoky 1-Naftolu, Sudanu Red G a Oil Red O v acetonu. Zásobní roztok 1-Naftolu byl připraven rozpuštěním 0,036 g látky v 50 ml acetonu. Výsledná koncentrace roztoku byla  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zásobní roztoky Sudanu Red G a Oil Red O byly připraveny obdobným způsobem. Koncentrace zásobního roztoku Sudanu Red G byla  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a roztoku Oil Red O  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Roztoky byly po celou dobu skladovány v lednici.

Kalibrační řady jednotlivých barviv v roztoku cIPA + cholesterol byly tvořeny pěti koncentracemi. Ze zásobního roztoku 1-Naftolu byl do suchých vialek pipetován potřebný objem tak, aby výsledné koncentrace byly  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$  a  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Po odpaření acetonu v digestoři byly do každé vialky přidány 2 ml isopropanolu (i-PrOH) a následně 2 ml roztoku cIPA + cholesterol. Takto připravené roztoky byly ponechány na třepačce po dobu 24 hodin. Kalibrační řady Sudanu Red G a Oil Red O byly připraveny

stejně, výsledné koncentrace byly  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$  a  $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>. U všech vzorků byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru. Každá koncentrace byla připravena třikrát pro stanovení minimální odchylky.

#### 4.3.4 Příprava vzorků pro solubilizaci

Pro stanovení solubilizační kapacity kataniontových vezikulárních systémů byly zvoleny dva přístupy. První metodou byla spontánní solubilizace barviv v již hotovém systému cIPA + cholesterol. Solubilizace byla stanovována při teplotách 25 °C a 50 °C po 1, 2, 3 a 7 dnech od přípravy vzorku. Do suchých vialek byly naváženy 2 mg 1-Naftolu. Byl připraven zásobní roztok systému cIPA + cholesterol (viz 4.3.2), ze kterého byl následně do každé vialky pipetován objem 3 ml. Takto připravené vzorky byly umístěny na míchačku do sušárny nastavené na 25 °C, kde byly ponechány po danou dobu 1, 2, 3 nebo 7 dní. Po uplynutí zvolené doby byly vzorky vytáhnuty a zcentrifugovány při 3 900 ot/min po dobu 15 minut. Do čisté vialky byly odebrány 2 ml supernatantu, ke kterým byly přidány 2 ml isopropanolu. Následně byla u vzorků proměřena absorbance. Stejně byly připraveny i vzorky pro teplotu 50 °C a pro Sudan Red G a Oil Red O. Všechny vzorky byly připraveny třikrát.

Druhou metodou byla přímá solubilizace barviva v průběhu přípravy systému cIPA + chol. Solubilizace byla stanovována pouze při laboratorní teplotě opět po 1, 2, 3 a 7 dnech od přípravy roztoků. Roztok cIPA + cholesterol byl připravován podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.2 s tím rozdílem, že k navážce cholesterolu bylo přidáno ještě 40 mg 1-Naftolu. Po odpaření chloroformu opět následovala rehydratace, vortexace a sonifikace vzniklého roztoku. Po sonifikaci byl roztok ihned zcentrifugován při 3 900 ot/min po dobu 15 minut pro odstranění nerozpuštěného barviva. Z takto připraveného roztoku byly po 1, 2, 3 a 7 dnech odebírány 2 ml do suchých vialek, ke kterým byly přidány 2 ml i-PrOH. Stejným způsobem byly připraveny i vzorky pro Sudan Red G a Oil Red O. Všechny vzorky byly připraveny třikrát a poté byla změřena jejich absorbance.

#### 4.4 UV-VIS Spektrofotometrie

Měření bylo prováděno na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary50 Probe. Jedná se o spektrofotometr s jednopaprskovým uspořádáním. Zdrojem záření je xenonová pulzní lampa, ze které světlo prochází přes monochromátor Czerny-Turner, kyvetu se vzorkem a dopadá na detektor, kterým jsou dvě křemíkové diody.

U všech vzorků byla měřena absorbance v rozsahu vlnových délek 250–700 nm. Pro měření byla použita křemenná kyveta o délce 1 cm. Absorbance byla měřena po posledním odběru vzorku, tedy po 7 dnech od přípravy. Před a po měření byly vzorky vždy uzavřeny a víčka obaleny parafilmem.

Pro zobrazení naměřených dat byl použit software CaryWinUV, ze kterého byla data exportována do programu Excel, ve kterém byla následně zpracována. Z naměřených hodnot absorbance byla pro každé barvivo vybrána nejvyšší hodnota v blízkosti jeho absorpčního maxima. Pro 1-Naftol to bylo při vlnové délce 295 nm, pro Sudan Red G při 510 nm a pro Oil Red O při 525 nm. U některých vzorků byla absorbance při dané vlnové délce příliš vysoká,

tyto vzorky byly zředěny a změřeny znovu. Koncentrace solubilizované látky (barviv) byla zjištěna z rovnice linregrese kalibrační křivky:

$$y = a \cdot x + b \Rightarrow A = a \cdot c + b \quad (4)$$

$$c = \frac{A-b}{a}, \quad (5)$$

kde  $A$  je změřená absorbance,  $a$  a  $b$  jsou koeficienty rovnice linregrese a  $c$  je koncentrace barviva. Z vypočtených koncentrací byl spočítán průměr a byla zjištěna jejich směrodatná odchylka.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Příprava IPA

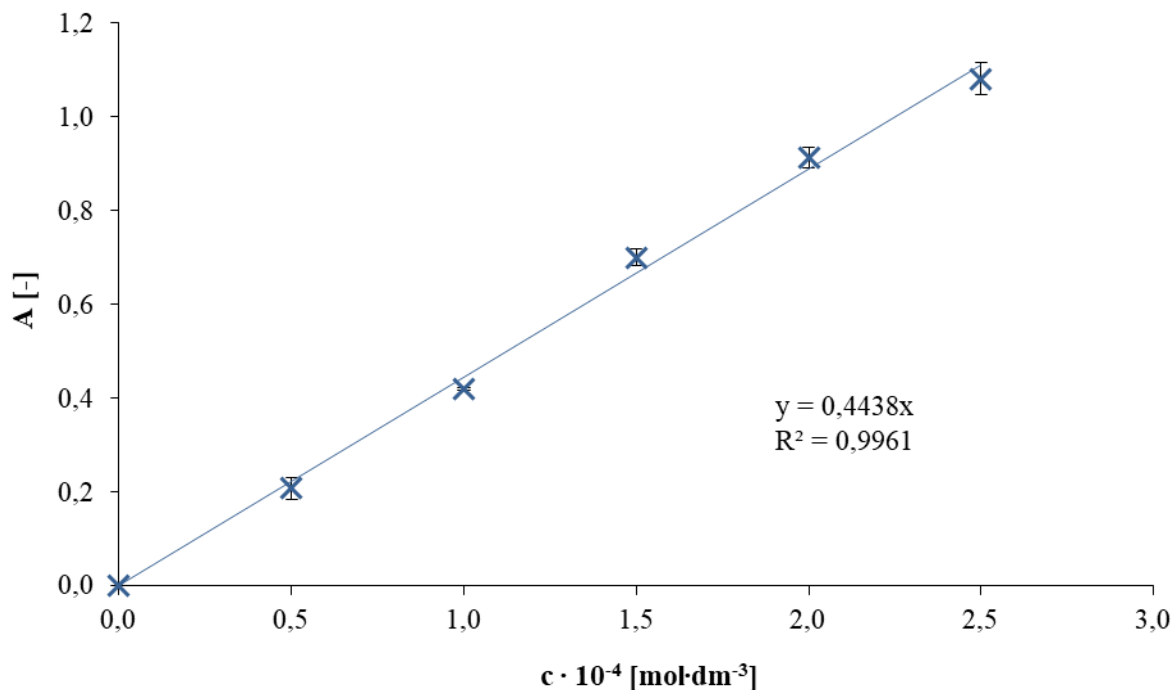
Roztoky CTAB a SDS byly po 24 hodinách na míchačce čiré. Jejich smícháním se vytvořil nejdříve bílý zákal a následně bílá sraženina. Ta byla odstředěna, zfiltrována, promyta a usušena. Výtěžek IPA byl 2,087 g.

### 5.2 Příprava cIPA + cholesterol

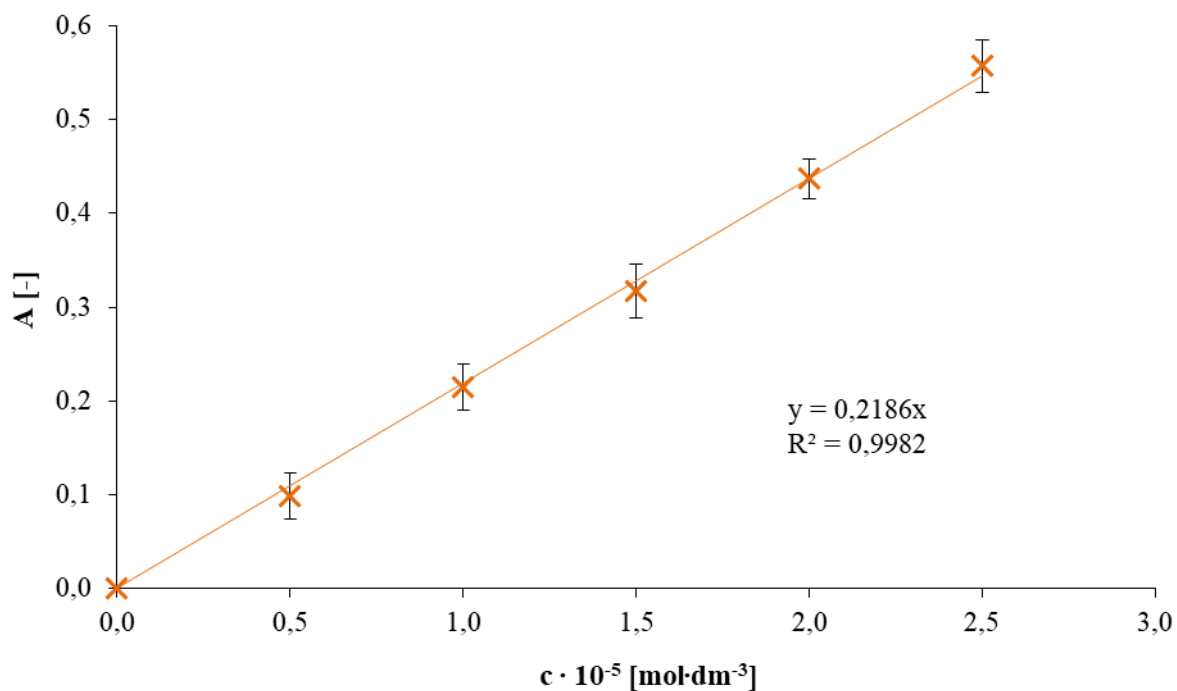
Po rehydrataci tenkého filmu na kuličkách byl roztok zakalený. Sonifikací roztoku došlo k téměř úplnému odkalení, kdy vzorky zůstaly mírně opalescentní. Pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) se ověřovala průměrná velikost vezikul. Velikost se vždy pohybovala v rozmezí 100 až 110 nm.

### 5.3 Kalibrační křivky

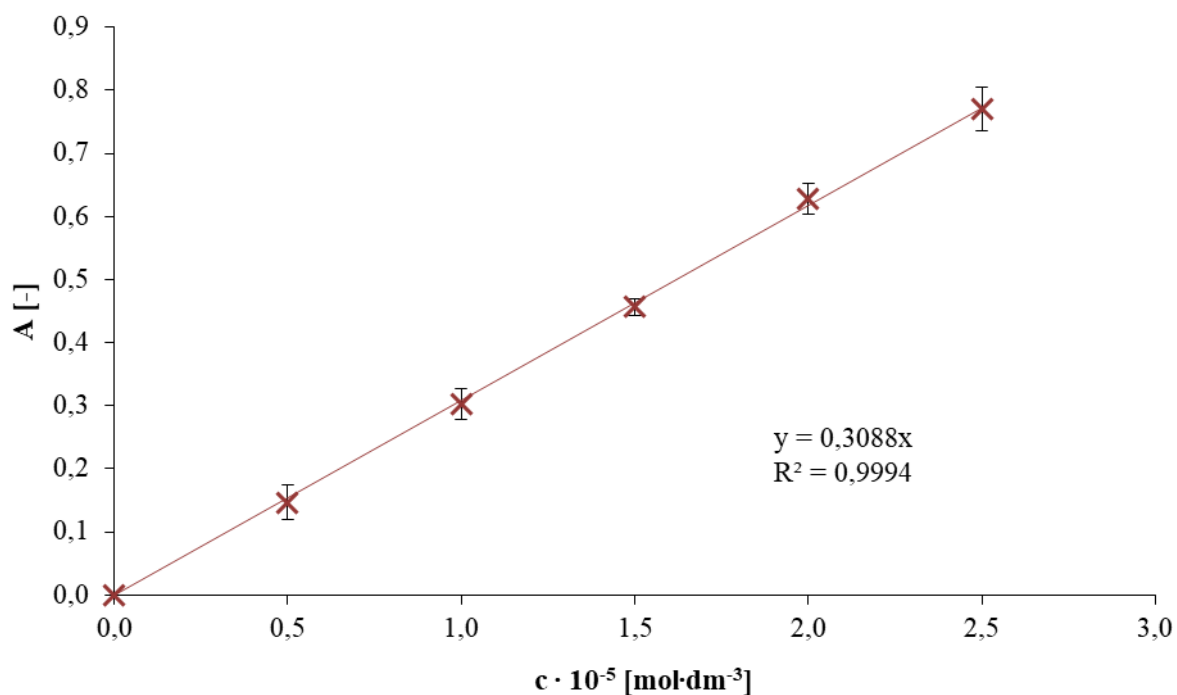
Ke stanovení solubilizační kapacity bylo potřeba sestavit kalibrační křivky 1-Naftolu, Sudanu Red G a Oil Red O v systému cIPA + cholesterol + i-PrOH. Křivky byly sestaveny měřením absorbance pěti roztoků o známých koncentracích. Z naměřených hodnot absorbancí byly vybrány nejvyšší hodnoty v blízkosti absorpčního maxima jednotlivých barviv – pro 1-Naftol při vlnové délce 295 nm, pro Sudan Red G při 510 nm a pro Oil Red O při 525 nm. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a byla vypočítána minimální odchylka. Kalibrační křivky byly vytvořeny v programu Excel jako závislosti naměřené absorbance na koncentraci. Jednotlivé kalibrační křivky jsou znázorněny na Obrázku 20 (1-Naftol), Obrázku 21 (Sudan Red G) a Obrázku 22 (Oil Red O).



Obrázek 20: Kalibrační přímka 1-Naftolu v systému cIPA + cholesterol + i-PrOH.



Obrázek 21: Kalibrační přímka Sudanu Red G v systému cIPA + cholesterol + i-PrOH.



Obrázek 22: Kalibrační přímka Oil Red O v systému cIPA + cholesterol + i-PrOH.

Vzorky kalibračních řad byly měřeny v systému s i-PrOH, jelikož u roztoků barviva v cIPA + chol. byl pozorován zákal, který způsoboval rozptyl procházejícího záření. Hodnoty absorbance v zakaleném roztoku byly naměřeny buď velice nízké, nebo vyšší než 1. Přidáním isopropanolu byla zrušena struktura vezikulárních systémů, čímž došlo k odkalení roztoku, uvolnění solubilizovaného barviva z vezikul a k naměření relevantnějších hodnot absorbance.

## 5.4 Solubilizační kapacita cIPA + cholesterol

Vzorky k solubilizaci byly připraveny pomocí dvou metod, které byly popsány v kapitole 4.3.4. Těmito metodami byly spontánní a přímá solubilizace.

### 5.4.1 Spontánní solubilizace

Vzorky připravené touto metodou musely být po solubilizaci zcentrifugovány, aby se oddělily zbytky nerozpuštěného barviva od roztoku vezikul. Během solubilizace navíc docházelo k přichytávání barviv (především Sudanu Red G a Oil Red O) na stěny vialky a následně k jeho odlupování ve větších kusech. Po centrifugaci a přidavku i-PrOH byla měřena absorbance vzorků. Všechny vzorky s 1-Naftolem bylo nutné 20krát zředit, protože hodnoty absorbance nezředěného roztoku byly mnohem vyšší než 1. Obdobně se musely zředit i některé vzorky Sudanu Red G a Oil Red O, ale u těchto vzorků bylo ředění pouze 2krát nebo 4krát.

Solubilizační kapacita systému cIPA + cholesterol byla stanovována při 25 °C a 50 °C po 1, 2, 3 a 7 dnech od přípravy vzorků. Koncentrace solubilizovaného barviva byla zjištěna výpočtem z kalibračních křivek 1-Naftolu, Sudanu Red G a Oil Red O uvedených v kapitole 5.3. Jak je uvedeno v kapitole 4.4, koncentrace byla vyjádřena z rovnice lineární regrese kalibrační přímky jako člen  $x$  a za  $y$  byla dosazena naměřená hodnota absorbance. Solubilizační kapacita byla porovnávána podle teploty. Hodnoty solubilizační kapacity ve vezikulárních systémech cIPA + cholesterol jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Solubilizační kapacita vezikulárních systémů cIPA + cholesterol při teplotě 25 °C ( $c_{25}$ ) a 50 °C ( $c_{50}$ ). Solubilizovanými látkami byl 1-Naftol, Sudan Red G a Oil Red O. Měření bylo prováděno po 1, 2, 3 a 7 dnech.

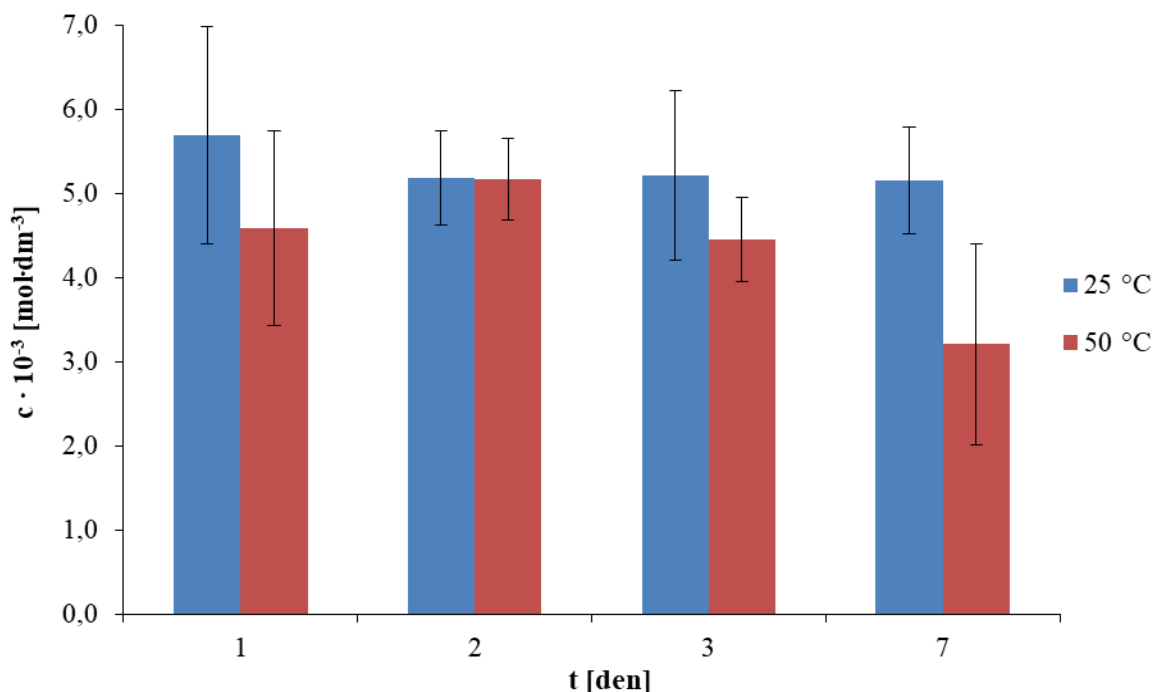
| t [den] | 1-Naftol          |                   | Sudan Red G       |                   | Oil Red O         |                   |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|         | $c_{25}$ [mmol/l] | $c_{50}$ [mmol/l] | $c_{25}$ [mmol/l] | $c_{50}$ [mmol/l] | $c_{25}$ [mmol/l] | $c_{50}$ [mmol/l] |
| 1       | 5,689             | 4,580             | 0,021             | 0,022             | 0,027             | 0,056             |
| 2       | 5,177             | 5,167             | 0,039             | 0,035             | 0,049             | 0,057             |
| 3       | 5,211             | 4,450             | 0,078             | 0,055             | 0,053             | 0,089             |
| 7       | 5,147             | 3,203             | 0,126             | 0,051             | 0,068             | 0,091             |

Na Obrázku 23, Obrázku 24 a Obrázku 25 jsou zobrazeny závislosti koncentrace nasolubilizovaných barviv ve vezikulárních systémech na čase. Z grafů jsou mezi jednotlivými barvivy patrné rozdíly v koncentracích, což je způsobeno různou velikostí jejich molekul. 1-Naftol je poměrně malá sloučenina a velmi dobře se solubilizuje (Obrázek 23). To se projevilo i na výsledných hodnotách koncentrací, které v některých případech vycházely vyšší než koncentrace barviva, která byla do systému přidána (4,624 mM). Vzhledem k velikosti odchylek je pravděpodobné, že došlo k nasolubilizování veškerého barviva do systémů vezikul. Procentuální vyjádření koncentrace a odchylek je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Koncentrace a odchylky nasolubilizovaného 1-Naftolu vyjádřené v procentech.

| t [den] | t = 25 °C |                | t = 50 °C |                |
|---------|-----------|----------------|-----------|----------------|
|         | c [%]     | $\Delta c$ [%] | c [%]     | $\Delta c$ [%] |
| 1       | 123,04    | 28,05          | 99,05     | 24,94          |
| 2       | 111,96    | 12,14          | 111,73    | 10,53          |
| 3       | 112,68    | 21,69          | 96,22     | 10,73          |
| 7       | 111,32    | 13,79          | 69,27     | 25,78          |

Při nižší teplotě byla koncentrace nasolubilizovaného 1-Naftolu lehce vyšší první den a následně se pohybovala kolem 5,2 mM. S přihlédnutím k velikosti odchylek ale může být hodnota koncentrace prvního dne obdobná jako u zbylých dnů. Při 50 °C solubilizace barviva od druhého dne klesá, opět si lze všimnout vyšších odchylek u prvního a posledního dne solubilizace, které pravděpodobně zkreslují skutečnou hodnotu koncentrace.

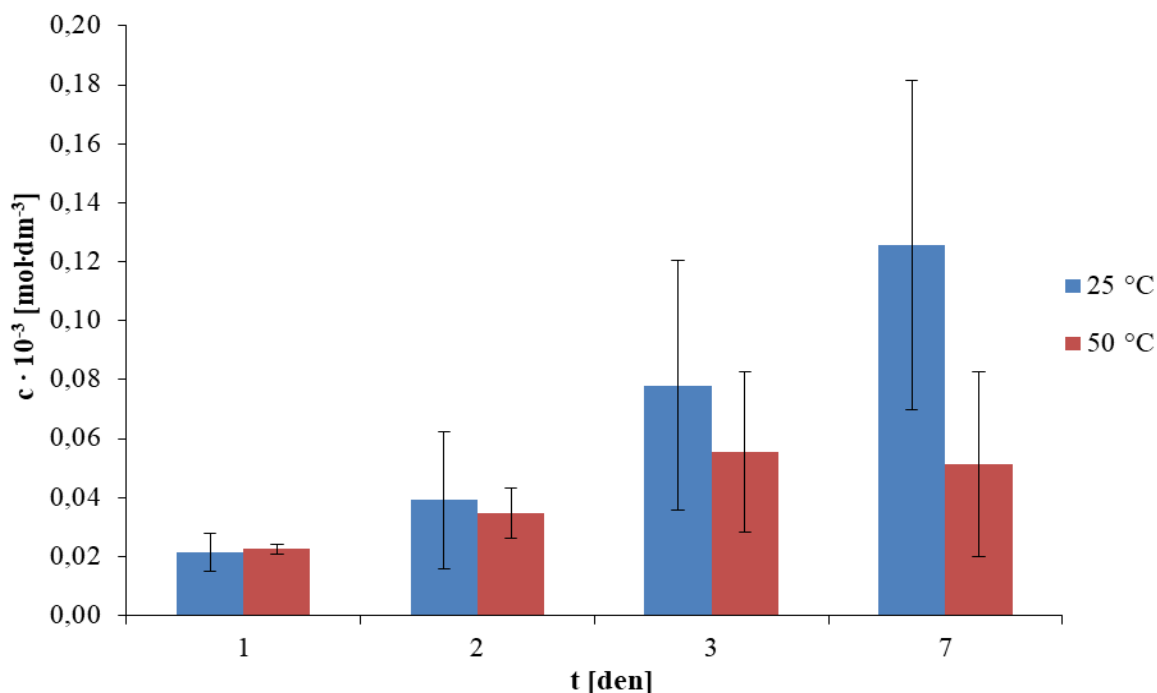


Obrázek 23: Množství nasolubilizovaného 1-Naftolu v systému cIPA + chol. v závislosti na čase.

Obrázek 24 znázorňuje solubilizaci Sudanu Red G. Na první pohled je patrné, že dochází k solubilizaci menšího množství barviva než v předchozím případě, jelikož Sudan Red G má větší molekulu než 1-Naftol. Právě díky větší molekule barviva a složitosti systémů cIPA + cholesterol je potřeba i delší čas na solubilizaci. Při nižší teplotě koncentrace solubilizovaného barviva roste s časem poměrně rychle. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo až po týdně solubilizace, avšak tato hodnota představuje pouze 5,23 % z původní koncentrace barviva (2,4 mM) přidané do systému vezikul. U zvýšené teploty také dochází k nárůstu koncentrace, ale podstatně menšímu než při 25 °C. Procentuální vyjádření koncentrací a odchylek je uvedeno v Tabulce 4. U nižší teploty jsou opět problémem velké odchylky, které jsou pravděpodobně způsobené přichytáváním barviva ke stěnám vialky v průběhu solubilizace.

Tabulka 4: Koncentrace a odchylky nasolubilizovaného Sudanu Red G vyjádřené v procentech.

| t [den] | t = 25 °C |                | t = 50 °C |                |
|---------|-----------|----------------|-----------|----------------|
|         | c [%]     | $\Delta c$ [%] | c [%]     | $\Delta c$ [%] |
| 1       | 0,89      | 0,27           | 0,93      | 0,07           |
| 2       | 1,63      | 0,97           | 1,44      | 0,35           |
| 3       | 3,25      | 1,77           | 2,31      | 1,14           |
| 7       | 5,23      | 2,33           | 2,14      | 1,31           |

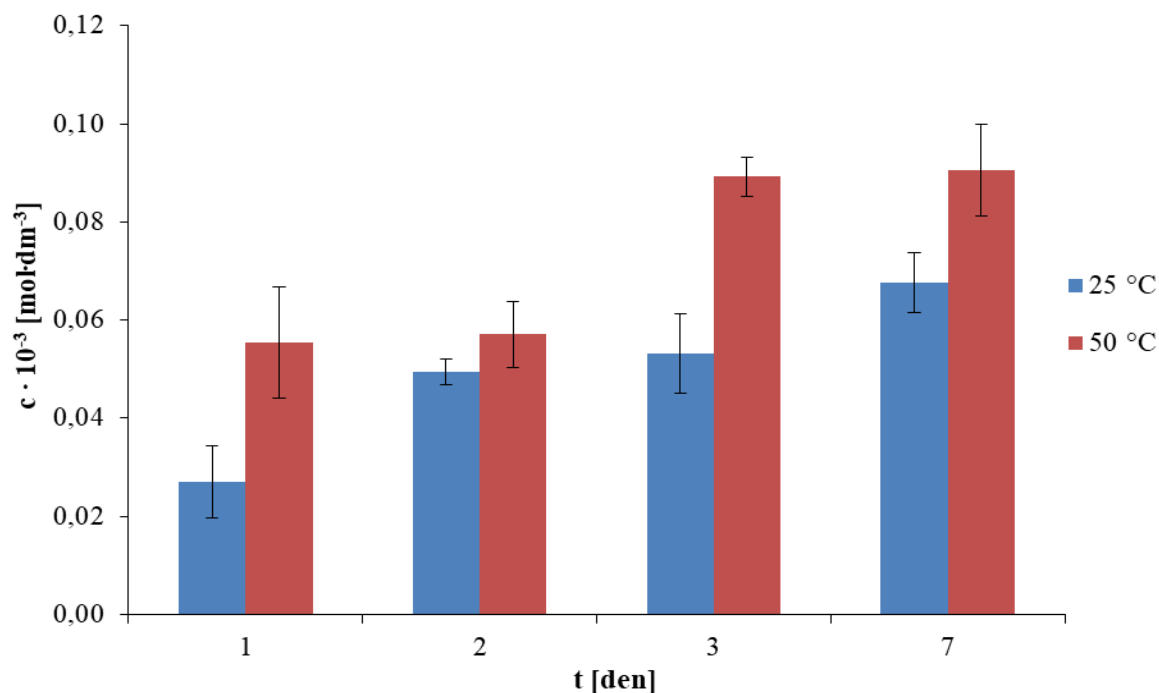


Obrázek 24: Množství nasolubilizovaného Sudanu Red G v systému cIPA + chol. v závislosti na čase.

Na Obrázku 25 je zobrazena solubilizace Oil Red O. Ze všech použitých barviv je to největší molekula, což se projevuje na koncentraci nasolubilizovaného barviva. Z grafu si lze všimnout nárůstu koncentrace v průběhu experimentu, a to při obou teplotách. Při 25 °C byl nárůst koncentrací pozvolný, naopak u zvýšené teploty je patrný jasný skok v množství nasolubilizovaného barviva mezi druhým a třetím dnem. Při 25 °C bylo dosaženo celkově nižších koncentrací, z čehož vyplývá, že solubilizace Oil Red O je na rozdíl od ostatních barviv podpořena zvýšením teploty. Nejvíce barviva bylo nasolubilizováno opět poslední den od přípravy vzorků. Tato hodnota koncentrace odpovídá asi 5,66 % původní koncentrace barviva (1,6 mM). Procentuální vyjádření všech koncentrací je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5: Koncentrace a odchylky nasolubilizované Oil Red O vyjádřené v procentech.

| t [den] | t = 25 °C |                | t = 50 °C |                |
|---------|-----------|----------------|-----------|----------------|
|         | c [%]     | $\Delta c$ [%] | c [%]     | $\Delta c$ [%] |
| 1       | 1,69      | 0,46           | 3,47      | 0,71           |
| 2       | 3,09      | 0,17           | 3,57      | 0,42           |
| 3       | 3,32      | 0,50           | 5,58      | 0,25           |
| 7       | 4,23      | 0,38           | 5,66      | 0,59           |



Obrázek 25: Množství nasolubilizované Oil Red O v systému cIPA + chol. v závislosti na čase.

#### 5.4.2 Přímá solubilizace

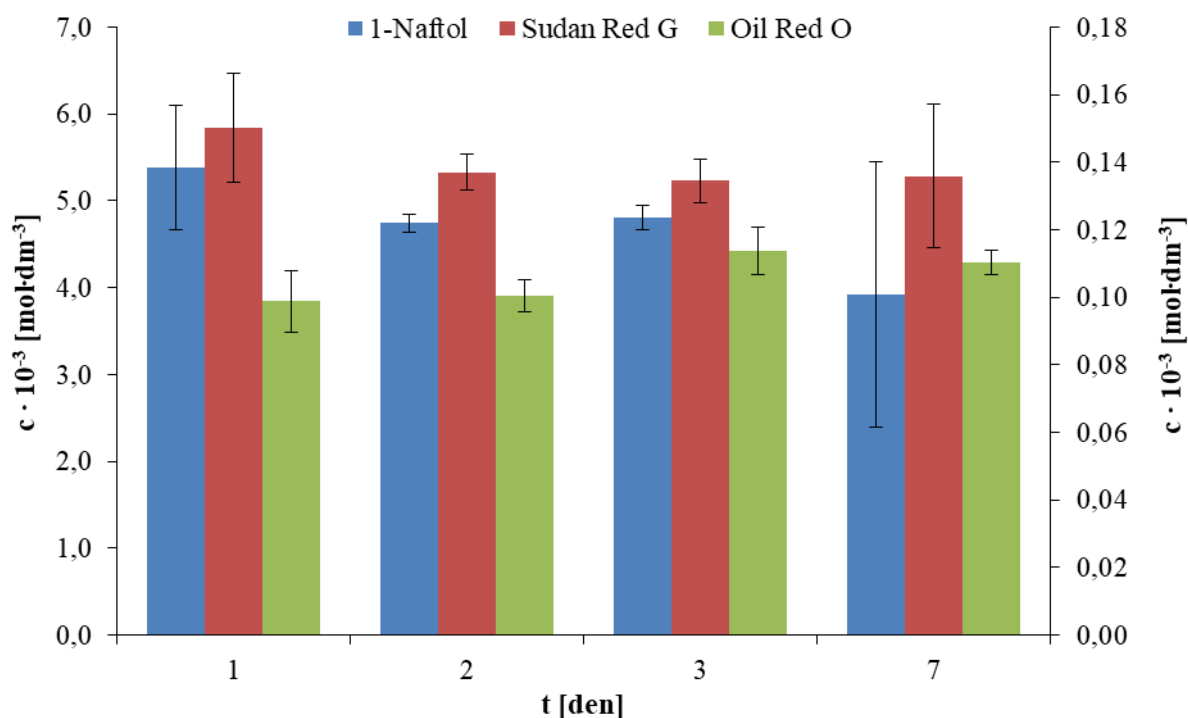
Solubilizační kapacita systému cIPA + cholesterol byla touto metodou stanovována pouze při laboratorní teplotě, jelikož při sonifikaci roztoku během přípravy dochází ke značnému zahřívání a teplotu není možné snadno regulovat. Vzorky byly měřeny po 1, 2, 3 a 7 dnech od přípravy roztoků. Všechny vzorky 1-Naftolu bylo opět nutné ředit 20krát, vzorky Sudanu Red G a Oil Red O byly ředěny 2krát. Koncentrace solubilizovaného barviva byla zjištěna jako u spontánní solubilizace výpočtem z kalibračních křivek 1-Naftolu, Sudanu Red G a Oil Red O uvedených v kapitole 5.3. Výsledné hodnoty solubilizační kapacity jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Solubilizační kapacita vezikulárních systémů cIPA + cholesterol stanovená přímou solubilizací barviv. Solubilizovanými látkami byl 1-Naftol, Sudan Red G a Oil Red O. Měření bylo prováděno po 1, 2, 3 a 7 dnech.

| t [den] | c [mmol/l] |             |           |
|---------|------------|-------------|-----------|
|         | 1-Naftol   | Sudan Red G | Oil Red O |
| 1       | 5,379      | 0,150       | 0,099     |
| 2       | 4,747      | 0,137       | 0,100     |
| 3       | 4,806      | 0,134       | 0,114     |
| 7       | 3,920      | 0,136       | 0,110     |

Obrázek 26 znázorňuje množství nasolubilizovaných barviv v jednotlivých dnech. U 1-Naftolu (hlavní osa) jsou hodnoty koncentrací obdobné jako hodnoty získané spontánní solubilizací. Pravděpodobně bylo opět dosaženo solubilizace veškerého barviva, jelikož hodnoty z prvních tří dnů jsou lehce vyšší než koncentrace, která byla k systému přidána. U 1-Naftolu i Sudanu Red G je patrný mírný pokles množství nasolubilizované látky v čase.

Sudan Red G (vedlejší osa) se touto metodou ovšem solubilizoval podstatně lépe než při spontánní solubilizaci. Látka byla nasolubilizována již první den ve srovnatelném množství jako v poslední den spontánní solubilizace, navíc i s menší odchylkou. V průběhu celého měření se hodnoty pohybovaly kolem 6 % původního množství přidaného barviva. U Oil Red O (vedlejší osa) také došlo k solubilizaci většího množství než u spontánní solubilizace. Průměrně se hodnota pohybovala kolem 6,6 % původní koncentrace barviva přidané do systému vezikul. Proti spontánní solubilizaci došlo podobně jako u Sudanu Red G k solubilizaci většího množství barviva již první den, poté se hodnota výrazně neměnila.



Obrázek 26: Množství nasolubilizovaných barviv v systému cIPA + cholesterol v závislosti na čase. Z důvodu nízkých hodnot byly Sudan Red G a Oil Red O znázorněny na vedlejší ose.

Pro jednodušší srovnání hodnot solubilizační kapacity systémů cIPA + cholesterol získaných spontánní a přímou solubilizací byly všechny naměřené hodnoty uvedeny do Tabulky 7. Pouze u 1-Naftolu je nasolubilizované množství srovnatelné v obou metodách. Mírně vyšší hodnoty byly sice dosaženy spontánní solubilizací, ale také zde byly získány vyšší odchylky. Na rozdíl od 1-Naftolu se zbylá barviva solubilizovala podstatně lépe přímou solubilizací. Sudan Red G i Oil Red O byly tímto způsobem nasolubilizovány už první den ve vyšším množství než poslední den spontánní solubilizace.

Tabulka 7: Hodnoty solubilizační kapacity systémů cIPA + cholesterol získané pomocí spontánní a přímé solubilizace. Spontánní solubilizace byla prováděna při 25 °C ( $c_{25}$ ) a 50 °C ( $c_{50}$ ), přímá solubilizace pouze při laboratorní teplotě ( $c$ ). Solubilizovanými látkami byl 1-Naftol, Sudan Red G a Oil Red O. Měření bylo prováděno po 1, 2, 3 a 7 dnech.

| 1-Naftol |                   |                   |            |
|----------|-------------------|-------------------|------------|
| t [den]  | $c_{25}$ [mmol/l] | $c_{50}$ [mmol/l] | c [mmol/l] |
| 1        | 5,689             | 4,580             | 5,379      |
| 2        | 5,177             | 5,167             | 4,747      |
| 3        | 5,211             | 4,450             | 4,806      |
| 7        | 5,147             | 3,203             | 3,920      |

| Sudan Red G |                   |                   |            |
|-------------|-------------------|-------------------|------------|
| t [den]     | $c_{25}$ [mmol/l] | $c_{50}$ [mmol/l] | c [mmol/l] |
| 1           | 0,021             | 0,022             | 0,150      |
| 2           | 0,039             | 0,035             | 0,137      |
| 3           | 0,078             | 0,055             | 0,134      |
| 7           | 0,126             | 0,051             | 0,136      |

| Oil Red O |                   |                   |            |
|-----------|-------------------|-------------------|------------|
| t [den]   | $c_{25}$ [mmol/l] | $c_{50}$ [mmol/l] | c [mmol/l] |
| 1         | 0,027             | 0,056             | 0,099      |
| 2         | 0,049             | 0,057             | 0,100      |
| 3         | 0,053             | 0,089             | 0,114      |
| 7         | 0,068             | 0,091             | 0,110      |

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením solubilizační kapacity kladně nabitých kataniontových vezikulárních systémů cIPA + cholesterol. Solubilizační kapacita byla stanovována metodou UV-VIS spektrofotometrie po 1, 2, 3 a 7 dnech od přípravy vzorků. Podstatnou součástí měření bylo sestavení kalibračních křivek solubilizovaných látek. Všechny vzorky bylo nutné ředit isopropanolem, jelikož samotné systémy cIPA + chol. + solubilizovaná látka způsobovaly rozptyl procházejícího záření.

Vezikulární systémy byly připraveny z tenzidů CTAB a SDS s přidavkem kladně nabitého dvouřetězcového tenzidu DODAC a cholesterolu pro zvýšení stability. Příprava vzorků pro solubilizaci byla provedena dvěma způsoby. Při prvním byla solubilizovaná látka přidána až do hotového systému cIPA + cholesterol (spontánní solubilizace), naopak při druhém byla látka přidána do systému vezikul už během přípravy (přímá solubilizace). Pro stanovení solubilizační kapacity byla použita tři hydrofobní barviva o různé velikosti molekul. Těmito látkami byly 1-Naftol, Sudan Red G a Oil Red O.

Solubilizační kapacita byla porovnána podle několika aspektů. Prvním z nich je způsob přípravy vzorků, kdy bylo barvivo přidáno v odlišných bodech přípravy. Z naměřených hodnot solubilizační kapacity jsou patrné mírné rozdíly mezi vzorky spontánní a přímé solubilizace. Spontánní solubilizace byla účinnější pouze u 1-Naftolu, ale získané hodnoty byly na rozdíl od přímé solubilizace zatíženy poměrně velkou chybou. Tento problém se vyskytoval i u vzorků ostatních barviv připravených tímto způsobem. U Sudanu Red G a Oil Red O byly podstatně lepší hodnoty získány přímou solubilizací. Dále lze solubilizační kapacitu porovnat podle použitého barviva. 1-Naftol má ze všech použitých látek nejmenší molekulu, díky čemuž se v tak složitém systému, jakým jsou kataniontové vezikuly, solubilizoval nejlépe. Z výsledků je patrné, že čím složitější je molekula solubilizované látky, tím menší množství se do vezikul dostane a za delší dobu. Solubilizační kapacitu lze také srovnat podle teploty měření. Toto srovnání je však možné pouze u spontánní solubilizace, jelikož u přímé solubilizace nebylo možné teplotu jednoduše regulovat. U spontánní solubilizace bylo stanovení kapacity prováděno při 25 °C a 50 °C. Předpoklad, že zvýšení teploty by mohlo zvýšit množství nasolubilizované látky, byl potvrzen pouze u Oil Red O, kde byl tento trend jasně patrný. U ostatních barviv bylo větší množství látky nasolubilizováno při laboratorní teplotě.

## 7 LITERATURA

- [1] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes: *Chemické listy*. 93, 1999, s. 421-427.
- [2] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana. Chemie a technologie tenzidů II. In: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: Fakulta technologická [online]. [cit. 2020-01-20]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>
- [3] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708- 0579-X.
- [4] *Bezpečnostní list: Cetyltrimethylamonium bromid* [online]. PENTA, 2019 [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: [https://www.pentachemicals.eu/soubory/bezpecnostni-listy/cetyltrimethylamonium\\_bromid.pdf](https://www.pentachemicals.eu/soubory/bezpecnostni-listy/cetyltrimethylamonium_bromid.pdf)
- [5] Hexadecyltrimethylammonium bromide [online]. Sigma-Aldrich, [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/hexadecyltrimethylammoniumbromide364455709011?lang=en&ion=CZ&attrlist=Brand|Physical%20Form>
- [6] *Dimethyldioctadecylammonium chloride* [online]. Sigma-Aldrich [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/40167?lang=en&ion=CZ>
- [7] *Dimethyldioctadecylammonium chloride* [online]. National Center for Biotechnology Information: PubChem Database [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyldioctadecylammonium-chloride>
- [8] *Safety Data Sheet: Sodium dodecyl sulfate* [online]. Sigma-Aldrich, 2020 [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=62862&brand=SIAL&PageToGoToURL=%2Ffsafety-center.html>
- [9] *Bezpečnostní list: Laurylsíran sodný* [online]. PENTA, 2019 [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: [https://www.pentachemicals.eu/soubory/bezpecnostni-listy/laurylsiran\\_sodny.pdf](https://www.pentachemicals.eu/soubory/bezpecnostni-listy/laurylsiran_sodny.pdf)
- [10] NOVÁK, Josef P. *Fyzikální chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-436-x.
- [11] EVANS, Fennell D. a Hakan WERNNERSTRÖM. *The colloidal domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology meet*. 2nd Ed. New York: Wiley-VCH, 1999. ISBN isbn:978-0-471-24247-5.
- [12] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [13] 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. 2020-01-25]. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-013-3104-9>
- [14] TAH, Bidisha, Prabir PAL, Mrityunjoy MAHATO a G. B. TALAPATRA. Aggregation Behavior of SDS/CTAB Catanionic Surfactant Mixture in Aqueous Solution and at the Air/Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2011, 115(26),

- 8493-8499 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.1021/jp202578s. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp202578s>
- [15] 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. 2020-01-25]. DOI: 10.1021/la047207g. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la047207g>
- [16] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced Physical Stability of Mixed Ion Pair Amphiphile/Double-chained Cationic Surfactant Vesicles in the Presence of Cholesterol. *Journal of Oleo Science* [online]. 2018, 67(6), 727-735 [cit. 2020-01-25]. DOI: 10.5650/jos.ess18008. ISSN 1345-8957. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/67/6/67\\_ess18008/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/67/6/67_ess18008/_article)
- [17] *Cholesterol* [online]. National Center for Biotechnology Information: PubChem Database [cit. 2020-02-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997>
- [18] BRAMER, Tobias, Noel DEW a Katarina EDSMAN. Pharmaceutical applications for catanionic mixtures. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2007, 59(10), 1319-1334 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1211/jpp.59.10.0001. ISSN 00223573. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.59.10.0001>
- [19] ZOLLINGER, Heinrich. *Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*. Ilustrované vydání. John Wiley & Sons, 2003. ISBN 3-906390-23-3.
- [20] *Barviva a pigmenty* [online]. 2009. Pardubice, 2009, s. 25 [cit. 2020-01-20]. Dostupné z: <http://www.upce.cz/fcht/uocht/spektrum/ktol-vlastnostib.pdf>
- [21] Chemické složení tiskových barev. In: *Elektronická učebnice* [online]. Olomouc: Online, 2009 [cit. 2020-01-20]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2548>
- [22] *Fluorofory v biomedicině* [online]. [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [23] SCHWILLE, Petra a Elke HAUSTEIN. Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications. Spectroscopy. *Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry*, 2001, 94 (22).
- [24] Hydroxyderiváty – fenoly. In: *Elektronická učebnice* [online]. Olomouc: Online, 2009 [cit. 2020-01-20]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2443>
- [25] ESME, Asli, Seda G. SAGDINC a S. Zeki YILDIZ. Experimental and theoretical studies on Sudan Red G [1-(2-methoxyphenylazo)-2-naphthol] and its Cu(II) coordination compound. *Journal of Molecular Structure*. 2014, 1075, 264-278. DOI: 10.1016/j.molstruc.2014.07.009.
- [26] BUMBRAH, Gurvinder S., Gurvinder S. SODHI a Jasjeet KAUR. Oil Red O (ORO) reagent for detection of latent fingerprints: a review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2019, 9(3). DOI: 10.1186/s41935-018-0107-1.
- [27] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN:80-86369-07-2.

- [28] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [29] GOHAIN, Neelakshi. *Studies on the structure and function of phenazine modifying enzymes PhzM and PhzS involved in the biosynthesis of pyocyanin* [online]. Dortmund, 2008 [cit. 2020-02-01]. Dostupné z: <https://eldorado.tu-dortmund.de/handle/2003/26205>. Dizertační práce. TU Dortmund.
- [30] CARRIÈRE, David, Youlia MICHINA a Daniel KOPETZKI. *Catanionic vesicles, process for preparing same and application thereof*. Francie. US20110253633A1. Uděleno 20.10.2011.
- [31] GUHA, Pritam, Biplab ROY, Gourab KARMAKAR, et al. Ion-Pair Amphiphile: A Neoteric Substitute That Modulates the Physicochemical Properties of Biomimetic Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2015, 119(11), 4251-4262 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1021/jp512212u. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp512212u>
- [32] WANG, Xiang, Emily J. DANOFF, Nikolai A. SINKOV, Jae-Ho LEE, Srinivasa R. RAGHAVAN a Douglas S. ENGLISH. Highly Efficient Capture and Long-Term Encapsulation of Dye by Catanionic Surfactant Vesicles. *Langmuir* [online]. 2006, 22(15), 6461-6464 [cit. 2020-04-20]. DOI: 10.1021/la0605135. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la0605135>

## 8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

### 8.1 Seznam použitých zkratk

|        |                                                |
|--------|------------------------------------------------|
| CF     | karboxyfluorescein                             |
| cIPA   | kladně nabité kataniontové vezikulární systémy |
| CMC    | kritická micelární koncentrace                 |
| CTAB   | hexadecyltrimethylamonium bromid               |
| CTAC   | cetyltrimethylamonium chlorid                  |
| CTAT   | cetyltrimethylamonium tosylát                  |
| DHDAB  | dihexadecyldimethylamonium bromid              |
| DLS    | dynamický rozptyl světla                       |
| DODAB  | dioctadecyldimethylamonium bromid              |
| DODAC  | dimethyldi-n-octadecylamonium chlorid          |
| DTDAB  | ditetradecyldimethylamonium bromid             |
| DXDAB  | dialkyldimethylamonium bromid                  |
| EYPC   | fosfatidylcholin                               |
| IPA    | amfifilní iontový pár                          |
| i-PrOH | isopropanol                                    |
| MB     | methylenová modř                               |
| PAL    | povrchově aktivní látka                        |
| SDBS   | dodecylbenzosulfonát sodný                     |
| SDS    | dodecylsulfát sodný                            |
| SEC    | vylučovací chromatografie                      |
| SLC    | sójový lecitin                                 |

## 8.2 Seznam použitých symbolů

|                 |                              |
|-----------------|------------------------------|
| $A$             | absorbance                   |
| $c$             | koncentrace                  |
| $\varepsilon$   | molární extinkční koeficient |
| $I_0$           | zářivý tok dopadající        |
| $I$             | zářivý tok prošlý            |
| $\lambda_{max}$ | vlnová délka                 |
| $l$             | délka optické dráhy          |
| $P_c$           | parametr balení              |
| $t$             | čas                          |
| $T$             | transmittance                |