



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

**STABILITA VEZIKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ VŮČI ZMĚNÁM
JEJICH KONCENTRACE**

STABILITY OF VESICULAR COMPLEXES AGAINST CHANGES IN THEIR CONCENTRATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Velichová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1688/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Veronika Velichová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Akademický rok: 2021/22

Název bakalářské práce:

Stabilita vezikulárních komplexů vůči změnám jejich koncentrace

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na koncentračně podmíněné změny vlastností vezikulárních komplexů a možné způsoby jejich studia.
2. Na základě rešerše vybrat vhodné vezikulární systémy a techniky stanovení jejich parametrů.
3. Připravit relevantní koncentrační řadu vybraných vezikulárních systémů a danými technikami popsat jejich fyzikálně chemické parametry.
4. Zhodnotit získané výsledky z hlediska použitých metod a změn jejich parametrů se změnou koncentrace.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Veronika Velichová
studentka

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stabilitou vezikulárních systémů tvořených z iontových amfifilních párů. Tyto kataniontové vezikuly jsou tvořeny jednořetězcovými tenzidy CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) a SDS (dodecylsírán sodný), které jsou stabilizované přídavkem dvouřetězcového tenzidu DODAC (dioktadecyldimethylamonium chlorid) a 43 mol.% cholesterolu. Cílem práce je ověřit stabilitu těchto systémů při změnách jejich koncentrace. Pro toto měření byla připravena koncentrační řada vezikul ředěná deionizovanou vodou. Stabilita byla vyhodnocována metodami dynamického (DLS) a elektroforetického (ELS) rozptylu světla měřením v týdenních intervalech po dobu čtyř týdnů. Metodou DLS byly určeny průměrné hodnoty velikosti vezikul v roztoku a jejich změny v průběhu měření, metodou ELS byla získána informace o změnách náboje vezikul o různé koncentraci v čase. Jako stabilní byly označeny vzorky o vyšší koncentraci, tedy do desetinásobného zředění roztoku vezikul, u nižších koncentrací byly naměřeny vyšší hodnoty průměrných velikostí a nižší hodnoty zeta potenciálu, podle nichž lze takto zředěné vezikuly označit za nestabilní. Bylo také provedeno vizuální pozorování, kde však nebyla pozorována viditelná agregace v roztocích. Dále bylo sledováno agregační chování vezikul metodou fluorescenční spektroskopie za pomoci sondy pyren.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kataniontové vezikuly, iontový amfifilní pár, stabilita, dynamický rozptyl světla, zeta-potenciál, fluorescenční spektroskopie, pyren

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the stability of vesicular systems that consist of ion pair amphiphile. These catanionic vesicles were prepared from single-chained surfactants CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and SDS (sodium dodecyl sulphate), which were stabilized by adding double-chained surfactant DODAC (dimethyldioctadecylammonium chloride) with 43 mol.% cholesterol. The aim of the thesis was to verify the stability of vesicular systems against changes in their concentration. For the measurement, a concentration series was prepared by diluting vesicles with deionized water. The stability was evaluated by dynamic (DLS) and electrophoretic (ELS) light scattering measurements at weekly intervals for four weeks. By DLS method were determined the average values of the size of vesicles and their changes during the measurement, the method ELS provided the information about changes of charge with different concentration in time. Samples with a higher concentration, i.e. no dilution till tenfold dilution of the vesicle solution, were marked as stable, higher values of average sizes and lower values of zeta potential were measured at solution with lower concentrations, according to which such diluted vesicles can be described as unstable. There were also visual observations made, but no visible aggregation in the solutions was observed. Furthermore, the aggregation behavior of the vesicles was observed by fluorescence spectroscopy using pyrene as fluorescent probe.

KEY WORDS

Catanionic vesicles, ion pair amphiphile, stability, dynamic light scattering, zeta-potential, fluorescence spectroscopy, pyrene

VELICHOVÁ, Veronika. *Stabilita vezikulárních komplexů vůči změnám jejich koncentrace* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-23]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138848>. 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:

Na tomto místě bych ráda poděkovala docentu Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D za jeho odborné vedení, cenné rady a vstřícný přístup při zpracování mé práce. Velké díky také patří mé konzultantce Ing. Martině Havlíkové za její pomoc, ochotu, cenné rady a nekonečnou trpělivost při měření, věcné připomínky při konzultacích a její čas, který mi při psaní bakalářské práce věnovala. Také bych ráda poděkovala své rodině za její podporu při studiu.

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Asociativní látky	9
2.2. Tenzidy.....	9
2.2.1. Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB).....	10
2.2.2. Dodecylsírán sodný (SDS)	11
2.2.3. Dioktadecyldimethylamonium chlorid (DODAC)	11
2.3. Micely	12
2.3.1. Kritická micelární koncentrace.....	14
2.3.2. Packing parameter	15
2.4. Vezikuly.....	15
2.4.1. Kataniontové vezikuly	16
2.5. Solubilizace	17
2.6. Použité metody	18
2.6.1. Dynamický rozptyl světla (DLS).....	18
2.6.2. Elektroforetický rozptyl světla (ELS).....	19
2.6.3. Fluorescenční spektroskopie.....	20
3. Současný stav řešené problematiky	23
3.1. Interakce CTAB a SDS.....	23
3.2. Stabilizace vezikul přidáním cholesterolu	23
3.3. Pozorování agregačního chování tenzidů v různých prostředích	24
4. Experimentální část.....	26
4.1. Chemikálie.....	26
4.2. Použité metody	26
4.2.1. Příprava zásobního prášku IPA	26
4.2.2. Příprava roztoku cIPA	26
4.2.3. Příprava cIPA + cholesterol.....	26
4.2.4. Příprava koncentrační řady pro měření DLS a ELS	27
4.2.5. Příprava roztoků pro měření intenzity fluorescence.....	27
4.2.6. Vizuální pozorování	27
4.2.7. Měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla	27

4.2.8. Měření fluorescence	28
5. Výsledky a diskuze	29
5.1. Měření dlouhodobé stability	29
5.1.1. Dynamický a elektroforetický rozptyl světla.....	29
5.1.2. Vizuální pozorování stability roztoků vezikul v čase.....	35
5.2. Pozorování agregačního chování systému při změnách jeho koncentrace.....	37
6. Závěr.....	40
7. Literatura.....	42
8. Seznam zkratk a symbolů	48
8.1. Seznam použitých zkratk	48
8.2. Seznam použitých symbolů	48
9. Přílohy	49
9.1. Měření dlouhodobé stability	49
9.1.1. Dynamický a elektroforetický rozptyl světla.....	49
9.1.2. Vizuální pozorování	52
9.2. Pozorování agregačního chování systému metodou fluorescenční spektroskopie	53
9.3. Souhrnné tabulky	54

1. ÚVOD

Předmětem této bakalářské práce jsou iontové amfifilní páry, tedy systém tvořený dvěma tenzidy, které mají opačné náboje. V současné době je velmi využíván a prostudovaný systém tvořený z kladně nabitého tenzidu CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) a záporně nabitého tenzidu SDS (dodecylsírán sodný). Tyto tenzidy jsou oba jednořetězcové, jejich spojením vzniká tzv. pseudo-dvouřetězcový systém, již dříve zmíněný iontový amfifilní pár (z ang. IPA). Tyto dva tenzidy spolu vzájemně interagují elektrostaticky přes náboje na jejich funkčních skupinách, výsledný pár se tedy jeví elektroneutrální. Ve vodném prostředí se přidávají také interakce hydrofobní, kdy má nepolární řetězec tenzidů tendenci být v co nejmenším kontaktu s okolní vodou a vznikají tak koloidní struktury, v tomto případě zvané vezikuly. Jsou to kulovité útvary tvořené dvojvrstvou z iontových amfifilních párů, do kterých lze solubilizovat další látku rozpustnou i nerozpustnou ve vodě. Takto tvořené vezikuly nazýváme kataniontové. Stabilita pouze takto vytvořených vezikul ale není příliš dobrá, dochází k jejich srážení a shlukování ve větší útvary. Proto je přidáván navíc cholesterol a další nabitý tenzid, pro tuto práci kladně nabitý tenzid DODAC (dioktadecyldimethylamonium chlorid), který udělí každé vezikule stejný náboj a díky elektrostatickým interakcím se vezikul vzájemně odpuzují. Cholesterol zde působí stejně jako v liposomech, snižuje fluiditu membrány a zabraňuje tak destabilizaci.

Schopnost kataniontových vezikul enkapsulovat hydrofilní i hydrofobní látku umožňuje potenciální využití v medicínském a farmaceutickém průmyslu, např. jako nosiče léčiv nebo jiných aktivních látek. Podobné vlastnosti mají také liposomy, které jsou tvořeny z fosfolipidů. Výhodou využití iontových amfifilních párů byla oproti liposomům byla široká škála tenzidů a nižší náklady na jejich přípravu, liposomy jsou tedy vzorem, kterému se snažíme přiblížit.

Cílem této bakalářské práce je zjistit stabilitu kataniontových vezikul se změnou jejich koncentrace, a to pozorováním jejich velikosti (metodou dynamického rozptylu světla) a zeta potenciálu (metodou elektroforetického rozptylu světla). Pro měření byla připravena koncentrační řada, která byla následně pozorována po dobu čtyř týdnů. Bylo také pozorováno agregační chování systému pomocí fluorescenční spektroskopie a sondy pyren.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Asociativní látky

Některé nízkomolekulární látky poskytují ve velmi zředěných roztocích tzv. pravé roztoky. Dosažením určité koncentrace dochází k asociaci molekul natolik, že vznikají koloidní částice zvané micely. Takto chovající se látky nazýváme micelární nebo také asociativní. Asociativní látky tvoří reversibilní soustavy, tedy soustavy, jejichž vlastnosti jsou dány okamžitými fyzikálními podmínkami jako např. tlak, teplota či koncentrace jednotlivých složek systému.

Asociativní látka musí být amfifilní, tedy musí obsahovat část lyofilní (rozpustnou v daném rozpouštědle) a lyofobní, která má za následek asociaci molekul. Pro látky rozpustné ve vodě platí, že lyofobní (zde hydrofobní) část je nepolární, např. uhlovodíkové řetězce, lyofilní (v tomto případě hydrofilní) část zde tvoří silně polární skupina, která způsobuje rozpustnost látky ve vodě. Ne každá amfifilní molekula tvoří micely, hydroxylové a karboxylové skupiny na molekule v kombinaci s dlouhým řetězcem jevící hydrofobní vlastnosti nejsou dostatečně hydrofilní a asociace nastává pouze při minimálních koncentracích [1].

Soustavy micelárních koloidů jsou i přes svůj amfifilní charakter klasifikovány jako lyofilní. Narozdíl od lyofobních micel je ale není třeba uměle stabilizovat a jejich velikost a koncentrace závisí pouze na okamžitém stavu systému. Tyto soustavy jsou termodynamicky stabilní.

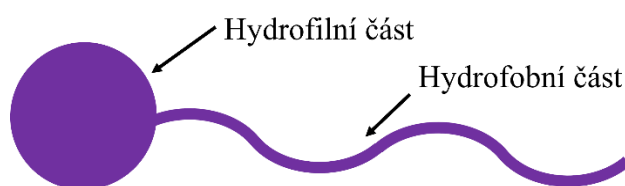
Lyofobní soly, tzv. lyosoly, jsou disperzní systémy s kapalným vodným nebo organickým disperzním prostředím a pevnými částicemi koloidních rozměrů. Lyofobní micely jsou tvořeny krystalickým jádrem, např. ultramikroskopickým krystalkem, a stabilizujícím obalem. Ten je tvořen ionty přitahovanými k povrchu nabitému ionizací či adsorpcí iontů na povrch. Takto vzniká elektrická dvojvrstva, která micely stabilizuje [2].

2.2. Tenzidy

Tenzid je organická povrchově aktivní látka (PAL). Molekuly povrchově aktivních látek mají jak část hydrofilní, tak hydrofobní; hydrofilní část je obvykle polární, hydrofobní je tvořena dlouhým uhlovodíkovým řetězcem. Hlavní skupina molekul může být dle schopnosti disociace ve vodném prostředí neiontová, aniontová nebo kationtová, pokud molekula obsahuje kladně i záporně nabitou skupinu, nazývá se amfoterní [3]. Neiontové povrchově aktivní látky nemají schopnost disociovat, jedná se např. o skupiny hydroxylové či esterové. Aniontové, kationtové a amfoterní PAL jsou schopny disociace ve vodném roztoku a souhrnně je lze nazvat iontové. Následkem disociace aniontových PAL vznikají povrchově aktivní anionty. Významnými představiteli aniontových PAL jsou alkalické soli vyšších mastných kyselin, tzv. přirozená mýdla. Samotné mastné kyseliny nejsou schopny asociace, karboxylová skupina $-COOH$ není dostatečně disociovaná a u vyšších mastných kyselin s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem tak nezaručuje dostatečně velkou rozpustnost. Naproti tomu disociace kationtových PAL vede ke vzniku povrchově aktivních kationtů [2]. U většiny kationtových tenzidů je jako kation kvartérní dusíkový atom, jedná se tedy o kvartérní amoniové soli [4], příp. jsou atomy dusíku substituované pyridinovými sloučeninami [2]. Strukturní variabilita je vyšší než u aniontových tenzidů. V různých směsích nelze volně kombinovat aniontové a kationtové tenzidy, jelikož by došlo k vysrážení nerozpustné sraženiny. Možnost kombinovat aniontové i kationtové tenzidy nabízí amfoterní tenzidy, kation a anion ale musí být obsažen v nedisociovatelné části

molekuly [4]. Amfoterní PAL mohou měnit svůj náboj v závislosti na pH [2]. Většina povrchově aktivních sloučenin je syntetického původu, nejsou tedy plně biologicky odbouratelné [5]. Významnou vlastností mnoha aniontových a neiontových tensidů je tedy jejich biologická rozložitelnost [4].

Tenzidy mají dvojí vlastnosti, které jsou určeny jejich hydrofilní a hydrofobní částí, a vykazují tedy dva hlavní jevy, a to adsorpci a agregaci [6]. Samouspořádání neboli agregace je spontánní organizace molekul do stabilnějších agregátů způsobená nekovalentními interakcemi. Agregace molekul probíhá vymezením rozpustnosti, důležitým faktorem je i polarita. Polární/hydrofilní sloučeniny jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech, nepolární/hydrofobní naopak v rozpouštědlech nepolárních [3]. PAL mají tendenci vytvářet monovrstvy, micely, dvojvrstvy a válcové micelární struktury, pro agregaci těchto útvarů je potřebná koncentrace vyšší než tzv. kritická micelární koncentrace [6].

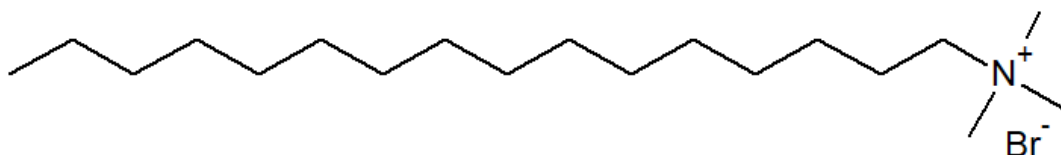


Obr. 1: Obecné schéma molekuly tenzidu.

Tenzidy se i v nízkých koncentracích hromadí ve fázovém rozhraní a snižuje povrchovou energii roztoku a mezifázovou energii soustavy [4]. Schopnost snížit povrchové napětí v roztoku definuje účinnost PAL. Dobrá PAL snižuje povrchové napětí vody až o více jak polovinu (ze 72 na 35 mN/m). Povrchové napětí roztoku koreluje s koncentrací PAL až do dosažení CMC, tedy dosažení koncentrace nezbytné pro tvorbu micel. Účinné PAL se vyznačují nižší CMC [5].

2.2.1. Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB)

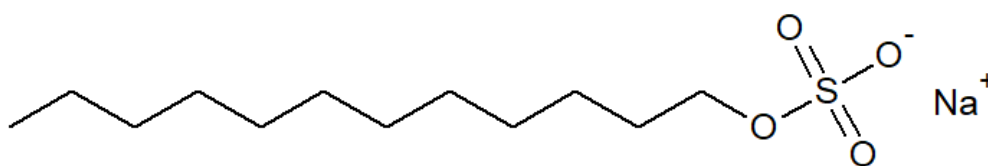
Cetyltrimethylamonium bromid je známá kvartérní amonná amfifilní sloučenina, jiným názvem také hexadecyltrimethylammonium bromid (HTMAB) [7]. Jedná se o kationtovou PAL, jejíž strukturu znázorňuje Obr. 2. Má typickou hydrofilní hlavu a hydrofobní řetězec, které ovlivňují velikost a tvar částic, do kterých jsou začleněny. Hydrofobní řetězec také tvoří sterickou zábranu na povrchu tenzidu a zabraňuje tak aglomeraci částic [8]. CTAB také ovlivňuje fázové chování, tekutost a velikost neiontových PAL [9]. Má značné chemoterapeutické, antibakteriální, antimykotické a antiproliferativní účinky, kterých je využíváno v průmyslu a zdravotnictví [7]. Nanokrystalické částice modifikované CTAB jsou schopny vázat více aktivní látky a stabilněji fixovat lék v hydrofobní doméně těchto částic [10]. CTAB má také významné inhibiční účinky na rychlost elektrodepozice a může být použit jako antimikrobiální látka [11], nebo v kombinaci s dalšími látkami, jako např. montmorillonitem, je schopen účinně čistit mikrobiální barviva z odpadních vod [12]. Roztoky CTAB o nízkých koncentracích účinně také napomáhají při opětovném skládání zdenaturovaného lysozymu [13].



Obr. 2: Chemická struktura CTAB [7].

2.2.2. Dodecylsírán sodný (SDS)

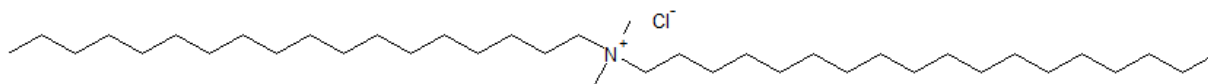
Dodecylsírán sodný je biologicky odbouratelná aniontová PAL na bázi síranů, jehož struktura je znázorněna na Obr. 3 [14]. Je to netoxická látka nerozpustná ve vodě s dobrou aniontovou a neiontovou kompatibilitou s komplexy [15]. SDS má podstatné využití v průmyslu, je to hlavní složka detergentů pro domácí práce [14] a denně využívané výrobky jako kosmetiku [15]. SDS má tendenci tvořit pevné vazby s proteiny, čímž způsobují jejich denaturaci v přítomnosti redukčních materiálů [14]. V praxi se tak využívá při extrakci DNA k oddělení nukleové kyseliny po denaturaci proteinů. Tento detergent má schopnost denaturovat sekundární a terciární strukturu, čímž proteinům udělí uniformní záporný náboj. Této schopnosti se využívá při PAGE-SDS [15]. Má také využití při charakterizaci proteinů a lze ho použít pro studium způsobu a rozsahu interakcí mezi polymery a PAL [14]. SDS je také schopna inhibovat korozi měkké oceli a jako aniontová PAL se účinně adsorbuje na kladně nabitě povrchy kovů, lze také přidat kationtovou PAL, např. CTAB [16].



Obr. 3: Chemická struktura SDS [15].

2.2.3. Dioktadecyldimethylamonium chlorid (DODAC)

Dioktadecyldimethylamonium chlorid je dvouřetězcová syntetická kationtová PAL (Obr. 4), klasifikovaná jako kvartérní amoniová sůl [17]. Jeho hydrofobní část je tvořena osmnácti-uhlíkovými (C18) řetězci [18]. Podobně jako fosfolipidy je DODAC schopný tvořit lamelární útvary, vezikuly a liposomy ve vodných roztocích [17]. Kladně nabitý monovalent k chloridovým protiiontům zajišťuje tvorbu kladně nabitých vezikul a liposomů [18]. Vlastnosti a struktura těchto vezikul závisí na koncentraci PAL, iontové síle rozpouštědla, metodě přípravy vezikul a chování protiiontů [19], [20]. Stabilní jednolamelární vezikuly lze připravit při nízkých koncentracích PAL, vyšší koncentrace poté podporují tvorbu multilamelárních vezikul, ty jsou však blíže u sebe a jejich vzájemná interakce může působit destabilizujícím účinkem [20]. DODAC je široce využíván v průmyslu pro své změkčovací vlastnosti nebo jako antistatikum či dezinfekce [17]. Protiionty mají vliv na řadu aplikací, např. jako katalyzátory, při transportu iontů nebo dodávání léků [19]. Liposomy sestavené z DODAC lze také využít pro transfekci nevirových genů nebo přípravu kationtových lipozomálních vakcín [21].

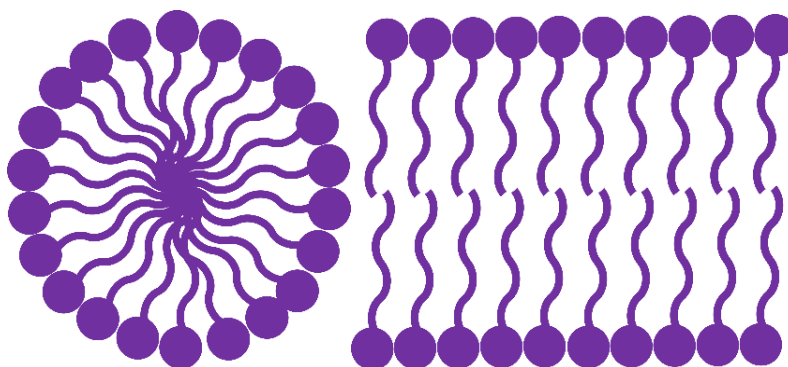


Obr. 4: Chemická struktura DODAC [19].

2.3. Micely

Tenzidy jsou díky své amfifilní struktuře schopné v různých typech prostředí vytvářet útvary jako micely, dvojvrstvy nebo vezikuly. Tvorba micel závisí na volbě prostředí a jeho koncentraci, o typu agregátu poté rozhoduje teplota soustavy, struktura a koncentrace povrchově aktivní látky [22], [23]. Rozptýlením amfifilních molekul ve vodném prostředí dochází k agregaci molekul [23]. Při kontaktu s okolní vodou jsou polární skupiny zvané hlavy umístěny po obvodu micely, nepolární řetězce jsou ukryty uvnitř micely a chráněny tak polárními skupinami před vodným prostředím [3]. Tento jev je vysvětlován velkými kohezními silami mezi molekulami vody, čímž molekuly vody „vytěsňují“ nepolární řetězce z roztoku a ty následně tvoří jádro micely. Vznik micel je spojen s poklesem Gibbsovy energie v soustavě [22]. V průběhu micelizace dochází k van der Waalsovým interakcím hydrofobních skupin [3].

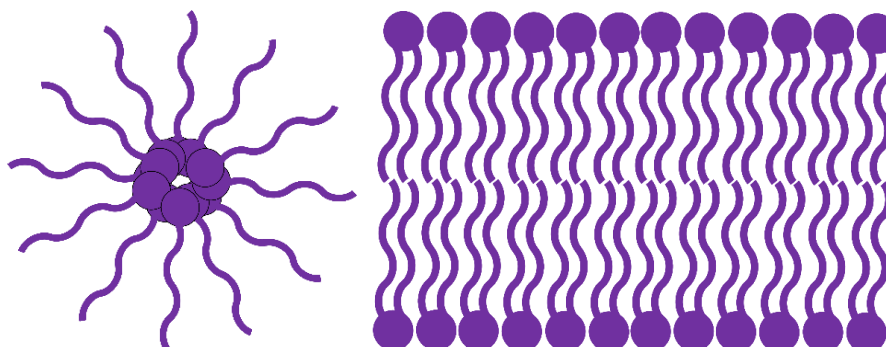
Vznik a struktura micel byly zkoumány metodou rozptylu světla [22]. Při nízkých koncentracích přidaného tenzidu do roztoku jsou molekuly přítomny jednotlivě, po dosažení tzv. kritické micelární koncentrace dochází k agregaci tenzidů do micel. Spíše než o konkrétní hodnotu se však jedná o koncentrační rozmezí [24]. Ve zředěných vodných roztocích o koncentraci vyšší než kritická micelární koncentrace jsou tvořeny tzv. Hartleyovy micely [22]. Tyto micely ukazuje Obr. 5. Jedná se o nejjednodušší typ agregátů, jsou to malé sférické micely kulovitého tvaru [3]. Jejich poloměr je roven délce molekuly PAL, nejčastěji jsou tvořeny padesáti až sto padesáti molekulami [22]. PAL, které tvoří micely, mají velkou plochu průřezu hydrofilní skupiny hlavy, ta přesahuje průměr řetězců a má kuželovitý tvar, což vede ke vzniku agregátů tvaru koule s průměrem 5–10 nm [3]. Micely nemusí být nutně jen sférické kulovité, mohou vznikat i další nesférické struktury chránící lyofobní části molekuly před rozpouštědlem, jako micely cylindrické (tzv. válcovité) nebo laminární [1]. Válcovité micely mají protáhlý tvar s povrchem tvořeným polárními skupinami, čímž chrání hydrofobní skupiny. Poloměr micely se může měnit; je roven délce hydrofobního řetězce, ale může se zvětšovat při začleňování dalších molekul [22]. Tento typ může vzniknout přidáním silně vázajících protiiontů, což vede ke snížení efektivní plochy skupiny hlavy. Další možností je použití iontového páru PAL, tedy směsi kationtových a aniontových PAL s jedním alkylovým řetězcem [3]. S rostoucí koncentrací vodného roztoku se uhlovodíkové řetězce orientují více rovnoběžně, čímž vznikají tzv. laminární (McBainovy) micely [22]. Laminární micely jsou tvořeny dvěma přilehlými rovinnými vrstvami, kde lyofobní části jedné vrstvy směřují k lyofobní části vrstvy druhé, počet molekul v těchto micelách je vyšší než v cylindrických. Tyto typy micel jsou tvořeny při poměrně vysokých koncentracích, při kterých klesá disociace ionogenních skupin, a tím se snižuje jejich náboj. Při dostatečně vysoké koncentraci mohou koloidní micely přecházet v gely [2], tedy v disperzní systém s trojrozměrnou sítí tvořenou dispergovanými částicemi [22].



Obr. 5: Tvary micel ve vodném prostředí - Hartleyova (vlevo) a McBainova (vpravo) [25].

Spontánní agregace PAL probíhá nejen ve vodných, ale i nevodných a smíšených prostředích. Různé vlastnosti nevodného média jako polarita, hydro- a lipofilita nebo schopnost vytvářet vodíkové můstky mohou vytvářet vhodné prostředí pro jejich agregaci [26]. Některé amfifilní molekuly mohou v nepolárních rozpouštědlech tvořit tzv. obrácené micely (viz. Obr. 6) [1]. Jádro tohoto typu micel je tvořeno polárními skupinami, kolem kterých jsou rozmístěny nepolární řetězce, které tak chrání jádro před větším stykem s nepolárním rozpouštědlem [2]. Do skupiny látek schopných tvořit tyto útvary patří látky s větším úložným faktorem, a tedy objemnější hydrofobní částí [1]. Kritickou micelární koncentraci lze pro obrácené micely definovat jen velmi obtížně, přechod na koloidní roztoky probíhá v relativně širokém intervalu koncentrací.

Obsahuje-li amfifilní molekula dva hydrofobní řetězce, mohou vznikat také další útvary. Jedním z těchto útvarů je dvouvrstvá membrána, jejíž strukturu lze vidět na Obr. 6 [2]. Dvojvrstva je tvořena mnoha páry molekul umístěných proti sobě, které k sobě přiléhají svými hydrofobními částmi. Interiér je tedy tvořen částí hydrofobní, na vnější straně dvojvrstvy se nachází část hydrofilní [3]. Příkladem těchto membrán jsou fosfolipidy. Uspořádání hydrofobní části je závislé na teplotě, s rostoucí teplotou může membrána dojít přes kapalně krystalickou fázi k bodu tání. V biologických membránách tak může docházet k pohybu molekul mezi vrstvami a odpovídajícímu natočení hydrofilní části. Tento pohyb umožňuje transport látek přes membránu [1].



Obr. 6: Obrácený typ micel v nevodném prostředí a obecné schéma dvojvrstvé membrány [25].

2.3.1. Kritická micelární koncentrace

Koncentrace, při které dochází k agregaci tenzidů do útvarů jako micel, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC, z ang. *critical micellar concentration*). Mezi faktory ovlivňující CMC lze řadit strukturu PAL, přítomnost přidaného elektrolytu v roztoku, povahu protiiontů vznikajících disociací ionogenních PAL nebo teplotu roztoku [3]. Co se týče chemické struktury, kritická micelární koncentrace závisí na vlastnostech hydrofilní i hydrofobní skupiny. CMC je významně ovlivněna chemickou strukturou uhlovodíkového řetězce. Tato koncentrace klesá s rostoucí délkou řetězce nebo připojením benzenového jádra k uhlovodíkovému řetězci, naopak roste s přítomností dvojných vazeb, substitucí polární skupiny na alkylový řetězec nebo přesunem polární skupiny dále od konce řetězce. CMC je u ionogenních PAL ovlivněna také protiionty a jejich nábojem; s rostoucím nábojem protiiontů tato koncentrace klesá.

2.3.1.1. Vliv cizích látek

Vliv cizích látek v roztoku záleží na charakteru látky – jedná-li se o elektrolyty nebo neelektrolyty. Elektrolyty ovlivňují více ionogenní látky než neionogenní a snižují CMC s rostoucí koncentrací a vyšším nábojem protiiontu. Neelektrolyty mají různé účinky; neelektrolytické nepolární látky mají na CMC minimální vliv, zatímco neelektrolytické polární látky mívají komplexní účinky.

2.3.1.2. Teplota a tlak

Vliv teploty se liší s ohledem na látku, na kterou působí. Vlivem teploty se může hodnota CMC zvyšovat, což se děje u látek ionogenních, nebo snižovat, což nastává u neionogenních PAL. Amfifilní molekuly mohou mít neobvyklou závislost rozpustnosti na teplotě. Při nízkých teplotách mají roztoky mnohdy nižší koncentraci, než je kritická micelární a netvoří se tedy micely. Zvýšením teploty na tzv. Krafftovu teplotu se vyrovná rozpustnost a CMC. Poté křivka rozpustnosti začne strmě stoupat, jelikož se začínají tvořit micely. Změny tlaku ovlivňují změny CMC pouze minimálně [2].

Krafftova teplota je minimální teplota, při které jsou PAL schopné agregovat do micel. Pod touto teplotou surfaktanty existují pouze jako monomery, CMC tedy nemá žádný význam. Alternativou je tzv. teplota tání hydratované pevné PAL, která se rozpouští nad Krafftovou teplotou a nad CMC začíná vytvářet micely. Hodnota této teploty je ovlivněna přidávkou elektrolytu a schopností rozpouštědla tvořit vodíkové můstky [26].

2.3.1.3. Povrchové napětí

Povrchové napětí kapaliny obecně roste s polaritou molekuly, amfifilní látky však vykazují nižší povrchové napětí. Tyto látky orientují na fázovém rozhraní vodného roztoku svou polární část do kapalné fáze a nepolární řetězce do fáze plynné. Amfifilní molekuly na rozhraní adsorbují a tím tvoří adsorpční vrstvu, ve které se látky opět orientují. Tendence orientovat se na rozhraní se zvyšuje s rostoucí koncentrací adsorbované látky na povrchu. Látky snižující svou orientací na rozhraní povrchové napětí nazýváme povrchově aktivní.

Při nižší než kritické micelární koncentraci vystupují asociativní molekuly jako povrchově aktivní, povrchové napětí se snižuje s rostoucí koncentrací a délkou řetězce. Dosažením kritické

koncentrace se změny povrchového napětí téměř zastavují z důvodu vytvoření úplné adsorpční vrstvy amfifilními molekulami. Povrchové napětí se v oblasti nad CMC mění jen velmi málo z důvodu asociace látky do tvaru micely.

2.3.2. Packing parameter

Ve zředěných roztocích tvoří povrchově aktivní látky co nejkompaktnější tvar. Jednoduché tenzidy s jedním lyofobním řetězcem snadno tvoří sférické micely, menší hustotu mají poté v cylindrických a laminárních uspořádáních. Složité tenzidy geometricky vyhovují vzniku cylindrických micel, lyofobní části zaujímají větší objem než jeden řetězec [1]. Síly umožňující agregaci jsou způsobeny vlastní strukturou těchto molekul. Uhlovodíkové řetězce se navzájem přitahují kvůli hydrofobním interakcím a mezifázovými silami na rozhraní uhlovodík-voda. Na polární skupiny hlav působí interakce hydrofilní, elektrostatické a sterické, díky nimž zůstávají v kontaktu s vodou. Tyto typy sil jsou protichůdné, jeden typ se snaží zmenšit mezifázovou plochu, druhé ji zvětšit. Kvůli rovnováze těchto sil se vytváří optimální plocha na molekulu vystavenou vodné fázi a_0 . Při této ploše je celková energie interakcí působících na molekulu minimální. Tvar a vlastnosti struktur tvořených tenzidy závisí na objemu uhlovodíkových řetězců V a maximální efektivní délce řetězce l_c , nazývanou kritická délka řetězce. Ze znalosti geometrických limitů molekuly lze určit, které typy struktur může daná PAL vytvořit. K tomu je využívána bezrozměrná veličina zvaná packing parameter, tzv. kritický sbalovací parametr:

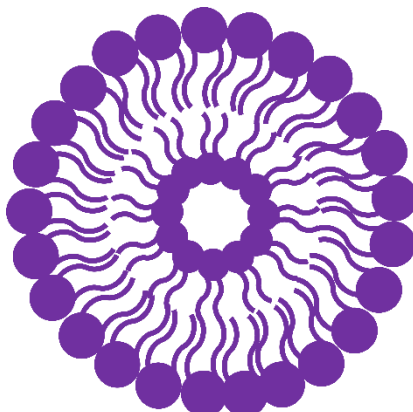
$$CPP = \frac{V}{a_0 l_c}. \quad (1)$$

Surfaktanty s hodnotou CPP menší než 1/3 tvoří tvar kužele, hodnota mezi 1/3 a 1 odpovídá tvaru komolého kužele, PAL s hodnotou 1 vytváří útvar válce a tedy planární dvojvrstvy a hodnoty nad 1 odpovídají tvarům obrácených kuželů [25].

2.4. Vezikuly

Dvouvrstvé membrány se mohou vyskytovat v rovinné i zakřivené formě [2]. Pokud je dvojvrstva zakřivená a na koncích uzavřená, nazývá se tento útvar vezikula (Obr. 7) [3]. Povrch vnitřní i vnější vrstvy tvoří lyofilní (pro vodná prostředí hydrofilní) část, vnější prostředí je zároveň i uzavřeno ve středu vezikuly. Vnitřní část tvoří lyofobní (hydrofobní) část [1]. Tato struktura umožňuje enkapsulovat hydrofilní, hydrofobní i amfifilní materiály [27]. Vezikuly lze připravit samovolným rozpouštěním nebo dispergováním ve vhodném prostředí [1]. Při rozpouštění ve vodném prostředí se nejdříve tvoří dvojvrstva, při tvorbě vezikul vzniká multilamelární struktura a musí být na unilamelární vezikuly přeměněna [23]. Při tvorbě vezikul z jediné amfifilní látky vznikají vezikuly s menším prostorem pro lyofilní látku a jsou termodynamicky nestabilní. Mají také omezenou životnost, po čase přejdou v rovinnou dvojvrstvu. Ze směsi dvou amfifilních látek s rozdílnou hodnotou úložného faktoru lze připravit termodynamicky stabilní vezikuly. Složka s menší hydrofilní částí se poté nachází ve vnitřní části, složka s větší hydrofilní částí ve větší. Vezikuly jsou takto stabilnější a jednotlivé části nejsou deformovány [1]. Jinou možností přípravy je využití směsi aniontových a kationtových jednořetězcových tenzidů [27]. Pokud je vezikul sestaven z fosfolipidů, nazýváme je liposomy [23]. Vezikuly mohou být unilamelární nebo multilamelární, jejich průměr se pohybuje

v rozmezí desítek nanometrů až několika mikrometrů [3]. Tyto útvary jsou hojně využívány v kosmetice a medicíně, oproti micelám mají větší kapacitu pro transport látek [2].



Obr. 7: Obecné schéma vezikuly [25].

2.4.1. Kataniontové vezikuly

Směsi aniontových a kationtových PAL ve vodných roztocích tvoří tzv. kataniontové smíšené roztoky. Směsi těchto PAL spontánně ve vodném prostředí agregují do různých struktur jako micel, vezikul nebo lamel. Jednoduchým smícháním aniontových a kationtových PAL je již při nízkých koncentracích zmenšena plocha na hydrofilní skupinu hlavy následkem párování iontů a tvorby molekulárních dvojvrstev a dvou jednoduchých řetězců kationtových a aniontových PAL, které působí jako dvojité amfoterní PAL. Kataniontové směsi vznikají smícháním kationtových a aniontových tenzidů v libovolném poměru kromě ekvimolárního, v poměru 1:1 vzniká sraženina, tzv. iontový amfifilní pár (IPA, z ang. *ion pair amphiphile*). K agregaci směsi aniontových a kationtových PAL dochází při značně nižších koncentracích než jsou CMC jednotlivých látek [28].

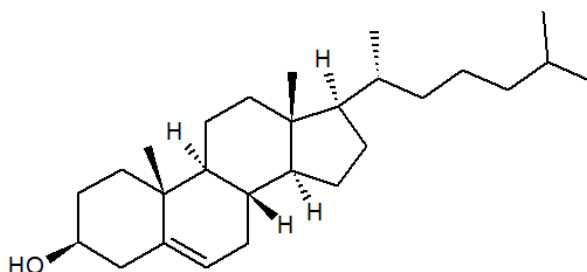
Amfifilní iontové páry jsou vezikulární prekurzory [29]. Jedná se o pseudo-dvouřetězcové tenzidy tvořené opačně nabitými PAL s odstraněnými protiionty. IPA je ve vodném prostředí schopna formovat vezikulární systémy [30]. Různými kombinacemi PAL lze připravit různé vezikuly o rozdílné velikosti, zeta-potenciálu a polydisperzitě. Vezikuly pak mají sférickou strukturu a hydrofilní i hydrofobní domény, díky čemuž jsou schopny do své struktury přijmout některé hydrofilní i hydrofobní látky, např. léky, a mohly by tak být použity jako alternativa k liposomům. Výhodou kataniontových vezikul je nižší cena a velké množství kombinací PAL, je zde ale možná toxicita systému. Toxicitu lze potlačit přidáním např. (bio)polymerů, jako je třeba hyaluronan sodný, který zvyšuje biokompatibilitu vezikul a zároveň zvyšuje jejich stabilitu [29].

Vezikuly tvořené z IPA také mohou být nestabilní a srážet se, a proto musí být stabilizovány povrchovým nábojem, který lze dodat přidáním další nabitě dvouřetězcové PAL, nebo přidáním cholesterolu [30]. Přídavkem nabitého tenzidu získají vezikuly stejný náboj a díky elektrostatickému odpuzování se neshlukují [29]. Vlastnostmi cholesterolu se dále zabývá kapitola 2.4.1.1.

2.4.1.1. Cholesterol

Cholesterol je často využívaný sterol ve složení liposomů a vezikul díky své schopnosti omezení agregace a zvýšení stability. Je to amfifilní molekula se steroidním kruhem s pružným sacharidovým ocasem a hydroxylovou skupinou, strukturu zobrazuje Obr. 8 [31]. Narozdíl od jiných lipidů se nachází v membránách živočišných buněk i ve vysokých koncentracích, typicky kolem 20–30 mol.%. Cholesterol má tedy řadu funkcí, např. v metabolismu jako prekurzor hormonů a vitamínů [32]. V buňkách působí jako regulátor propustnosti, pružnosti a tuhosti [31], je schopen zvyšovat mechanickou pevnost, snižovat propustnost malých molekul a regulovat tekutost membrán [32].

Přidání cholesterolu do IPA vezikul způsobuje zvětšení vzdálenosti polárních skupin PAL, ze kterých je IPA zformována. Polární skupiny záporně nabitých tenzidů jsou posunuty směrem do membrán, kladně nabitě naopak vyčnívají [30]. Pro kataniontové vezikuly připravené z cetyltrimethylamonium-dodecylsulfátu (IPA) je nejvhodnější množství přidaného cholesterolu 40 až 50 mol.% [29].



Obr. 8: Chemická struktura cholesterolu [31].

2.5. Solubilizace

Významnou a prakticky využívanou vlastností micelárních koloidů je solubilizace [22]. Solubilizace, tedy schopnost rozpouštět látky v daném prostředí nerozpustné, je jednou ze společných vlastností asociativních koloidů. Mechanismus je pro různé typy látek odlišný. Nepolární látky pronikají do jádra micely nebo v případě laminárních micel pronikají mezi uhlovodíkové řetězce, naopak polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely [2]. Vzniklé útvary nazýváme smíšené micely [1].

Solubilizace má v praxi mnohá využití. Denně využívaná je detergence, tedy praní povrchů znečištěných povrchově aktivními látkami [2]. Směsi tenzidů s detergenčními vlastnostmi, tedy schopností převést nečistoty z povrchu do roztoku, se nazývají detergenty [4]. Díky micelám je také možné rozpustit organické substráty ve vodném prostředí [33]. V praxi je lze využít k promývání půd, hydrofobní část je afinitní k sytkému médiu a hydrofilní skupina interaguje s médiem [5].

V kosmetickém průmyslu jsou v dnešní době jsou kladeny nároky také na mírnost a biologickou rozložitelnost PAL. Často využívané jsou biokompatibilní PAL, tzv. biosurfaktanty, a proto jsou syntetizovány analogy přírodních surfaktantů. Mezi ně patří např. alkylglukosidy nebo acylglukosaminy, které mají využití v detergentech a kosmetice, a molekuly lipo-aminokyselin a peptidů, které ve vodě agregují jako micely [3]. Oproti syntetickým PAL vykazují vysokou specifitu, biologickou rozložitelnost a biokompatibilitu [5].

Kladně nabité kataniontové vezikuly lze také mohou tvořit stabilní komplexy s DNA. Nejstabilnější v tomto případě byly IPA vezikuly (z CTAB) stabilizované dvouřetězcovým tenzidem, a to v poměru 9:1. Tyto vezikuly jsou fyzikálně stabilní a lze je využít pro transport DNA [34].

2.6. Použité metody

2.6.1. Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla (DLS) je analytická metoda, kterou lze získat informace o velikosti částic nebo difúzní koeficient [35]. Vzorkem prochází paprsek světla, který je přítomnými částicemi rozptylován [36]. Průměrná velikost částic je stanovována ze Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a}, \quad (2)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, T představuje teplotu, η značí viskozitu prostředí a a udává hydrodynamický poloměr sférických částic [37].

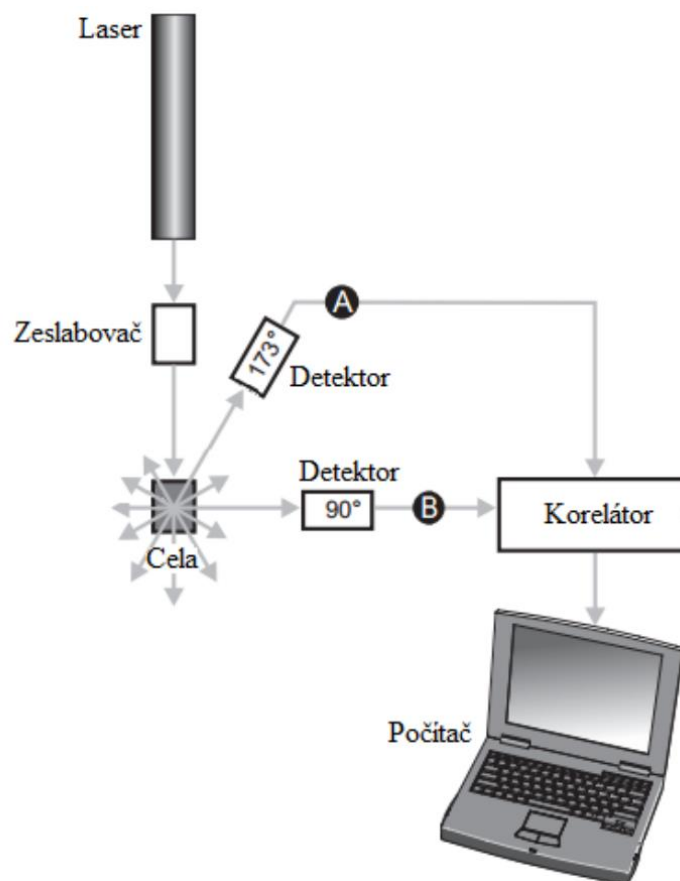
Technikou lze určit velikost nanočástic měřením Brownova pohybu částic v roztoku [38]. Měřenou velikostí částic je průměr koule pohybující se stejnou rychlostí jako měřená částice [35]. Metoda je přesnější pro monodisperzní systémy, u polydisperzních dochází ke zkreslení výsledků směrem k větším částicím [38]. Částice v roztoku jsou navíc považovány za sférické, skutečná velikost částic tedy může být rozdílná. DLS je jedna z užitečných metod detekce agregátů v roztoku, lze ji využít ke sledování časového vývoje koagulačních procesů měřením intenzity rozptýleného světla [35].

2.6.1.1. Instrumentace

Zdrojem světla ozařující částice přítomné v roztoku v kyvetě je laser. Trajektorie většiny laserových paprsků není při průchodu vzorkem ovlivněna, některé jsou rozptýleny přítomnými částicemi. Rozptýlené světlo poté dopadá na detektor, který zaznamenává jeho intenzitu. Teoreticky by bylo možné detektor umístit do jakékoli polohy, protože světlo je rozptylováno do všech směrů, v praxi používané nastavení je v závislosti na modelu přístroje 173° nebo 90°.

Aby byl detektor schopný zaznamenat intenzitu rozptýleného záření, musí být v určitém rozsahu, na který je přístroj nastavený. Při příliš malé intenzitě by nemuselo dojít ke změření intenzity, naopak u vyšších hodnot intenzity by mohlo dojít k přetížení detektoru. Pro případné snížení intenzity laseru a tedy intenzity měření je používán tzv. tlumič.

Z detektoru pokračuje signál na kolektor, kde je upraven na digitální signál. Intenzity rozptýleného světla jsou poté srovnávány v po sobě jdoucích časových intervalech a je odvozena rychlost změny intenzity světla. Data jsou poté analyzována v softwaru a je z nich odvozena informace o velikosti částic. Za použití optických parametrů je poté možné vypočítat početní a objemovou distribuci velikosti částic [37]. Schéma zapojení jednotlivých částí přístroje je znázorněno na Obr. 9.



Obr. 9: Schéma přístroje pro měření velikosti částic metodou DLS [39].

2.6.2. Elektroforetický rozptyl světla (ELS)

Zeta potenciál je jedna z charakteristik koloidních systémů, kterou lze vyjádřit stabilitu systému. Souvisí s povrchovým nábojem částic a interakcí s jinými molekulami [40]. Přítomnost náboje na povrchu částice ovlivňuje výskyt iontů v okolním prostředí, kde tedy dochází ke zvýšení koncentrace opačně nabitých iontů v blízkém okolí částice. Kolem každé částice se tedy tvoří elektrická dvojvrstva. Kapalná fáze kolem částice existuje ve dvou formách – jako vnitřní oblast, tzv. Sternova vrstva, ve které jsou ionty silně vázány, a vnější oblast, kde jsou ionty vázány méně. Ve vnější vrstvě je pomyslná hranice, uvnitř které tvoří ionty stabilní oblast, která se při pohybu částice pohybuje s ní, za touto hranicí se již ionty s pohybující se částicí nepohybují. Potenciál na této pomyslné hranici se nazývá zeta potenciál [37].

Jednou z významných metod stanovení zeta potenciálu je elektroforetický rozptyl světla (ELS) [40]. Do systému složeného ze vzorku a článku s elektrodami je vloženo vnější elektrické napětí, částice se poté pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem a je měřena jejich elektroforetická mobilita, která je následně pomocí Henryho rovnice převedena na hodnotu zeta potenciálu:

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(Ka)}{3\eta}, \quad (3)$$

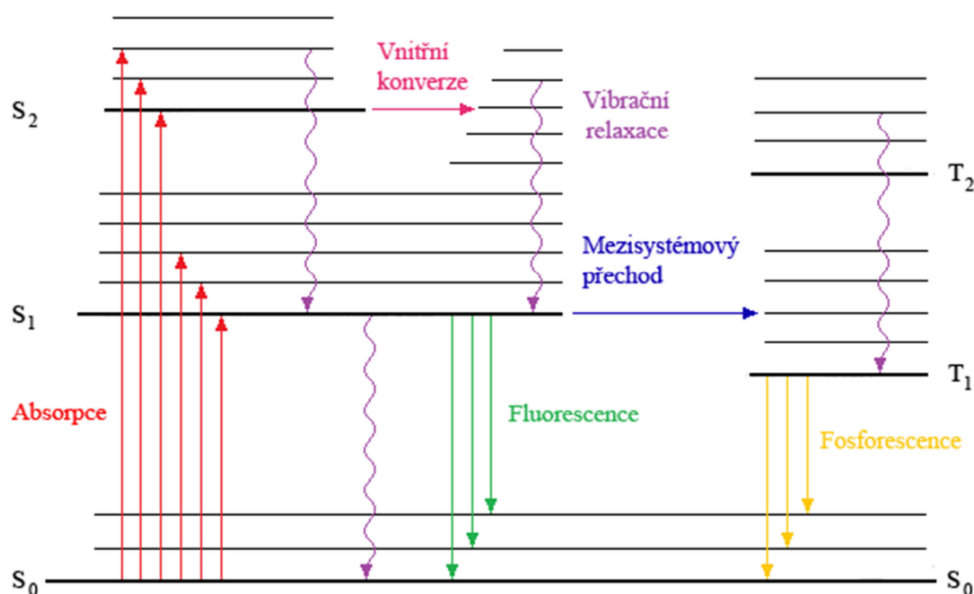
kde z představuje zeta potenciál, U_E je elektroforetická mobilita, ε dielektrická konstanta a η značí viskozitu. Člen $f(Ka)$ udává Henryho funkci, která má v tomto případě hodnotu 1,5 – odkazuje na Smoluchowskiho aproximaci [37].

Na pohyb částic a tedy hodnoty zeta potenciálu působí také nehomogenita teploty a koncentrace prostředí, které způsobují rušivý šum [40]. Při působení elektrického pole mohou také vznikat agregáty [41].

2.6.3. Fluorescenční spektroskopie

2.6.3.1. Fluorescence

Molekuly se přirozeně vyskytují ve stavu s elektrony na nejnižší energetické hladině S_0 . Absorpcí fotonu elektrony přijímají energii, díky které mohou přejít na vyšší energetickou hladinu. Tento stav se nazývá deexcitovaný. Absorpci světla umožňují tzv. chromofory, tedy atomy nebo skupiny atomů zodpovědné za barvu molekuly. Existují dva typy excitovaných stavů – singletový stav s antiparalelními spiny a tripletový stav se spiny paralelními. Z hlediska symetrie je více pravděpodobný singletový excitovaný stav, protože zde při přechodu ze základní energetické hladiny nedochází ke změně spinu. Excitovaný stav ale není stabilní, elektrony se snaží opět dosáhnout základní energetické hladiny, potřebují se tedy zbavit nadbytečné energie. Mezi možné způsoby deaktivace patří zářivé deaktivace jako fluorescence a fosforescence nebo nezářivé přechody. Při fluorescenci dochází k přechodu elektronu ze singletového stavu z energetické hladiny S_1 zpátky na hladinu S_0 , jedná se o krátký proces, trvá 10^{-9} až 10^{-6} s. Fosforescence je naopak delší, probíhá po dobu 10^{-4} až 10^2 s, což je spojeno zakázaným přechodem z tripletového stavu spojeným se změnou spinu elektronu. Mezi nezářivé přechody patří vnitřní konverze, vibrační relaxace a mezisystémový přechod. Jednotlivé přechody znázorňuje Perrin-Jabloňského diagram (Obr. 10) [42].



Obr. 10: Jabloňského diagram [43].

2.6.3.2. Fluorescenční sondy

Následkem silného vlivu na okolního média na fluorescenci jsou fluoreskující molekuly využívány pro výzkum fyzikálně-chemických, biochemických a biologických systémů. Fluorescenční sondy jsou rozděleny do tří skupin: vnitřní sondy, vnější kovalentně vázané sondy a vnější asociující sondy. Výhodou kovalentně vázaných sond před vnějšími asociujícími sondami je jejich známá pozice v molekule. Existuje mnoho různých vnějších sond kovalentně

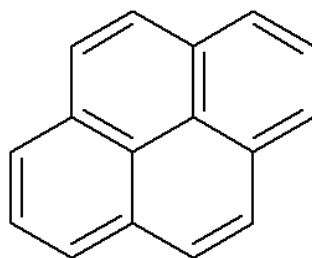
vázaných na tenzidy, fosfolipidy, proteiny nebo polynukleotidy. Syntéza molekul a makromolekul s vnějšími kovalentně vázanými sondami je obtížná, pro většinu výzkumů jsou proto používány nekovalentně asociující sondy. Místa rozpouštění vnějších sond jsou určena jejich chemickou povahou a výslednými specifickými interakcemi, které mohou vznikat uvnitř sondovaného systému. Zásadní je charakter sondy – mezi hydrofobní sondy patří pyren, mezi hydrofilní sondy bývá řazen pyranin a mezi amfifilní sondy (1-pyrenyl)dodekanová kyselina [42].

2.6.3.2.1. Pyren

Pyren a jeho deriváty patří mezi nejpoužívanější fluorescenční sondy. Pyren je polyaromatický uhlovdík se symetrickou strukturou, kterou znázorňuje Obr. 11. Díky symetrické struktuře silně reaguje na polaritu svého okolí. První singletový přechod ($S_0 \rightarrow S_1$) této sloučeniny je z hlediska symetrie zakázaný, některé vibrační přechody jsou poté silně závislé na polaritě okolí.

Interakce pyrenu s prostředním způsobuje překryv prvního zakázaného a druhého dovoleného excitovaného stavu. To způsobuje, že přechod 0-0 je silně závislý na polaritě rozpouštědla, v emisním spektru je dán prvním píkem při vlnové délce 373 nm. Třetí pík emisního spektra značí přechod 0-2 při vlnové délce 383 nm, tento přechod je nazýván referenční.

Další charakteristická oblast se nachází při vlnové délce 470 nm, kde dochází ke tvorbě excimeru. Excimer, nebo také excitovaný dimer, je komplex vzniklý spojením dvou molekul pyrenu, kdy jedna se nachází ve stavu základním a druhá ve stavu excitovaném. K tvorbě excimeru dochází při přebytku molekul pyrenu nad množstvím hydrofobních domén, tedy při koncentracích kolem kritické micelární koncentrace, kdy v roztoku zatím není větší množství vytvořených micel. S vyšší koncentrací excimeru v roztoku intenzita fluorescence při charakteristické vlnové délce roste [44].

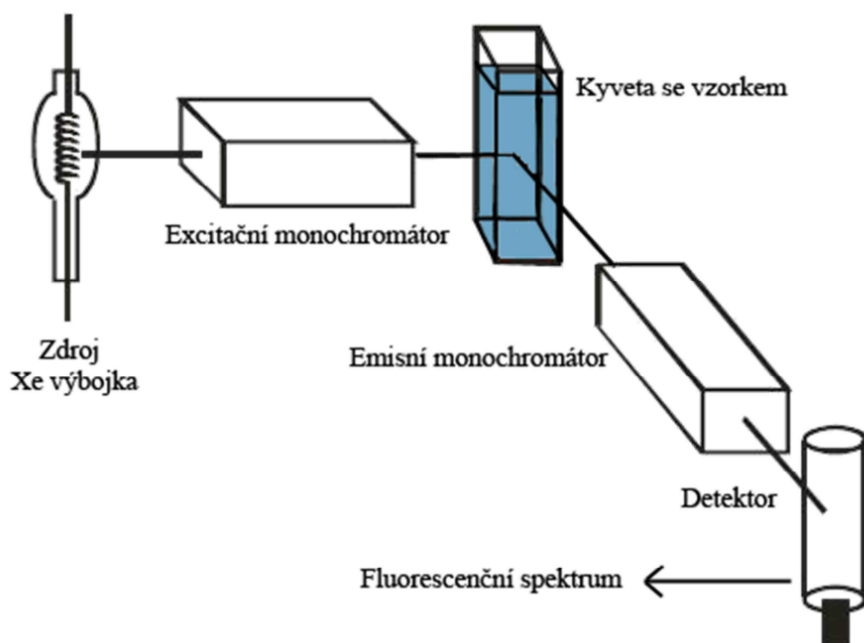


Obr. 11: Chemická struktura pyrenu [44]

2.6.3.3. Instrumentace

Fluorescence je měřena pomocí spektrofluorimetru, jeho schéma je znázorněno na Obr. 12. Ten se skládá z několika hlavních částí – zdroje světla, kterým často bývá vysokotlaká xenonová výbojka, excitačního monochromátoru pro výběr excitační vlnové délky záření, celý pro kyvetu s měřeným vzorkem, emisním monochromátorem, který slouží pro výběr vlnové délky záření prošlého vzorkem, a detektorem propojeným se softwarem, který slouží k zaznamenání naměřených dat. Uspořádání hlavních částí spektrofluorimetru je pravoúhlé, k detekci prošlého záření dochází kolmo ke zdroji záření.

Výsledkem měření na spektrofleurimetru jsou emisní a excitační spektra. Emisní spektrum odpovídá změnám intenzity fluorescence coby funkce vlnové délky, excitační vlnová délka je při měření emisního spektra konstantní. Oproti tomu excitační spektrum odráží změny intenzity fluorescence v závislosti na excitační vlnové délce, konstantní je při tomto měření vlnová délka, při níž je intenzita fluorescence pozorována [42].



Obr. 12: Schéma spektrofleurimetru [43].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V rámci bakalářské práce budou používány kataniontové vezikuly připravované z HTMA-DS stabilizované pomocí DODAC a cholesterolu. Bude pozorována jejich stabilita v závislosti na změnách koncentrace. Na toto téma nebylo provedeno příliš mnoho výzkumů, následující kapitola se proto bude zabývat přípravou a stabilizací tohoto typu vezikul.

3.1. Interakce CTAB a SDS

Interakcemi mezi cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB) a dodecylsíránem sodným (SDS) se zabýval **Mal A. et al.** Interakce těchto tenzidů mají za následek formování mnoha typů agregátů. Výzkumný tým se zabýval interakcemi těchto tenzidů v různých poměrech včetně ekvimolárního. V rámci experimentu byl připraven zásobní roztok SDS nebo CTAB a vysokokoncentrační roztok tenzidu druhého, roztoky byly následně proti sobě titrovány, a to buď SDS k CTAB, nebo reverzně CTAB k SDS. V průběhu titrace byly sledovány koncentrace pod CMC, kolem CMC a nad touto koncentrací, v systému bylo pozorováno mnoho přechodů mezi typy agregátů. Při nízké koncentraci jednoho roztoku tenzidu jsou v roztoku monomery nebo micely, s rostoucí koncentrací prochází systém přechodem od těchto micel ke smíšeným micelám nebo plochým dvojvrstvám a při vyšších koncentracích poté k zakřiveným dvojvrstvám a vezikulám. V ekvimolárním poměru je systém složen převážně z vezikul a pouze malého množství jiných útvarů. U vznikajících vezikul byla měřena velikost a zeta potenciál, vezikuly byly velké, jejich průměry se pohybovaly mezi 200 a 1100 nm. Zeta potenciál byl při titraci roztoku CTAB roztokem SDS na počátku kladný, s větším přírůstkem záporného tenzidu se kladný náboj zmenšoval až do bodu ekvivalence, s dalšími přírůstky rostly hodnoty zeta potenciálu do záporných hodnot. Dále bylo zjištěno, že při nízkých koncentracích jednotlivých tenzidů v ekvimolárním poměru dochází ke tvorbě sraženiny až po pěti dnech, při vyšších koncentracích tenzidů rychleji, stabilní vezikuly jsou formovány při CMC. Ve studii byl také pozorován zákal v roztoku v závislosti na poměru jednotlivých tenzidů. Zásobní roztoky obou PAL byly průhledné, při titrování jednoho tenzidu k druhému objevoval zákal až do ekvimolárního poměru, kdy byl nejvýraznější, zároveň byl stabilní a nedocházelo k jeho usazování. Při dalším přidávání docházelo k solubilizaci jedné PAL do druhé a tím opět vznikl průhledný roztok [45].

3.2. Stabilizace vezikul přidáním cholesterolu

Vezikuly připravené pouze z tenzidů CTAB a SDS je ale třeba stabilizovat. Vlivem přidaného cholesterolu na chování kataniontových vezikul stabilizovaných uniformním kladným nábojem se zabýval **Kuo A.-T.** se svým týmem. Vliv cholesterolu na stabilitu vezikul byl poté zkoumán dle velikosti a zeta potenciálu za účelem zjištění fyzikální stability a charakteru náboje a Fourierovy transformační analýzy pro analýzu charakteru molekulární agregace. Cholesterol jeví schopnost ovlivnit agregaci dvojvrstev do vezikul a zvýšit stabilitu kataniontových vezikul. Vliv na stabilitu byl pozorován vystavením mechanickému poškození na vezikulech připravených z HTMA-DS (hexadecyltrimethylamonium-dodecylsírán) a DTDAB (ditetradecyldimethylamonium bromidu) v přítomnosti i nepřítomnosti cholesterolu. Ekvimolární směšovací poměr HTMA-DS a DTDAB bez přidaného cholesterolu vedl k vytvoření kataniontových vezikul s dobrou fyzikální stabilitou, DTDAB pravděpodobně upravuje obal uhlovodíkových řetězců, čímž podporuje tvorbu vezikul. Podle naměřených dat

se jako nejprůznivější množství přidaného cholesterolu pro tvorbu a stabilitu vezikul jeví 43 mol.%, s výjimkou ekvimolárního směšovacího poměru, kdy bylo vhodnější množství 30 mol.%. Byla pozorována velikost a fyzikální stabilita vezikul. Při směšovacích poměrech HTMA-DS/DTDAB 7/3 a 5/5 se velikost vezikul s rostoucí koncentrací přidaného cholesterolu do koncentrace 30 mol.% zmenšovala, cholesterol má v při nižších koncentracích tendence maximalizovat vzdálenost sousedních řetězců a tím zvyšovat vzdálenost polárních skupin. To vede k většímu zakřivení dvojvrstev a zmenšení vezikul. Při vyšším obsahu cholesterolu je zakřivení vezikulární dvojvrstvy menší a tvoří se tedy vezikuly větších rozměrů. U malých vezikul s nižším obsahem cholesterolu (pod 30 mol.%) byla sledována postupná agregace a tvorba velkých vezikul, vyšší koncentrace cholesterolu naopak této agregaci mohou zabránovat [46].

Vlivem cholesterolu na vlastnosti kataniontových vezikulárních systémů se zabývalo více výzkumných týmů. Studium účinků hladiny cholesterolu na stabilitu IPA vezikulárních systémů se zabývala **Havlíková M. et al.** Byly připraveny kataniontové vezikuly z tenzidů HTMAB a SDS a byly stabilizovány dvouřetězcovým tenzidem DODAC (smíchány byly v molárním poměru HTMA-DS/DODAC 9:1). K takto připraveným vezikulám bylo přidáno různé množství cholesterolu, a to v množství 0, 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63 a 73 mol.%. Byla studována velikost vezikul pomocí dynamického rozptylu světla a jejich zeta potenciál, který byl měřen elektroforetickým rozptylem světla. Průměrná velikost byla vypočtena z difúzního koeficientu ve Stokes-Einsteinově rovnici, zeta potenciál byl získán ze Smoluchowského modelu. Většina vzorků vykazovala velkou opalescenci, což bylo problematické pro měření DLS, nejnížší zákal vykazovaly vzorky s obsahem cholesterolu 33, 43 a 53 mol.%. Proto byla změřena turbidita vzorků a ty byly následně rozředěny až do hodnoty turbidity mezi 0,1 a 0,3. Vzorky s obsahem cholesterolu 0–23 mol.% byly značně nestabilní, opakování měření vedlo k vysokým hodnotám směrodatné odchylky a nesrovnatelným výsledkům. Malá stabilita systému také vedla ke vzniku polydisperzního systému a tedy vysokým hodnotám indexu polydisperzity. Vzorky s obsahem cholesterolu 33–53 mol.% měly nejlepší parametry, vykazovaly nejmenší průměrnou velikost a vysoké hodnoty zeta potenciálu. Naopak s nejvyššími přídávky cholesterolu, tedy 63 a 73 mol.%, došlo ke snížení stability a zvětšení velikosti, což bylo pravděpodobně způsobeno krystalizací sacharidových řetězců a tedy destabilizací vezikul. Vzorky s obsahem cholesterolu 33–53 mol.% byly následně podrobeny měření stability v čase, po dobu 36 dní bylo prováděno měření DLS a ELS. I přes předpoklad stability vzorku s obsahem cholesterolu 33 mol.% se tento vzorek ukázal jako stabilní pouze jeden den, poté došlo ke snížení zeta potenciálu a zvýšení indexu polydisperzity. Po celou dobu měření se jevily stabilní vzorky s 43 a 53 mol.% cholesterolu, průměrná velikost se pohybovala mezi 80 a 100 nm a hodnoty zeta potenciálu mezi 40 a 60 mV, množství přidaného cholesterolu pro stabilizaci těchto vezikulárních systémů se tedy jeví optimální v koncentraci 43 až 53 mol.% [47].

3.3. Pozorování agregačního chování tenzidů v různých prostředích

Pro pozorování agregačního chování povrchově aktivních látek je často využívána technika fluorescenční spektroskopie. K tomu jsou používány různé fluorescenční sondy, jednou z nich je fluorescein. Bylo zjištěno, že spektrální vlastnosti fluorescenční sondy fluoresceinu jsou ovlivňovány typy tenzidu. Kritickou koncentrací micel fluorescenčními technikami stanovovali

Salemlssa J. K. et al. Pro práci byly připraveny zásobní roztok fluoresceinu o koncentraci 250 mM a zásobní roztoky povrchově aktivních látek rozpuštěním v potřebném množství deionizované vody. Tenzidy ve vodném prostředí tvoří micely. Fluorescenční spektra byla zaznamenávána v rozsahu vlnových délek 450 až 750 nm se šířkou šterbiny 10 nm. Koncentrovaný zásobní roztok tenzidu byl postupně přidáván do vodného roztoku fluoresceinu tak, aby koncentrace byla v rozsahu pod až nad CMC. Excitační vlnová délka fluoresceinu byla 491 nm, hlavní absorpční pík se nacházel při vlnové délce 486 nm a emisní pík při 516 nm. Fluorescenční spektra fluoresceinu jsou v přítomnosti různých koncentrací tenzidu nižších než CMC posunuta směrem k vyšším vlnovým délkám, kde spektra zůstala i při CMC a nad ní. Intenzita fluorescence tedy byla měřena při 530 nm, kde má fluorescence emisní vrchol. Pro stanovení CMC byly vyneseny změny fluorescence v nejintenzivnějším píku proti koncentracím tenzidu, křivky byly popsány sigmoidní Boltzmannovou funkcí a CMC byla stanovena v inflexním bodu. Jak autoři uvedli v závěru práce, takto získané hodnoty kritické koncentrace byly v souladu s hodnotami získanými jinými metodami, se tedy o užitečnou metodu pro stanovení CMC micel [48].

Mezi rozšířené chemické sloučeniny patří proteiny, důležitým systémem pro biotechnologické procesy a medicínské aplikace je systém peptid-tenzid, protože přidáním PAL do peptidového roztoku lze měnit jejich schopnost vázat další molekuly. Tím se zabýval **Chauhan S.** se svým týmem. Pro práci byly vybrány kationtové PAL CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) a DTAB (dodecyltrimethylamonium bromid) a byly sledovány změny v micelizačním chování těchto PAL při různých koncentracích glycyldipeptidu v roztoku. Agregační chování bylo pozorováno pomocí fluorescenční spektroskopie a sondy pyren. Bylo pozorováno pět emisních maxim ve fluorescenčním spektru, poté poměr prvního a třetího píku, který dává informaci o polaritě mikroprostředí kolem molekul pyrenu. Při nižších koncentracích se pyren pohyboval ve vodném prostředí, kde je ale méně rozpustný než v nevodných prostředích, poměr prvního a třetího píku tedy rychle klesá s nástupem tvorby micel. Bylo také zaznamenáno, že poměr píků je u tenzidu DTAB větší než u CTAB, což souvisí s delším alkylovým řetězcem CTAB a vyšší hydrofobicitou CTAB ve vodném prostředí. Byla také stanovena kritická micelární koncentrace, a to fluorescenční metodou i měřením konduktivity, obě tyto metody vedly k velmi podobným výsledkům [49].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie

Tab. 1: Přehled použitých chemikálií pro přípravu kataniontových vezikul

Název (zkratka) chemikálie	Mr (g/mol)	Výrobce	CAS číslo
CTAB	364,45	Sigma-Aldrich	57-09-0
SDS	288,38	Fluka	151-21-3
DODAC	586,64	Alfa Aesar	107-64-2
Cholesterol	386,65	Sigma-Aldrich	57-88-5
Chloroform	119,38	Penta	67-66-3

4.2. Použité metody

4.2.1. Příprava zásobního prášku IPA

Byly připraveny zásobní roztoky navážením potřebného množství tenzidů CTAB a SDS tak, aby po zalití odpovídajícím množstvím deionizované vody byla výsledná koncentrace roztoků 20 mM. Oba roztoky byly přes noc ponechány na magnetické míchačce. Druhý den byly připravené roztoky smíchány v ekvimolárním poměru (1:1), vznikl tak mléčně zakalený roztok, který byl ponechán 3 dny na magnetické míchačce, přitom byla udržována teplota roztoku 30 °C. Roztok byl poté centrifugován 10 minut při 3500 ot/min. Po centrifugaci následovala filtrace za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce přes speciální filtrační papír (Munktell Filter Paper, Grade 391,84 g/m², Ahlstrom-Munksjö), díky kterému nedochází k výraznějšímu znečištění zásobního prášku. Zachycený filtrační koláč – IPA – byl i s filtračním papírem přenesen na Petriho misku a ponechán 3 až 5 dní v sušárně při 50 °C. Poté byl získaný zásobní prášek uskladněn v suché vialce.

4.2.2. Příprava roztoku cIPA

Byl připraven zásobní roztok IPA v chloroformu o výsledné koncentraci 120 mM tak, že potřebné navážené množství zásobního prášku IPA bylo přelito odpovídajícím množstvím chloroformu a ponecháno rozpustit.

Byl připraven zásobní roztok DODAC v chloroformu o stejné výsledné koncentraci jako zásobní roztok IPA. Ze znalosti, že výsledná koncentrace roztoku má být opět 120 mM, bylo navážené příslušné množství DODAC zalito odpovídajícím objemem chloroformu. Roztok byl zamíchán a ponechán rozpustit.

Roztok cIPA, neboli kladně nabitá IPA, je roztok kataniontových párů IPA a dvouřetězcového tenzidu DODAC v molárním poměru 9:1. Ze znalosti, že výsledný roztok má mít objem 60 ml a výslednou koncentraci 2 mM, byly přepočteny objemy zásobních roztoků tenzidů. Pro přípravu 60 ml výsledného roztoku o koncentraci 2 mM v poměru 9:1 IPA/DODAC by bylo potřeba připravit 54 ml 2 mM roztoku IPA v chloroformu a 6 ml 2 mM roztoku DODAC v chloroformu. S přihlédnutím ke koncentraci 120 mM zásobních roztoků IPA a DODAC bylo tedy třeba 0,9 ml zásobního roztoku IPA a 0,1 ml zásobního roztoku DODAC.

4.2.3. Příprava cIPA + cholesterol

Bylo navázeno takové množství cholesterolu, aby po přidání 1 ml připraveného roztoku cIPA byla jeho koncentrace v roztoku 43 mol.%. Roztok byl promíchán a cholesterol ponechán

rozpustit. Poté byly do roztoku přidány skleněné kuličky v množství, aby dno pokryly ve třech řadách. Vzniklý roztok byl i s kuličkami zvortexován, čímž došlo k obalení kuliček tenkým chloroformovým filmem. Poté byl roztok ponechán do druhého dne v digestoři, aby došlo k úplnému odpaření chloroformové fáze.

Kuličky s filmem byly druhý den rehydratovány 60 ml deionizované vody a roztok byl opět zvortexován, aby došlo k úplnému rozpuštění, tím došlo k tvorbě roztoku multilamelárních vezikul. Roztok byl následně sonifikován tyčovým dispergátorem (ultrazvukový homogenizátor Bandelin SONOPULS UW 3200, sonda VS 70/T) při 50 % amplitudě, dokud nebylo dosaženo energie 25 kJ. V průběhu sonifikace došlo k vytvoření malých unilamelárních vezikul a odkalení roztoku. Pro ověření vzniku unilamelárních vezikul byla použita metoda DLS, průměrná velikost vezikul by se měla pohybovat mezi 80 a 100 nm. Zásobní roztok vezikul je nutné skladovat v sušárně při 30 °C kvůli citlivost zejména tenzidu CTAB na teploty nižší než 25 °C, kdy dochází k jeho vysrážení z roztoku.

4.2.4. Příprava koncentrační řady pro měření DLS a ELS

Do vialek bylo napipetováno potřebné množství roztoku vezikul z HTMA-DS a DODAC stabilizovaných 43 mol.% cholesterolu, to bylo ředěno deionizovanou vodou do koncentrační řady vezikuly : deionizovaná voda 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 a 1:9. Pro pozorování chování vezikul při větších zředěních byl roztok vezikul rozředěn také do zředění 1:49, 1:99, 1:149 a 1:199. Každé zředění bylo vždy připravováno do objemu 10 ml. Takto připravené roztoky byly mezi jednotlivými měřeními uchovávány v sušárně při 30 °C.

4.2.5. Příprava roztoků pro měření intenzity fluorescence

Pro měření fluorescence byla připravena kompletní koncentrační sada zmíněná výše, pro detailnější měření bylo navíc přidáno dalších šest vzorků s menší koncentrací vezikul. Takto připravené vzorky byly značeny fluorescenční sondou pyren. Použit byl roztok pyrenu v chloroformu o koncentraci 10^{-4} M, do vialek k jednotlivým vzorkům bylo pipetováno potřebné množství pro dosažení výsledné koncentrace pyrenu ve vzorcích 10^{-6} M. Vzorky byly ponechány do druhého dne v sušárně při 30 °C na třepačce pro účinnější solubilizaci fluorescenční sondy do vezikul.

4.2.6. Vizualní pozorování

Pro vizualní pozorování jednotlivých ředění byly od každého vzorku z připravené koncentrační řady pipetovány 4 ml do označených plastových kyvet, které byly následně překryty parafilmem. Vzorky v kyvetách byly pozorovány v týdenních intervalech po dobu čtyř týdnů, uchovávány byly v sušárně při 30 °C.

4.2.7. Měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla

Měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla bylo provedeno na přístroji ZetaSizer Nano Series, Malvern. U jednotlivých vzorků byla nejdříve měřena velikost přítomných vezikul a následně jejich zeta potenciál, aby bylo zabráněno případným možným kontaminacím či agregacím v důsledku vloženého napětí. Měření bylo u každého vzorku provedeno ihned po přípravě a následně v týdenních intervalech 7., 14., 21. a 28. den. Výsledkem měření velikosti vezikul je hodnota průměrné velikosti, index polydisperzity (PDI, z ang. *polydisperze*

index) a korelační a distribuční křivky. Parametry nastavení přístroje pro měření velikosti a zeta potenciálu jsou uvedeny v níže uvedené tabulce (Tab. 2):

Tab. 2: Nastavení přístroje ZetaSizer pro měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla

Dynamický rozptyl světla – velikost vezikul		Elektroforetický rozptyl světla – zeta potenciál	
Prostředí	Voda	Prostředí	Voda
Kyveta	Skleněná (PCS1115)	Kyveta	Cela pro Zeta
Teplota	25 °C	Teplota	25 °C
Délka jednoho měření	10 s	Model	Smoluchowski
Počet měření		Počet měření	
v jednom opakování	12	v jednom opakování	12 až 20
Počet opakování	3	Počet opakování	5
Pozice měření v kyvetě	1 nm		

4.2.8. Měření fluorescence

Pro měření intenzity fluorescence byl použit spektrofleurimetr FS5, Edinburgh Instrument Ltd., využita byla cela SC-25. Jednotlivé vzorky značené pyrenem byly měřeny v křemenné kyvetě, výsledkem měření jsou emisní a excitační spektra. Nastavené parametry přístroje pro měření jsou shrnuty v níže uvedené tabulce (Tab. 3):

Tab. 3: Nastavení spektrofleurimetru FS5 pro měření intenzity fluorescence

Emisní měření		Excitační měření	
Metoda měření	Emisní spektrum	Metoda měření	Excitační spektrum
Měřené spektrum	360 až 530 nm	Měřené spektrum	310 až 360 nm
Krok vlnové délky	1 nm	Krok vlnové délky	1 nm
Dwell time	0,15 s	Dwell time	0,15 s
	Excitační maximum	338 nm	
	Emisní maximum	394 nm	
	Polarizátory	Žádné	

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Měření dlouhodobé stability

Byla měřena a vyhodnocována stabilita IPA vezikul v rámci jednoho měsíce od přípravy. Měření probíhalo na přístroji ZetaSizer, na kterém byla měřena velikost a zeta potenciál pomocí metod DLS a ELS, z nich následně byla stanovována stabilita vezikul. Pro měření byla připravena koncentrační řada vezikul, konkrétní zředění a koncentrace jednotlivých roztoků jsou uvedeny v Tab. 4.

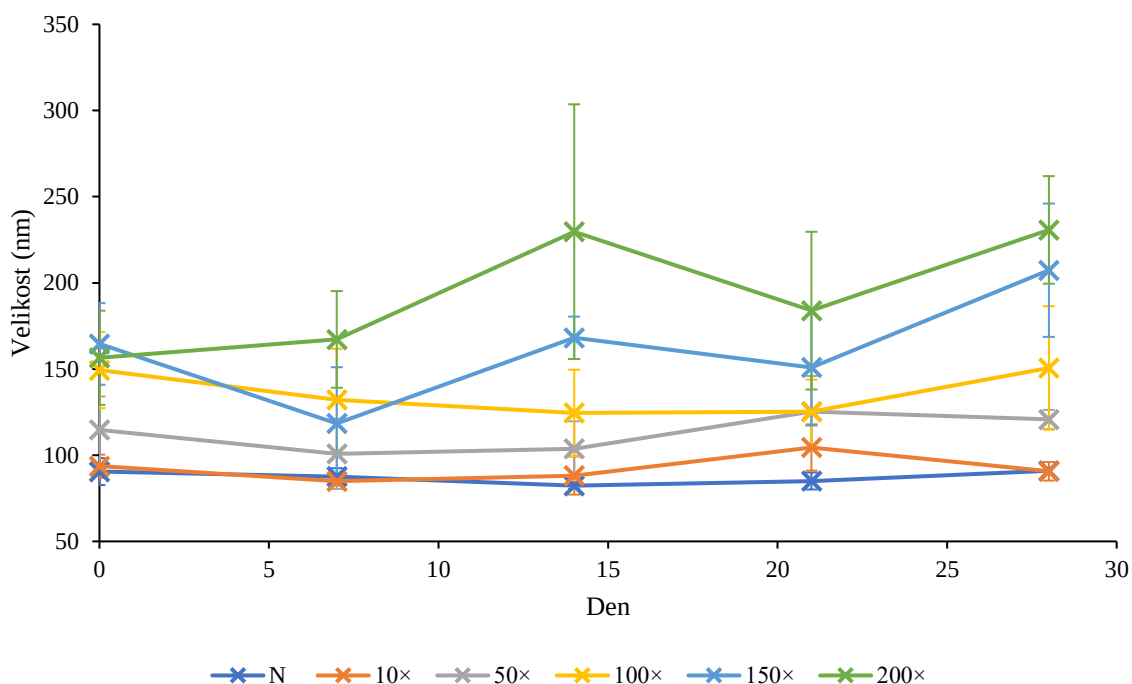
Tab. 4: Přehled jednotlivých ředění (vezikuly:deionizovaná voda) a odpovídající koncentrace připravených roztoků

ŘEDĚNÍ	ZŘEDĚNO	c (mM)
N	0.0×	2,0000
9:1	1.1×	1,8000
8:2	1.3×	1,6000
7:3	1.5×	1,4000
6:4	1.7×	1,2000
5:5	2.0×	1,0000
4:6	2.5×	0,8000
3:7	3.3×	0,6000
2:8	5.0×	0,4000
1:9	10.0×	0,2000
1:49	50.0×	0,0400
1:99	100.0×	0,0200
1:149	150.0×	0,0133
1:199	200.0×	0,0100

5.1.1. Dynamický a elektroforetický rozptyl světla

Připravené roztoky byly proměřovány na přístroji ZetaSizer podle nastavení uvedeného v Tab. 2. U každého vzorku byla sledována velikost vezikul přítomných v roztoku, jejich zeta potenciál a index polydisperzity systému. Pro měření byl roztok použit nezředěný a poté zředěný 10×, 50×, 100×, 150× a 200×, pro získání detailnějších informací o chování systému při ředění bylo použito dalších 8 koncentrací mezi koncentracemi nezředěného roztoku a roztoku 10× zředěného. První měření bylo vždy provedeno v den ředění zásobního roztoku do jednotlivých koncentrací, další měření byla následně prováděna v týdenních intervalech po dobu jednoho měsíce, tedy 7., 14., 21. a 28. den. Všechny naměřené hodnoty včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v přílohách v Tab. 7.

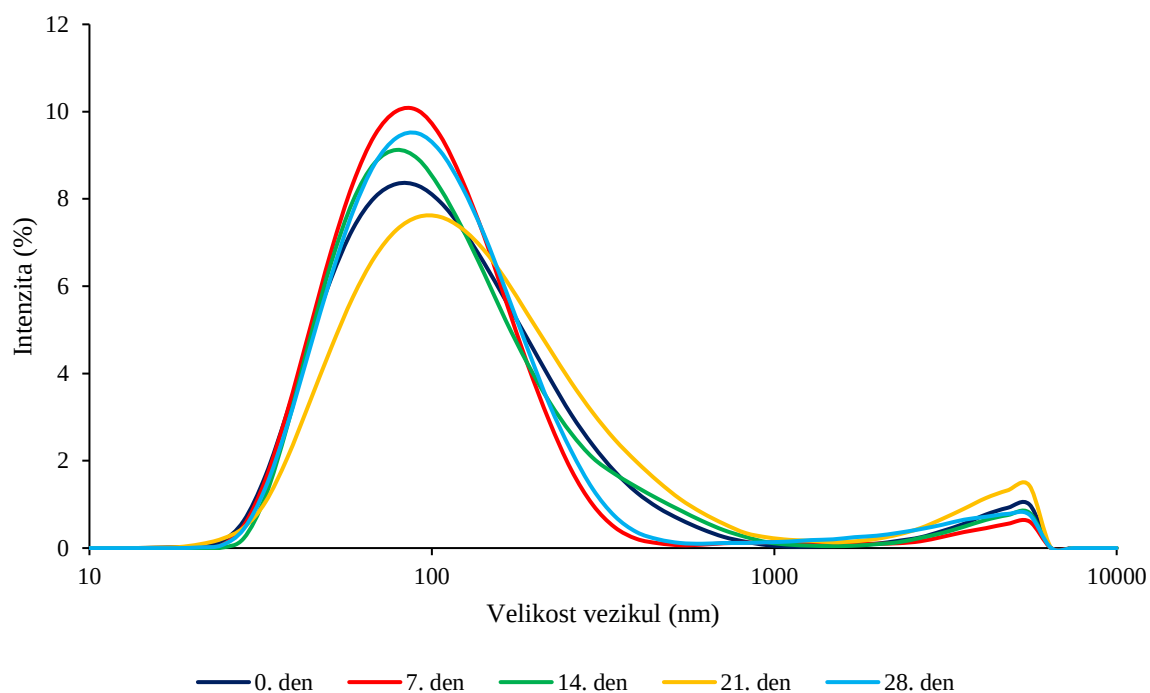
Prvním pozorovaným parametrem byla velikost vezikul, změny velikosti v průběhu měření pro vybrané koncentrace (nezředěný, 10,0×, 50,0×, 100,0×, 150,0× a 200,0× zředěný vzorek) shrnuje Obr. 13. V grafu jsou uvedeny hodnoty Z-average.



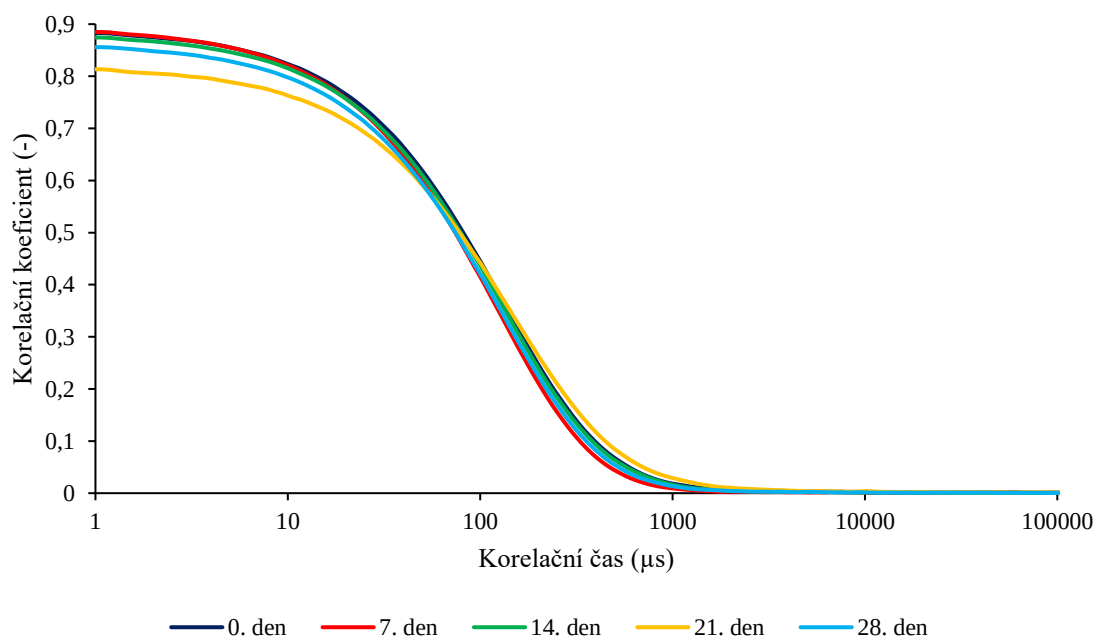
Obr. 13: Změny průměrných hodnot velikostí vezikul (Z-average) v průběhu čtyř týdnů měření pro vybraná ředění vezikul.

V grafu si lze všimnout, že průměrnou velikost vezikul mezi 80 a 100 nm, tedy velikost vezikul po jejich přípravě, udrží v průběhu měsíce pouze nezředěný a 10,0× zředěný vzorek, s výjimkou 21. dne, kde dochází u 10,0× zředěného roztoku k menšímu vychýlení směrem k vyšším hodnotám, při dalším měření průměrná velikost zase klesla. U dalších vzorků je patrné, že se snižující se koncentrací vezikul v roztoku dochází ke zvětšení průměrných hodnot velikosti a s časem k dalším nárůstům hodnot.

Tento nárůst souvisí především s vyššími hodnotami indexu polydisperzity, v roztoku se nachází vezikuly a pravděpodobně další agregáty, které průměrnou hodnotu zvyšují. Naměřené indexy polydisperzity pro jednotlivé koncentrace v měřených dnech jsou shrnuty v Tab. 7 (viz. Přílohy). Nezředěný roztok vezikul vykazoval index polydisperzity po celou dobu měření pod hodnotu 0,3, systém tedy lze pokládat za monodisperzní. To bylo potvrzeno také znázorněním distribučních křivek pro jednotlivé dny měření (viz. Přílohy, Obr. 25). U 10,0× zředěného vzorku dosahují některé hodnoty indexu polydisperzity hodnot menších než 0,4, ale větších než 0,3, dle distribučních křivek lze ale systém stále označit za monodisperzní (Obr. 14). S polydisperzitou systému souvisí také tvar korelačních křivek, monodisperzní systémy mají hladkou esovitou křivku, kterou vzorky této koncentrace jevíly po celou dobu měření, to ukazuje Obr. 15.



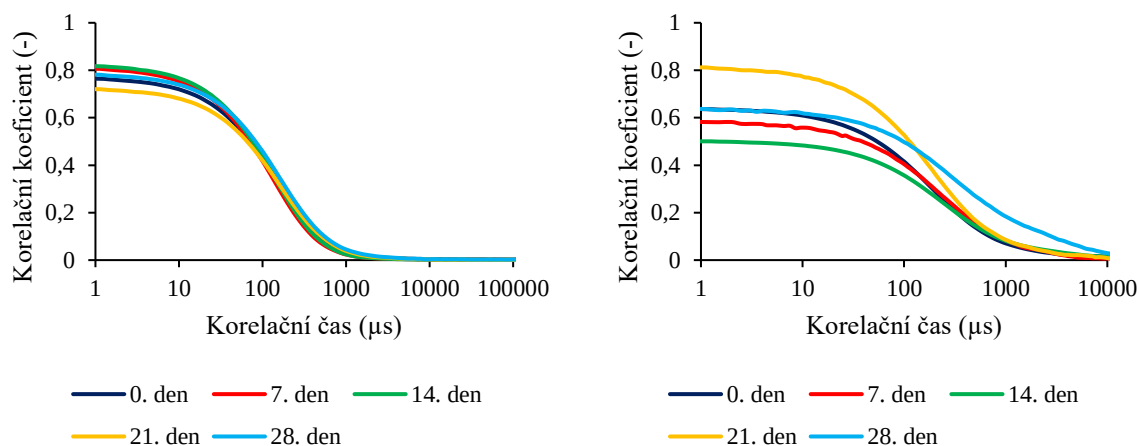
Obr. 14: Distribuční diagram závislosti intenzity na velikosti vezikul $10,0\times$ zředěného vzorku vezikul pro jednotlivé dny měření.



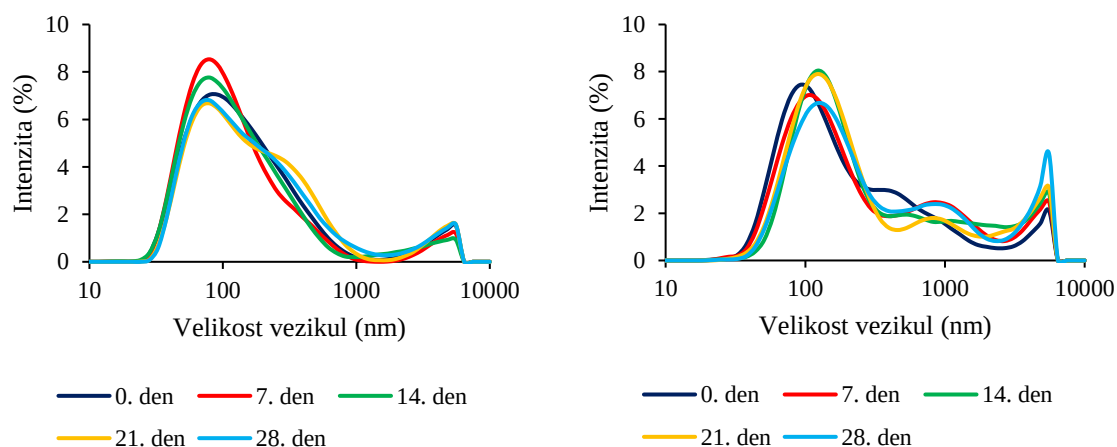
Obr. 15: Závislost korelačního koeficientu na korelačním čase pro $10,0\times$ zředěný vzorek ve všech dnech měření.

Vzorky zředěné $50,0\times$ až $200,0\times$ vykazovaly polydisperzní charakter, jejich indexy polydisperzity se pohybovaly mezi hodnotami 0,3 až 0,6. Polydisperzní charakter systému je také zřejmý z distribučních křivek pro tato zředění a jejich korelačních křivek. Se zmenšující se koncentrací vezikul v roztoku se korelační křivky více protahují a inflexní body se posouvají více k delším časům. Pro $50,0\times$ zředěné vzorky jsou korelační křivky podobné menšímu ředění,

pro $200,0\times$ zředěné roztoky jsou křivky vzájemně odlišné a protažené, jak je znázorněno na Obr. 16. Vyšší polydisperzita systému je také zřejmá z distribučních křivek těchto zředění (Obr. 17). Distribuční a korelační křivky $100,0\times$ a $150,0\times$ zředěných roztoků jsou uvedeny v přílohách, pro $100,0\times$ zředěný vzorek Obr. 26 (korelační diagram) a Obr. 28 (distribuční diagram), pro $150,0\times$ zředěný vzorek Obr. 27 (korelační diagram) a Obr. 29 (distribuční diagram).



Obr. 16: Korelační koeficient v závislosti na korelačním čase pro $50,0\times$ (vlevo) a $200,0\times$ (vpravo) zředěný vzorek ve dnech měření.



Obr. 17: Distribuční diagram závislosti intenzity na velikosti vezikul $50,0\times$ (vlevo) a $200,0\times$ (vpravo) zředěného vzorku pro jednotlivé dny měření.

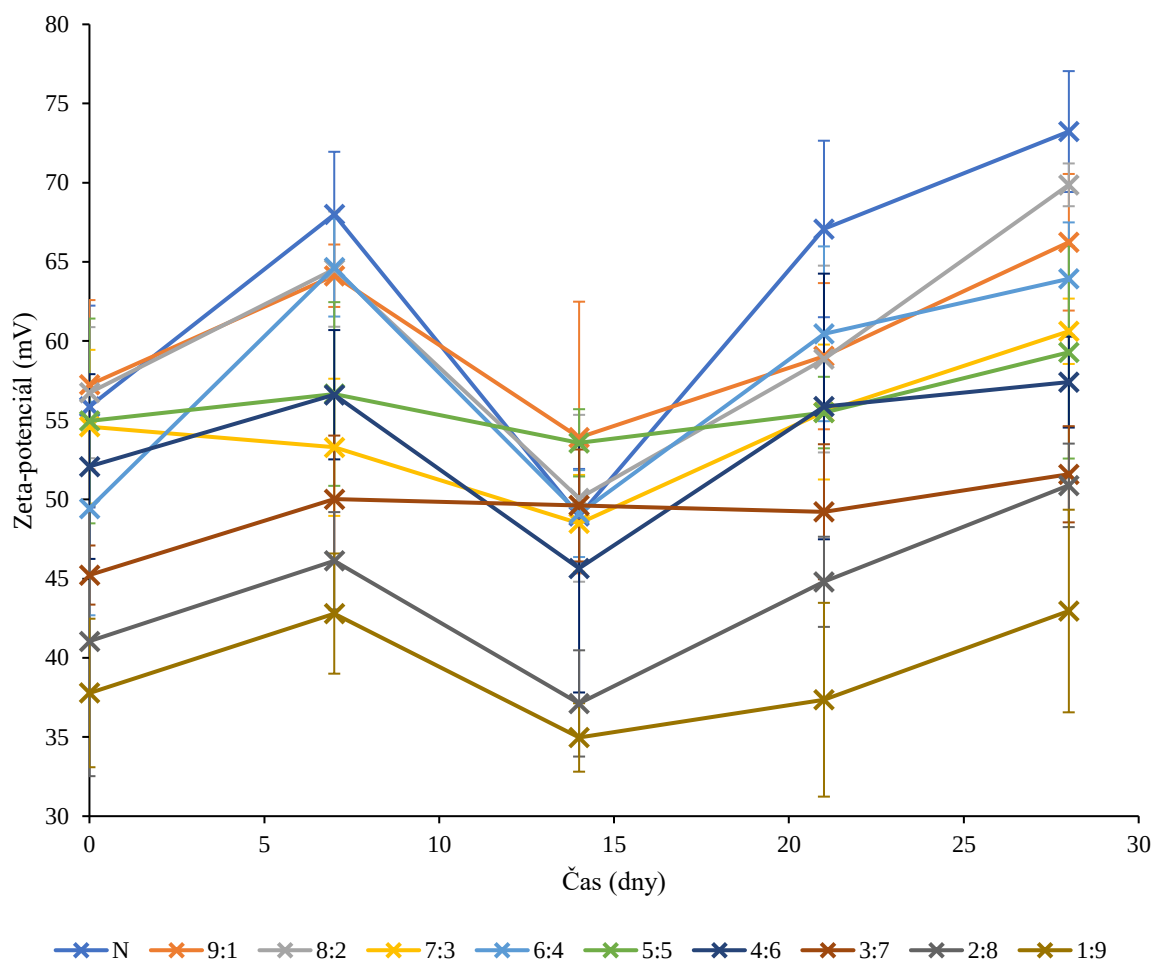
Vysoká polydisperzita je způsobena výskytem několika velikostních frakcí v roztoku. Ty jsou shrnuty v uvedené tabulce (Tab. 5), ve které jsou shrnuty průměrné hodnoty velikostí vezikul při výše zmíněných zředěních a následně nejvíce zastoupené frakce. Menší z frakcí pravděpodobně odpovídá vezikulám přítomným v roztoku, i tak ale dochází ke zvětšování průměrné velikosti s klesající koncentrací vezikul. To může být spojeno s nižší stabilitou vezikul ve více zředěných roztocích a agregací vezikul do větších útvarů.

Tab. 5: Přehled průměrných hodnot velikostí vezikul ve vybraných roztocích a hodnot jednotlivých piků pro polydisperzní vzorky v průběhu měření

DEN	0		7		14	
	21		28			
ZŘEDĚNO	z-avg (nm) d ₁ (nm) d ₂ (nm)		z-avg (nm) d ₁ (nm) d ₂ (nm)		z-avg (nm) d ₁ (nm) d ₂ (nm)	
0,0×	91 ± 8		88 ± 5		82 ± 2	
	85 ± 5		91 ± 3			
10,0×	94 ± 7		85 ± 3		88 ± 11	
	104 ± 13		91 ± 5			
50,0×	115 ± 19		101 ± 20		104 ± 16	
	105 ± 48	430 ± 213	99 ± 1	167 ± 28	100 ± 7	548 ± 97
	125 ± 21		121 ± 6			
100,0×	112 ± 48	332 ± 143	99 ± 28	427 ± 160		
	149 ± 22		132 ± 30		125 ± 25	
	128 ± 10	422 ± 79	110 ± 9	590 ± 187	120 ± 30	498 ± 291
150,0×	125 ± 19		151 ± 36			
	109 ± 30	964 ± 352				
	165 ± 24		118 ± 33		168 ± 12	
200,0×	140 ± 46	612 ± 312	113 ± 5	900 ± 325	143 ± 18	815 ± 152
	151 ± 34		207 ± 39			
	141 ± 21	763 ± 70	165 ± 20	1162 ± 11		
200,0×	157 ± 27		167 ± 28		230 ± 74	
	119 ± 23	601 ± 291	125 ± 17	852 ± 309	149 ± 10	1173 ± 361
	184 ± 46		231 ± 31			
	149 ± 32	883 ± 51	158 ± 6	919 ± 377		

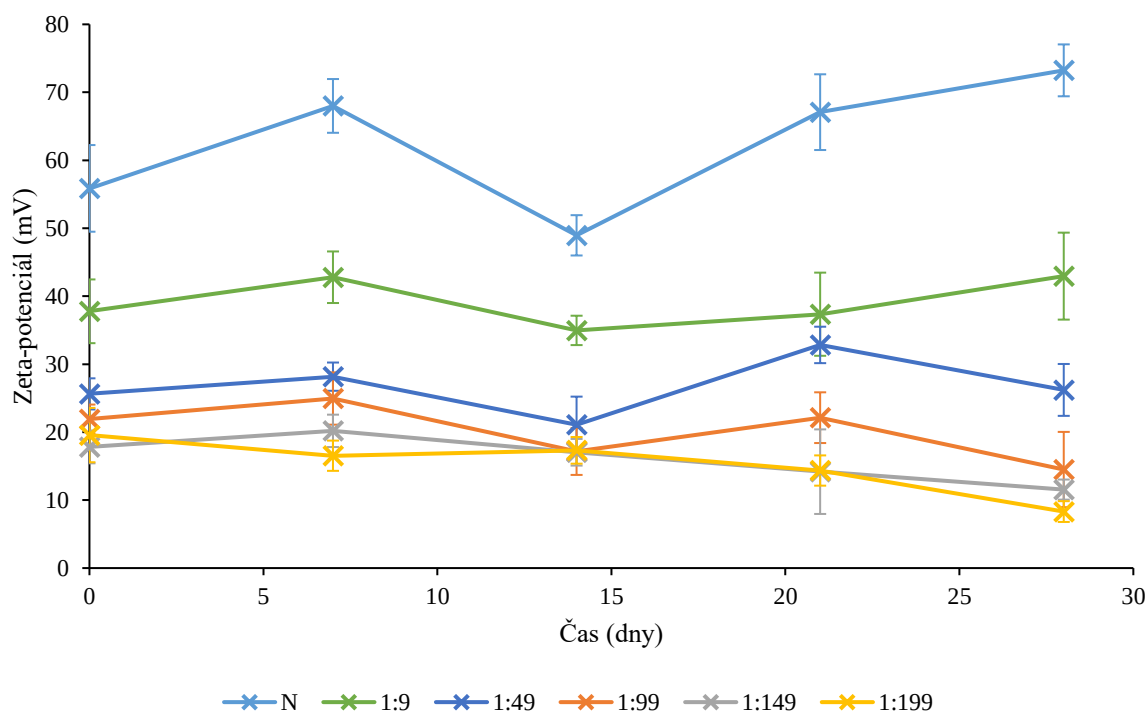
U roztoků s menším zředěním, tedy zředěné 0,0× až 10,0× docházelo k menším velikostním změnám, po celou dobu měření vykazovaly roztoky průměrnou velikost vezikul mezi 80 a 100 nm (s výjimkou 10,0× roztoku, kde byla 21. den naměřena průměrná velikost 104 nm). To znázorňuje Obr. 30 (viz. Přílohy).

Dalším měřeným parametrem pro stanovení stability vezikul je zeta potenciál. Hodnoty zeta potenciálu jsou ovlivněny přidavkem kladně nabitého dvouřetězcového tenzidu DODAC, který udává vezikulám kladný náboj. Stabilita vezikul byla následně hodnocena podle toho, jestli byly hodnoty zeta potenciálu vyšší než +30 mV nebo nižší než -30 mV [29]. Hodnoty zeta potenciálu byly kolísavé, byly zde rozdíly mezi jednotlivými vzorky i mezi jednotlivými měřeními v rámci jednoho vzorku. Na Obr. 18 lze vidět, že nezředěný vzorek a málo zředěné vzorky vezikul se stabilně pohybují v hodnotách zeta potenciálu nad +30 mV a jsou tedy stabilní. U 3,3× až 10,0× zředěných vzorků se vyskytuje trend, že s menší koncentrací vezikul v roztoku dochází ke snížení zeta potenciálu.



Obr. 18: Změny zeta-potenciálu v závislosti na dni měření pro vybrané málo zředěné vzorky.

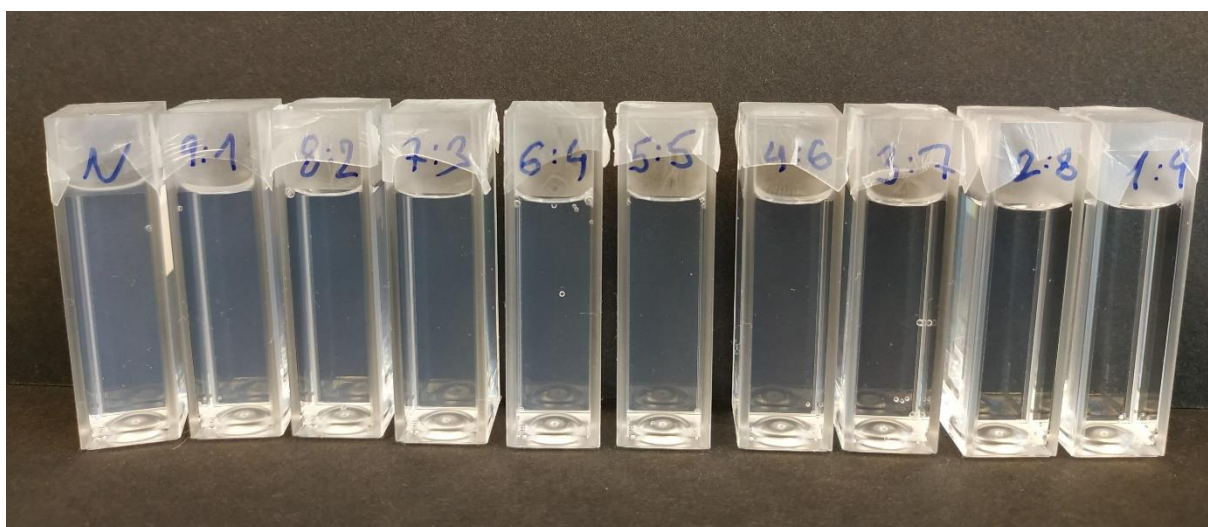
Obr. 19 ukazuje změny zeta potenciálu v průběhu měření pro nezředěný vzorek a pro 10,0× až 200,0× zředěné vzorky. Z těchto vzorků lze jako stabilní označit pouze nezředěný a 10,0× zředěný vzorek, vezikuly ve vzorcích s větším zředěním se chovají nestabilně, jejich zeta potenciál se pohybuje v hodnotách pod +30 mV. Nízké hodnoty zeta potenciálu mohou mít za následek destabilizaci systému a způsobovat agregaci vezikul do větších agregátů. Lze také pozorovat, že s klesajícím zeta potenciálem roztoků vezikul těchto nižších koncentrací se zvyšuje průměrná velikost přítomných vezikul.



Obr. 19: Závislost zeta-potenciálu na dni měření pro nezředěný vzorek a více zředěné vzorky vezikul.

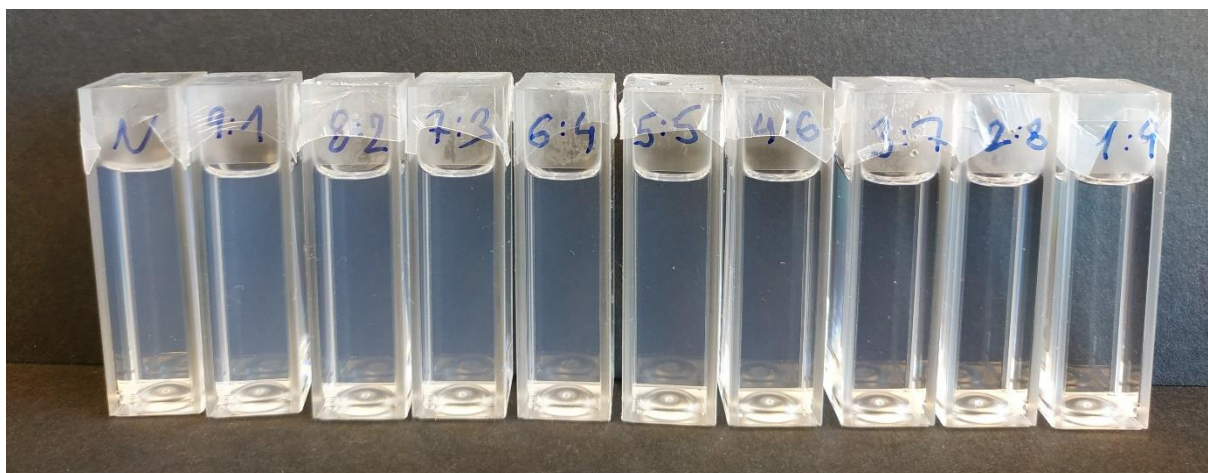
5.1.2. Vizuální pozorování stability roztoků vezikul v čase

V rámci hodnocení stability vezikulárních systémů bylo také provedeno vizuální pozorování roztoků. Část vzorků sledované koncentrační řady byla odpipetována do plastových označených kyvet, zbylá část byla použita pro měření průměrné velikosti vezikul a jejich zeta potenciálu, byla tak také ověřena správnost přípravy. Vzorky byly následně sledovány v týdenních intervalech, bylo pozorováno, jestli dojde ke vzniku sraženiny v roztoku. Nezředěný vzorek vezikul jeví mírně opaleskující vzhled, který s větším zředěním ustupuje a roztok se stává průhlednějším. Vzorky od nezředěného po 10,0× zředěný hned po přípravě lze vidět na Obr. 20.



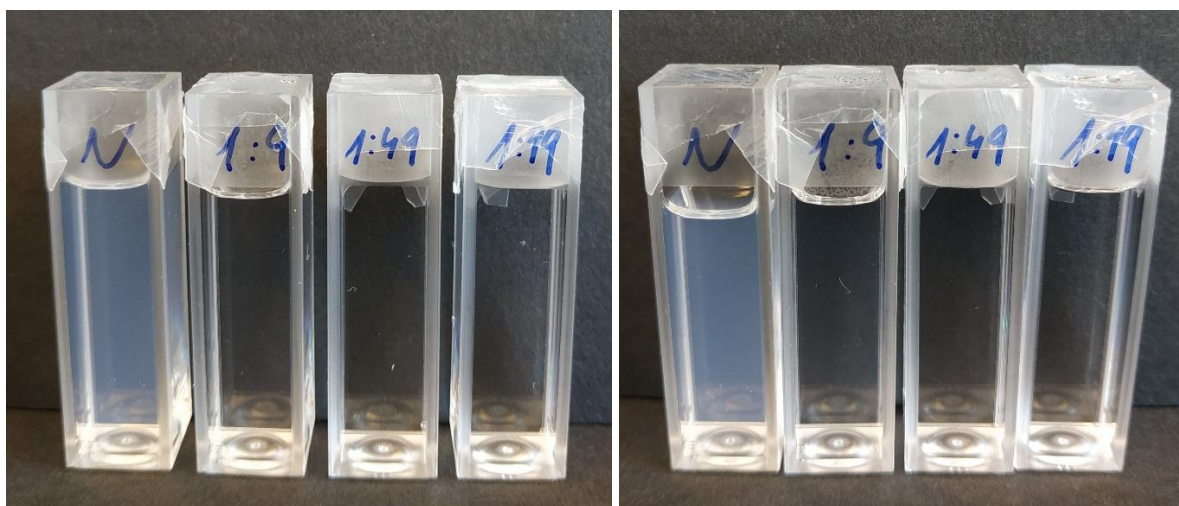
Obr. 20: Nezředěný až 10,0× zředěný vzorek vezikul v den přípravy.

Na vzorcích nebyly v průběhu měsíce pozorovány výrazné změny, nedocházelo ke vzniku sraženin ani sedimentaci agregátů, tato koncentrační řada na konci pozorování je znázorněna na Obr. 21.



Obr. 21: Vzorky vezikul 28. den pozorování (nezředěný až $10,0\times$ zředěný).

Ostatní dny jsou uvedeny v přílohách, pozorování po 7 dnech na Obr. 31, po 14 dnech na Obr. 32 a po 21 dnech na Obr. 33. $10,0\times$ zředěný roztok už byl velmi průhledný, téměř bez zákalu, z větších zředění byly následně pozorovány pouze $50,0\times$ a $100,0\times$ zředěný roztok vezikul, protože při těchto zředěních byla již koncentrace vezikul ve vzorku příliš malá a vizuálně se jednalo téměř o deionizovanou vodu, kterou byly vezikuly ředěny. Vzhledem k tomu, že nebyly pozorovány žádné změny v průběhu 28 dnů u vzorků s vyšší koncentrací vezikul, byla větší zředění sledována ve čtrnáctidenních intervalech, pozorování po 14 dnech zachycuje Obr. 34 v přílohách. Tato dvě zředění a nezředěný a $10,0\times$ vzorek pro srovnání změn vzhledu hned po přípravě a následně po 28 dnech ukazuje Obr. 22.



Obr. 22: Pozorované vzorky vezikul (nezředěný, $10,0\times$, a z větších zředění $50,0\times$ a $100,0\times$ zředěný) v den přípravy (vlevo) a 28. den pozorování (vpravo).

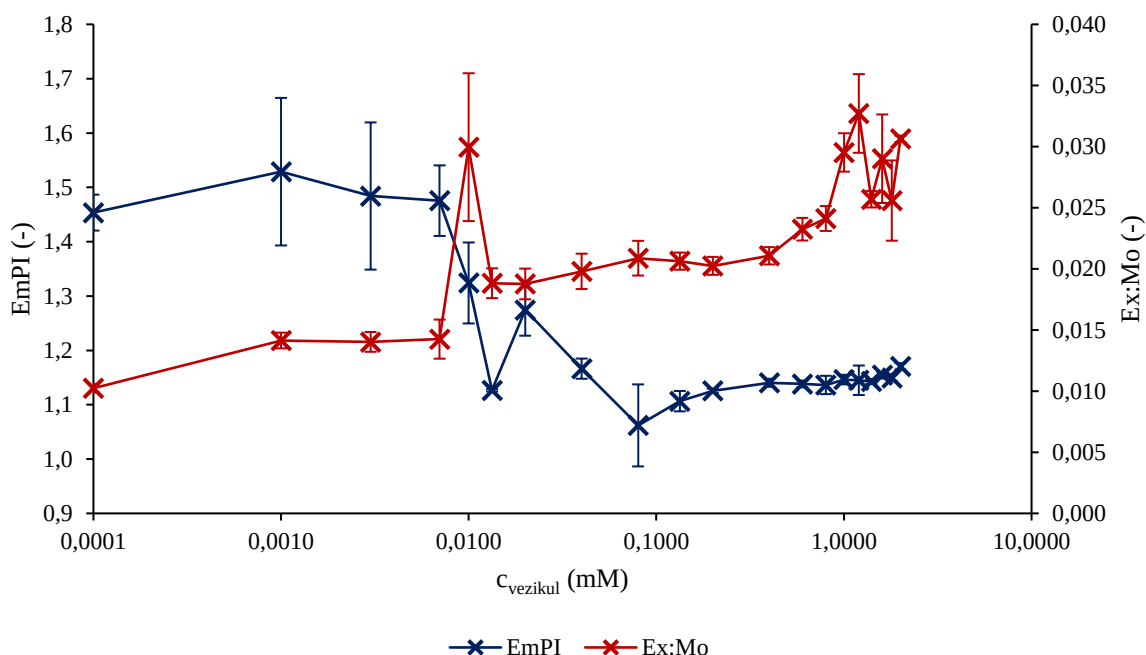
5.2. Pozorování agregačního chování systému při změnách jeho koncentrace

V rámci práce bylo také pozorováno, jak se systém chová při různých koncentracích vezikul přítomných v roztoku. Pro měření byla využita metoda fluorescenční spektroskopie za použití fluorescenční sondy pyren. Byla využita koncentrační řada z měření dynamického a elektroforetického rozptylu světla rozšířená o dalších šest vzorků, jejichž ředění a koncentrace jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Přehled jednotlivých ředění (vezikuly:deionizovaná voda) a odpovídající koncentrace vzorků přidanych pro fluorescenční měření

ŘEDĚNÍ	ZŘEDĚNO	c (mM)
N	0.0×	2,0000
9:1	1.1×	1,8000
8:2	1.3×	1,6000
7:3	1.5×	1,4000
6:4	1.7×	1,2000
5:5	2.0×	1,0000
4:6	2.5×	0,8000
3:7	3.3×	0,6000
2:8	5.0×	0,4000
1:9	10.0×	0,2000
1:14	15,0×	0,1333
1:24	25,0×	0,0800
1:49	50.0×	0,0400
1:99	100.0×	0,0200
1:149	150.0×	0,0133
1:199	200.0×	0,0100
1:285	286,0×	0,0070
1:666	667,0×	0,0030
1:1999	2000,0×	0,0010
1:19999	20000,0×	0,0001

Ke vzorkům z připravené koncentrační řady byla přidána sonda pyren a vzorky byly ponechány do druhého dne na třepačce, následně byly roztoky změřeny ve spektrofluorimetru Edinburgh podle nastavení uvedeného v Tab. 3. Měření bylo provedeno jednorázově, nebyly zde sledované změny v čase. Z naměřených dat byly vypočítány polaritní indexy, pro excitační polaritní index (ExPI) byl použit poměr intenzit při vlnových délkách 333 a 338 nm, emisní polaritní index (EmPI) byl spočítán jako poměr intenzit prvního a třetího píku, kdy maximum prvního píku se pohybovalo mezi 372 a 374 nm a maximum třetího píku mezi 383 a 385 nm. Dále byl určen poměr Ex:Mo, vlnová délka, při níž byl detekován excimer, je 470 nm. Graf závislosti EmPI a Ex:Mo na koncentraci vezikul v roztoku je uveden na Obr. 23, osa udávající koncentraci vezikul je znázorněna v logaritmickém měřítku.



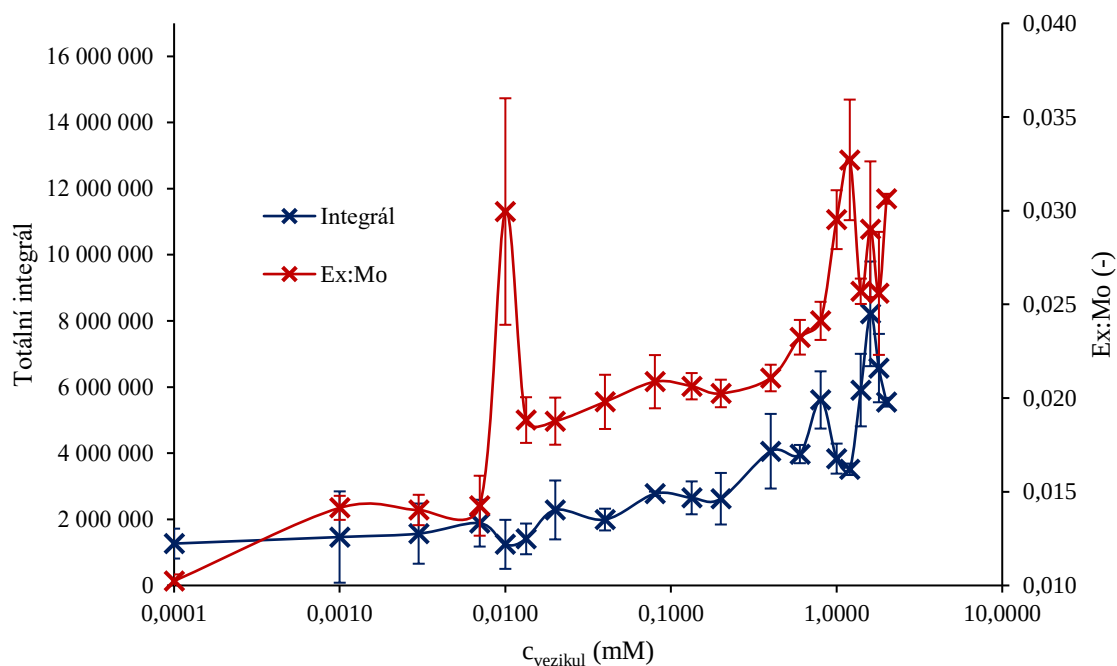
Obr. 23: Závislost $EmPI$ (modrá křivka) a poměru $Ex:Mo$ (červená křivka) na koncentraci vezikul.

V grafu lze vidět, že při nízkých koncentracích vezikul v roztocích je prostředí polární, tenzidy tvoří pravé roztoky nebo se vyskytují na rozhraní, se zvyšující se koncentrací se začínají formovat agregáty/pravé micely a $EmPI$ postupně klesá, u vyšších koncentrací je závislost emisního polaritního indexu na koncentraci v rámci odchylek téměř konstantní, při těchto koncentracích dochází k nárůstu počtu agregátů/vezikul. Určitou odchylku lze pozorovat u vzorků, které jsou $100,0\times$ a $150,0\times$ zředěny. Dochází zde k opětovnému nárůstu poměru prvního a třetího píku, polarita mikroprostředí kolem molekul pyrenu mírně narůstá, je tedy více volných molekul pyrenu ve vodném prostředí oproti okolním koncentracím. Při vyšších koncentracích už je pyren enkapsulován uvnitř vezikul.

Naopak závislost poměru $Ex:Mo$ se při nízkých koncentracích pohybuje v malých hodnotách, v oblasti poklesu hodnot $EmPI$ dochází ke zvyšování tohoto poměru, k nárůstu dochází v důsledku tvorby agregátů/vezikul. Tento nárůst je zatížen určitou chybou, i při jejím zohlednění však dochází k nárůstu hodnot tohoto poměru. S rostoucí koncentrací je závislost téměř konstantní, při vysokých koncentracích vezikul v roztocích dochází ke změnám hodnot poměru $Ex:Mo$, při vysokých koncentracích byla ale prokázána stabilita systému v rámci předchozího měření, vezikuly by se neměly rozpadat ani mezi sebou agregovat, pravděpodobně se tedy jedná o chybu měření. Byla také vynesena závislost $EmPI$ a $ExPI$ na koncentraci vezikul přítomných v roztoku, tuto závislost ukazuje Obr. 35 (viz. Přílohy). Z grafu lze vidět, že obě závislosti mají velmi podobný průběh. Závislost $ExPI$ tvoří pěknou esovitou křivku, u závislosti $EmPI$ se vyskytují odchylky do hladkého esovitého průběhu.

Byla také vynesena závislost totálního integrálu intenzity fluorescence na koncentraci roztoku vezikul (viz. Obr. 24), do grafu byla také přidána závislost poměru $Ex:Mo$ na koncentraci. V grafu lze vidět, že při nízkých koncentracích je intenzita fluorescence téměř konstantní, při koncentraci $0,01 \text{ mM}$ dochází k jejímu poklesu a zároveň růstu křivky závislosti poměru

Ex:Mo na koncentraci, její lokální maximum odpovídá při téže koncentraci vzorku minimu na křivce intenzity. Dochází tedy k tvorbě excimeru, který způsobuje zhášení fluorescence, a tedy pokles intenzity. Křivky poté pokračují vzájemně rovnoběžně a od bodu 0,2 dochází opět k růstu koncentrace excimeru, nejvyšší nárůst je při koncentraci 1 mM, kdy by mohlo opět docházet k poklesu intenzity fluorescence v důsledku zhášení. Celkově lze říct, že intenzita fluorescence s rostoucí koncentrací narůstá velmi pozvolna.



Obr. 24: Závislost hodnoty totálního integrálu (modrá křivka) a poměru Ex:Mo (červená křivka) na koncentraci vezikul.

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zaměřuje na pozorování stability vezikulárních systémů při postupném ředění. Byl použit vezikulární systém připravený z tenzidů CTAB a SDS s odstraněnými protiiionty, vezikuly byly stabilizovány přidavkem dvouřetězcového tenzidu DODAC a cholesterolu v koncentraci 43 mol.%. Stabilita byla vyhodnocována na připravené koncentrační řadě na základě měření průměrné velikosti metodou DLS, zeta potenciálu metodou ELS a vizuálním pozorováním. Vzorky byly ředěny deionizovanou vodou. Dále bylo sledováno agregační chování systému ve větším koncentračním rozsahu metodou fluorescenční spektroskopie s použitím sondy pyren.

Průměrná velikost připravených vezikul by se měla pohybovat mezi 80 a 100 nm, takto připravené vezikuly o koncentraci 2,0 mM by při neměnné koncentraci měly zůstat stabilní i po dobu několika měsíců. To bylo také ověřeno v rámci měření, které probíhalo po dobu čtyř týdnů v týdenních intervalech, první měření bylo provedeno v den přípravy, následně byly vzorky měřeny 7., 14., 21. a 28. den. Nežředěný vzorek vezikul vykazoval malé rozdíly při jednotlivých měřeních. Podobně tomu také bylo při vyšších koncentracích vzorků, konkrétně 1,8; 1,6; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6 a 0,4 mM. U těchto vzorků nedocházelo k vychýlení z intervalu velikostí, které mají nežředěné vezikuly. U desetkrát zředěného vzorku o koncentraci 0,2 mM došlo ke zvýšení hodnoty průměrné velikosti nad 100 nm, a to při měření 21. den od přípravy vzorku, o týden později byla ale velikost opět v rámci intervalu jako méně zředěné vzorky.

Rozdílné a zároveň vyšší hodnoty průměrné velikosti byly pozorovány u čtyř vzorků o menší koncentraci, konkrétně 0,040; 0,020; 0,013 a 0,010 mM. U těchto vzorků byla naměřená vyšší průměrná velikost vezikul již v den přípravy roztoků, v průběhu dalších týdnů docházelo u koncentrací 0,040 a 0,020 mM k menším odchylkám od hodnoty průměrné velikosti v den přípravy, naopak při koncentracích 0,013 a 0,010 mM docházelo ke změnám průměrných hodnot a i jejímu nárůstu. Se snižující se koncentrací vezikul v roztoku docházelo ke zvyšování indexu polydisperzity, i při zohlednění několika velikostních frakcí v roztoku byla ale naměřená velikost vezikul vyšší.

Druhým parametrem stability vezikul je jejich zeta potenciál, který byl měřen na stejné koncentrační řadě. Aby mohly být vezikuly považovány za stabilní, musí dosahovat potenciálu vyššího než +30 mV, tuto podmínku splňovaly po celou dobu měření vzorky až do desetinásobného zředění, čtyři nejmenší koncentrace připravené řady vykazovaly snížení pod tuto hranici a mírný pokles v průběhu čtyř týdnů měření. Nižší hodnoty zeta potenciálu mohou souviset s destabilizací systému a možnou agregací do větších útvarů. Z naměřených hodnot je patrné, že snižování zeta potenciálu probíhá za současného zvyšování průměrné velikosti vezikul.

Bylo také provedeno vizuální pozorování stability systému. Použita byla měřená koncentrační řada vyjma dvou nejmenších koncentrací, pozorována byla v týdenních intervalech po dobu měření. Roztok vezikul je po přípravě opalescentní, tento vzhled ustupuje se zvyšujícím se zředěním, roztoky se stávají více průhlednými a čirými, větší zředění se svým vzhledem

podobají deionizované vodě. V rámci čtyř týdnů, kdy byly vzorky pozorovány, nebyly zaznamenány změny vzhledu, nedocházelo k viditelné agregaci a sedimentaci sraženin.

V rámci pozorování agregačního chování systému byla připravena dříve zmíněná koncentrační řada rozšířená o dalších šest vzorků pro větší rozsah koncentrací. Následně byla sledována závislost EmPI, ExPI, poměru Ex:Mo a totálního integrálu na koncentraci vezikul. Závislost ExPI na koncentraci vytváří hladkou esovitou křivku, závislost EmPI tvoří podobný tvar, u koncentrací 0,020 a 0,013 mM došlo k vychýlení z esovitého tvaru a hodnoty narostly, pravděpodobně došlo ke změnám v agregaci. Další sledovanou závislostí byl poměr Ex:Mo na koncentraci vezikul. Ta vykazovala nízké hodnoty, v bodě poklesu křivky EmPI začala růst, v místě prvního nárůstu jsou tvořeny agregáty, křivka dále pokračovala téměř rovnoběžně s osou, při vysokých koncentracích hodnoty poměru Ex:Mo opět narůstají, což spojujeme s chybou měření. Poslední vykreslenou závislostí je totální integrál na koncentraci, který ukazuje změnu intenzity fluorescence, při nárůstu křivky Ex:Mo a tedy nárůstu excimeru je intenzita fluorescence na minimu, protože dochází k jejímu zhášení, následně dochází k pozvolnému lineárnímu nárůstu.

7. LITERATURA

- [1] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: VŠCHT, 2008. ISBN: 978-80-7080-674-6.
- [2] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Praha: VŠCHT, 2018. ISBN: 978-80-7080-745-3.
- [3] GHOSH, S., A. RAY a N. PRAMANIK. Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. Inflow: Biophysical Chemistry [online]. 2020, 265 (106429) [cit. 2022-01-30]. ISSN: 0301-4622. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030146222030137X>.
- [4] ŠMIDRKAL, Jan. Tensides and detergents today. Inflow: Chemické listy [online]. 1999, 93 (7), 421-427 [cit. 2022-01-30]. ISSN: 0009-2770. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000081770300005>.
- [5] MULLIGAN, Catherine N. Environmental applications for biosurfactants. Inflow: Environmental Pollution [online]. 2005, 133 (2), 183-198 [cit. 2022-01-30]. ISSN: 0269-7491. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749104002702?casa_token=9UvGvOc52VwAAAAA:iYhvWDzzRjDJAXvnaeVEeDql73H6ZBFydCgUc-AOtNZi5Sp-QKthlD_5PEIU8Zdnp1_h2UyOfw.
- [6] RAJIV, Kohli a K. L. MITTAL. Preface. Inflow: Surfactants in Precision Cleaning [online]. 2022, 15-18 [cit. 2022-01-30]. ISBN: 978-0-12-822216-4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128222164000148>.
- [7] LUKÁČ, M., M. MRVA, M. GARAJOVÁ, G. MOJŽISOVÁ, L. VARINSKÁ, J. MOJŽIŠ, M. SABOL, J. KUBINCOVÁ, H. HARAGOVÁ, F. ONDRISKA a F. DEVÍNSKY. Synthesis, self-aggregation and biological properties of alkylphosphocholine and alkylphosphohomocholine derivatives of cetyltrimethylammonium bromide, cetylpyridinium bromide, benzalkonium bromide (C16) and benzethonium chloride. Inflow: European Journal of Medicinal Chemistry [online]. 2013, 66, 46-55 [cit. 2022-02-01]. ISSN: 0223-5234. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523413003425>.
- [8] GAO, Y., W. ZHAO a D. ZHANG. Preparation of prismatic g-C₃N₄ by CTAB hydrothermal method and its degradation performance under visible light. Inflow: Diamond and Related Materials [online]. 2022, 121(108787) [cit. 2022-02-04]. ISSN: 0925-9635. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925963521005501>.
- [9] SIVARAMAKRISHNA, D., M. D. PRASAD a M. J. SWAMY. A homologous series of apoptosis-inducing N-acylserinols: Thermotropic phase behavior, interaction with cholesterol and characterization of cationic N-myristoylserinol-cholesterol-CTAB niosomes. Inflow: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes [online]. 2019, 1861 (2), 504-513 [cit. 2022-02-03]. ISSN: 0005-2736. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273618303523>.

- [10] ZAINUDDIN, N., I. AHMAD, M. H. ZULFAKAR, H. KARGARZADEH a S. RAMLI. Cetyltrimethylammonium bromide – nanocrystalline cellulose (CTAB-NCC) based microemulsions for enhancement of topical delivery of curcumin. Inflow: Carbohydrate Polymers [online]. 2021, 254 (117401) [cit. 2022-02-01]. ISSN: 0144-8617. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720315745>.
- [11] LIANG, Y., H. CHU, M.-Z. GUO, Y. ZENG, Z. ZHU a L. JIANG. CTAB-assisted electrodeposition of Cu coating on hardened cement paste for controlling microbial induced concrete corrosion. Inflow: Construction and Building Materials [online]. 2021, 304 (124605) [cit. 2022-02-01]. ISSN: 0950-0618. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950061821023606>.
- [12] FAISAL, A. A. H., Z. K. RAMADHAN, N. AL-ANSARI, G. SHARMA, M. NAUSHAD a CH. BATHULA. Precipitation of (Mg/Fe-CTAB) – Layered double hydroxide nanoparticles onto sewage sludge for producing novel sorbent to remove Congo red and methylene blue dyes from aqueous environment. Inflow: Chemosphere [online]. 2022, 291 (1,132693) [cit. 2022-02-05]. ISSN: 0045-6535. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653521031659>.
- [13] WANG, J., D. LU, Y. LIN a Z. LIU. How CTAB assists the refolding of native and recombinant lysozyme. Inflow: Biochemical Engineering Journal [online]. 2005, 24 (3), 269-277 [cit. 2022-02-01]. ISSN: 1369-703X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X05000720>.
- [14] HOQUE, M. A., M. A. RUB, M. M. RAHMAN, M. A. KHAN, D. KUMAR a A. M. ASIRI. Micellization, interaction and thermodynamics behavior of BSA + SDS mixture in aqua-organic mixed solvent: Influences of temperature and solvent composition. Inflow: Journal of Molecular Liquids [online]. 2021, 344 (117770) [cit. 2022-02-06]. ISSN: 0167-7322. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732221024958>.
- [15] CHEMICAL BOOK. *Chemicalbook.com* [online]. ©2017 [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2147453.htm.
- [16] KOUNDAL, M., A. K. SINGH a CH. SHARMA. Study on the effect of imidazolium ionic liquid as a modulator of corrosion inhibition of anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS) on mild steel in sodium chloride solution. Inflow: Journal of Molecular Liquids [online]. 2022, 350 (118561) [cit. 2022-02-05]. ISSN: 0167-7322. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732222000964>.
- [17] TAYLOR, D. M., Y. DONG a C. C. JONES. Characterization of monolayers and LB multilayers of dioctadecyldimethylammonium chloride. Inflow: Thin Solid Films [online]. 1996, 284-285, 130-133 [cit. 2022-02-03]. ISSN: 0040-6090. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609095082883?via%3Dihub>.

- [18] OLIVEIRA, A. C. N., J. FERNANDES, A. GONCALVES, A. C. GOMES. a M. E. C. D. R. OLIVEIRA. Lipid-based Nanocarriers for siRNA Delivery: Challenges, Strategies and the Lessons Learned from the DODAX: MO Liposomal System. Inflow: Current Drug Targets [online]. 2019, 20 (1), 29-50 [cit. 2022-02-01]. ISSN: 1389-4501. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000456747800003>.
- [19] FEITOSA, E. a F. R. ALVES. The role of counterion on the thermotropic phase behavior of DODAB and DODAC vesicles. Inflow: Chemistry and Physics of Lipids [online]. 2008, 156 (1-2), 13-16 [cit. 2022-02-03]. ISSN: 0009-3084. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308408003368>.
- [20] FEITOSA, E., F. R. ALVES, E. M. S. CASTANHEIRA a M. E. C. D. R. OLIVEIRA. DODAB and DODAC bilayer-like aggregates in the micromolar surfactant concentration domain. Inflow: Colloid and Polymer Science [online]. 2009, 287 (5), 591-599 [cit. 2022-02-04]. ISSN: 0303-402X. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000265382800011>.
- [21] LARGE, D. E., R. G. ABDELMESSIH, E. A. FINK a D. T. AUGUSTE. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. Inflow: Advanced Drug Delivery Reviews [online]. 2021, 176 (113851) [cit. 2022-02-01]. ISSN: 0169-409X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X2100243X>.
- [22] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie, koloidy a nanosvět kolem nás*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2014. ISBN: 978-80-7290-758-8.
- [23] FALCONE, R. D., N. M. CORREA a J. J. SILBER. Amphiphilic ionic liquids as sustainable components to formulate promising vesicles to be used in nanomedicine. Inflow: Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry [online]. 2020, 26 (100382) [cit. 2022-02-01]. ISSN: 2452-2236. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452223620300717>.
- [24] MÜLLEROVÁ, M., M. ŠVÁB a M. M. DOS SANTOS. Měření kritických micelárních koncentrací tenzidů ve vodných roztocích. Inflow: Chemické listy [online]. 2007, 101, 509-514 [cit. 2022-02-04]. ISSN: 0009-2770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1784/1784>.
- [25] KOBIERSKI, J., A. WNETRZAK, A. CHACHAJ-BREKEISZ a P. DYNAROWICZ-LATKA. Predicting the packing parameter for lipids in monolayers with the use of molecular dynamics. Inflow: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2022, 211 (112298) [cit. 2022-02-09]. ISSN: 0927-7765. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777652100744X>.
- [26] PATRA, N., A. MAL, A. DEY a S. GHOSH. Influence of solvent, electrolytes, β -CD, OTAB on the krafft temperature and aggregation of sodium tetradecyl sulfate. Inflow: Journal of Molecular Liquids [online]. 2019, 280, 307-313 [cit. 2022-02-13]. ISSN: 0167-7322. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732218352127>.

- [27] KUO, AN-TSUNG a CHIEN-HSIANG CHANG. Recent Strategies in the Development of Catanionic Vesicles. Inflow: Journal of Oleo Science [online]. 2016, 65 (5), 377-384 [cit. 2022-02-09]. ISSN: 1347-3352. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/65/5/65_ess15249/article.
- [28] HAO, JINGCHENG a HEINZ HOFFMANN. Self-assembled structures in excess and salt-free catanionic surfactant solutions. Inflow: Current Opinion in Colloid & Interface Science [online]. 2004, 9 (3-4), 279-293 [cit. 2022-02-05]. ISSN: 1359-0294. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029404000585?casa_token=sPuB1c1W-JQAAAAA:Gmj1FUjM0xH1YWFDSBP269JGY8cXVPWr2d9l8ujkFBbYtqJuyFK0jDXa5cH8TPdgNKQ5sfppEQ.
- [29] HAVLÍKOVÁ, M., A. JUGL, J. KROUSKÁ, J. SZABOVÁ, L. MRAVCOVÁ, T. VENEROVÁ, CH.-H. CHANG, M. PEKAŘ a F. MRAVEC. Interactions between Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles and Hyaluronan – A Physicochemical Study. Inflow: Langmuir [online]. 2021, 37 (28), 8525-8533 [cit. 2022-02-03]. ISSN: 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.langmuir.1c00993>.
- [30] HAVLÍKOVÁ, M., J. SZABOVÁ, L. MRAVCOVÁ, T. VENEROVÁ, CH.-H. CHANG, M. PEKAŘ, A. JUGL a F. MRAVEC. Cholesterol Effect on Membrane Properties of Cationic Ion Pair Amphiphile Vesicles at Different Temperatures. Inflow: Langmuir [online]. 2021, 37 (7), 2436-2444 [cit. 2022-02-01]. ISSN: 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs-acsc-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1021/acs.langmuir.0c03504>.
- [31] JOVANOVIĆ, A. A., B. D. BALANČ, A. OTA, P. A. GRABNAR, V. B. DJORDJEVIĆ, K. P. ŠAVIKIN, B. M. BUGARSKI, V. A. NEDOVIĆ a N. P. ULRICH. Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. Inflow: European Journal of Lipid Science and Technology [online]. 2018, 120 (9) [cit. 2022-01-31]. ISSN: 1438-9312. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejlt.201800039?saml_referrer.
- [32] RÓG, T., M. PASENKIEWICZ-GIERULA, I. VATTULAINEN a M. KARTTUNEN. Ordering effects of cholesterol and its analogues. Inflow: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes [online]. 2009, 1788 (1), 97-121 [cit. 2022-02-01]. ISSN: 0005-2736. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0005273608002721>.
- [33] ACHARJEE, A., A. RAKSHIT, S. CHOWDHURY a B. SAHA. Micelle catalysed conversion of ‘on water’ reactions into ‘in water’ one. Inflow: Journal of Molecular Liquids [online]. 2021, 321 (114897) [cit. 2022-02-16]. ISSN: 0167-7322. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732220371397>.

- [34] LEE, CH.-H., Y.-M. YANG, K.-L. LEU, H.-Y. LIN, CH.-H. LIANG a CH.-H. CHANG. Exploring physical stability characteristics of positively charged catanionic vesicle/DNA complexes. Inflow: Colloid and Polymer Science [online]. 2015, 293, 2239-2247 [cit. 2022-02-27]. ISSN: 1435-1536. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00396-015-3608-6>.
- [35] WANG, LINGLING a HEFA CHENG. Principles and application of laser light scattering (LLS) in characterization of the spatial configuration of microbial products in aqueous solution. Inflow: Trends in Environmental Analytical Chemistry [online]. 2015, 8, 12-19 [cit. 2022-02-02]. ISSN: 2214-1588. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214158815300039>.
- [36] VAN DER POL, E., F. COUMANS, Z. VARGA, M. KRUMREY a R. NIEUWLAND. Innovation in detection of microparticles and exosomes. Inflow: Journal of Thrombosis and Haemostasis [online]. 2013, 11 (1), 36-45 [cit. 2022-02-11]. ISSN: 1538-7836. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jth.12254>.
- [37] Malvern Instruments Ltd.: Zetasizer Nano Series: User Manual. Worcestershire, 2003.
- [38] ALMIZRAQ, R. J., J. SEGATCHIAN, J. L. HOLOVATI a J. P. ACKER. Extracellular vesicle characteristics in stored red blood cell concentrates are influenced by the method of detection. Inflow: Transfusion and Apheresis Science [online]. 2017, 56 (2), 254-260 [cit. 2022-02-04]. ISSN: 1473-0502. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147305021730040X>.
- [39] BARBOŘÍKOVÁ, H. *Směsné lipidy a jejich interakce s biopolymery*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [40] HUANG, G., B. XU, J. QUI, L. PENG, K. LUO, D. LIU a P. HAN. Symmetric electrophoretic light scattering for determination of the zeta potential of colloidal systems. Inflow: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineerign Aspects [online]. 2020, 587, 124339 [cit. 2022-02-05]. ISSN: 0927-7757. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775719313378>.
- [41] VARENNE, F., J.-B. COTY, J. BOTTON, F.-X. LEGRAND, H. HILLIAIREAU, G. BARRATT a C. VAUTHIER. Evaluation of zeta potential of nanomaterials by electrophoretic light scattering: Fast field reversal versus Slow field reversal modes. Inflow: Talanta [online]. 2019, 205, 120062 [cit. 2022-02-16]. ISSN: 0039-9140. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914019306873>.
- [42] VALEUR Bernard, Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. ISBN: 3-527-29919-X.
- [43] SZEWIECZKOVÁ, J. Studium interakcí hyaluronan-fosfolipid za přítomnosti biokompatibilních neionogenních tenzidů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

- [44] MOHANAMBE L. a S. VASUDEVAN. Aromatic Molecules in Restricted Geometries: Pyrene Excimer Formation in an Anchored Bilayer. *The journal of physical chemistry B* [online]. 2006, 100 (29), 14345-14354 [cit. 2022-4-22]. ISSN: 1520-5207. Dostupné z: <https://pubs-acrs-org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/full/10.1021/jp061695e>.
- [45] MAL, A., S. BAG, S. GHOSH a S. P. MOULIK. Physicochemistry of CTAB-SDS interacted catanionic micelle-vesicle forming system: An extended exploration. *Inflow: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2018, 553, 633-644 [cit. 2022-02-26]. ISSN: 0927-7757. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775718304758?via%3Dihub>.
- [46] KUO, A.-T., CH.-L. TU, Y.-M. YANG a CH.-H. CHANG. Enhanced physical stability of positively charged catanionic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Inflow: Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* [online]. 2018, 92, 29-35 [cit. 2022-02-26]. ISSN: 1876-1070. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107018300993?via%3Dihub>.
- [47] HAVLÍKOVÁ M., J. SZABOVÁ, A. JUGL, L. MRAVCOVÁ, CH.-H. CHANG, P.-S. HUANG, M. PEKAŘ a F. MRAVEC. Study of cholesterol's effect on the properties of catanionic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Inflow: Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, 607, 125526 [cit. 2022-05-01]. ISSN: 0927-7757. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0927775720311195#bib0045>.
- [48] SALEM J. K., I. M. EL-NAHHAL a S. F. SALAMA. Determination of the critical micelle concentration by absorbance and fluorescence techniques using fluorescein probe. *Inflow: Chemical Physics Letter* [online]. 2019, 730, 445-450 [cit. 2022-05-01]. ISSN: 0009-2614. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261419305123>.
- [49] CHAUHAN S., S. KUMARI a K. SINGH. Conductometric and fluorescence probe analysis on molecular interactions between cationic surfactants in aqueous medium of glycyl dipeptide: Concentration and temperature effect. *Inflow: The Journal of Chemical Thermodynamics* [online]. 2017, 105, 337-344 [cit. 2022-05-15]. ISSN: 0021-9614. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021961416303548>.

8. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1. Seznam použitých zkratk

CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CPP	kritický sbalovací parametr
cIPA	kladně nabitá IPA
DLS	dynamický rozptyl světla
DODAC	dioktadecyldimethylamonium chlorid
DTDAB	ditetradecyldimethylamonium bromid
ELS	elektroforetický rozptyl světla
EmPI	emisní polaritní index
Ex:Mo	excitační pás excimeru : excitační pás monomeru
ExPI	excitační polaritní index
HTMAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
HTMA-DS	hexadecyltrimethylamonium-dodecylsírán
IPA	iontový amfifilní pár
PAL	povrchově aktivní látka
PDI	index polydisperzity
SDS	dodecylsírán sodný

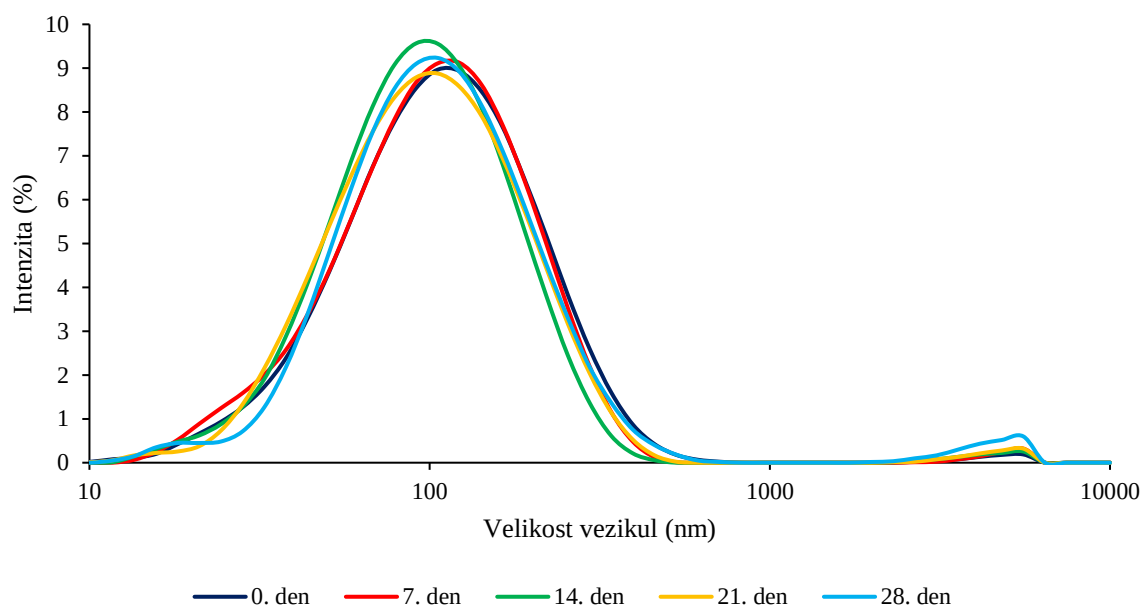
8.2. Seznam použitých symbolů

a	hydrodynamický poloměr sférických částic
a_0	optimální plocha molekuly vystavená vodné fázi
c	koncentrace
D	difúzní koeficient
ε	dielektrická konstanta
$f(Ka)$	Henryho funkce
k	Boltzmannova konstanta
l_c	kritická délka řetězce
η	viskozita
T	termodynamická teplota
U_E	elektroforetická mobilita
V	objem uhlovodíkových řetězců
z	zeta potenciál

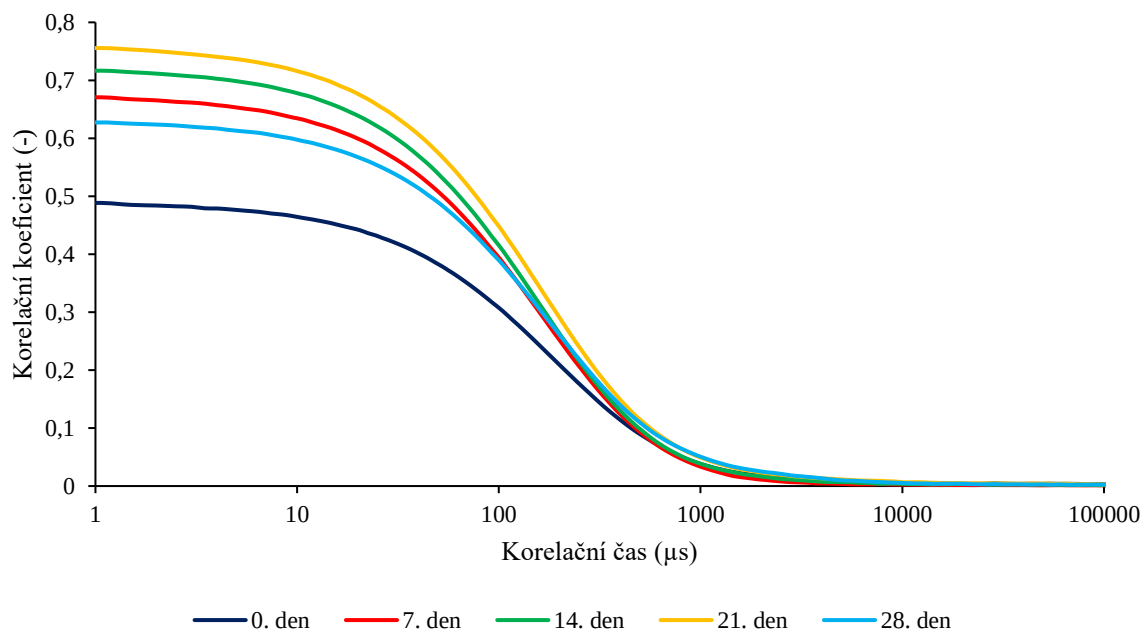
9. PŘÍLOHY

9.1. Měření dlouhodobé stability

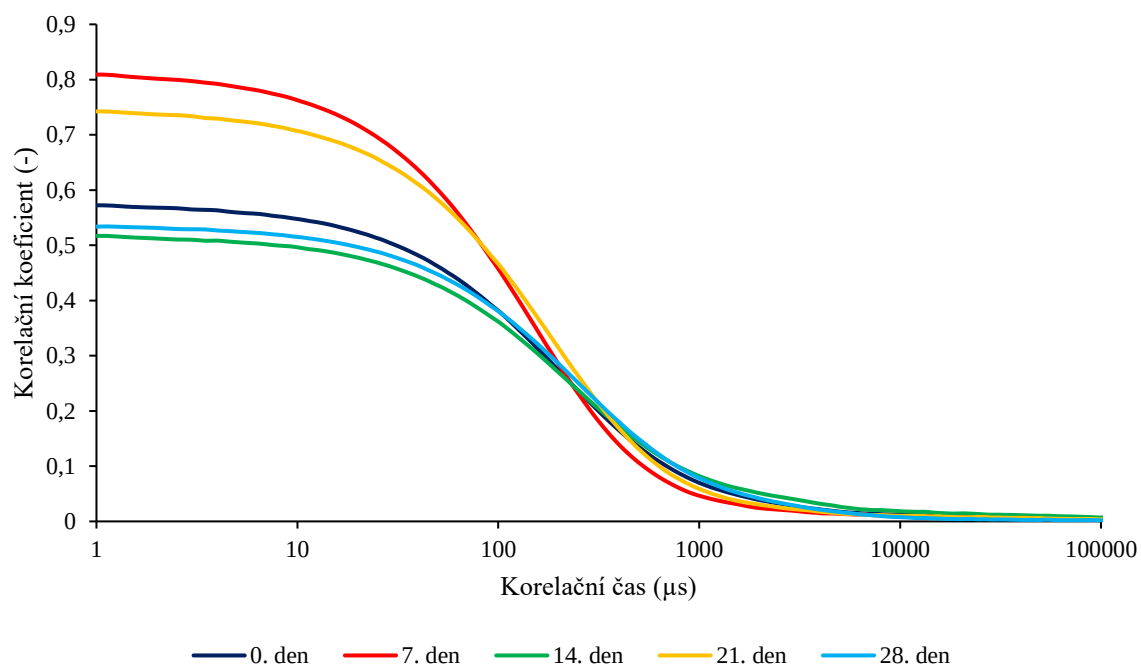
9.1.1. Dynamický a elektroforetický rozptyl světla



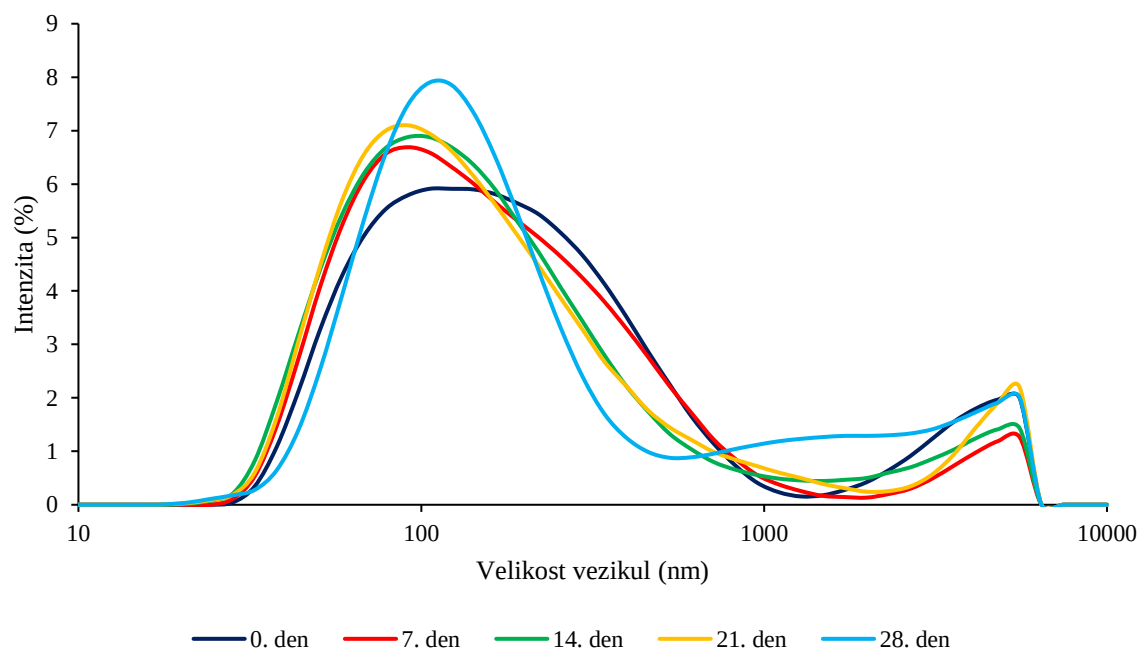
Obr. 25: Distribuční diagram závislosti intenzity na velikosti vezikul pro nezředěný vzorek.



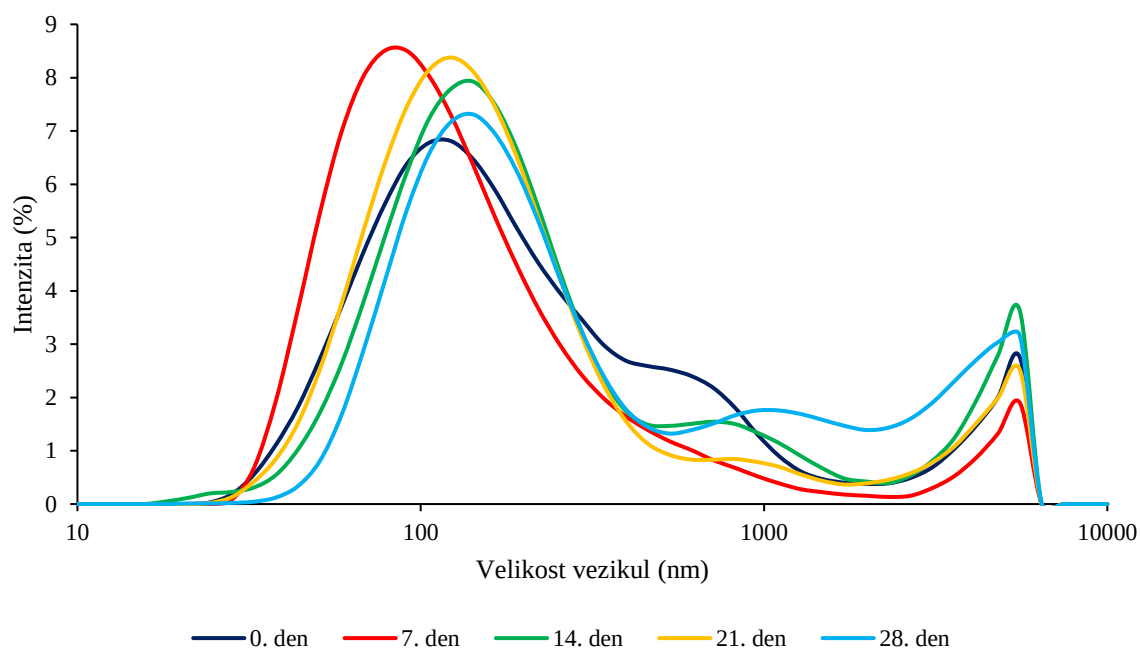
Obr. 26: Korelační koeficient v závislosti na korelačním čase pro 100,0× vzorek.



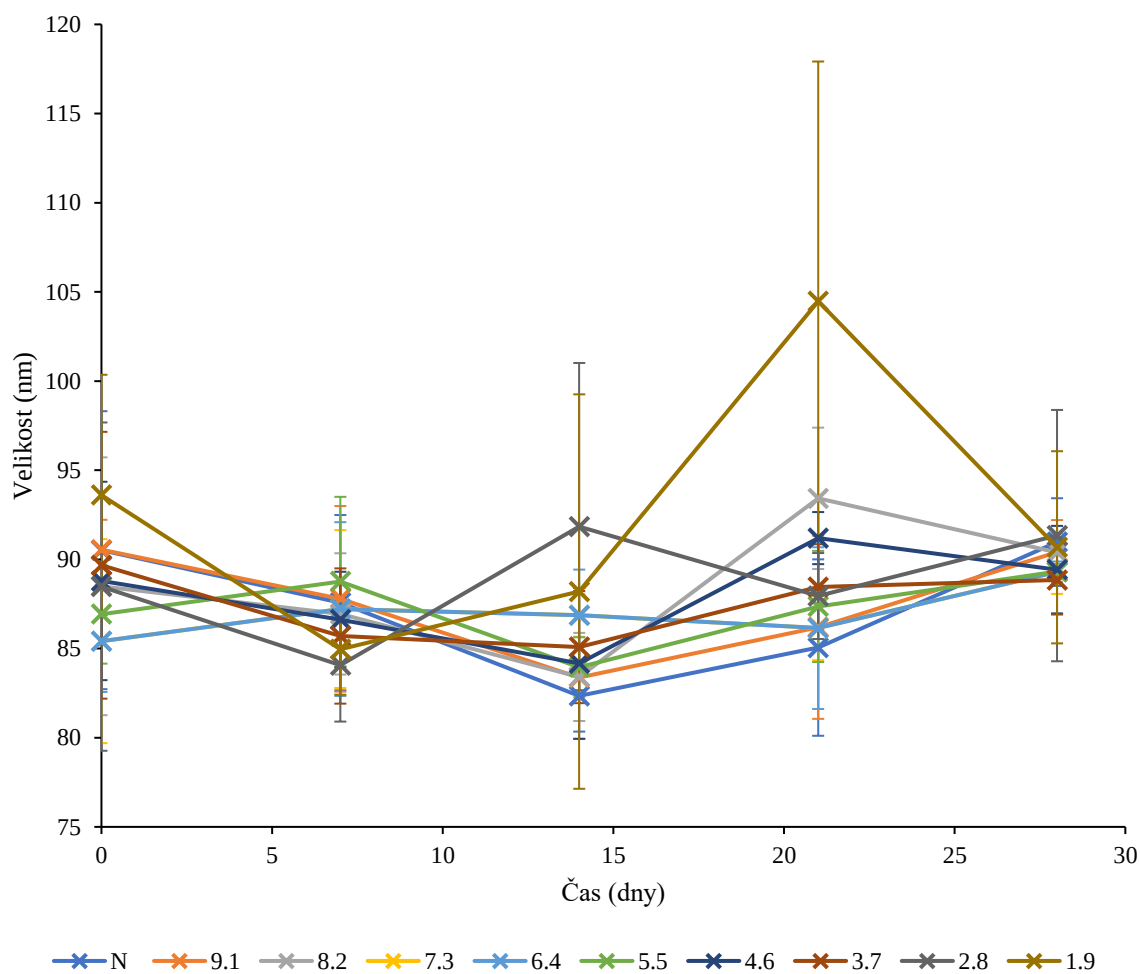
Obr. 27: Závislost korelačního koeficientu na korelačním čase pro $150,0\times$ zředěný vzorek.



Obr. 28: Distribuční diagram závislosti intenzity na velikosti vezikul pro $100,0\times$ zředěný vzorek.

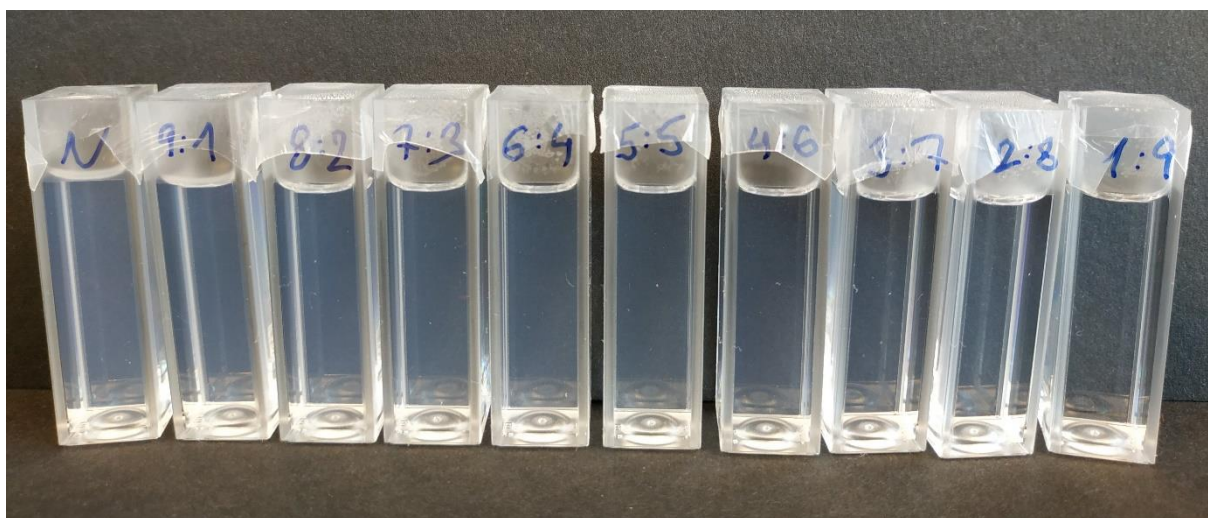


Obr. 29: Distribuční diagram závislosti intenzity na velikosti vezikul pro $150,0\times$ zředěný vzorek.

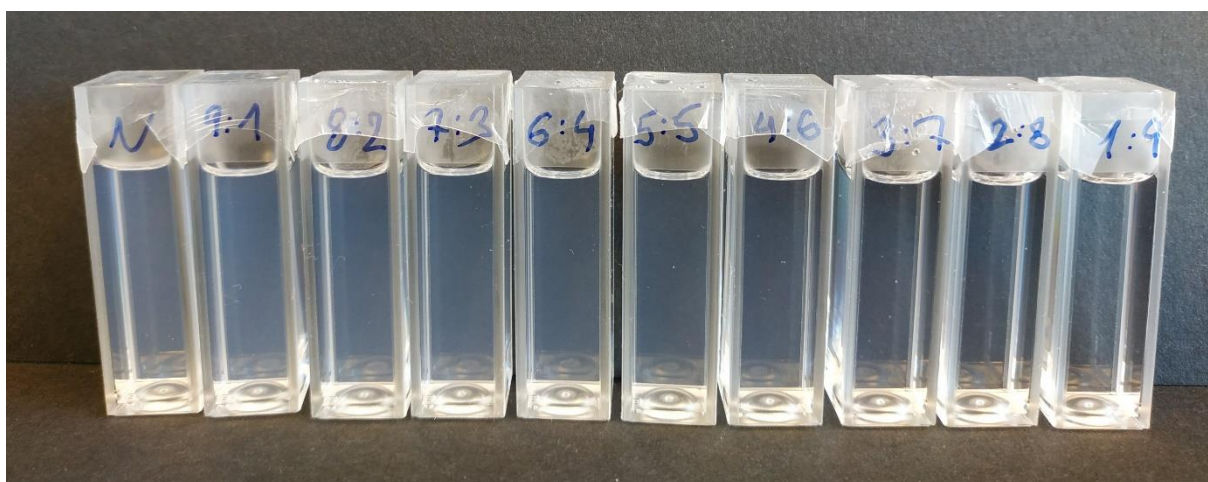


Obr. 30: Změny hodnot průměrných velikostí vezikul v závislosti na dni měření pro malá zředění vezikul (nezředěný až $10,0\times$ zředěný vzorek vezikul).

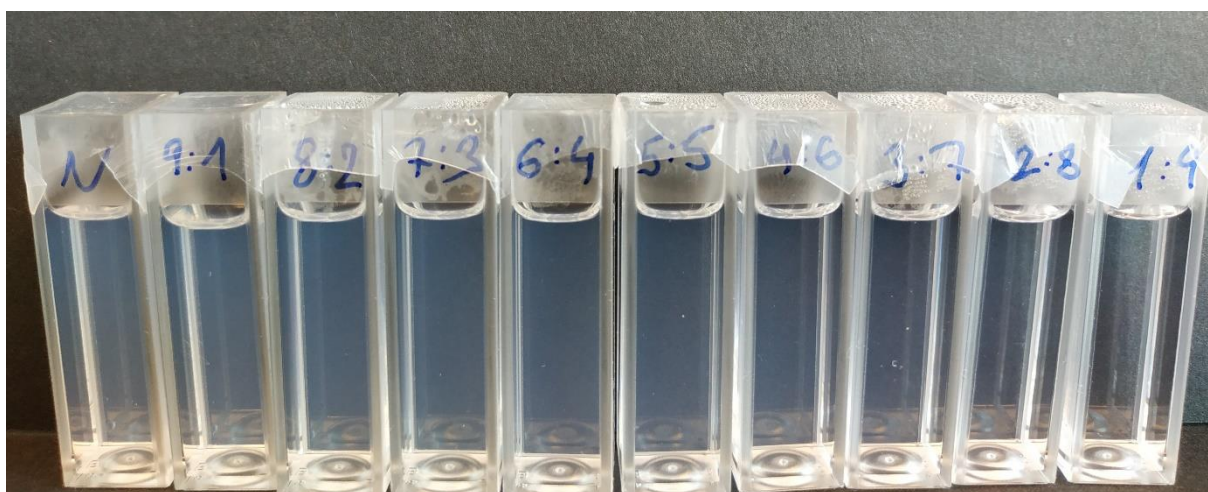
9.1.2. Vizuální pozorování



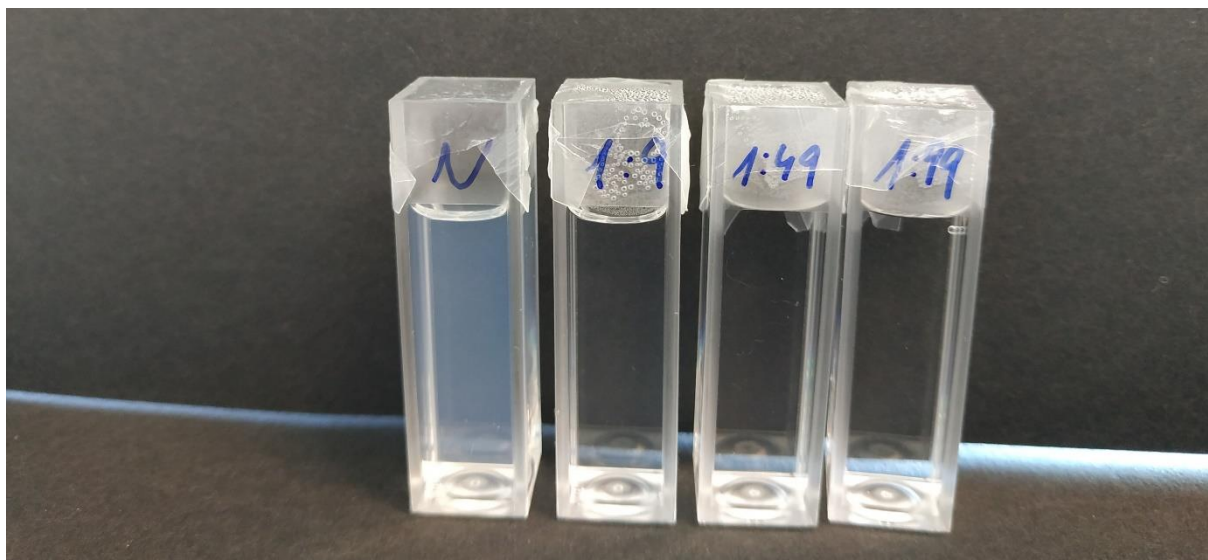
Obr. 31: Vzorky vezikul 7. den od přípravy (nezředěný až $10,0\times$ zředěný).



Obr. 32: Vzorky vezikul 14. den od přípravy (nezředěný až $10,0\times$ zředěný).

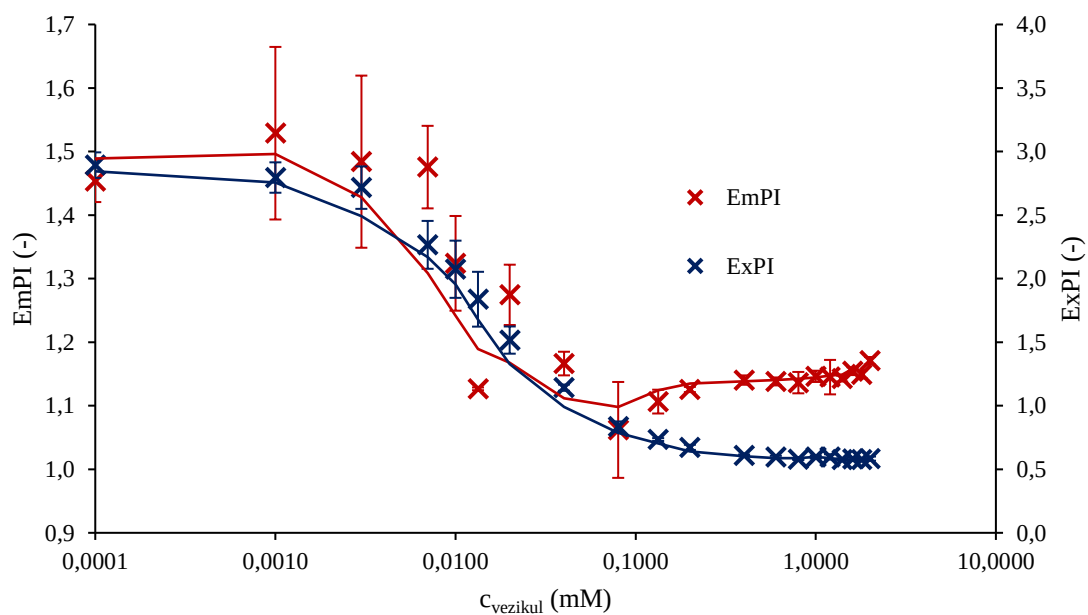


Obr. 33: Vzorky vezikul 21. den od přípravy (nezředěný až $10,0\times$ zředěný).



Obr. 34: Vzorky vezikul 14. den od přípravy (nezředěný, $10,0\times$ a z větších zředění $50,0\times$ a $100,0\times$ zředěný vzorek).

9.2. Pozorování agregačního chování systému metodou fluorescenční spektroskopie



Obr. 35: Porovnání závislosti emisního (EmPI - červená křivka) a excitačního (ExPI - modrá křivka) polaritního indexu na koncentraci vezikul.

9.3. Souhrnné tabulky

Tab. 7: Přehled všech naměřených dat - průměrných hodnot velikostí, indexů polydisperzity a zeta potenciálů včetně odchylek ze čtyř týdnů měření

zředěno	DEN	0	7	14	21	28	zředěno	DEN	0	7	14	21	28
0.0×	velikost (nm)	90,52	87,57	82,35	85,06	90,97	1,7×	velikost (nm)	85,41	87,21	86,87	86,15	89,30
	odchylka (nm)	7,79	4,92	2,00	4,95	2,46		odchylka (nm)	2,85	4,87	2,56	4,53	0,58
	PDI (-)	0,275	0,274	0,258	0,267	0,296		PDI (-)	0,249	0,250	0,277	0,249	0,246
	odchylka (-)	0,013	0,009	0,015	0,009	0,042		odchylka (-)	0,009	0,011	0,045	0,007	0,007
	ZP (mV)	55,86	68,00	48,96	67,08	73,23		ZP (mV)	49,43	64,64	49,11	60,46	63,94
	odchylka (mV)	6,37	3,95	2,97	5,57	3,82		odchylka (mV)	6,74	3,09	2,74	5,52	3,55
1.1×	velikost (nm)	90,54	87,79	83,37	86,19	90,42	2,0×	velikost (nm)	86,93	88,76	83,95	87,36	89,32
	odchylka (nm)	1,68	5,20	3,44	5,13	1,79		odchylka (nm)	2,77	4,75	1,68	3,11	0,44
	PDI (-)	0,296	0,262	0,261	0,260	0,267		PDI (-)	0,243	0,250	0,247	0,250	0,242
	odchylka (-)	0,051	0,008	0,009	0,005	0,010		odchylka (-)	0,007	0,009	0,008	0,026	0,007
	ZP (mV)	57,24	64,13	53,91	59,05	66,24		ZP (mV)	54,96	56,66	53,58	55,49	59,29
	odchylka (mV)	5,35	1,97	8,58	4,62	4,31		odchylka (mV)	6,47	5,80	2,12	2,26	6,71
1.3×	velikost (nm)	88,49	86,94	83,41	93,42	90,40	2,5×	velikost (nm)	88,79	86,62	84,17	91,19	89,43
	odchylka (nm)	7,23	3,40	2,47	3,96	1,06		odchylka (nm)	5,56	2,69	4,23	1,46	2,45
	PDI (-)	0,277	0,257	0,251	0,321	0,257		PDI (-)	0,261	0,237	0,257	0,293	0,249
	odchylka (-)	0,040	0,006	0,010	0,063	0,013		odchylka (-)	0,026	0,015	0,041	0,055	0,013
	ZP (mV)	56,74	64,55	50,07	58,87	69,87		ZP (mV)	52,08	56,61	45,65	55,87	57,41
	odchylka (mV)	4,14	3,64	5,27	5,90	1,35		odchylka (mV)	5,83	4,08	7,84	8,39	2,87
1,5×	velikost (nm)	85,30	87,38	87,59	88,07	88,73	3,3×	velikost (nm)	89,67	85,70	85,08	88,45	88,84
	odchylka (nm)	5,72	4,43	1,20	1,80	1,24		odchylka (nm)	7,48	3,79	3,14	2,40	1,93
	PDI (-)	0,248	0,247	0,298	0,299	0,249		PDI (-)	0,285	0,235	0,256	0,278	0,239
	odchylka (-)	0,007	0,005	0,036	0,081	0,003		odchylka (-)	0,054	0,007	0,016	0,039	0,013
	ZP (mV)	54,59	53,29	48,49	55,52	60,62		ZP (mV)	45,23	50,01	49,62	49,22	51,59
	odchylka (mV)	4,85	4,33	3,06	4,26	2,06		odchylka (mV)	1,87	4,02	3,54	4,26	3,04

zředěno	DEN	0	7	14	21	28	zředěno	DEN	0	7	14	21	28
5,0×	velikost (nm)	88,47	84,07	91,84	87,95	91,33	100,0×	velikost (nm)	149,40	132,22	124,55	125,20	150,63
	<i>odchylka (nm)</i>	9,20	3,16	9,18	2,41	7,05		<i>odchylka (nm)</i>	22,06	29,55	25,08	18,69	35,82
	PDI (-)	0,273	0,239	0,308	0,273	0,271		PDI (-)	0,476	0,387	0,416	0,467	0,500
	<i>odchylka (-)</i>	0,062	0,013	0,066	0,035	0,049		<i>odchylka (-)</i>	0,094	0,035	0,077	0,052	0,146
	ZP (mV)	41,05	46,13	37,12	44,80	50,89		ZP (mV)	21,92	24,95	17,16	22,13	14,50
	<i>odchylka (mV)</i>	8,52	3,07	3,35	2,85	2,64		<i>odchylka (mV)</i>	2,15	3,85	3,45	3,73	5,54
10,0×	velikost (nm)	93,61	84,96	88,20	104,48	90,68	150,0×	velikost (nm)	164,56	118,43	168,13	150,99	207,33
	<i>odchylka (nm)</i>	6,75	2,55	11,06	13,44	5,39		<i>odchylka (nm)</i>	23,70	32,64	12,29	33,72	38,68
	PDI (-)	0,326	0,252	0,297	0,388	0,283		PDI (-)	0,470	0,383	0,484	0,421	0,586
	<i>odchylka (-)</i>	0,058	0,030	0,082	0,081	0,048		<i>odchylka (-)</i>	0,059	0,085	0,063	0,070	0,062
	ZP (mV)	37,78	42,79	34,97	37,35	42,96		ZP (mV)	17,83	20,19	17,04	14,19	11,55
	<i>odchylka (mV)</i>	4,69	3,79	2,16	6,12	6,40		<i>odchylka (mV)</i>	2,41	2,38	1,96	6,22	1,48
50,0×	velikost (nm)	114,77	100,81	103,74	125,30	120,73	200,0×	velikost (nm)	156,54	167,19	229,73	183,90	230,73
	<i>odchylka (nm)</i>	19,35	20,36	15,95	20,68	5,58		<i>odchylka (nm)</i>	27,32	28,04	73,90	45,76	31,20
	PDI (-)	0,383	0,347	0,351	0,435	0,453		PDI (-)	0,506	0,583	0,518	0,559	0,505
	<i>odchylka (-)</i>	0,038	0,096	0,054	0,074	0,078		<i>odchylka (-)</i>	0,063	0,070	0,066	0,066	0,123
	ZP (mV)	25,63	28,16	21,09	32,83	26,21		ZP (mV)	19,57	16,53	17,32	14,36	8,32
	<i>odchylka (mV)</i>	2,29	2,08	4,14	2,68	3,82		<i>odchylka (mV)</i>	4,00	2,22	1,96	2,23	1,53