



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

KATANIONTOVÉ VEZIKULÁRNÍ SYSTÉMY

CATANIONIC VESICULAR SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Romana Repová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1220/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Romana Repová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Kataniontové vezikulární systémy

Zadání bakalářské práce:

- 1) Rešerše na téma přípravy a využití kataniontových komplexů.
- 2) Na základě rešerše a z dostupných látek navrhnout složení, způsob přípravy a charakterizaci kataniontových komplexů.
- 3) Experimentálně ověřit navržený způsob přípravy pomocí zvolených charakterizačních technik.
- 4) Zhodnotit postup přípravy a diskutovat využitelnost připravených komplexů v medicínských a farmaceutických aplikacích.

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

Romana Repová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá kataniontovými vezikulárnymi systémami. Cieľom práce bolo pripraviť a charakterizovať tieto systémy. Kataniontový vezikulárny systém sa skladá z kladne a záporne nabitej povrchovo aktívnej látky. Ako kladne nabité PAL boli vybraté látky CTAB, CTAC, TTAB, DTAB a záporne nabitý tenzid SDS. Na zvýšenie stability kataniontových vezikulárnych systémov bol pridávaný kladne nabitý tenzid DODAC v rôznych koncentráciách. Kataniontové vezikulárne systémy boli charakterizované pomocou metódy merania dynamického rozptylu svetla, zeta potenciálu a fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Pomocou dynamického rozptylu svetla a merania zeta potenciálu bola určená veľkosť systémov a ich stabilita. Fluorescenčnou korelačnou spektroskopiou bol sledovaný difúzny koeficient systémov.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with catanionic vesicles. The aim of the study was to prepare and characterize these systems. The catanionic vesicles are composed of cationic (CTAB, CTAC, TTAB, DTAB) and anionic surfactants (SDS). The physical stability of the vesicles was enhanced with the addition of cationic surfactant DODAC. The catanionic vesicles were characterized by the measurement of the dynamic light scattering, zeta potencial and fluorescence correlation spectroscopy. The size and stability of the system were determined using dynamic light scattering. Difussion coefficient of the system was analyzed using fluorescence correlation spectroscopy.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

Kladne nabitá povrchovo aktívna látka, záporne nabitá povrchovo aktívna látka, dvojfázový amfifil, kataniontový vezikulárny systém, dynamický rozptyl svetla, fluorescenčná korelačná spektroskopia.

KEYWORDS

Cationic surfactant, anionic surfactant, ion pair amphiphile, catanionic vesicles, dynamic light scattering, fluorescence correlation spectroscopy.

REPOVÁ, R. *Kataniontové vezikulární systémy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

Podakovanie:

Rada by som sa poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za cenné rady, pripomienky, trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval pri konzultáciách. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za jeho ochotu, čas a pomoc pri meraní a Ing. et. Ing. Sabine Jarábkovej za jej rady a pripomienky k vypracovaniu tejto bakalárskej práce. Na záver by som sa chcela poďakovať rodine a priateľom za ich podporu.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1 Tenzidy	8
2.1.1 Anionaktívne tenzidy	8
2.1.2 Kationaktívne tenzidy	9
2.2 Micelárne koloidy	10
2.2.1 Molekulárna štruktúra micelárnych koloidov	10
2.2.2 Vznik micel	10
2.2.3 Nesférické micely	12
2.3 Kataniontové vezikulárne systémy	13
2.3.1 Tvorba kataniontových vezikúl	14
2.3.2 Geometria kataniontových vezikúl	14
2.3.3 Aplikácia	15
2.4 Dynamický rozptyl svetla	15
2.5 Zeta potenciál	15
2.5.1 Inštrumentácia	16
2.6 Fluorescencia	17
2.6.1 Fluorescenčné sondy	18
2.6.2 Fluorescenčná korelačná spektroskopia	20
3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	22
3.1 Kladne nabité kataniontové vezikuly	22
3.2 Účinky spolurozpúšťadla na stabilitu kataniontových vezikúl	22
3.3 Zvýšenie fyzikálnej stability kladne nabitých kataniontových vezikúl v prítomnosti chloridu vápenatého	23
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	25
4.1 Chemikálie	25
4.2 Použité metódy	27
4.2.1 Príprava vodného roztoku kladne nabitej povrchovo aktívnej látky	27
4.2.2 Príprava vodného roztoku záporne nabitej povrchovo aktívnej látky	27
4.2.3 Príprava IPA	27
4.2.4 Príprava kataniontových vezikulárnych systémov	27

4.2.5	Príprava kladne nabitých kataniontových vezikulárnych systémov	28
4.2.6	Príprava fluorescenčne zafarbených kataniontových vezikulárnych systémov	28
4.2.7	Dynamický rozptyl svetla a zeta potenciál	28
4.2.8	FCS – Systém MicroTime 200	28
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	30
5.1	Príprava IPA	30
5.2	Príprava kataniontových vezikulárnych systémov	30
5.3	Dynamický rozptyl svetla	32
5.4	Zeta potenciál	35
5.5	FCS	36
6	ZÁVER	41
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	43
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	47

1 ÚVOD

Vezikulárny systém je uzavretý dutý sférický objekt. Od vonkajšieho prostredia je oddelený štruktúrou dvojvrstvy. Štruktúra systému sa skladá z hydrofóbnej a hydrofilnej časti, a tak umožňuje enkapsuláciu hydrofóbnych aj hydrofilných materiálov. Lipozómy sú tvorené fosfolipidovou dvojvrstvou. Ich praktická aplikácia je však obmedzená kvôli vysokým nákladom pri príprave. Kataniontové vezikulárne systémy sa skladajú z opačne nabitých povrchovo aktívnych látok. Povrchovo aktívne látky sú ľahko dostupné a lacné. Vďaka tomu sú v poslednej dobe tieto systémy považované za možné náhrady súčasných nosičov liečiv alebo DNA nosičov [1, 2].

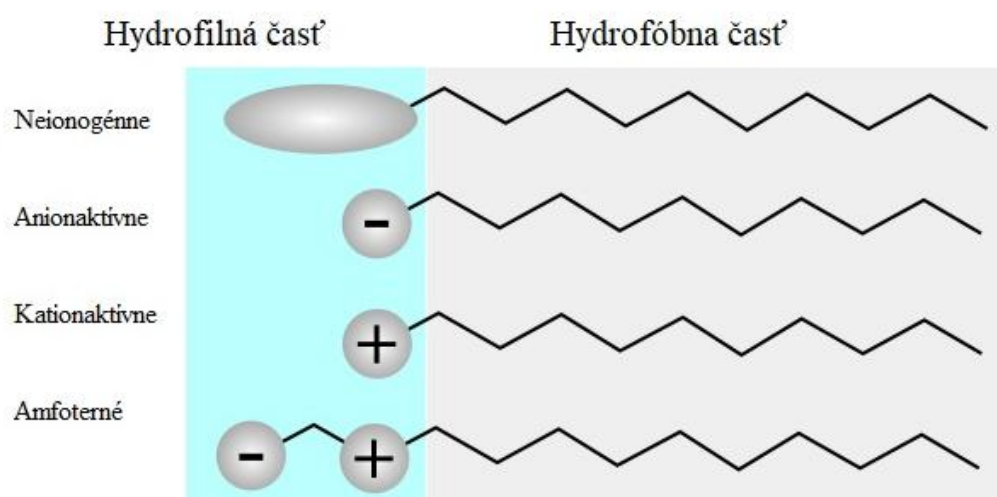
Cieľom tejto práce bolo preskúmať možnosti prípravy kataniontových vezikulárnych systémov. Na prípravu systémov boli použité rôzne kombinácie opačne nabitých tenzidov. Na ich charakterizáciu boli zvolené metódy dynamického rozptylu svetla, meranie zeta potenciálu a fluorescenčná korelačná spektroskopia. Pomocou metódy dynamického rozptylu svetla bolo možné potvrdiť prítomnosť vezikulárnych systémov v pripravených vzorkách.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Tenzidy

Tenzid je povrchovo aktívna látka (PAL), ktorá znižuje povrchové napätie a medzifázovú energiu sústavy na fázovom rozhraní. Tam sa tenzid hromadí už pri nízkych koncentráciách. Ide o prirodzenú snahu systému dosiahnuť čo najnižšiu energiu. Štruktúra pozostáva z hydrofilnej a hydrofóbnej časti. Ak je rozpúšťadlom voda, hydrofilná časť je priťahovaná k nej a naopak hydrofóbna časť čo najviac obmedzuje kontakt s rozpúšťadlom. Hydrofóbnu zložku tvoria dlhé uhlíkovodíkové reťazce (lineárne nerozvetvené alkylové reťazce, rozvetvené alkylové reťazce, nenasýtené reťazce alkénov, alkylbenzény, alkylnaftalény, fluoroalkylové skupiny, polydimetylsiloxany) [3].

Podľa schopnosti hydrofilnej skupiny podliehať elektrolytickej disociácii delíme tenzidy na neionogénne a ionogénne, kde patria kationaktívne, anionaktívne a amfoterné [3].



Obrázok 1: Štruktúra a rozdelenie tenzidov [4]

2.1.1 Anionaktívne tenzidy

Anionaktívne tenzidy nesú vo vodnom prostredí záporný náboj. Ich aktivita je najvyššia v mierne alkalickom prostredí. V kyslom prostredí sú nestále.

Soli karboxylových kyselín

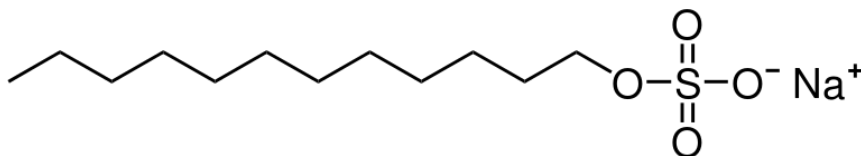
Alkalické soli organických monokarboxylových kyselín a ich deriváty vykazujú stredne vysokú povrchovú aktivitu. V kyslom prostredí nastáva potlačenie disociácie organickej kyseliny. Vplyvom vápenatých a horečnatých iónov vytvárajú zrazeniny a strácajú povrchovú aktivitu.

Alkylsulfáty

Soli alkylesterov kyseliny sírovej majú vysokú povrchovú aktivitu v kyslom prostredí vďaka sulfátovej skupine na konci reťazca, ktorá ľahko podlieha hydrolyze. Alkylsulfáty sú dobre rozpustné vo vode a zlúčeniny, ktoré obsahujú lineárne alkyly, sú dobre biologicky rozložiteľné. Najznámejší predstaviteľ tejto skupiny je dodecylsulfát sodný [3].

2.1.1.1 Dodecylsulfát sodný (SDS)

Dodecylsulfát sodný je chemicky sodná soľ organosulfátu. Organosulfát sa skladá z 12 uhlíkov a je pripojený k záporne nabitej sulfátovej skupine. Uhl'ovodíkový reťazec je nepolárny a sulfátová skupina polárna. Vďaka tejto štruktúre má amfifilný charakter. Jeho kritická micelárna koncentrácia (CMC) v čistej vode je pri 25 °C 8,2 mM. Je to biela látka takmer bez zápachu, ktorá môže byť vo forme kryštálov, vločiek alebo prášku. Je stabilný za bežných skladovacích podmienkach, ale treba zabrániť zahrievaniu, pretože je horľavý. Jeho detergentné vlastnosti sa uplatňujú vo využití ako čistiaci prostriedok, vo vlasových šampónoch, pastách a taktiež ako prísada do plastov, farbív a lakov. SDS má nízku toxicitu a žiadne chronické účinky, avšak u niektorých jedincov môže spôsobiť alergickú reakciu vo forme ekzému [5, 6, 7].



Obrázok 2: Štruktúra dodecylsulfátu sodného [8]

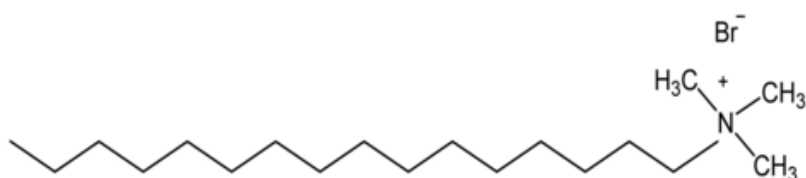
2.1.2 Kationaktívne tenzidy

Kationaktívne tenzidy vo vodnom prostredí disociujú a vytvárajú kladne nabité ióny. Vďaka kladnému náboju sa môžu adsorbovať na pevný povrch, ktorý je nabitý záporne. Majú germicídne, antistatické a zmäkčovacie účinky. To využíva farmaceutický, kozmetický a textilný priemysel. Medzi kationaktívne tenzidy patria:

- Alkylamíny, ktoré vykazujú nízku povrchovú aktivitu.
- Kvartérne amóniové soli sú najpoužívanejšou skupinou. Uhl'ovodíkový reťazec sa pohybuje v rozmedzí 12 až 18 uhlíkov a protiión je halogenidový anión. Tieto soli nie sú pH senzitívne, a tak sa dajú použiť v rôznom rozmedzí pH. Najznámejší zástupca je hexadecyltrimetylamónium bromid.
- Soli pyridíniových zásad, ktoré vykazujú vysokú povrchovú aktivitu [3, 9].

2.1.2.1 Hexadecyltrimetylamónium bromid (CTAB)

Hexadecyltrimetylamónium bromid, inak nazývaný aj ako cetrimóniumbromid alebo cetyltrimetylamóniumbromid (CTAB), je kvartérna amóniová zlúčenina. Jej reťazec sa skladá zo 16 uhlíkov kladne nabitého atómu dusíka s tromi metylovými skupinami. Hexadecyltrimetylamóniový kation má antiseptické účinky voči hubám a baktériám. Je to biela pevná látka, ktorá sa využíva pri izolácii DNA, pri syntéze zlatých nanočastíc a v kozmetickom priemysle [10, 11].



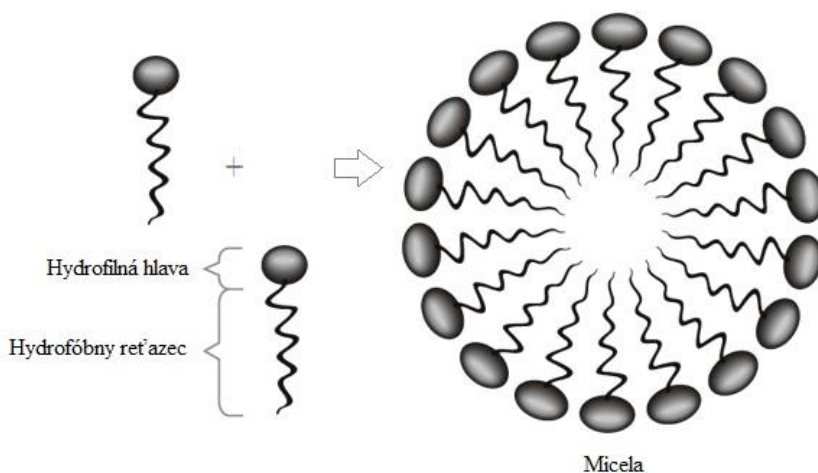
Obrázok 3: Štruktúra CTAB [12]

2.2 Micelárne koloidy

Nízkomolekulárne látky vytvárajú vo veľkých zriedeniach pravé roztoky, ale pri určitej koncentrácii asociujú molekuly do tej miery, že vznikajú koloidné disperzné častice – micely. Látky chovajúce sa týmto spôsobom sa nazývajú micelárne alebo asociatívne koloidy. Micelárne koloidné roztoky vznikajú samovoľným rozpustením. Tvar, štruktúra a priemerný rozmer micely je závislý na fyzikálnych podmienkach a vlastnosti sú určené okamžitým stavom systému. Z toho vyplýva, že micelárne koloidy sú reverzibilné systémy [13, 14].

2.2.1 Molekulárna štruktúra micelárnych koloidov

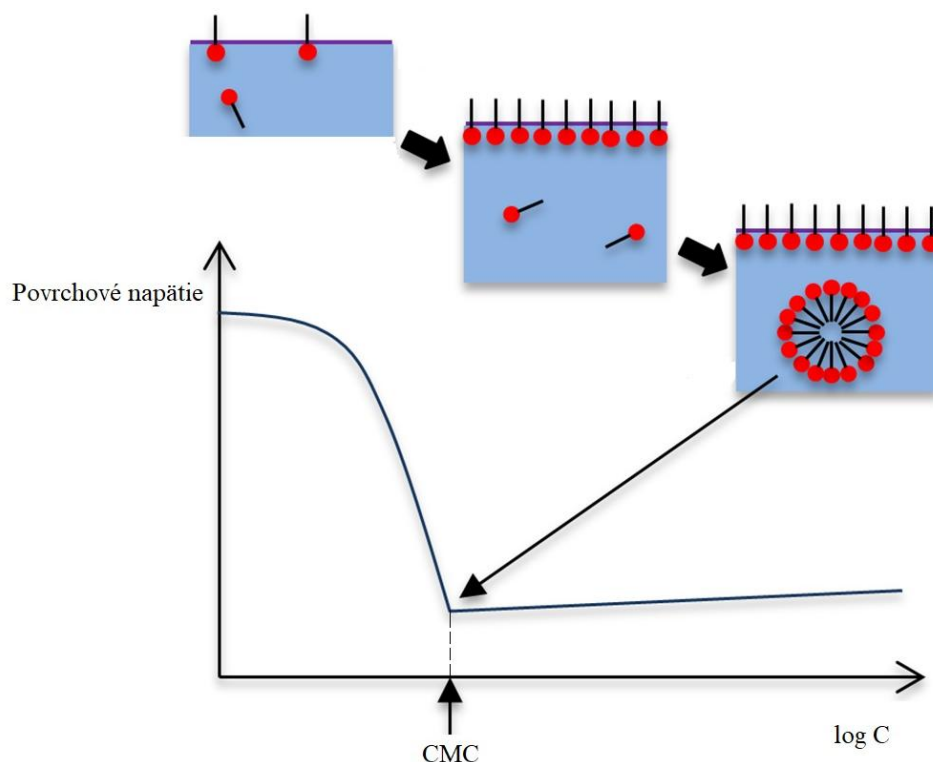
Aby molekula mohla vytvárať micely, musí byť amfifilná. Micely sa skladajú z hydrofilnej a hydrofóbnej časti a v závislosti od polarít prostredia, v ktorom sa nachádzajú nastane natočenie ich časti k rozpúšťadlu. Jej neochota interagovať s molekulami rozpúšťadla je následne príčinou asociácie. Povrchovo aktívne látky (PAL) rozpustné vo vodnom prostredí musia obsahovať rozsiahlu hydrofóbnu nepolárnu časť, ktorá je tvorená dlhým uhlíkovodíkovým reťazcom a silne hydrofilnú polárnu skupinu, ktorá zabezpečí rozpustnosť vo vode. Do skupiny micelárnych koloidov rozpustných vo vode patria mydlá, detergenty a tenzidy [13, 14].



Obrázok 4: Štruktúra a vznik micel

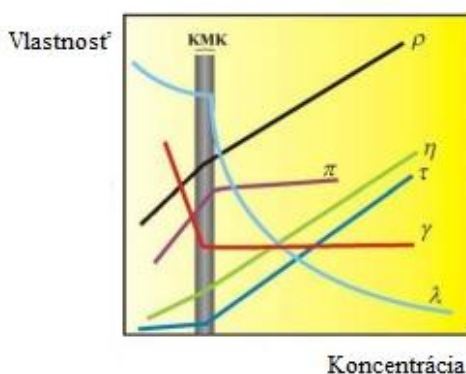
2.2.2 Vznik micel

Tenzidy sa zhromažďujú na fázovom rozhraní už pri nízkych koncentráciách, aby minimalizovali povrchové napätie rozpúšťadla. Pri postupnom zvyšovaní koncentrácie dochádza k tvorbe agregátov amfifilných molekúl. Táto koncentrácia, pri ktorej začnú vznikať väčšie zhluky (micely) sa nazýva kritická micelárna koncentrácia (CMC). CMC sa pohybuje v rozmedzí 10^{-5} až $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



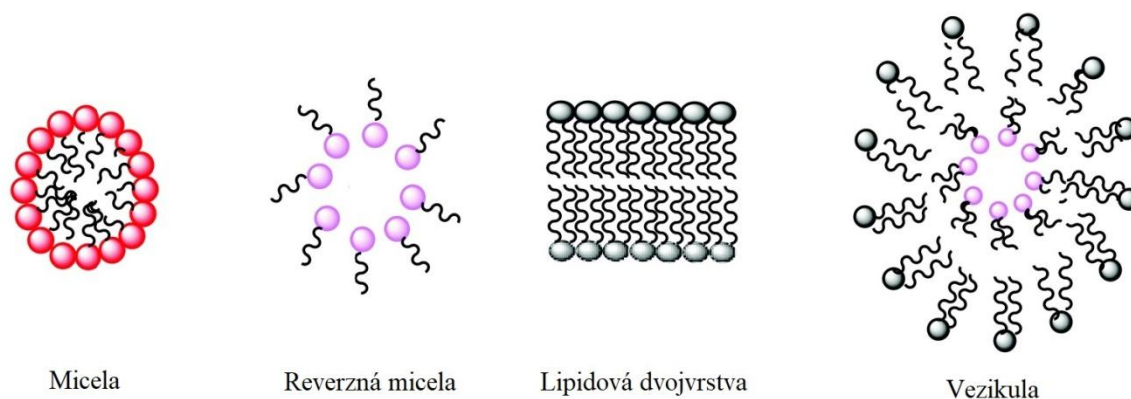
Obrázok 5: Zobrazenie priebehu tvorby micel [15]

Pri kritickej micelárnej koncentrácii sa menia mnohé fyzikálno-chemické vlastnosti (hustota, viskozita, povrchové napätie, osmotický tlak) roztoku PAL. Štruktúru micel ovplyvňuje prostredie, v ktorej vzniká. V polárnom prostredí tvoria jadro navzájom prepletené uhl'ovodíkové reťazce povrchovo aktívnych látok a polárne skupiny sa nachádzajú na vonkajšom povrchu micely. Hydrofóbne častice molekúl PAL sú tak v minimálnom styku s molekulami vody. V nepolárnom prostredí je jadro tvorené polárnou skupinou a uhl'ovodíkové reťazce smerujú von do prostredia. Tieto micely sa nazývajú reverzné. Ďalšie faktory, ktoré ovplyvňujú CMC sú teplota, dĺžka, štruktúra uhl'ovodíkového reťazca a vlastnosti hydrofilnej skupiny [16, 17].



Obrázok 6: Fyzikálne vlastnosti roztokov povrchovo aktívnych látok [16]

V zriedených roztokoch vznikajú sférické guľovité micely. Veľkosť polomeru micely je približne rovnaká ako dĺžka molekuly PAL. Pri zvýšených koncentráciách PAL v roztoku narastá veľkosť micely a usporiadanie uhl'ovodíkových reťazcov je rovnobežné. Útvary sa menia z guľovitých na valcovité a pri ešte vyššej koncentrácii vznikajú laminárne micely zložené z dvoch vrstiev PAL. Vo vrstve sú uhl'ovodíkové reťazce k sebe navzájom obrátené a polárne skupiny smerujú von. Laminárne micely spadajú do skupiny nesférických micel [16, 17].



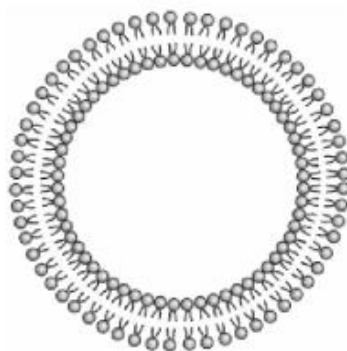
Obrázok 7: Typy micelárnych koloidov [18]

2.2.3 Nesférické micely

Medzi nesférické micely patria cylindrické, valcovité útvary, kedy plášť tvoria polárne skupiny a nepolárna časť je ukrytá vo vnútri micely. Laminárne micely sa skladajú z dvoch priľahlých rovinných vrstiev s polárnymi skupinami orientovanými do vody a nepolárnymi reťazcami smerujúcimi k reťazcom druhej vrstvy. V prítomnosti dvoch hydrofóbných reťazcov môžu vzniknúť dvojvrstvové membrány, vezikuly a obrátené micely. Tvar micely je vždy závislý na primárnej amfifilnej molekule a koncentrácii roztoku [13].

2.2.3.1 Vezikuly

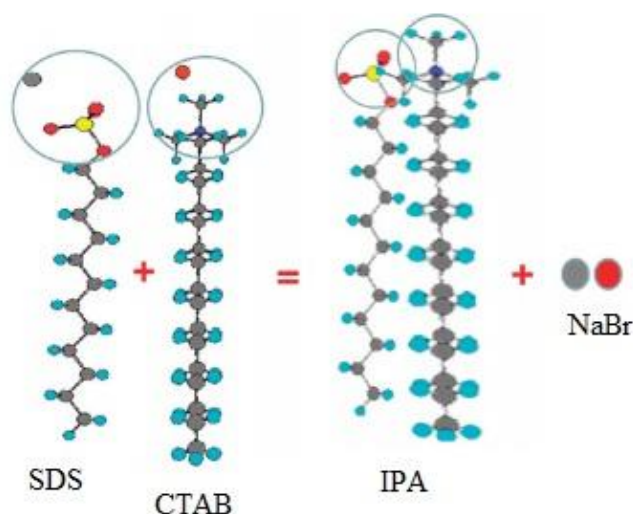
Vezikuly sú duté štruktúry tvorené povrchovo aktívnymi látkami, lipidmi alebo blokovými kopolymérmi vo vodnom roztoku. Sú tvorené jednou alebo viacerými do kruhu zakrivenými dvojvrstvovými membránami. Vonkajšia a vnútorná časť dvojvrstvovej membrány je tvorená hydrofilnými skupinami a hydrofóbnymi reťazcami sú orientované do vnútra dvojvrstvy, a tak je zamedzený kontakt s vodou. Vonkajšie disperzné prostredie je oddelené obalom, ktorý obklopuje inertnú vodnú fázu. Vezikuly rozdeľujeme na unilaminárne a multilaminárne. Unilaminárne vezikuly sú zložené len z jednej dvojvrstvy a multilaminárne sú tvorené viacerými dvojvrstvami, ktoré sú na seba navrstvené. Prírodné a syntetické fosfolipidy vytvárajú vezikuly, ktoré sa nazývajú lipozómy. Vezikuly majú dôležité postavenie v kozmetickom priemysle a v medicíne ako nástroj dávkovania liečiv. Výhodou vezikúl oproti micelám je v ich väčšej enkapsulačnej kapacite a transporte látok v organizme [13].



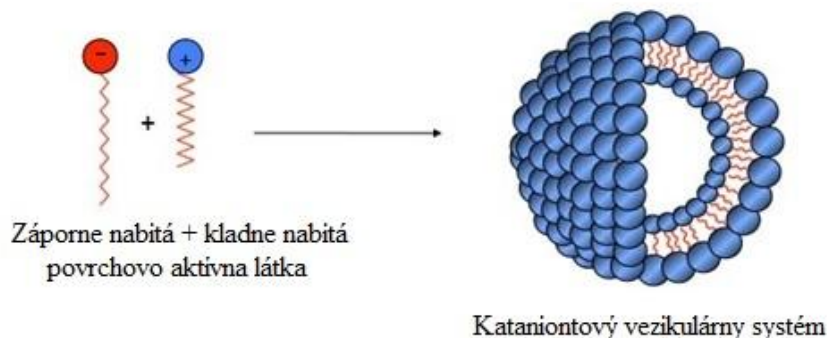
Obrázok 8: Unilaminárna vezikula tvorená amfifilnými molekulami s jednou hydrofilnou skupinou a dvomi hydrofóbnymi reťazcami [13].

2.3 Kataniontové vezikulárne systémy

Kataniontové vezikuly sa skladajú zo zmesi kationových a aniónových povrchovo aktívnych látok vďaka elektrostatickému pôsobeniu medzi polárnymi skupinami hlavy. V čistom povrchovo aktívnom činidle medzi dvoma podobne nabitými hlavovými skupinami pôsobí odpudzujúca elektrostatická interakcia, ktorá zvyšuje voľnú energiu a vytvoria sa micely. Na druhej strane, v katanionických zmesiach elektrostatická interakcia medzi dvoma rozdielne nabitými hlavnými skupinami znižuje voľnú energiu za vzniku stabilnej kataniontovej vezikuly. Po odstránení protiiónov zo zmesi sa zvyšok nazýva dvojfázový amfifíl (IPA). IPA je všeobecne tvorený spárovaním dvoch jednoretazcových protiľahlých povrchovo aktívnych látok v rovnakom molárnom pomere. Tieto dva reťazce ale nie sú kovalentne viazané na rovnakú hlavnú skupinu. IPA je považovaný za povrchovo aktívnu látku so pseudodvojným reťazcom. IPA tvoria radšej vezikuly ako micely. Vysvetľuje to kritický parameter balenia, ktorý sa používa na predpovedanie štruktúry agregátov povrchovo aktívnych látok vo vodnom prostredí. Kritické balenie IPA je väčšie ako jeho prekursorov na tvorenie micel v dôsledku toho, že sa zníži efektívna plocha hlavy. Tvorba vezikúl je spontánny proces [1].



Obrázok 9: Vytvorenie IPA z SDS a CTAB [19]



Obrázok 10: Vznik kataniontového vezikulárneho systému

2.3.1 Tvorba kataniontových vezikúl

Zlúčeniny, ktoré sa najčastejšie využívajú pre tvorbu vezikúl, sú alkylamónium alkylsulfáty alebo sulfonáty. Kataniontové vezikuly s dvoma symetrickými alkylovými reťazcami, u ktorých je počet atómov uhlíka menší nanajvýš rovný 10, sú takmer nerozpustné vo vode. Taktiež aj v prípade, že sú vezikuly z asymetrických alkylových reťazcov, kde je jeden dlhý (počet uhlíkov je väčší nanajvýš rovný 11) a jeden krátky (počet uhlíkov je menší nanajvýš rovný 9). Kataniontové vezikuly s kratšími reťazcami sú rozpustné vo vode a tvoria micelárne roztoky [2].

2.3.2 Geometria kataniontových vezikúl

Geometria povrchovo aktívnych látok má hlavnú úlohu pri definovaní agregáčného správania kataniontových vezikúl. Druh agregátov závisí od hodnoty parametra kritického balenia P_c :

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

kde a_0 je minimálna medzifázová oblasť obsadená hlavnou skupinou, v je objem a l_c je maximálna dĺžka hydrofóbného chvosta v natiahnutom stave. Pokiaľ bude $P_c < 0,33$ povrchovo aktívna látka je schopná tvoriť sférické micely. Valcovité alebo diskovité tvary sa budú vytvárať pri $0,33 \leq P_c \leq 0,5$. Pri tvorbe vezikúl by mala byť hodnota P_c medzi 0,5 a 1. Pre hodnotu rovnú 1 vznikajú rovinné dvojvrstvy a pri $P_c > 1$ sa tvoria obrátené micely.

Na základe kritického parametra balenia môžeme povedať, že účinná plocha medzifázovej hlavnej skupiny každého IPA partnera môže byť podstatne menšia ako plocha pre každú jednotlivú povrchovo aktívnu látku. Je to vďaka elektrostatickému pôsobeniu medzi hlavnými skupinami a udržiava sa hydrofóbny objem koncov povrchovo aktívnych látok.

Veľký rozdiel v dĺžke hydrofóbného chvosta stabilizuje tvorbu vezikúl s krátkymi koncami, ktoré sa nachádzajú vo vnútri dvojvrstvy. To umožňuje energeticky priaznivé balenie dlhším koncom vo vonkajšej vrstve. Vnútorne a vonkajšie membrány musia mať rovnaké a spontánne zakrivenie [20].

2.3.3 Aplikácia

Kataniontové vezikuly môžu interagovať s molekulami DNA, ktoré sú záporne nabité. Vytvorí sa komplex, vďaka ktorému môžu vstupovať do bunky prostredníctvom endocytózy. Vezikuly tvoria agregáty, čo vedie k nízkej génovej transfekčnej účinnosti komplexov vezikúl/DNA. Skúmanie možností zlepšenia je v procesoch viacerých štúdií [21].

Vezikulárne štruktúry vďaka svojej hydrofóbnej a hydrofilnej oblasti dokážu enkapsulovať hydrofilné aj hydrofóbne materiály. Táto vlastnosť vyzdvihuje potenciál vezikúl v aplikácii podávania liečiv a taktiež aj riadeného uvoľňovania liečiv [1].

2.4 Dynamický rozptyl svetla

Disperzné sústavy vykazujú charakteristické optické vlastnosti. Optické vlastnosti ovplyvňuje veľkosť častíc, elektrická vodivosť a absorpcia svetla látkou. Po dopade svetelného lúča na vzorku sa svetlo rozptýli alebo absorbuje, a tým sa zníži intenzita žiarenia. Veľkosť efektov je závislá na vlastnostiach častíc v systéme a na vlnovej dĺžke svetla. V disperzných systémoch, ktoré obsahujú koloidné častice a častice o väčších rozmeroch sa uplatňuje hlavne rozptyl svetla.

Dynamický rozptyl svetla (DLS) je metóda, ktorá využíva meranie intenzity rozptýleného svetla z laserového zdroja. Touto metódou sa určuje veľkosť častíc a distribúcia veľkosti častíc v submikrónovej oblasti. Monochromatické koherentné žiarenie dopadá na vzorku, kde sú rozptýlené častice. Následne je žiarenie zachytené optickými prvkami, pomocou ktorých sa meria intenzita rozptýleného svetla. Princípom merania veľkosti častíc je sledovanie rýchlosti Brownovho pohybu. Častice sa pohybujú v kvapaline náhodne a určitou rýchlosťou. Intenzita rozptýleného svetla sa mení v závislosti na pohybe častíc. Čím rýchlejšie sa častice pohybujú, tým rýchlejšie sa mení intenzita rozptýleného svetla. Zmena intenzity rozptýleného svetla je priamo úmerná veľkosti molekúl za predpokladu, že teplota a viskozita rozpúšťadla je známa a konštantná. Difúzny koeficient sa určí štatickou analýzou. Následne sa veľkosť častíc (d_h) vypočíta pomocou Stokes-Einsteinovej rovnice:

$$d_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot D}, \quad (2)$$

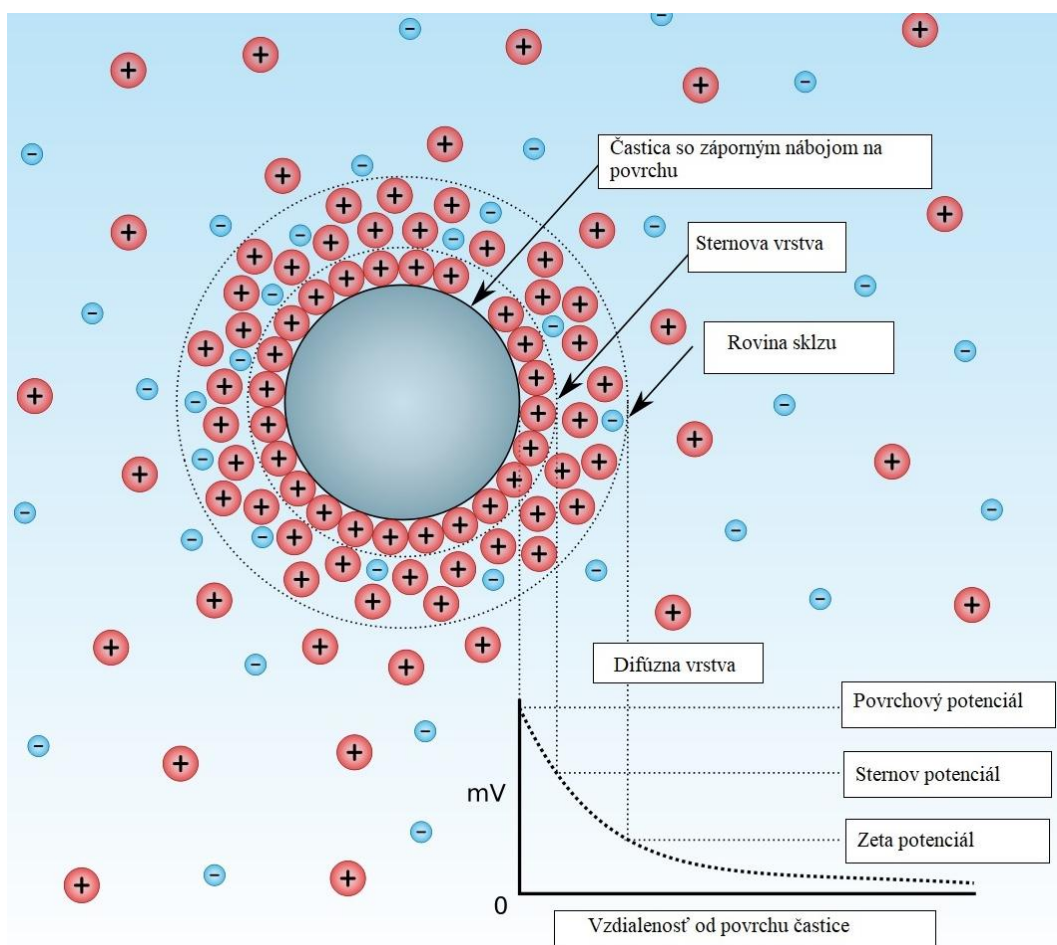
kde k_B je Boltzmannova konštanta, T termodynamická teplota, η_0 viskozita rozpúšťadla a D difúzny koeficient [22, 23, 24, 25].

2.5 Zeta potenciál

Väčšina kvapalín obsahuje ióny, ktoré v koloidných systémoch nesú náboj. Ak je nabitá častica v styku s inými iónami roztoku, začnú sa k jej povrchu priťahovať opačne nabité ióny. Ióny, ktoré sa zoskupia okolo povrchu častíc vytvoria spolu s povrchom častice dve vrstvy. Tieto vrstvy sú navzájom opačne nabité a tvoria tak elektrickú dvojvrstvu. Elektrická dvojvrstva sa skladá z vnútornej časti, ktorá sa nazýva Sternova vrstva. Ióny sú v tejto vrstve viazané na povrch častice pevne. Vonkajšia časť je tvorená priťahovanými iónmi opačného znamienka, ktoré sú viazané elektrickými a absorpčnými silami. Tieto ióny, ktoré sú vzdialenejšie od povrchu častice, vytvárajú difúznú vrstvu. Vo vnútornej vrstve sa ióny nepohybujú, ale v difúznej vrstve áno. Difúzna vrstva sa vyznačuje teoretickou hranicou.

Ióny sa po aplikácii napätia vo vnútri tejto hranice budú pohybovať s časticou a vonkajšie ióny nie. Toto rozhranie je označované ako rovina sklzu. Potenciál, ktorý vzniká na tejto hranici sa nazýva zeta potenciál. Zeta potenciál sa mení podľa vzdialenosti od povrchu častice. Ak má systém dostatočne záporný alebo kladný zeta potenciál a odpudivé sily sú dostatočne veľké, systém je elektrostaticky stabilný. Nestabilný systém sa vyznačuje hodnotami od -30 mV do 30 mV .

Elektroforetický rozptyl svetla meria, ako rýchlo sa častice pohybujú v kvapaline po aplikovaní elektrického pola. Pri známej rýchlosti častice, veľkosti aplikovaného pola a zahrnutí konštánt ako je viskozita a dielektrická konštanta vzorku, môžeme vypočítať zeta potenciál. Pri meraní zeta potenciálu je veľa faktorov, ktoré ovplyvňujú meranie, napríklad zmena koncentrácie roztoku, hodnota pH a prídanie elektrolytu [22, 23, 25].

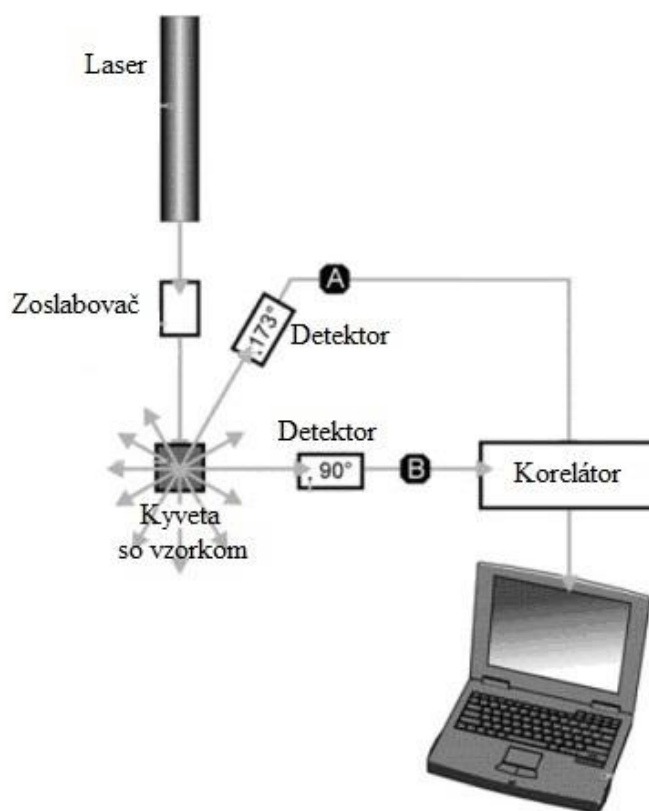


Obrázok 11: Elektrická dvojvrstva a zeta potenciál [26]

2.5.1 Inštrumentácia

Ako zdroj svetla sa používa laser na ožiarenie vzorku v kyvete. Za zdrojom svetla sa nachádza zoslabovač, ktorý znižuje intenzitu laserového lúču. U veľmi koncentrovaných vzorkách alebo pri meraní veľkých častíc je to dôležité z toho dôvodu, aby nedochádzalo k preťaženiu detektora. Následne je zaradený detektor, ktorý meria intenzitu rozptýleného svetla. Zetasizer Nano obsahuje detektor, ktorý sníma buď pod uhlom 173° alebo 90° . Pri uhle 173° sa jedná o spätný rozptyl svetla. Svetelný lúč vtedy neprechádza celou vzorkou,

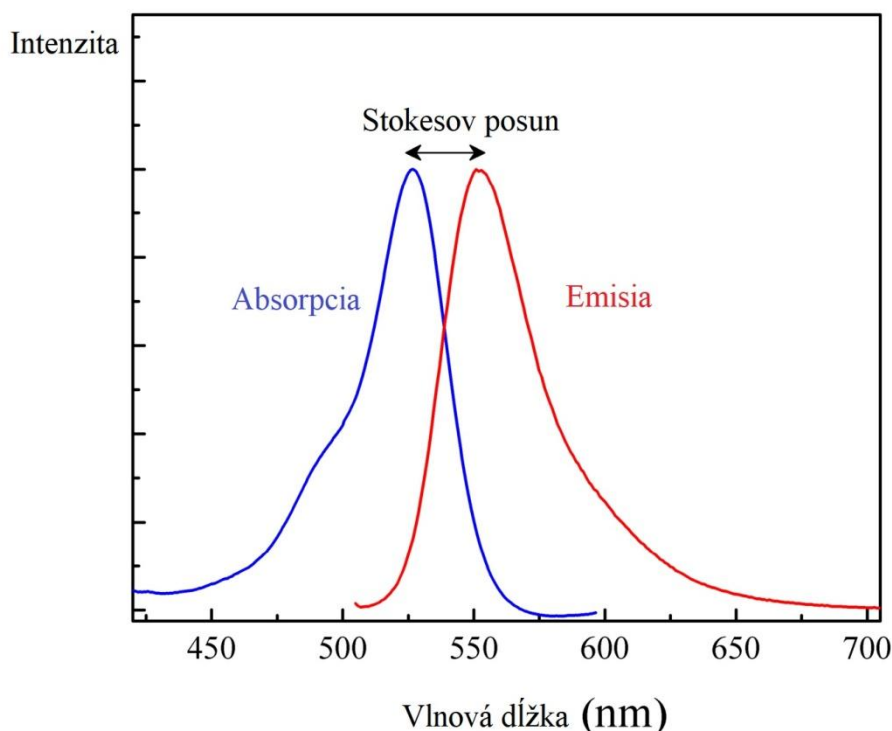
má kratšiu optickú dráhu a môžeme merať vzorky aj o vyššej koncentrácii. Ďalším komponentom je digitálny korelátor, ktorý spracováva intenzitu rozptylu svetla v časových úsekoch a následne informácie vyhodnotí počítač [22, 25, 27].



Obrázok 12: Schéma prístroja na meranie zeta potenciálu [28]

2.6 Fluorescencia

Fluorescencia je jav, pri ktorom molekula v základnom singletovom stave (S_0) po absorpcii svetla prejde z orbitálu s najnižšou energiou do najbližšieho neobsadeného orbitálu s vyššou energiou. Vtedy dochádza k excitácii elektrónu. Excitované stavy môžu nastať dva. Prvý je singletový stav (S_1), v ktorom majú elektróny antiparalelné spiny. Druhý je tripletový stav (T_1) a spiny elektrónov sú paralelné, tu sa jedná o tzv. zakázaný spin. Jabloňského diagram popisuje schému zobrazenia energií molekúl v základnom a excitovanom stave. Pri fluorescencii nastane spinovo povolený prechod z rovnovážnej hladiny singletového stavu do niektorého z vibračných hladín základného stavu. Po absorpcii svetla o určitej vlnovej dĺžke nastáva emisia, ktorej vyžiarené svetlo má dlhšiu vlnovú dĺžku, nižšiu energiu a inú farbu. Tento posun (Stokesov posun) vzniká ako dôsledok straty energie nežiarivými prechodmi [29, 30].



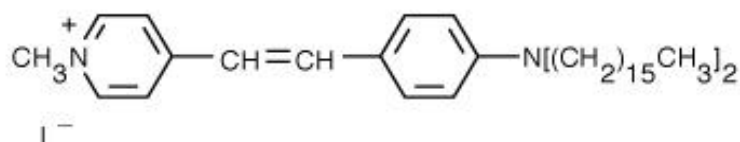
Obrázok 13: Stokesov posun [31]

2.6.1 Fluorescenčné sondy

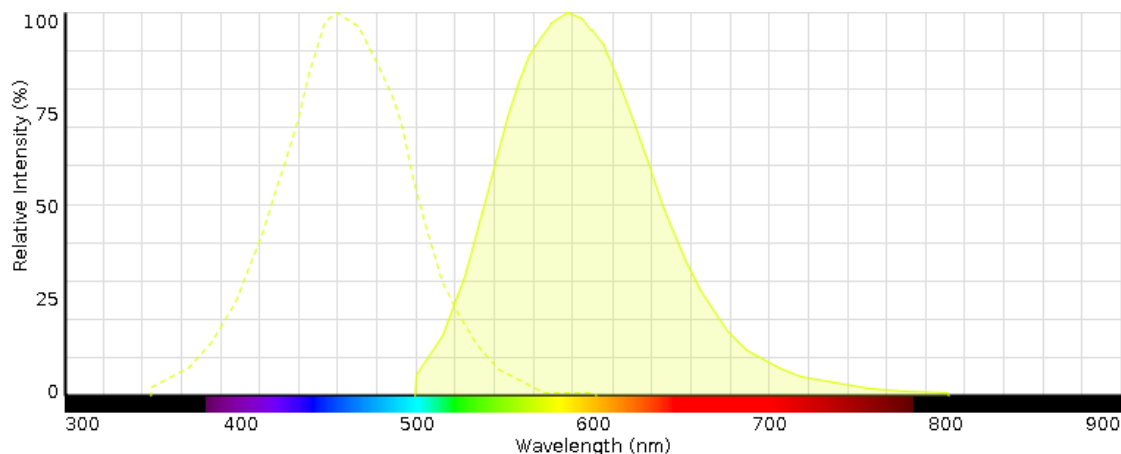
Fluorescenčné sondy (fluorofory) sú najčastejšie organické látky, ktoré vykazujú fluorescenciu. Na štruktúru viazanej molekuly sa môžu viazať kovalentne aj nekovalentne a menia svoje vlastnosti. Fluorofory sa rozdeľujú do troch skupín: vnútorné, vonkajšie kovalentne naviazané a vonkajšie asociačné fluorofory. Vnútorné fluorofory sa vyskytujú prirodzene, patria sem napr. proteíny, NADH, NADPH. Vonkajšie kovalentne viazané fluorofory sa označujú ako fluorescenčné značky. Fluorescenčné značky sa využívajú najčastejšie k značeniu bielkovín, napr. fluoresceín. Vonkajšie asociačné fluorofory, známe aj ako fluorescenčné sondy, sú obvykle aromatické zlúčeniny, polyaromatické uhľovodíky alebo heterocykly a viažu sa nekovalentne. Výber sond sa uskutočňuje predovšetkým podľa jej štruktúry a charakteru: amfifilný, hydrofilný, hydrofóbny [32, 33].

2.6.1.1 DiA

Sonda DiA alebo 4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-methylpyridinium jodid je lipofilná fluorescenčná sonda. Využíva sa ako membránové farbivo. Skladá sa z dvoch alkylových koncov, ktoré sú orientované paralelne k fosfolipidovému acylovému reťazcu. Jej emisné spektrum je veľmi široké a môže byť detekované zeleným, oranžovým a červeným filtrom [34].



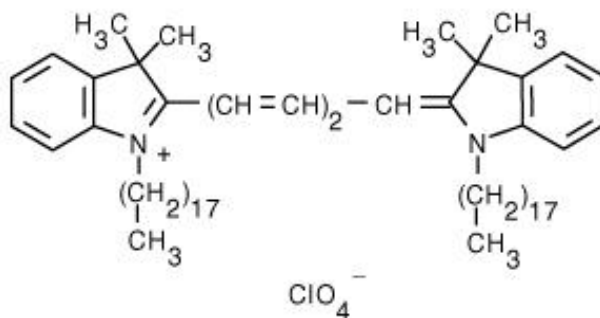
Obrázok 14: Štruktúra DiA [34]



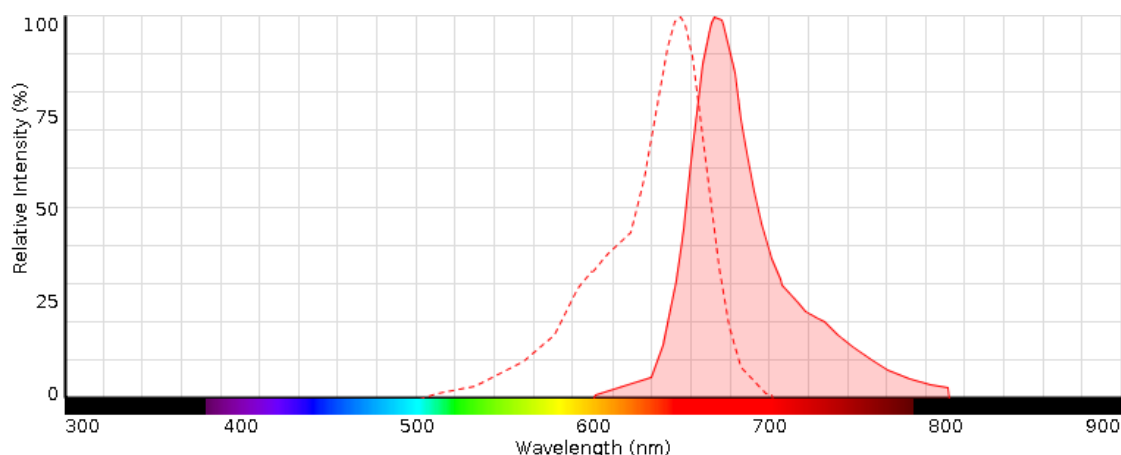
Obrázok 15: DiA – emisné spektrum je znázornené plnou čiarou, excitačné spektrum čiarkovanou čiarou [34].

2.6.1.2 DiD

Sonda DiD alebo 1,1'-dioktadecyl-3,3',3'-tetramethylindodikarbokyanin perchlorát taktiež patrí do skupiny lipofilných fluorescenčných sond. Využíva sa na označovanie bunkových membrán. Jej emitované žiarenie sa nachádza v červenej oblasti. Silnú fluorescenciu vykazuje po začlenení do membrány a vo vode fluoreskuje len slabo. Má mimoriadne vysoký extinkčný koeficient a životnosť krátkych excitovaných stavov v lipidových prostrediach [35].



Obrázok 16: Štruktúra DiD [35]



Obrázok 17: DiD – emisné spektrum je znázornené plnou čiarou, excitačné spektrum čiarkovanou čiarou [35].

2.6.2 Fluorescenčná korelačná spektroskopia

Fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS) je metóda, ktorá sleduje časovú zmenu intenzity fluorescence, ktorá je priradená fyzikálnemu alebo chemickému parametru, ako je napríklad translačný difúzny koeficient, rýchlosť toku, rýchlostná konštanta chemickej reakcie, rotačný difúzny koeficient, molekulová hmotnosť alebo agregácia.

Molekuly v konfokálnom objeme emitujú fluorescenčné žiarenie. To je následne prenášané mikroskopom na detektor. Intenzita fluorescence je určená priemerným počtom molekúl v konfokálnom objeme. Pri vstupe molekuly do objemu sa intenzita fluorescence zvýši, pri výstupe sa následne zníži. Dobu fluorescenčnej zmeny určuje rýchlosť difúzie molekúl a veľkosť konfokálneho objemu. Konfokálny objem býva 0,3 až 1 fl.

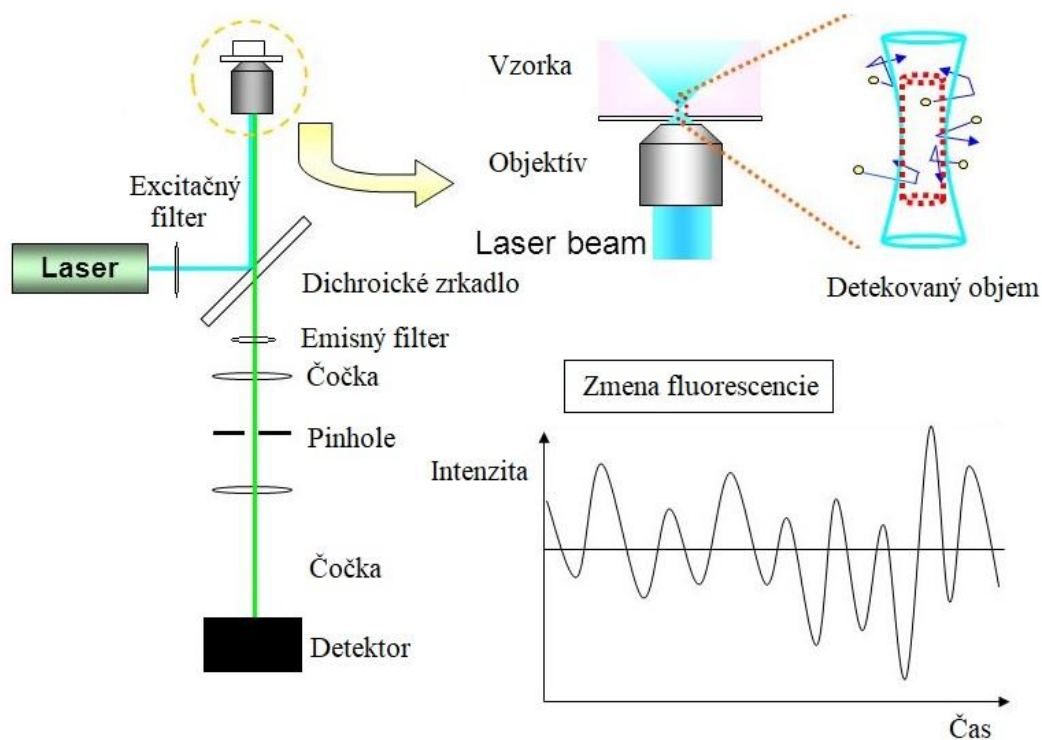
V metóde FCS je hlavnou zložkou konfokálny mikroskop. Konfokálny mikroskop patrí do skupiny klasického optického mikroskopu, ktorý skenuje sledovanú vzorku a vytvára jej obraz. Avšak v FCS mikroskop umožňuje sledovať časové zmeny intenzity fluorescence. Dôležitou podmienkou je fluorescencia vzorky, ktorá sa docielí fluorescenčným značením, pokiaľ vzorka nevykazuje vlastnú fluorescenciu. Fluorescenčná sonda musí byť vybraná tak, aby mala vysoký kvantový výťažok a aby vydržala vysokú intenzitu žiarenia v ohnisku mikroskopu. Statická analýza fluorescenčného signálu určí priemernú dobu molekuly v detekčnom objeme, koncentráciu danej látky a dobu života fluoroforu, ktorá predstavuje ako dlho molekula zostala v excitovanom stave.

Fluorescenčná korelačná spektrometria umožňuje zobrazit' jednu molekulu, celé časovo rozlíšené obrázky FLIM, kros-korelačnú FCS, časovo rozlíšenú FCS a časovo rozlíšenú kros-korelačnú FCS [36, 37, 38].

2.6.2.1 Inštrumentácia

Hlavnou súčasťou je konfokálny fluorescenčný mikroskop. Ako zdroj žiarenia sa používa laser. Vo fluorescenčnom mikroskope žiarenie excituje fluorofory vzorky. Excitovaný fluorofor emituje fluorescenciu o nižšej energii než je excitačné žiarenie. Emitované žiarenie je izolované pomocou filtrov a fluorescencia je snímaná objektívom. Pomocou dichorického zrkadla je emisné žiarenie odrazené späť a emisný filter prechádza až do detektoru. Týmto sa

oddeli excitačné a emisné žiarenie. Konfokálna štrbina „pinhole,, sa nachádza v detekčnej časti optickej dráhy. Slúži na odklonenie nežiaduceho signálu z oblasti mimo ohniskovú rovinu. Najčastejšie sa používa objektív s vodnou imerziou, ale môže byť použitá aj olejová imerzia [39, 40].



Obrázok 18: Inštrumentácia FCS [41]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Kladne nabité kataniontové vezikuly

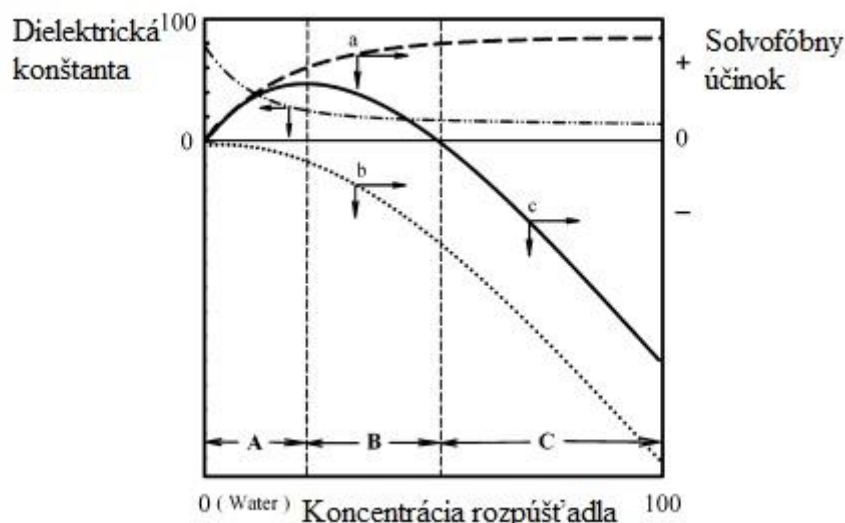
Chih-Jung Wua a spol. sa vo svojej štúdií zamerali na prípravu kladne nabitých kataniontových vezikúl za predpokladu zvýšenia stability systému a tesnosti membrány. Kataniontové vezikuly CTAB-DS boli zmiešané s kladne nabitou povrchovo aktívnou látkou dialkyldimetylamónium bromidom DXDAB v rôznych molárnych pomeroch od 0,1 do 0,5. Stabilitu kladne nabitých kataniontových vezikúl následne skúmali pomocou merania zeta potenciálu.

Kladne nabité kataniontové vezikuly, ku ktorým bolo DXDAB pridané v molárnom pomere nižšom ako 0,3 vykazovali zlú fyzickú stabilitu. Od molárneho pomeru 0,3 bola stabilita vezikúl vyššia s vyšším molárnym pomerom DXDAB. Avšak zeta potenciály vezikúl neboli významne zmenené so zvýšením DXDAB. To naznačuje, že elektrostatické pôsobenie nebolo hlavným faktorom pre zlepšenie stability. Predpokladá sa, že DXDAB, ktoré má dva symetrické alkylové reťazce zohráva úlohu pri zmene balenia CTAB-DS. Zmenou balenia sa zlepši stabilita vezikúl. So zvyšovaním DXDAB by sa mohol premiestniť kladný reťazec CTAB a vytvorili by sa DXDA-DS. To by následne viedlo k vyčnievaniu hlavnej skupiny a tým k zníženiu chybného balenia. S rastúcou dĺžkou reťazca DXDAB by sa zvyšovala molekulárna interakcia vo vezikulárnej dvojvrstve, čo by inhibovalo rozpustenie kladného CTAB a zlepšila by sa stabilita systému. Avšak zhoda s dĺžkou hydrofóbného reťazca vo vezikule by mohla spôsobiť rozpadnutie vezikúl na dvojvrstvové fragmenty. Táto nestabilita sa preukazuje u dlho skladovaných vezikúl [1].

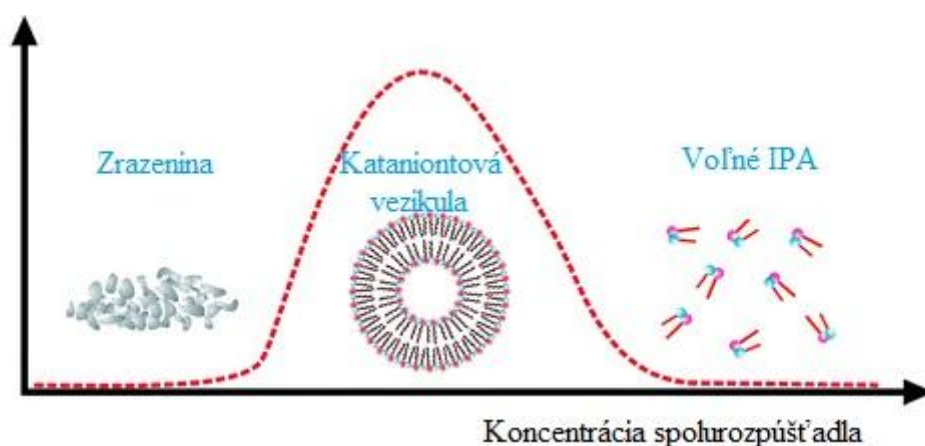
3.2 Účinky spolurozpúšťadla na stabilitu kataniontových vezikúl

Shao-Jen Yeh a spol. skúmali účinok pridávania rôznych koncentrácií spolurozpúšťadla na stabilitu kataniontových vezikúl. Ako spolurozpúšťadlá používali alkoholy s krátkymi alkylovými reťazcami (metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol). Dôkaz meraním dynamického rozptylu svetla preukázal, že by vezikuly mohli byť účinne stabilizované pridaním vhodného množstva 1-propanolu a 1-butanolu. Životnosť bola pozorovaná až 1 rok a 132 dní pre 5% roztok 1-butanolu a 15% roztok 1-propanolu. Stabilita je závislá na koncentrácii pomocného rozpúšťadla. Stabilita vezikúl sa zvyšovala so zvýšením koncentrácie pomocného rozpúšťadla až dosiahla maximum. Ďalej sa už so zvyšovaním koncentrácie znižovala. Po dosiahnutí maxima sa vezikuly rozpadli na samostatné IPA. Vysvetlenie efektov spolurozpúšťadla je založené na strednej dielektrickej konštante.

Pridanie spolurozpúšťadla, ktoré znižuje strednú dielektrickú konštantu roztoku môže vyvolať dva protikladné účinky na interakcie medzi zmiešaným rozpúšťadlom a IPA. Pri znižovaní dielektrickej konštanty zmiešaných rozpúšťadiel zvýšením koncentrácie spolurozpúšťadla sa na jednej strane zosilní solvofóbný účinok hydrofílnych hlavných skupín IPA a na druhej strane bude zoslabená hydrofóbná chvostová časť IPA. Tieto dva protikladné účinky sa navzájom vyvažujú a vedú k zmenám stability vezikúl. V celom rozsahu vedú k 3 efektom: zvýšenie stability vezikulárneho stavu, zmenšenie stability vezikulárneho stavu a stav molekulárnej disperzie. Na objasnenie mechanizmu efektov, ktoré vznikajú pridaním alkoholov ako spolurozpúšťadiel je potreba previesť ešte veľa experimentov [42].



Obrázok 19: Schematické znázornenie efektu pridania spolurozpúšťadla na formovanie kataniontových vezikúl. Krivka a znázorňuje solvofóbny účinok na hlavné skupiny IPA, b solvofóbny účinok na chvostové skupiny IPA, c celkový solvofóbny účinok na IPA [42].



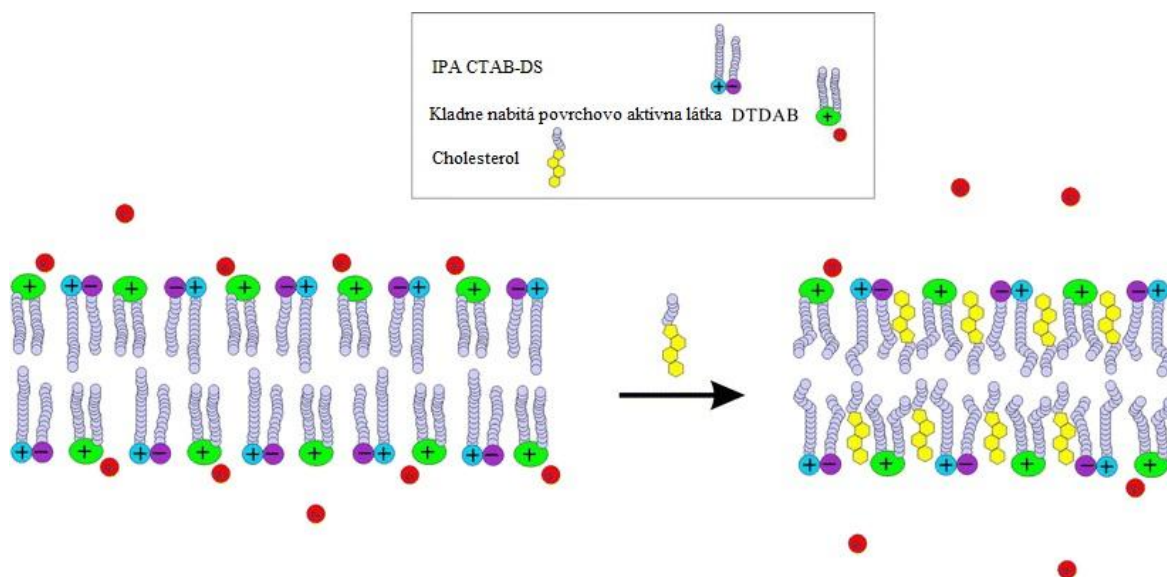
Obrázok 20: Vplyv koncentrácie spolurozpúšťadla na formovanie vezikúl [42]

3.3 Zvýšenie fyzikálnej stability kladne nabitých kataniontových vezikúl v prítomnosti chloridu vápenatého

IPA a dvojité reťazec kladne nabitej povrchovo aktívnej látky dimetyldimyrystylamóniumbromidu vytvárajú kladne nabitú kataniontovú vezikulu. Tieto vezikuly by mohli mať potenciálnu aplikáciu pri prenose génov. Kataniontové vezikuly môžu interagovať s molekulami DNA za tvorby komplexov, ktoré môžu vstupovať do bunky pomocou endocytózy. Štúdium fyzikálnych vlastností nevírusových vezikúl použitých ako nosiče DNA na prenos génov sa stáva populárnym. Avšak kataniontové vezikuly tvoria agregáty, čo vedie k nízkej transfekčnej génovej účinnosti komplexu vezikula-DNA. Mnohé štúdie sa preto zaoberajú zvyšovaním účinnosti génovej transfekcie komplexov vezikula-DNA a uvádzajú, že prítomnosť chloridu vápenatého vo vodnej fáze má potenciál zlepšiť účinnosť transfekcie génov. **Chen-Hsuan Lee a spol.** skúmali, či pridanie chloridu

vápenatého bude mať kladný alebo záporný účinok na fyzikálnu stabilitu vezikulárneho systému a aký vplyv má na vezikulárny systém cholesterol.

Bolo preukázané, že chlorid vápenatý má na fyzikálnu stabilitu vezikulárneho systému negatívny vplyv, pretože stabilita sa znížila. Začlenenie cholesterolu však môže zlepšiť fyzikálnu stabilitu vezikúl aj v prítomnosti chloridu vápenatého vo vysokej koncentrácii. Pri začlenení cholesterolu sa pohyb alkylového reťazca zvýšil a molekulárne balenie bolo menej usporiadané. Po začlenení cholesterolu do systému nadobúda dvojvrstva charakter fluidnej vrstvy, a tým je vezikulárny systém stabilný [43].



Obrázok 21: Začlenenie cholesterolu do vezikulárneho systému [43]

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Chemikálie

Záporne nabitá povrchovo aktívna látka

Dodecylsulfát sodný SDS

Vzorec: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$

$M_w = 288,38 \text{ g/mol}$

CAS: 205-788-1

Sigma Aldrich

Kladne nabitá povrchovo aktívna látka

Hexadecyltrimetylamónium chlorid CTAC

Vzorec: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Cl})(\text{CH}_3)_3$

$M_w = 320 \text{ g/mol}$

CAS: 112-02-07

Sigma Aldrich

Hexadecyltrimetylamónium bromid CTAB

Vzorec: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$

$M_w = 364,45 \text{ g/mol}$

CAS: 57-09-0

Sigma Aldrich

Tetradecyltrimetylamónium bromid TTAB

Vzorec: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$

$M_w = 336,41 \text{ g/mol}$

Č.šarže: 214-290-3

CAS: 1119-97-7

Fluka Analytical

Dodecyltrimetylamónium bromid DTAB

Vzorec: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$

$M_w = 308,35 \text{ g/mol}$

CAS: 1119-94-4

Sigma Aldrich

Diocetadecyldimetylammónium chlorid DODAC

Vzorec: $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}]_2\text{N}(\text{Cl})(\text{CH}_3)_2$

$M_w = 586,65 \text{ g/mol}$

CAS: 107-64-2

Alfa Aesar

Fluorescenčné sondy

DiA

4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-methylpyridinium jodid

$M_w = 933,87 \text{ g/mol}$

CAS: 41085-99-8

Sigma Aldrich

DiD

1,1'-dioketadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodikarbokyanin perchlorát

CAS: 1639-15-3

Sigma Aldrich

Nilska červen

CAS: 7385-67-3

$M_w = 318,37 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Sigma Aldrich

Deionizovaná voda

H₂O, Systém ELGA

Chloroform

CAS: 67-66-3

Penta s.r.o.

Acetón

CAS: 67-64-1

Penta s.r.o.

Metanol

CAS: 67-56-1

Penta s.r.o.

4.2 Použité metódy

4.2.1 Príprava vodného roztoku kladne nabitej povrchovo aktívnej látky

Bol pripravený 20 mM vodný roztok rozpustením 1,4419 g dodecylsulfátu sodného v 250 ml deionizovanej vody. Roztok bol dôsledne premiešaný na miešačke do vytvorenia číreho roztoku.

4.2.2 Príprava vodného roztoku záporne nabitej povrchovo aktívnej látky

Bol pripravený 20 mM vodný roztok rozpustením 1,6 g hexadecyltrimetylamónium chloridu v 250 ml deionizovanej vody, 1,8230 g hexadecyltrimetylamónium bromidu v 250 ml deionizovanej vody, 1,6821 g tetradecyltrimetylamónium bromidu v 250 ml deionizovanej vody a 1,5427 g dodecyltrimetylamónium bromidu v 250 ml deionizovanej vody. Roztok bol miešaný na miešačke až dokým sa nevytvoril číry roztok.

4.2.3 Príprava IPA

20 mM roztoky opačne nabitých povrchovo aktívnych látok boli zmiešané a deň ponechané na precipitáciu pri izbovej teplote. Následne sa zrazenina oddelila od vodnej fázy centrifugáciou 5 500 ot/min. Vytvorená zrazenina sa prefiltrovala a prečistila deionizovanou vodou. Filtračný koláč bol sušený v sušiarňi pri 50 °C počas 3 dní, čím bol získaný prášok IPA.

4.2.4 Príprava kataniontových vezikulárnych systémov

Vytvorený prášok IPA bol rozpustený v 5 ml chloroformu. Chloroform bol odparený na magnetickej miešačke za vzniku tenkého filmu. Tenký film bol následne hydratovaný 30 ml deionizovanej vody. Roztok bol vortexovaný, aby sa tenký film rozpustil v deionizovanej vode. Po rozpustení filmu bol roztok sonifikovaný 60 minút pri teplote 70 °C.

Tabuľka 1: Prehľad kataniontových vezikulárnych systémov vytvorených kombináciou rôznych povrchovo aktívnych látok

Kataniontové vezikulárne systémy	
Hexadecyltrimetylamónium chlorid + dodecylsulfát sodný	CTAC-DS
Hexadecyltrimetylamónium bromid + dodecylsulfát sodný	CTAB-DS
Tetradecyltrimetylamónium bromid + dodecylsulfát sodný	TTAB-DS
Dodecyltrimetylamónium bromid + dodecylsulfát sodný	DTAB-DS

4.2.5 Príprava kladne nabitých kataniontových vezikulárnych systémov

Vytvorený prášok IPA bol zmiešaný s rôznymi navážkami dioktadecyldimetylamónium chloridu, aby výsledná koncentrácia v roztoku bola 10 hm. %, 30 hm. % a 50 hm. %. Následne bolo pridaných 5 ml chloroformu. Chloroform bol odparený za vzniku tenkého filmu. Tenký film bol hydratovaný 30 ml deionizovanej vody a roztok bol vortexovaný, aby došlo k rozpusteniu všetkých častíc. Následne bol roztok sonifikovaný 60 minút pri teplote 70 °C.

4.2.6 Príprava fluorescenčne zafarbených kataniontových vezikulárnych systémov

Zásobný roztok nílskej červene bol pripravený navážením 0,015 9 g nílskej červene. Navážka bola kvantitatívne prevedená do odmernej banky s objemom 100 ml a odmerná banka bola doplnená po rysku acetónom. Výsledná koncentrácia roztoku bola $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Následne zvolením vhodného riedenia bol pripravený roztok o koncentrácii $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zásobné roztoky DiA a DiD boli pripravené rovnakým spôsobom ako nílska červená. Navážky boli rozpustené v metanole. Výsledná koncentrácia roztokov fluorescenčných sond DiA a DiD bola $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Potrebné množstvo fluorescenčnej sondy bolo napipetované do vialky a následne bolo rozpúšťadlo odparené. Kataniontové vezikulárne systémy rozpustené vo vode boli pridané k sonde. Nasledovalo vortexovanie vzorky pre úplne rozpustenie častíc a sonifikácia po dobu 60 minút pri 70 °C. Výsledná koncentrácia fluorescenčnej sondy v kataniontových vezikulárnych systémov bola $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

4.2.7 Dynamický rozptyl svetla a zeta potenciál

Meranie veľkosti častíc prebiehalo na prístroji ZetaSizer Nano ZS od firmy Malvern Instrument v režime *size*. Pri meraní veľkosti častíc bola vzorka prevedená do kyvety a na prístroji boli nastavené parametre merania. Bolo potrebné nastaviť, že rozpúšťadlom v tomto prípade bola voda, teplota 25 °C a použitá kyveta bola plastová. Meranie prebiehalo 10 sekúnd v 3 opakovaníach. Výsledkom merania je graf v závislosti intenzity na veľkosti častíc a taktiež korelačná krivka, ktorá nám zobrazuje priebeh merania.

Meranie zeta potenciálu nás informuje o stabilite systému. Meranie prebiehalo na rovnakom prístroji len v režime *zeta*. V tomto prípade bola kyveta naplnená vzorkou a do nej bola ponorená dip cela s meracou elektródou. Meracou elektródou sa do systému vkladá napätie a prístroj sleduje následnú fázovú odozvu na vloženom napätí. Potrebné parametre pre meranie boli nastavené ako u merania veľkosti častíc.

Pre toto meranie bolo možné použiť vzorky tri TTAB-DS, DTAB-DS a CTAB-DS. CTAC-DS nebolo možné zmerať. Častice u tejto vzorky boli viditeľné okom.

4.2.8 FCS – Systém MicroTime 200

Prístroj na meranie fluorescenčnej korelačnej spektroskopie sa skladá z mikroskopu Olympus IX 71 s dvoma imerznými objektívmi a jedným suchým objektívom, excitačného zdroja, pulznej laserovej diódy o vlnových dĺžkach 375, 470, 510 a 640 nm a štyroch nezávislých detekčných kanálov. V prístroji sa nachádza taktiež externý spektrograf s CCD kamerou Newton, ktorý sníma stacionárne fluorescenčné spektrá súčasne s konfokálnym experimentom.

Pre tento experiment bol použitý mikroskop s objektívom s vodnou imerziou, excitačný zdroj o vlnovej dĺžke 470 nm, emisný filter 690/70 a detektor τ -SPAD 1. Bola sledovaná časová fluktuácia. Namerané dáta boli sledované pomocou programu SymPhoTime 64 a vyhodnocované pomocou programu MS-Excel. Pre meranie FCS boli vybrané kataniontové vezikulárne systémy CTAB-DS a TTAB-DS + 10 hm. % DODAC. Tieto systémy boli vybrané po meraní DLS a tak aby častice neboli v roztoku systému viditeľné okom.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Príprava IPA

Pripravené roztoky samostatných tenzidov boli číre. Po zmiešaný roztoku kladne nabitej PAL a záporne nabitej PAL sa vytvorila zrazenina, ktorá bola odstredená a usušená. Získané výťažky IPA sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Výťažok IPA

Kataniontové vezikulárne systémy	Výt'azok
CTAC-DS	0,0270 g
CTAB-DS	0,0685 g
TTAB-DS	0,7234 g
DTAB-DS	2,0012 g

5.2 Príprava kataniontových vezikulárnych systémov

Pripravené kataniontové vezikulárne systémy mali v každom prípade iný vzhľad. Vo vzorke CTAC-DS boli častice viditeľné okom. Preto táto vzorka nebola použitá pre ďalšie merania. CTAB-DS mal jemný biely zákal a bol vhodný pre nasledujúce meranie DLS a zeta potenciálu. Vo vzorkách TTAB-DS bol viditeľný zákal, a tak bolo pre nasledujúce merania použité 10-násobné riedenie. Vzorka DTAB-DS obsahovala v roztoku gélovitú zrazeninu a pri prídavkoch DODAC vznikol gélovitý roztok. Tieto vzorky boli použité len pre meranie DLS a zeta potenciálu.

Tabuľka 3: Vzhľad roztoku kataniontových vezikúl

Kataniontový vezikulárny systém	Vzhľad vzorky
CTAC-DS	Jemné biele sfarbenie Častice viditeľné okom
CTAB-DS	Jemný biely zákal Častice neviditeľné okom
TTAB-DS	Biely zákal Častice neviditeľné okom
+ 10 hm. % DODAC	Biela gélovitá zrazenina na dne
+ 30 hm. % DODAC	Jemné biele sfarbenie
+ 50 hm. % DODAC	Jemné biele sfarbenie
DTAB-DS	Gélovitá zrazenina v roztoku Častice neviditeľné okom
+ 10 hm. % DODAC	Gélovitý roztok
+ 30 hm. % DODAC	Biely gélovitý roztok
+ 50 hm. % DODAC	Biely gélovitý roztok



Obrázok 22: Vľavo je možné vidieť vzorky CTAC-DS, CTAC-DS + nílka červeň. Vpravo sa nachádzajú vzorky CTAB-DS, CTAB-DS + nílka červeň.



Obrázok 23: Pripravené vzorky z ľava TTAB-DS, TTAB-DS + nílka červeň, TTAB-DS + 10 hm. % DODAC, TTAB-DS + 30 hm. % DODAC, TTAB-DS + 50 hm. % DODAC



Obrázok 24: Pripravené vzorky z ľava DTAB-DS, DTAB-DS + nílka červeň, DTAB-DS + 10 hm. % DODAC, DTAB-DS + 30 hm. % DODAC, DTAB-DS + 50 hm. % DODAC

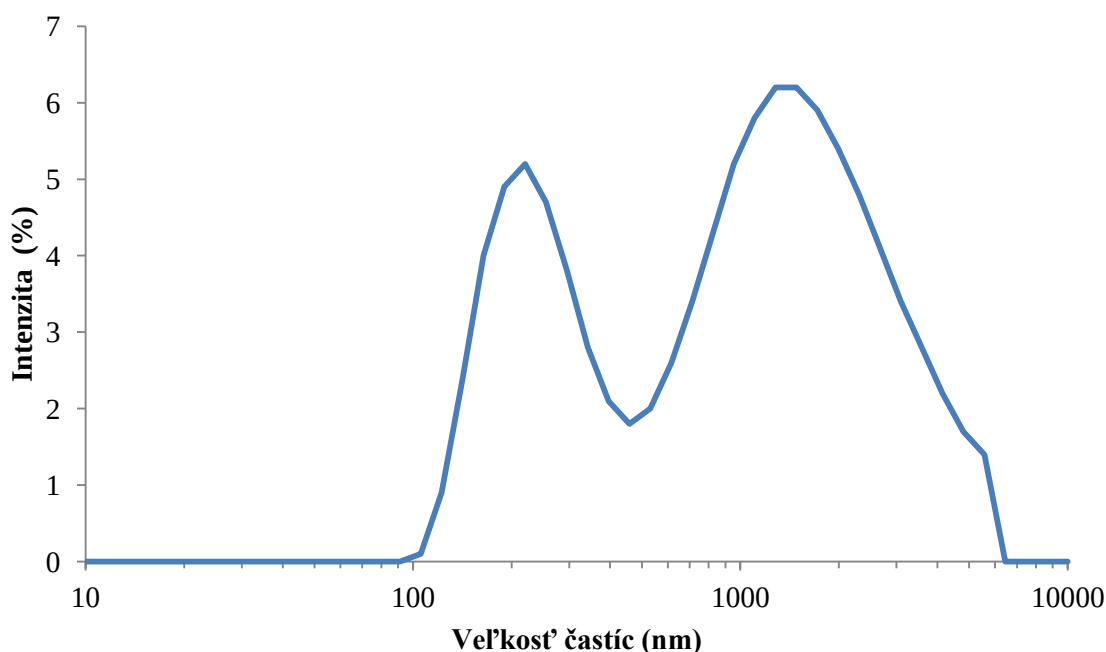
5.3 Dynamický rozptyl svetla

Na obrázku 20 je znázornená vzorka CTAB-DS, u ktorej bolo možné pozorovať častice okolo 100 nm, ale prevládali častice s veľkosťou 1000 nm. Korelačná krivka mala ideálny priebeh.

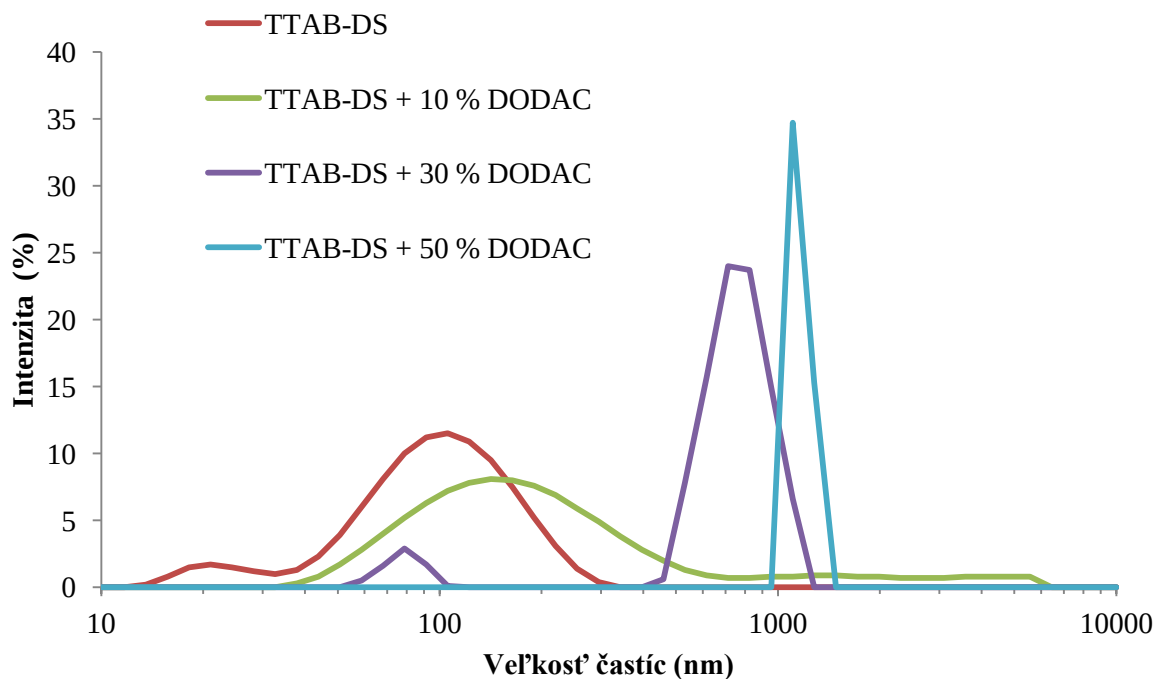
Častice TTAB-DS nadobúdajú veľkosti len do 100 nm. U 10 hm. % prídavku DODAC sa taktiež veľkosti pohybovali okolo 100 nm, avšak u vyšších prídavkov bolo významné zastúpenie častíc okolo 1 000 nm. U 50 hm. % prídavku sa dokonca častice s rozmerom 100 nm v systéme nenachádzali. V tomto prípade vysoký prídavok spôsobil tvorbu veľkých agregátov. Korelačné krivky vyšších prídavkov poukazujú na intenzívnu distribúciu a dáta sú zaťažené veľkou chybou.

Veľkosti častíc systému DTAB-DS sa pohybujú v rozmedzí od 100 nm do 1 000 nm. Korelačná krivka v tomto prípade nevykazuje ideálny priebeh, ďalšie vzorky už sa približujú k ideálnemu priebehu korelačnej krivky. Prídavok 10 hm. % a 30 hm. % DODAC zvýšil počet častíc o veľkosti 100 nm. Stále je ale väčšie zastúpenie častíc s veľkosťou okolo 1 000 nm. V tomto prípade 50 hm. % prídavok DODAC nadobúdala najlepšie výsledky a častice sa nachádzali v rozmedzí 100 nm.

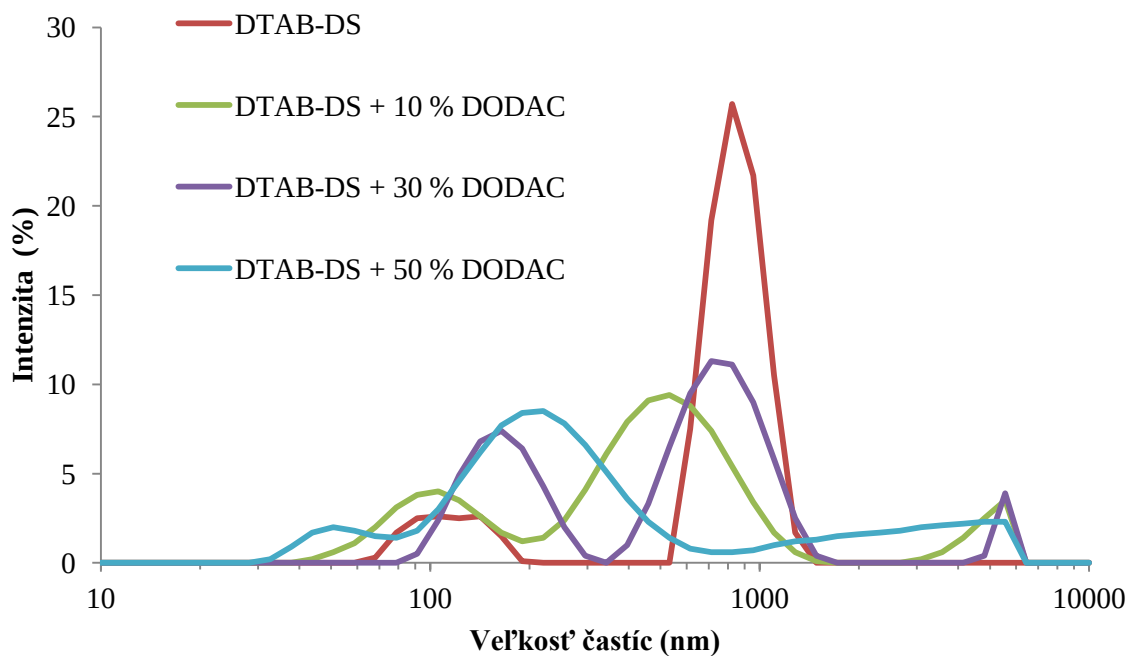
Hodnota okolo 100 nm zodpovedá vezikulárnemu systému, a tak v niektorých prípadoch bola potvrdená prítomnosť kataniontových vezikúl.



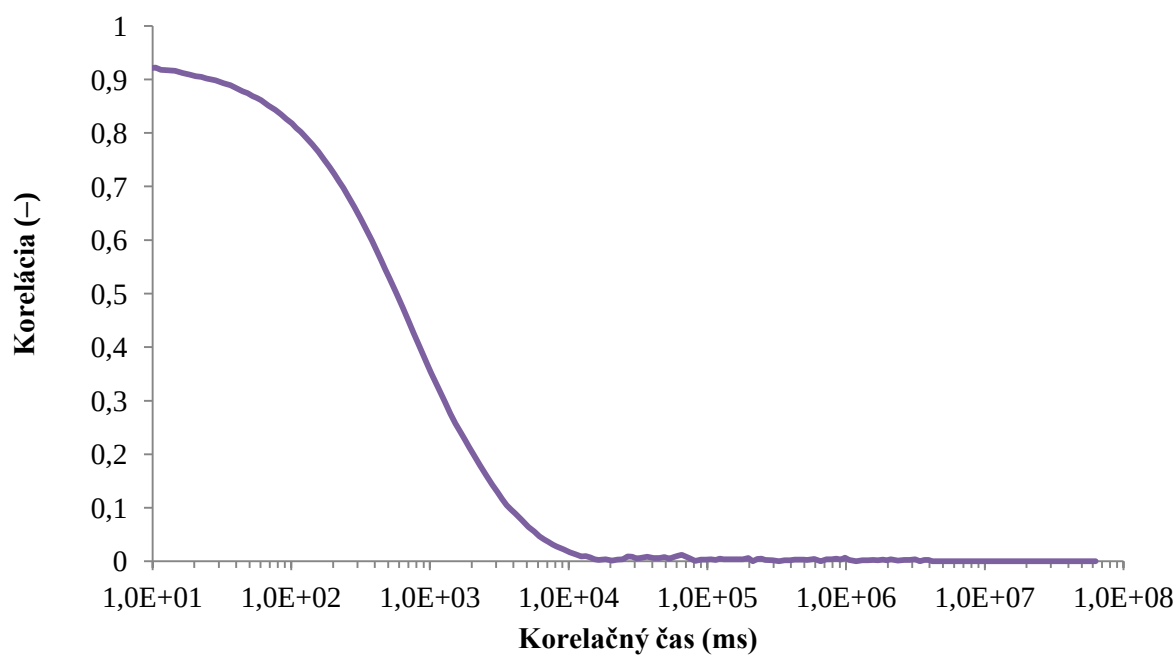
Obrázok 25: Graf závislosti intenzity na veľkosti častíc pre vzorku hexadecyltrimetylamónium bromidu s dodecylsulfátom sodným



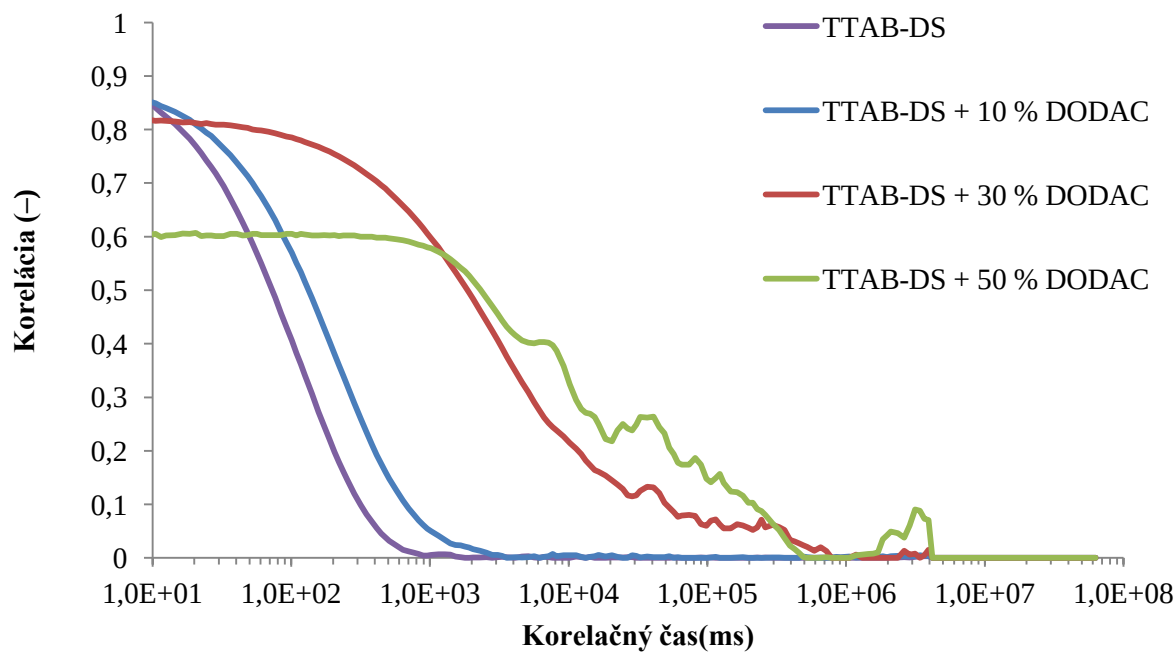
Obrázok 26: Graf závislosti intenzity na veľkosti častíc pre vzorku tetradecyltrimetylamónium bromidu s dodecylsulfátom sodným a 10, 30, 50 hm. % prídavkami dioktadecyldimetylamónium chloridu



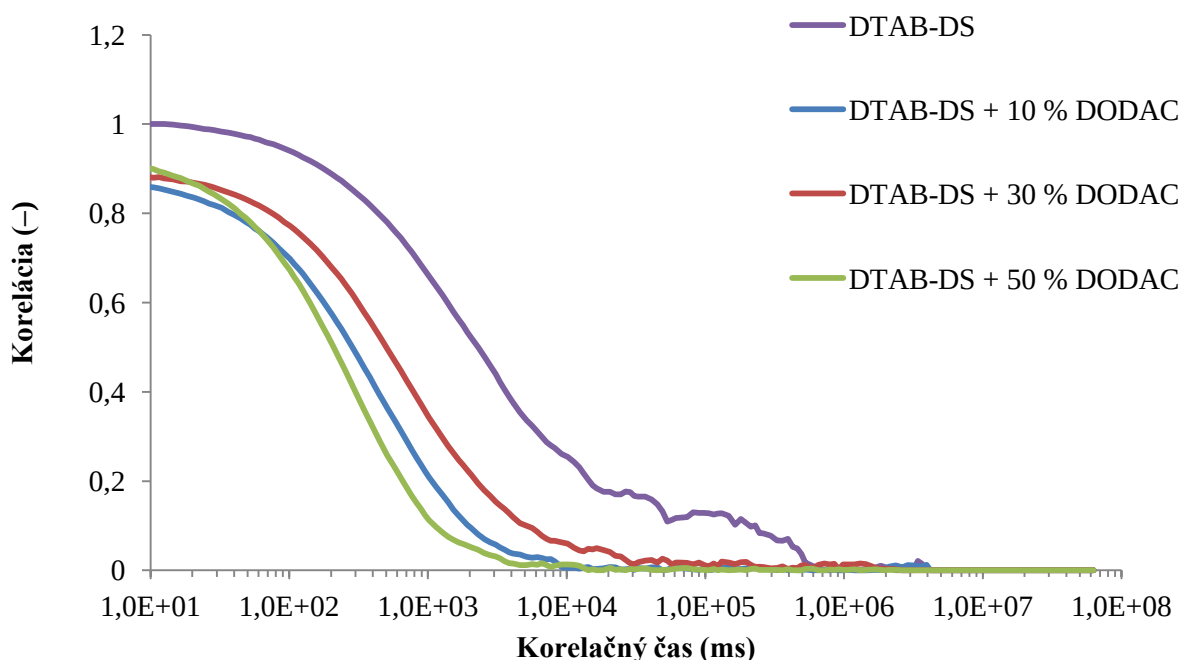
Obrázok 27: Graf závislosti intenzity na veľkosti častíc pre vzorku dodecyltrimetylamónium bromidu s dodecylsulfátom sodným a 10, 30, 50 hm. % prídavkami dioktadecyldimetylamónium chloridu



Obrázok 28: Korelačná krivka pre vzorku hexadecyltrimetylamónium bromidu s dodecylsulfátom sodným



Obrázok 29: Korelačná krivka pre vzorku tetradecyltrimetylamónium bromidu s dodecylsulfátom sodným a 10, 30, 50 hm. % prídavkami dioktadecyldimetylamónium chloridu



Obrázok 30: Korelačná krivka pre vzorku dodecyltrimetylammónium bromidu s dodecylsulfátom sodným a 10, 30, 50 hm. % prídavkami dioktadecyldimetylammónium chloridu

5.4 Zeta potenciál

Hodnoty zeta potenciálu poukazujú na to, že pripravené vzorky sú stabilné, až na vzorky TTAB-DS + 50 hm. % DODAC a DTAB-DS + 10 hm. % DODAC. Ich potenciál sa pohybuje v rozmedzí -30 až 30 mV. Vezikulárne systémy sú na povrchu kladne nabité, na čo poukazujú kladné hodnoty zeta potenciálov. V prípade DTAB-DS bola hodnota zeta potenciálu záporná. Vezikulárny systém je teda na povrchu nabitý záporne. Následné prídavky kladne nabitej povrchovo aktívnej látky DODAC však zeta potenciál zmenili a povrch systému sa nabil kladne za vzniku kladne kataniontového vezikulárneho systému.

Tabuľka 4: Namerané hodnoty zeta potenciálu a veľkosti častíc

Kataniontové vezikulárne systémy	Zeta potenciál [mV]	Priemer častíc [nm]
CTAB	$56,27 \pm 1,9$	565,30
TTAB-DS	$64,80 \pm 1,82$	78,55
TTAB-DS + 10 hm. % DODAC	$38,63 \pm 0,9$	150,10
TTAB-DS + 30 hm. % DODAC	$33,30 \pm 1,00$	1858,00
TTAB-DS + 50 hm. % DODAC	$16,67 \pm 1,03$	18900,00
DTAB-DS	$-33,40 \pm 0,26$	1185,00
DTAB-DS + 10 hm. % DODAC	$13,30 \pm 0,95$	307,60
DTAB-DS + 30 hm. % DODAC	$26,87 \pm 1,37$	539,80
DTAB-DS + 50 hm. % DODAC	$43,20 \pm 0,46$	216,10

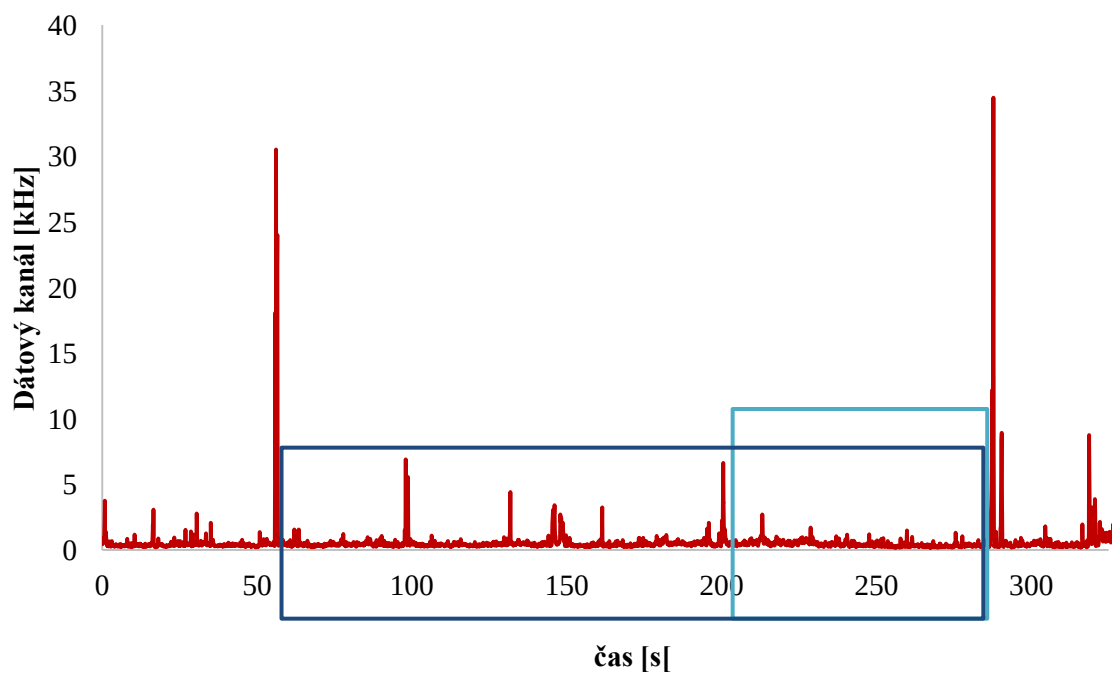
5.5 FCS

Pre meranie boli zvolené vzorky CTAB-DS a TTAB-DS + 30 hm. % DODAC na základe predošlého merania DLS. Ako prvá fluorescenčná sonda bola použitá níliska červeň, ktorá je hydrofóbná a zabudovala sa do systému kataniontových vezikúl. Intenzita fluorescencie však bola nízka a následne bola získaná nízka korelácia. Pre ďalšie meranie boli vybrané fluorescenčné sondy DiA a DiD, ktoré sa typicky používajú v lipozomálnych štruktúrach a pri dvojreťazcových tenzidoch. DiA a DiD sa zabudovávajú do palisádových vrstiev z vonkajšej strany. Fluorescenčné sondy DiA a DiD poskytli dostatočne silný signál a primerané výsledné hodnoty. Fluorescenčná sonda DiA poskytovala nižší signál ako sonda DiD.

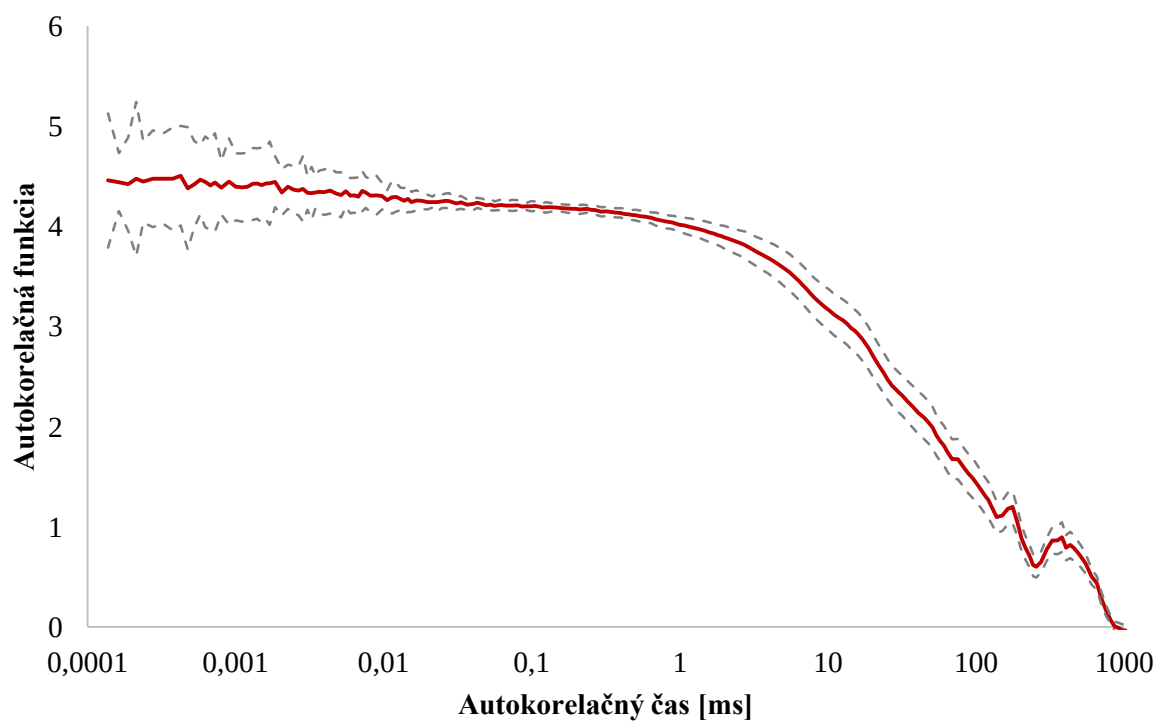
Vzorka CTAB-DS poskytla s obidvoma sondami približne rovnaké výsledky a preukázali sa vezikulárne systémy o veľkosti 56 a 82 nm.

Na obrázku 26 je zobrazený „TimeTrace“ – celkový časový záznam fluktuácie u vzorky TTAB-DS + DiD. Priebeh krivky nám popisuje výskyt vezikulárnych systémov a spojených agregátov, ktoré vytvárajú veľké častice. Veľké častice predstavujú vysoké píky, ktoré sú ale zastúpené v malom množstve. Tieto častice majú vysoký difúzny čas, ktorý predstavuje nízky difúzny koeficient. Následne boli veľké častice vyfiltrované vybraním iného rozmedzia času, v ktorom sa nenachádzajú. Prvé rozmedzie času bolo 59 – 285 s. V tomto prípade sa však ešte vyskytovali väčšie častice, ktoré skresľovali priebeh krivky zobrazenej na obrázku 28. V rozmedzí času 205 – 285 s sa v grafe vyskytovali len menšie častice a krivka nadobúdala vyhovujúci priebeh približujúci sa svojim koncom k nule.

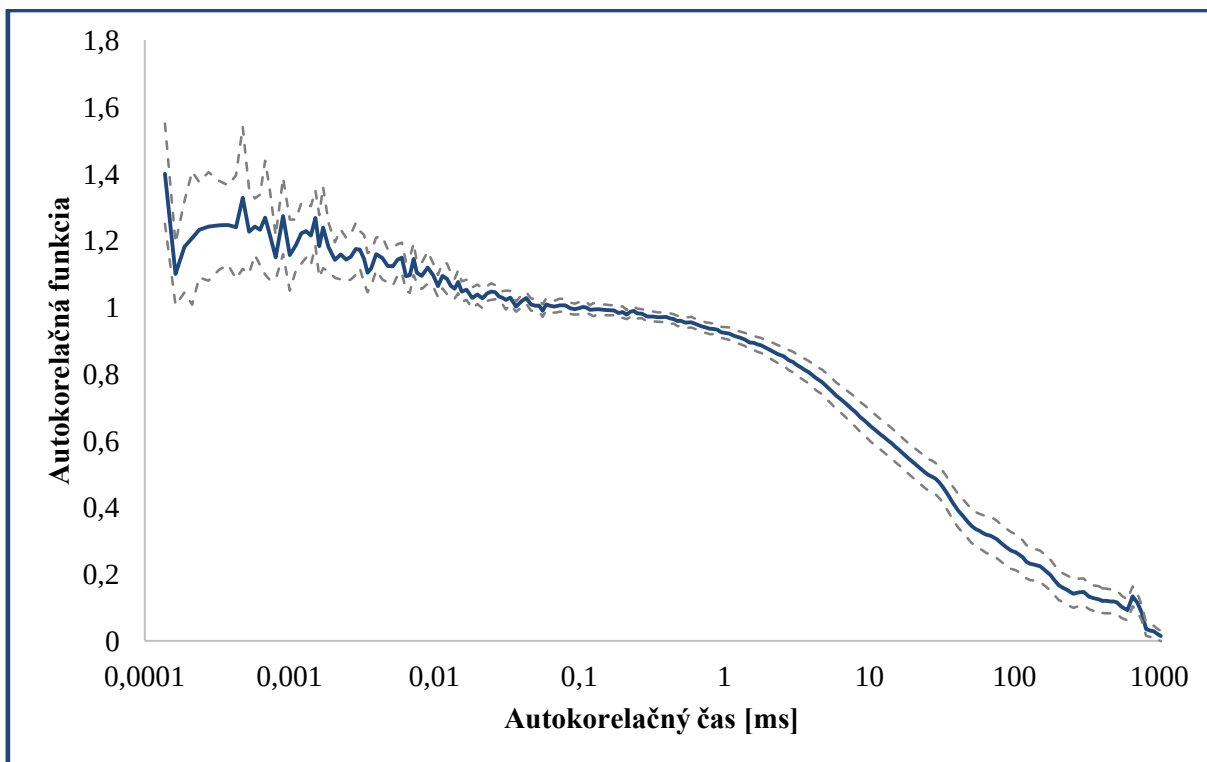
U TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s fluorescenčnou sondou DiA sa vyskytovali dva difúzne časy. Tieto dva difúzne časy odpovedajú 2 rôznym populáciám vo vzorke. Populácie mohli vzniknúť pridaním DODAC a začlenením jeho rôznej koncentrácie do vezikulárnych systémov. Častice okolo 100 nm predstavujú 39 % a menšie častice okolo 10 nm v zastúpení 61 %. Malé častice môžu predstavovať nezbalené IPA, ktoré fluktuujú okolo vezikulárnych systémov. Fluorescenčná sonda DiD vytvorila triplet so svojou vlastnou amplitúdou a dva difúzne časy. V tomto prípade sa vo vzorke vyskytovali veľké častice okolo 800 nm v zastúpení 34 % a vezikulárne systémy do 100 nm v zastúpení 66 %. U fluorescenčnej sondy DiD je zastúpených menej častíc ako u sondy DiA. Avšak čím je viac častíc, tým je menšia difúzny charakter. Táto nezhoda môže byť záležitosťou výberu špecifických oblastí, ktorú musíme brať do úvahy. Veľkosť častíc bola vypočítaná pomocou zistených difúzných koeficientov podľa Stokes-Einsteinovej rovnice, ktorá je popísaná v kapitole 2.4.



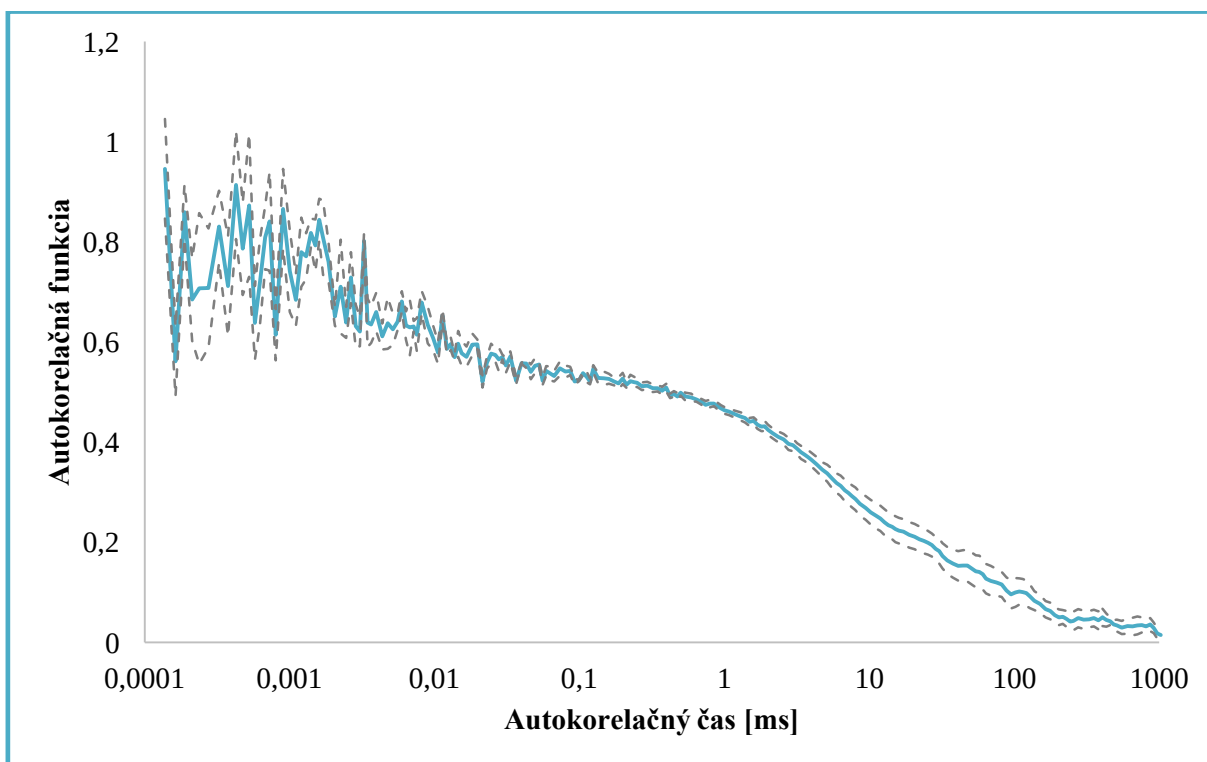
Obrázok 31: Timetrace – celkový časový záznam fluktuácie



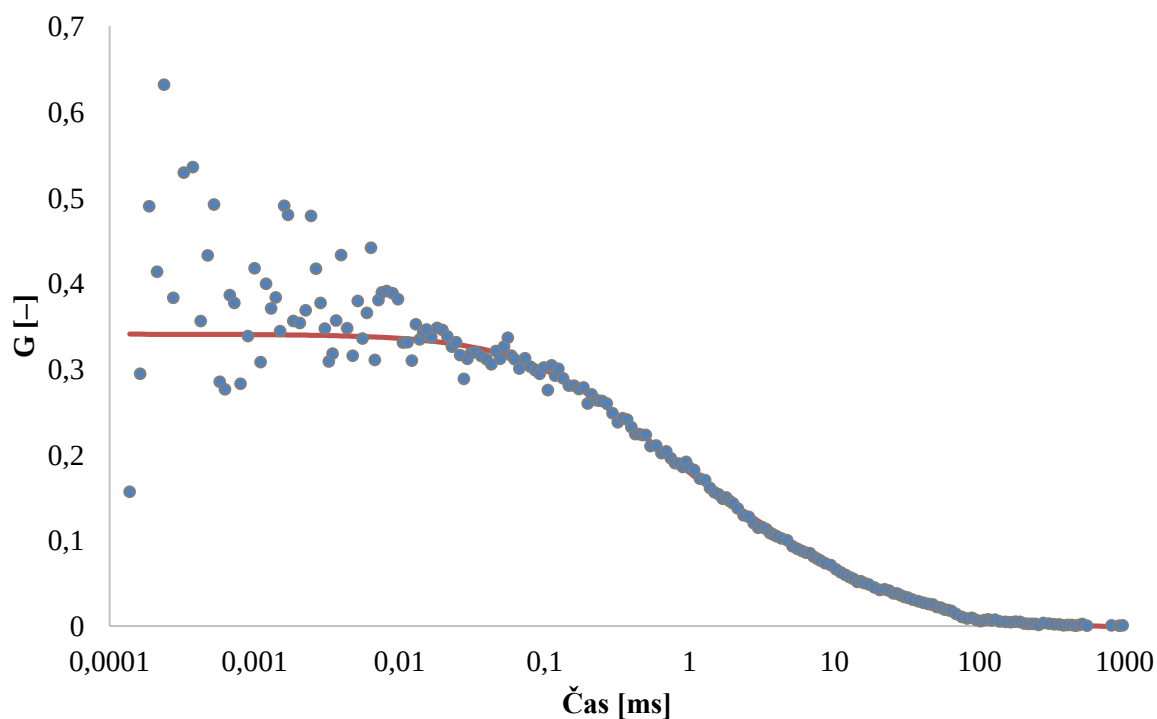
Obrázok 32: Autokorelačná funkcia z celého rozsahu u vzorky TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s fluorescenčnou sondou DiD



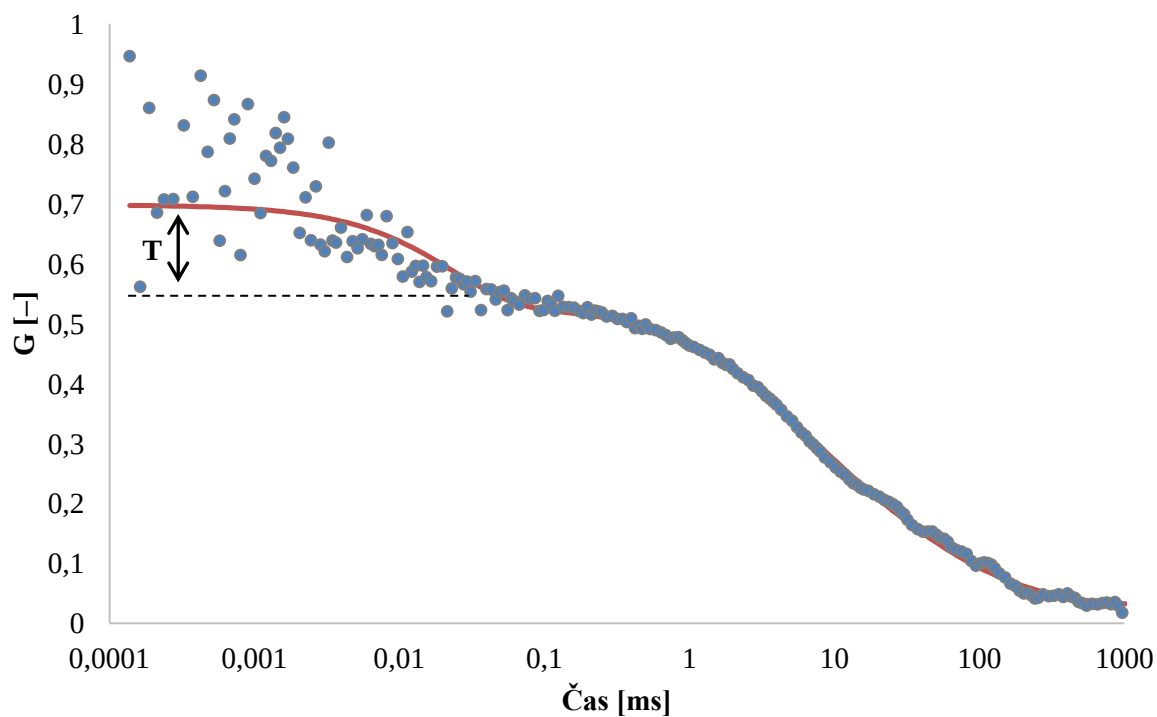
Obrázok 33: Autokorelačná funkcia vyhodnotená z časového úseku 59 – 285 vzorku TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s florescenčnou sondou DiD



Obrázok 34: Autokorelačná funkcia vyhodnotená z časového úseku 205 – 285 vzorku TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s florescenčnou sondou DiD



Obrázok 35: Závislosť intenzity fluorescencie na čase vzorku TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s fluorescenčnou sondou DiA. V priebehu krivky sa vyskytujú dva difúzne časy.



Obrázok 36: Závislosť intenzity fluorescencie na čase pre vzorku TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s fluorescenčnou sondou DiD. V prípade tejto sondy sa v priebehu krivky zobrazil triplet T, ktorý má svoju amplitúdu. V pokračovaní krivky sa nachádzajú dva difúzne časy.

Tabuľka 5: Difúzne koeficienty CTAB-DS a vypočítané veľkosti častíc

Kataniontový vezikulárny systém	Fluorescenčná sonda	Difúzny koeficient D [$\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	Veľkosť častíc [nm]
CTAB-DS	DiA	$4,3 \pm 0,59$	56 ± 7
CTAB-DS	DiD	$2,9 \pm 0,37$	82 ± 10

Tabuľka 6: Difúzne koeficienty TTAB-DS + 30 hm. % DODAC a vypočítané veľkosti častíc

Kataniontový vezikulárny systém	Fluorescenčná sonda	Difúzny koeficient D [$\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]		Percentuálne zastúpenie	
		D1	D2	D1	D2
TTAB-DS + 30 hm.% DODAC	DiA	$32 \pm 4,2$	$1,5 \pm 0,18$	61%	39%
TTAB-DS + 30 hm.% DODAC	DiD	$0,273 \pm 0,074$	$2,9 \pm 0,16$	34%	66%

Kataniontový vezikulárny systém	Veľkosť častíc [nm] D ₁	Veľkosť častíc [nm] D ₂
TTAB-DS + 30 hm.% DODAC	7 ± 1	159 ± 19
TTAB-DS + 30 hm.% DODAC	875 ± 237	82 ± 5

6 ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo navrhnuť zloženie a následnú prípravu kataniontových vezikulárnych systémov. Spôsob prípravy kataniontových vezikúl bol overený pomocou metódy merania dynamického rozptylu svetla a fluorescenčnej mikroskopie. Dynamickým rozptylom svetla bola charakterizovaná veľkosť vezikulárnych systémov a stabilita bola určená pomocou zeta potenciálu.

Kataniontové vezikulárne systémy sa pripravujú zo zmesi kladne a záporne nabitých povrchovo aktívnych látok. Ako kladne nabité povrchovo aktívne látky boli použité CTAB, CTAC, TTAB, DTAB a záporne nabitý tenzid SDS. Roztoky opačne nabitých PAL boli pripravené v koncentrácii 20 mM. Po ich zmiešaní sa vytvorila zrazenina, ktorá predstavovala systém IPA. Zrazenina bola odstredená a premytá, aby sa odstránili protióny. Kataniontové vezikulárne systémy vznikli rozpustením IPA v chloroforme, ktorý bol odparený za vzniku tenkého filmu. Tenký film bol následne rozpustený vo vode a sonifikovaný. Z vybratých látok sa pomocou metódy DLS potvrdila prítomnosť vezikúl vo vzorkách CTAB-DS, TTAB-DS. Zeta potenciál nadobúdal kladné hodnoty a systém bol stabilný. Vo vzorke DTAB-DS bola prítomnosť vezikúl len vo veľmi malom množstve. Zeta potenciál bol v tomto prípade záporný a systém bol stabilný. Vzorka CTAC-DS obsahovala častice viditeľné okom.

Kataniontové vezikulárne systémy vykazujú nízku stabilitu, a tak sa pre zvýšenie stability použil prídavok kladne nabitej PAL DODAC na vytvorenie kladne nabitého kataniontového vezikulárneho systému. DODAC bolo pridávané k IPA v 10 hm. %, 30 hm. % a 50 hm. %. Zeta potenciály boli u TTAB-DS po prídavku 10 hm. % a 30 hm. % DODAC znížené, ale stále bol systém stabilný. Zvýšenie stability sa skôr preukázalo v zmene balenia systému. Systém TTAB-DS s 50 hm. % prídavkom DODAC však už nebol stabilný. DTAB-DS, ktorý mal záporný zeta potenciál pri pridaní 50 hm. % DODAC zmenil svoj zeta potenciál na kladný a systém bol stabilný. U prídavku 10 hm. % a 30 hm. % bol systém nestabilný.

Na meranie FCS bola vybratá ako sonda nílska červeň, ktorá sa zabudovala do systému kataniontových vezikúl a však poskytovala nízku intenzitu fluorescencie. Pre ďalšie merania bola použitá sonda DiA a DiD, ktorá už poskytovala dostatočnú intenzitu fluorescencie. Fluorescenčná sonda DiA poskytovala vyššiu intenzitu fluorescencie ako DiD, čo mohlo byť spôsobené ich odlišnou štruktúrou a následným naviazaním sa do systému. DiA má lineárnu štruktúru a sonda DiD má hlavnú časť, z ktorej vychádzajú dva uhl'ovodíkové reťazce. Z pripravených kataniontových vezikulárnych systémov bola pre toto meranie vybratá vzorka CTAB-DS a TTAB-DS + 30 hm. % DODAC.

U vzorky CTAB-DS nám obidve sondy poskytli približne rovnaký signál. Veľkosť pri sonde DiA bola stanovená na 56 ± 7 nm a u DiD 82 ± 10 nm.

Vzorka TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s fluorescenčnou sondou DiA poskytovala dva difúzne časy. Tieto dva difúzne časy poukazujú na výskyt dvoch populácií vo vzorke, ktoré mohli vzniknúť rozdielnym začlenením DODAC do systému. Nachádzali sa tu častice okolo 100 nm, ktoré predstavovali 39 % a menšie častice okolo 10 nm v zastúpení 61 %, ktoré môžu predstavovať nezbalené IPA. U vzorky TTAB-DS + 30 hm. % DODAC s fluorescenčnou

sondou DiD sa vyskytol triplet s vlastnou amplitúdou a následne dva difúzne časy. V tomto prípade sa vo vzorke nachádzala populácia s časticami o veľkosti okolo 800 nm v zastúpení 34 % a vezikulárne systémy do 100 nm v zastúpení 66 %. Populácia s časticami o veľkosti 800 nm môže predstavovať spojené agregáty.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

[1] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged catanionic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2014, **292**(3), 589-597 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-013-3104-9>

[2] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir* [online]. 2005, **21**(14), 6179-6184 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.1021/la047207g. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la047207g>

[3] ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy a detergenty dnes: Chem.Listy* 93. 1999, s. 421-427.

[4] Surfactant. *Naver* [online]. [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://blog.naver.com/PostView.nhn?blogId=kamboo96&logNo=220981926917>

[5] DENNISON, Clive. *A guide to protein isolation*. Online-Ausg. New York [u.a.]: Kluwer, 1999. ISBN 0306468689.

[6] *Bezpečnostní list: Laurylsíran sodný* [online]. 05.11.2010 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: https://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/l/bezplist_428.pdf

[7] ROSEN, Milton J. *Surfactants and interfacial phenomena*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2004. ISBN 0471478180.

[8] Sodium dodecyl sulfate. *Wikimedia Commons* [online]. [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sodium_dodecyl_sulfate.svg

[9] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana. Chemie a technologie tenzidů II. In: *Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: Fakulta technologická* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>

[10] Karta bezpečnostných údajov. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SK&language=sk&productNumber=H9151&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fh9151%3Flang%3Den>

[11] CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02195029>

[12] Ask an Expert: What is CTAB and why is it toxic? Why is it used in gold nanorod synthesis?. *Nanohybrids* [online]. [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <https://nanohybrids.net/pages/what-is-ctab-and-why-it-is-used-in-gold-nanorod-synthesis>

[13] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.

[14] NOVÁK, Josef P. *Fyzikální chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-436-x.

[15] Figure 3. Surface tension and surfactant concentration. *Science and Education Publishing From Scientific Research to Knowledge* [online]. [cit. 2018-05-19]. Dostupné z: <http://pubs.sciepub.com/wjce/4/2/2/figure/3>

[16] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-x.

[17] HOLMBERG, T., B. JÖNSSON, B. KRONBERG, B. LINDMAN. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. 2002. [online]. ISBN 0-471-49883-1. Dostupné z: <http://www.files.rushim.ru/books/polimers/surfactants-and-polymers-in-aqueoussolution.pdf>.

[18] From α -nucleophiles to functionalized aggregates: exploring the reactivity of hydroxamate ion towards esterolytic reactions in micelles. *Royal Society of Chemistry* [online]. [cit. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ob/c4ob02067g/unauth>

[19] TAH, Bidisha, Prabir PAL, Mrityunjoy MAHATO a G. B. TALAPATRA. Aggregation Behavior of SDS/CTAB Catanionic Surfactant Mixture in Aqueous Solution and at the Air/Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2011, **115**(26), 8493-8499 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1021/jp202578s. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp202578s>

[20] KARUKSTIS, Kerry K., Candace A. ZIELENIUK a Marja J. FOX. Fluorescence Characterization of DDAB–AOT Catanionic Vesicles. *Langmuir* [online]. 2003, **19**(24), 10054-10060 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.1021/la034829d. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la034829d>

[21] LEE, Chen-Hsuan, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhancing physical stability of positively charged catanionic vesicles in the presence of calcium chloride via cholesterol-induced fluidic bilayer characteristic. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2014, **292**(10), 2519-2527 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.1007/s00396-014-3285-x. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-014-3285-x>

[22] KVÍTEK, Libor. *Metody studia koloidních soustav*. In: *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis* [online]: *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis* [online]. Olomouc: Czech Republic: Faculty of Physical Culture, Palacky University [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/>

[23] *Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu*. [online]. 2008 [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>

[24] BROWN, Wyn. *Dynamic light scattering: the method and some applications*. New York: Oxford University Press, 1993. ISBN 978-0-19-853942-1.

[25] KALINA, Michal. *CHARAKTERIZACE ČÁSTICOVÝCH STANDARDŮ A REÁLNÝCH VZORKŮ METODAMI ROZPTYLU SVĚTLA* [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: https://moodle.vutbr.cz/pluginfile.php/271588/mod_resource/content/1/c%C3%ADle%20pr%C3%A1ce%20%2B%20teorie.pdf

[26] Zeta potencial. *Wikipedia* [online]. [cit. 2018-05-19]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential

[27] *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele*. MALVERN INSTRUMENTS LTD. 2007.

[28] Dynamic Light Scattering - Understanding the Basics. *AZO Nano* [online]. [cit. 2018-05-19]. Dostupné z: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>

[29] Fluorescenční mikroskopie. *Katedra experimentální biologie rostlin* [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>

[30] MRAVEC, Filip. *AGREGAČNÍ CHOVÁNÍ MICELÁRNÍCH KOLOIDŮ - FLUORESCENCE* [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: https://moodle.vutbr.cz/pluginfile.php/271591/mod_resource/content/1/c%C3%ADle%20pr%C3%A1ce%20%2B%20teorie.pdf

[31] Stokes shift. *Wikipedia* [online]. [cit. 2018-05-19]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift

[32] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.

[33] *Fluorofory v biomedicině* [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>

[34] DiA; 4-Di-16-ASP (4-(4-(Dihexadecylamino)styryl)-N-Methylpyridinium Iodide). *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D3883?SID=srch-srp-D3883>

[35] DiD' oil; DiIC18(5) oil (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate). *Thermo Fisher Scientific*[online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D307?SID=srch-srp-D307>

[36] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf

[37] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 0-387-31278-1.

[38] KOYNOV, Kaloian a Hans-Jürgen BUTT. Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*[online]. 2012, **17**(6), 377-387 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.09.003. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029412000994>

[39] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir* [online]. 2009, **25**(11), 6368-6376 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la804170k>

[40] Konfokální mikroskopie a FCS. *ChemPoint* [online]. [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/konfokalni-mikroskopie-a-fcs>

[41] Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements Jörg Enderlein et al., *ChemPhysChem*, 8, 433–443. *SlidePlayer* [online]. [cit. 2018-05-19]. Dostupné z: <http://slideplayer.com/slide/8250655/>

[42] YEH, Shao-Jen, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir*[online]. 2005, **21**(14), 6179-6184 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1021/la047207g. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la047207g>

[43] LEE, Chen-Hsuan, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhancing physical stability of positively charged catanionic vesicles in the presence of calcium chloride via cholesterol-induced fluidic bilayer characteristic. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2014, **292**(10), 2519-2527 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1007/s00396-014-3285-x. ISSN 0303-402X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-014-3285-x>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

Skratka	Význam skratky
CMC	kritická micelárna koncentrácia
PAL	povrchovo aktívne látky
IPA	dvojfázový amfifil
CTAB	hexadecyltrimetylamónium chlorid
CTAC	hexadecyltrimetylamónium bromid
TTAB	tetradecyltrimetylamónium bromid
DTAB	dodecyltrimetylamónium bromid
SDS	dodecylsulfát sodný
DODAC	dioktadecyldimetylamónium chlorid
DiA	4-(4-dihexadecylaminostyryl)-N-methylpyridinium jodid
DiD	1,1'-dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodikarbokyanin perchlorát
DLS	dynamický rozptyl svetla
FCS	fluorescenčná korelačná spektroskopia
FLIM	doba života fluorescencia snímaná mikroskopom
NADH	nikotínadeninindinukleotid
NADPH	nikotínadeninindinukleotidfosfát
Pc	parameter kritického balenia
v	objem
lc	maximálna dĺžka
A_0	minimálna medzifázová oblasť
d_H	veľkosť častíc
k_B	Boltzmannova konštanta
T	termodynamická teplota
η_0	viskozita rozpúšťadla
D	difúzny koeficient
S_0	základný singletový stav
S_1	singletový excitovaný stav
T_1	tripletový stav