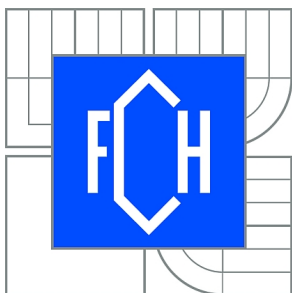




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM INTERAKCÍ HYALURONAN-FOSFOLIPID ZA PŘÍTOMNOSTI BIOKOMPATIBILNÍCH NEIONOGENNÍCH TENZIDŮ

STUDY OF INTERACTION BETWEEN HYALURONAN AND PHOSPHOLIPID IN A PRESENCE OF
BIOCOMPATIBLE NON-IONIC SURFACTANT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JANA SZEWIECZKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0530/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Jana Szewieczková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	

Název bakalářské práce:

Studium interakcí hyaluronan-fosfolipid za přítomnosti biokompatibilních neionogenních tenzidů

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o interakci nativního hyaluronanu a fosfolipidů. U fosfolipidů uvažovat micelární i liposomální formu.
2. Na základě rešerše vybrat fosfolipidy a vhodné biokompatibilní neionogenní tenzidy využitelné k podpoře interakcí mezi fosfolipidem a hyaluronanem a v hodnou metodiku pro toto studium.
3. Navrhnout a provést základní experimenty agregace vybraných tenzidů v přítomnosti fosfolipidů a studovat vliv hyaluronanu na tento komplex.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití takovýchto komplexů v kosmetice a farmacii.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Jana Szewieczková
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce je založena na zkoumání agregačního chování cukerných tenzidů a *sn*-glycero-dipalmitoylphosphatidylcholinu (DPPC) ve vodném prostředí a na studiu interakcí v systémech neionogenní tenzid-DPPC a neionogenní tenzid-DPPC-hyaluronan. Z neionogenních tenzidů byly použity cukerné tenzidy. Chování jednotlivých systémů bylo zkoumáno pomocí fluorescenční spektroskopie. Byly zjištěny hodnoty kritických micelárních koncentrací (CMC) použitých cukerných tenzidů, počátek agregace DPPC, vliv DPPC na agregaci cukerných tenzidů a vliv hyaluronanu na systém neionogenní tenzid-DPPC. Dále byla určena CMC CPC (cetylpyrimidium chlorid), jenž byl použit na zhášení fluorescence při určení agregačních čísel cukerných tenzidů. Při měření byly použity fluorescenční sondy pyren, perylen, nilská červeň, akridinová oranž a hydrofobní barvivo sudánova červeň.

ABSTRACT

This work is based on investigation of aggregation behavior of sugar surfactants and *sn*-glycero-dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) in aqueous environment and on study of the interactions in nonionic surfactant-DPPC and DPPC-nonionic surfactant-hyaluronan systems. Sugar surfactants were used from non-ionic surfactants. The behavior of each systems was studied by fluorescence spectroscopy. Values of critical micellar concentrations (CMC) of sugar surfactants, beginning of aggregation of DPPC, DPPC aggregation effect of sugar surfactants and the effect of hyaluronan on the system non-ionic surfactant-DPPC has been investigated. Also CMC of the CPC (cetylpyrimidium chloride), which was used for fluorescence quenching in the determination of aggregate numbers of sugar surfactants, has been determined. Fluorescent probes pyrene, perylene, Nile red, acridine orange and hydrophobic dye Sudan red were used for measurements.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, neionogenní tenzid, fosfolipid, směsné micely, fluorescence, fluorescenční sondy

KEY WORDS

hyaluronan, non-ionic surfactant, phospholipid, mixed micelles, fluorescence, fluorescence probes

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..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za odborné rady a vskutku nekonečnou trpělivost při řešení problémů, a konzultantce Ing. Tereze Halasové za cenné připomínky a obětavou spolupráci.

OBSAH

1	ÚVOD	- 6 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 7 -
2.1	Kyselina hyaluronová	- 7 -
2.1.1	Struktura.....	- 7 -
2.1.2	Uspořádání hyaluronanu v roztoku.....	- 7 -
2.1.3	Výskyt a použití hyaluronanu	- 8 -
2.2	Povrchově aktivní látky (PAL).....	- 8 -
2.2.1	Struktura.....	- 8 -
2.2.2	Uspořádání PAL v roztoku	- 9 -
2.3	Fosfolipidy.....	- 10 -
2.4	Směsné micely.....	- 10 -
2.5	Fluorescence	- 10 -
2.5.1	Instrumentace.....	- 11 -
2.5.2	Fluorescenční sondy	- 12 -
2.5.3	Zhášení.....	- 15 -
2.5.4	Vnitřní filtrační efekt a excimery.....	- 15 -
2.5.5	Stanovení agregačního čísla zhášením	- 15 -
2.6	Absorpční měření	- 15 -
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	- 17 -
4	MATERIÁLY A METODY	- 20 -
4.1	Použité chemikálie.....	- 20 -
4.2	Metody.....	- 22 -
4.2.1	Příprava vzorků.....	- 22 -
4.2.2	Zpracování výsledků.....	- 24 -
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	- 27 -
5.1	Stanovení CMC C12Mal	- 27 -
5.2	Stanovení CMC C8Pyr	- 28 -
5.3	Studium agregace DPPC	- 29 -
5.4	Studium vlivu DPPC a směsi DPPC a HYA na agregaci C12Mal.....	- 30 -
5.5	Studium vlivu DPPC a směsi DPPC a HYA na agregaci C8Pyr.....	- 34 -
5.6	Stanovení CMC CPC.....	- 37 -
5.7	Stanovení agregačního čísla cukerných tenzidů a jejich směsí s DPPC.....	- 38 -
5.8	Studium interakcí HYA, C12Mal a DPPC	- 39 -
6	ZÁVĚR	- 42 -
7	POUŽITÁ LITERATURA	- 44 -
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	- 46 -
9	SEZNAM PŘÍLOH	- 47 -
10	PŘÍLOHY.....	- 48 -
10.1	Příloha 1.....	- 48 -
10.2	Příloha 2.....	- 49 -
10.3	Příloha 3.....	- 49 -
10.4	Příloha 4.....	- 50 -
10.5	Příloha 5.....	- 50 -

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová. Tato na první pohled nezajímavá bílá látka je pro své unikátní vlastnosti člověkem již po řadu let hojně využívána. Nejprve byla použita při léčbě popálenin a kožních vředů, později v oftalmologii, dále při výživě kloubů a v kosmetických přípravcích pro redukci vrásek a regeneraci. Fenoménem dnešní doby je výzkum hyaluronanu jako nosiče pro cílenou distribuci léčiv, a to zejména léčiv pro léčbu rakoviny. Hyaluronan je vhodný z hlediska biokompatibility i biodegradability a v kombinaci s vhodným tenzidem by mohl být utvořen systém, který je rozpustný ve vodě a zároveň je schopen nést hydrofobní látku.

Již byla prostudována řada systémů s různými druhy tenzidů, avšak ve většině případů nebyly tyto tenzidy zcela biodegradabilní. Proto je snaha najít jinou povrchově aktivní látku, jež bude dokonale biologicky odbouratelná. Nejjednodušší je hledat tuto látku mezi látkami přirozeně se vyskytujícími v lidském těle. Fosfolipidy jsou spolu s proteiny hlavní složkou buněčných membrán, jsou tedy také biokompatibilní. Nechovají se ale jako klasické tenzidy, místo kulovitých micel tvoří vesikulární útvary zvané liposomy. Další nevýhodou je jejich nízká rozpustnost ve vodě. Jednou z možností jak eliminovat nevýhody fosfolipidů a současně využít jejich výhody, je kombinace s tenzidem, jež tvoří klasické micely. Je zřejmé, že opět budeme hledat látky, jež je lidské tělo schopno snadno odbourat. Takovými látkami mohou být některé sloučeniny ze skupiny alkyl-glykosidů, neboli cukerných tenzidů. Tyto tenzidy jsou neionogenní, polární část je tvořena kyslíkovými atomy přítomnými v cukerných kruzích. Smícháním fosfolipidu a zmíněného cukerného tenzidu mohou vzniknout agregáty buď lamelární nebo micelární, což závisí na poměru koncentrací fosfolipid/tenzid. Z důvodu nízké rozpustnosti použitého fosfolipidu ve vodě byly studovány systémy s nízkou koncentrací fosfolipidu, kdy by měly vznikat směsné micely. Náplní této práce je studium chování jednotlivých složek ve vodném prostředí, studium systému neionogenní tenzid-fosfolipid a následně celého systému neionogenní tenzid-fosfolipid-hyaluronan.

Ze skupiny fosfolipidů byl vybrán 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin a z alkyl-glykosidů dodecyl- β -D-maltosid s dvěma cukernými kruhy spojenými glykosidickou vazbou a dvanácti uhlíkovým řetězcem, a oktyl- β -D-glukopyranosid pouze s jedním cukerným kruhem a osmi uhlíkovým řetězcem. Zmíněné dva cukerné tenzidy se tedy od sebe liší velikostí polární části a délkou nepolárního řetězce.

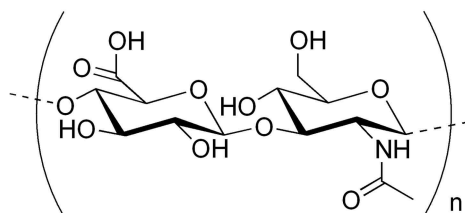
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová jako taková byla připravena již v druhé polovině devatenáctého století, avšak poprvé byla spolehlivě popsána až v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem, jež ji izolovali z hovězího sklivce. Kyselina, kterou vysráželi, obsahovala uronovou kyselinu. Název kyselina hyaluronová je vytvořen z *hyalos* (sklovitý) a *uronová kyselina* [1].

2.1.1 Struktura

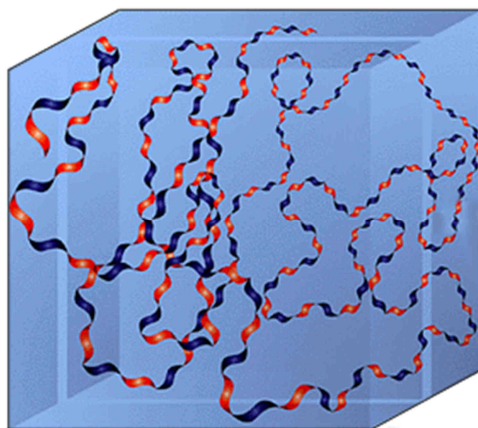
Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární lineární polysacharid složený z opakujících se glykosacharidových jednotek, kyseliny D-glukoronové a N-acetylglukosaminu spojených β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou (**Obr. 01**). Obě cukerné jednotky umožňují všem rozlehlým skupinám (např. hydroxyly a karboxylové skupiny) zaujímat stericky výhodnější ekvatoriální pozice, zatímco malé atomy vodíku zaujímají stericky méně výhodné axiální pozice. Tudíž je struktura disacharidové jednotky stabilní. Množství disacharidových jednotek tvořících jednu molekulu hyaluronanu může dosáhnout počtu 10 000 i více, s molekulovou hmotností 4 MDa. Průměrná délka disacharidové jednotky je okolo 1 nm [2].



Obr. 01 Struktura kyseliny hyaluronové

2.1.2 Uspořádání hyaluronanu v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je páteř molekuly hyaluronanu vyztužena kombinací chemické struktury disacharidových jednotek, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní oblast, zatímco ekvatoriální skupiny tvoří polární, hydrofilní část, proto kyselina hyaluronová formuje v roztoku struktury podobné zkrouceným pásům (**Obr. 02**) [2].



Obr. 02 Uspořádání hyaluronanu v roztoku [2]

Řetězec hyaluronanu obsahuje dva druhy spojení. První druh, cukerný kruh, je relativně neohebný. Mezi těmito pevnými cukernými jednotkami jsou glykosidické vazby, každá tato vazba je složena z kyslíkového atomu spojujícího jednu cukernou jednotku s druhou. Vazby vycházející z kyslíkového atomu jsou orientovány ve tvaru „V“. Substituenty připojené na tyto vazby mohou volně rotovat. Ačkoli výpočet a molekulová modelace ukazují, že kolem vazeb není možné zaujmout všechny teoretické uspořádání okolo molekuly kyslíku v glykosidickém můstku, protože cukerné jednotky si mohou navzájem překážet, přesto je zde několik možných uspořádání na každém můstku. Znásobením těchto možných uspořádání na každém můstku počtem můstků v celém řetězci dostaneme ohromné množství možných tvarů každé molekuly. Uspořádání hyaluronanu v roztoku se proto zdá být náhodné, ale není. Struktura hyaluronanu v roztoku je uspořádaná, každá disacharidová jednotka je pootočená o 180° oproti předchozí a následující jednotce v řetězci. Dvě otočení (360°) navrací původní orientaci, proto je tato struktura nazývána „two-fold helix“ (dvakrát stočená šroubovice) [3].

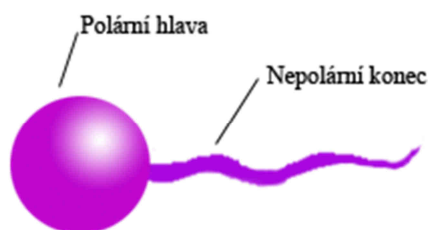
2.1.3 Výskyt a použití hyaluronanu

V lidském těle se hyaluronan vyskytuje převážně ve formě sodné soli. Hyaluronan je v lidském organismu přirozeně zastoupen například v kůži, kloubech nebo synoviální tekutině. Kyselina hyaluronová je využívána již po řadu let v mnoha medicínských aplikacích. Je biokompatibilní a biodegradovatelná, tudíž z této stránky ideální jako složka léčiva. Na trhu již existuje řada léčiv a kosmetických přípravků obsahujících kyselinu hyaluronovou. Jedná se zejména o doplňky stravy pro kloubní výživu, nosní kapky či pleťové krémy. Fenoménem dnešní doby je výzkum kyseliny hyaluronové pro použití při léčbě rakoviny, kde by léčba pomocí cílených nosičových systémů mohla nahradit chemoterapii.

2.2 Povrchově aktivní látky (PAL)

2.2.1 Struktura

Povrchově aktivní látky neboli tenzidy jsou amfifilní látky obsahující polární a nepolární část (**Obr. 03**). Polární část (hydrofilní hlava) může být reprezentována například amoniiovou nebo sulfátovou skupinou nebo i cukerným zbytkem. Nepolární část (hydrofobní konec) bývá tvořena uhlíkovým řetězcem.



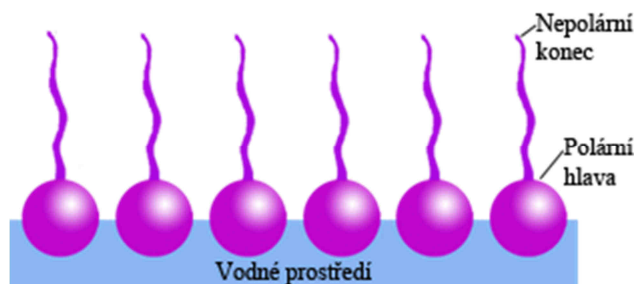
Obr. 03 Struktura tenzidu

PAL se dělí podle náboje, který je lokalizován na polární části molekuly, na ionogenní a neionogenní. Neionogenní tenzidy nemají náboj, za polaritu jsou odpovědné například kyslíkové atomy (cukerné tenzidy). Mezi ionogenní tenzidy patří kationaktivní, jež jsou nabitě kladně (cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), cetylpyrimidium chlorid (CPC)),

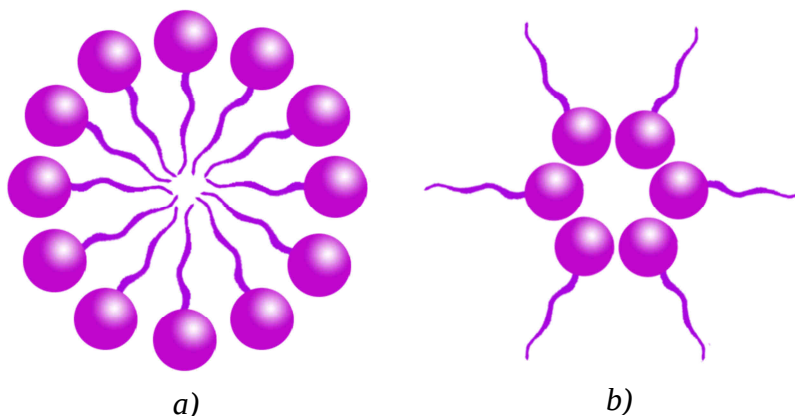
a záporně nabitě anionaktivní tenzidy (dodecyl-sulfát sodný (SDS)). Poslední skupinou z hlediska náboje polární skupiny jsou zwiteriony, jež mají na polární hlavě lokalizovaný jak kladný, tak i záporný náboj, jejich výsledný náboj závisí na pH okolního prostředí (DPPC).

2.2.2 Uspořádání PAL v roztoku

V polárním rozpouštědle molekuly tenzidu automaticky zaujímají takovou polohu, aby nepolární konec nebyl vystaven polárnímu prostředí. Nejprve dojde k nasycení povrchu kapaliny (**Obr. 04**), poté se začínají v roztoku tvořit agregáty zvané micely (**Obr. 05a**). Analogicky je tomu v nepolárním rozpouštědle, kde se tvoří obrácené micely (**Obr. 05b**). Koncentrace, při níž dojde k nasycení povrchu kapaliny molekulami tenzidu, a začínají se v roztoku tvořit micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Vzniklé micely nemusí mít kulovitý tvar, mohou být zploštělé, elipsoidní [4], což závisí na podmínkách měření [5]. Elipsoidní micela má hlavní osu až dvakrát delší než osu vedlejší, přičemž vedlejší osa není kratší než poloměr kruhu, který by měla kulovitá micela stejného tenzidu. Je tedy zřejmé, že elipsoidní micely budou mít vyšší agregační číslo [4].



Obr. 04 Hladina rozpouštědla nasycená molekulami tenzidu

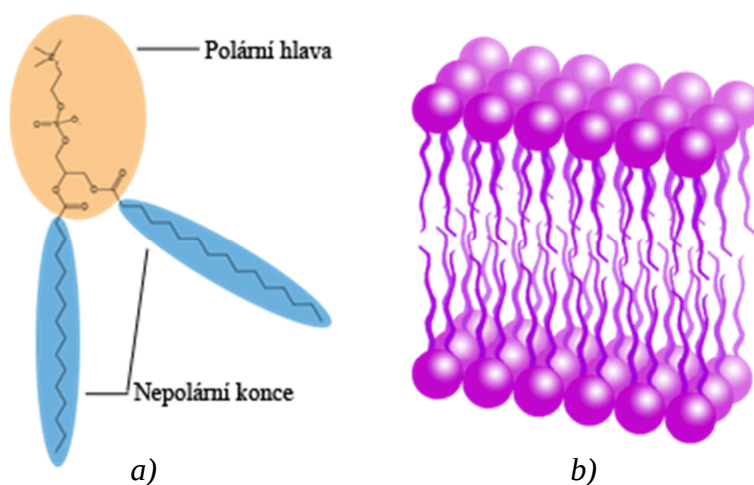


Obr. 05 a) struktura micely v polárním prostředí, b) struktura micely v nepolárním prostředí

Agregační číslo je počet molekul tenzidu, které tvoří jednu micelu. Jak již bylo uvedeno výše, micela složená z molekul stejného tenzidu může mít různé agregační číslo v závislosti na tvaru micely. Obecně platí, že s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce agregační číslo stoupá, a naopak s narůstající velikostí polární hlavy molekuly tenzidu agregační číslo klesá.

2.3 Fosfolipidy

Jak už vyplývá z názvu, fosfolipidy patří do skupiny tuků. Jsou odvozeny od glycerolu. Mají amfifilní strukturu, nepolární část tvoří uhlíkové zbytky mastných kyselin, polární část je složena z fosfátové skupiny a další polární skupiny (ethanolaminu, cholinu, glycerolu, atd.) (**Obr. 06a**). Ve vodě (polárním rozpouštědle) se jednotlivé molekuly fosfolipidu orientují stejně jako molekuly tenzidu tak, aby nepolární části nebyly v kontaktu s rozpouštědlem, tvoří se hydrofobní domény a molekuly se při vyšších koncentracích fosfolipidu seskupují do dvojvrstvy (**Obr. 06b**). Tím se liší od klasických tenzidů, jež i při vysokých koncentracích tvoří kulovité micely. Díky této vlastnosti jsou fosfolipidy hlavní složkou buněčných membrán. Nejvýznamnějšími fosfolipidy jsou lecitiny, kefaliny, kardiolipin, fosfatidylinositol.



Obr. 06 a) Struktura fosfolipidu (cholinu), b) Fosfolipidová dvojvrstva

2.4 Směsné micely

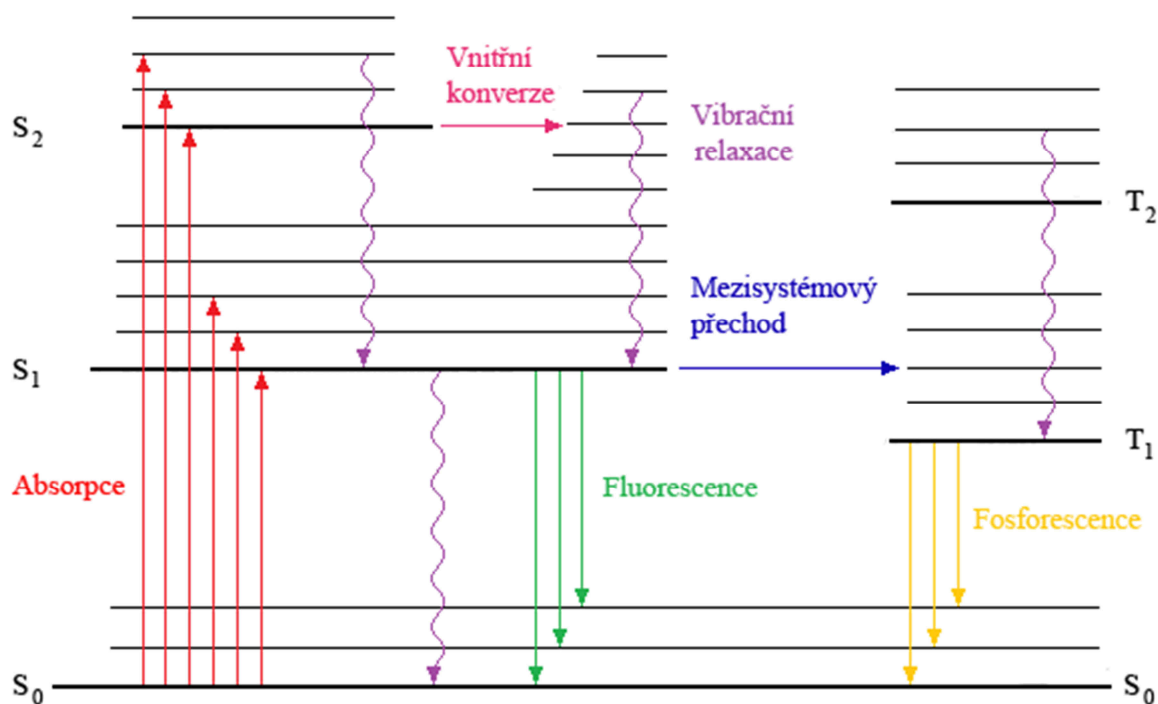
Je-li v roztoku přítomno více druhů molekul tenzidu, mohou se vytvářet směsné micely. Velikost a tvar směsných micel závisí na velikosti obou molekul tenzidu, na síle interakce hydrofobních domén (uvažujeme-li polární rozpouštědlo) a na charakteru agregátů, jež vytváří samotné molekuly tenzidu, které jsou v nadbytku. Tedy pokud bude v nadbytku tenzid vytvářející dvojvrstvy (fosfolipid) v přítomnosti klasického tenzidu, molekuly tohoto tenzidu budou začleněny v dvojvrstvě. Naopak, je-li v roztoku nadbytek klasického tenzidu vytvářející kulovité micely v přítomnosti fosfolipidu, bude tvar směsných micel blízký kulovitému tvaru. Mezi těmito případy existuje přechodná oblast, kdy koncentrace fosfolipidu a tenzidu jsou si blízké, vytvářejí se agregáty jak lamelární, tak micelární [4].

Důvodem výzkumu směsných micel je nízká rozpustnost některých amfifilních látek, které jsou biokompatibilní a biodegradabilní, a jsou potencionálními složkami nosičových systémů. S vhodnými tenzidy, jež podporují jejich solubilizaci, pak tvoří směsné micely [6].

2.5 Fluorescence

Molekuly se přirozeně vyskytují v základním energetickém stavu s elektrony lokalizovanými na hladině S_0 s nejnižší možnou energií. Tento stav je vysoce stabilní. Absorpcí kvanta světla získávají elektrony energii a přecházejí do stavu excitovaného. Za

absorpci světla je zodpovědný atom nebo skupina atomů, tzv. chromofor. Typickými organickými chromofory jsou konjugované π -systémy. Existují dva typy excitovaných stavů, stav singletový (S_x), kde jsou spiny antiparalelní, a stav tripletový (T_x) s paralelními spiny. Z hlediska symetrie je pravděpodobnější stav S_x , kde nedochází při přechodu ze stavu S_0 ke změně spinu. Excitovaný stav je značně nestabilní, elektrony se snaží „zbavit“ energie, aby dosáhly stabilního základního stavu. Jedním ze způsobů deaktivace je zářivá deaktivace – fluorescence a fosforescence. Při fluorescenci přechází elektron ze singletového stavu zpět do stavu S_0 , trvá 10^{-9} až 10^{-6} s. Při fosforescenci se dostává elektron z tripletového stavu do stavu S_0 , fosforescence je spojena se změnou spinu, proto trvá delší dobu – 10^{-4} až 10^2 s. Dalším způsobem deaktivace jsou nezářivé přechody – vibrační relaxace, vnitřní konverze a mezisystémový přechod. Při vibrační relaxaci je energie excitovaného stavu převedena na vibrační energii, která je následně disipována ve formě tepla. Elektrony mohou podléhat také izoenergetickým změnám, vnitřní konverzi, kde nedochází ke změně spinu, při mezisystémovém přechodu ke změně spinu dochází. Jednotlivé přechody znázorňuje Jablůnskiho diagram (**Obr. 07**).

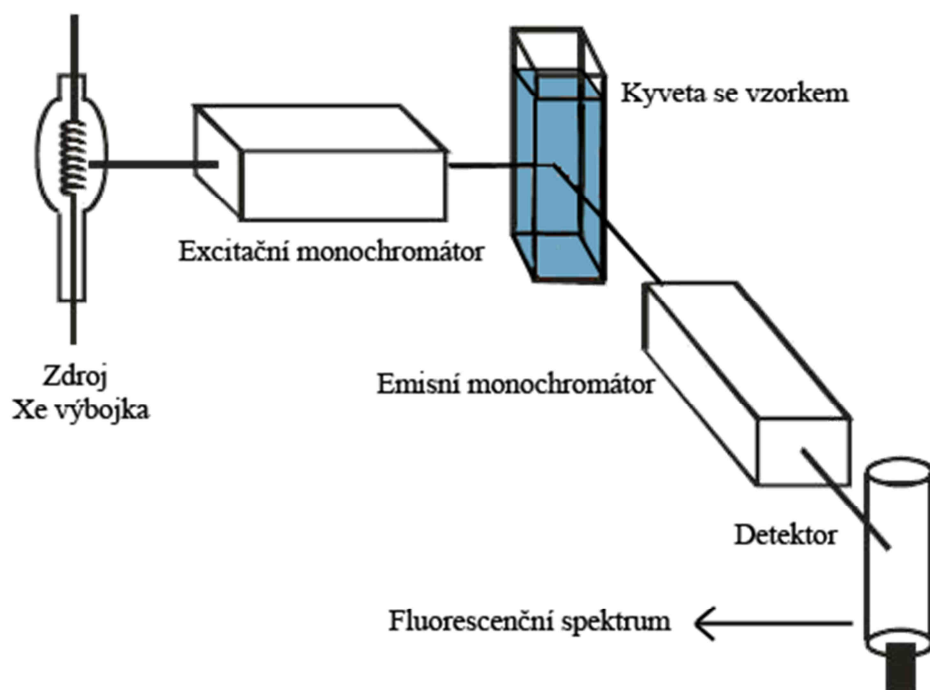


Obr. 07 Jablůnskiho diagram

2.5.1 Instrumentace

Měření fluorescence je realizováno pomocí spektrofleurimetru. Ten je tvořen několika hlavními částmi – zdrojem světla, kterým bývá xenonová nebo rtuťová výbojka, excitačním monochromátorem pro výběr požadované excitační vlnové délky záření, celou se vzorkem, emisním monochromátorem pro selekci vlnové délky prošlého záření, a detektorem. Spektrofleurimetr bývá propojen s počítačem s vhodným softwarem pro vyhodnocení excitačních a emisních spekter. Uspořádání spektrofleurimetru bývá pravoúhlé, jak je znázorněno na **Obr. 08**.

Při měření excitačního skenu je na emisním monochromátoru nastavena konstantní vlnová délka záření, mění se excitační vlnová délka a je zaznamenávána intenzita fluorescence v závislosti na excitační vlnové délce, výsledkem je excitační sken. Při měření emisního skenu je tomu analogicky, získáváme emisní sken.



Obr. 08 Schéma spektrofleurimetru

2.5.2 Fluorescenční sondy

Fluoreskující molekuly jsou používány jako sondy pro výzkum fyzikálně-chemických, biochemických a biologických systémů díky silnému vlivu okolního prostředí na fluorescenci. Fluorescenční sondy se dělí do tří skupin, vnitřní (vlastní) sondy, vnější kovalentně vázané sondy a vnější asociující sondy. Vnitřní sondy jsou ideální, ale je zde jen málo zástupců (např. tryptofan v proteinech). Výhodou vnějších kovalentně vázaných sond oproti vnějším asociujícím sondám je, že je známa jejich pozice. Je několik různých vnějších sond kovalentně vázaných na tenzidy, řetězce polymerů, fosfolipidy, proteiny či polynukleotidy. Avšak syntéza makromolekul s kovalentně vázanými sondami je poměrně složitá, proto je většina výzkumu prováděna s nekovalentními asociujícími sondami. Místo, kde dochází k rozpouštění vnějších sond, je určeno chemickou povahou sond a výslednými specifickými interakcemi uvnitř sondovaného systému. Podstatný je charakter sondy – hydrofilní (pyranin), hydrofobní (pyren) nebo amfifilní (12(1-pyrenyl)dodekanová kyselina) [7].

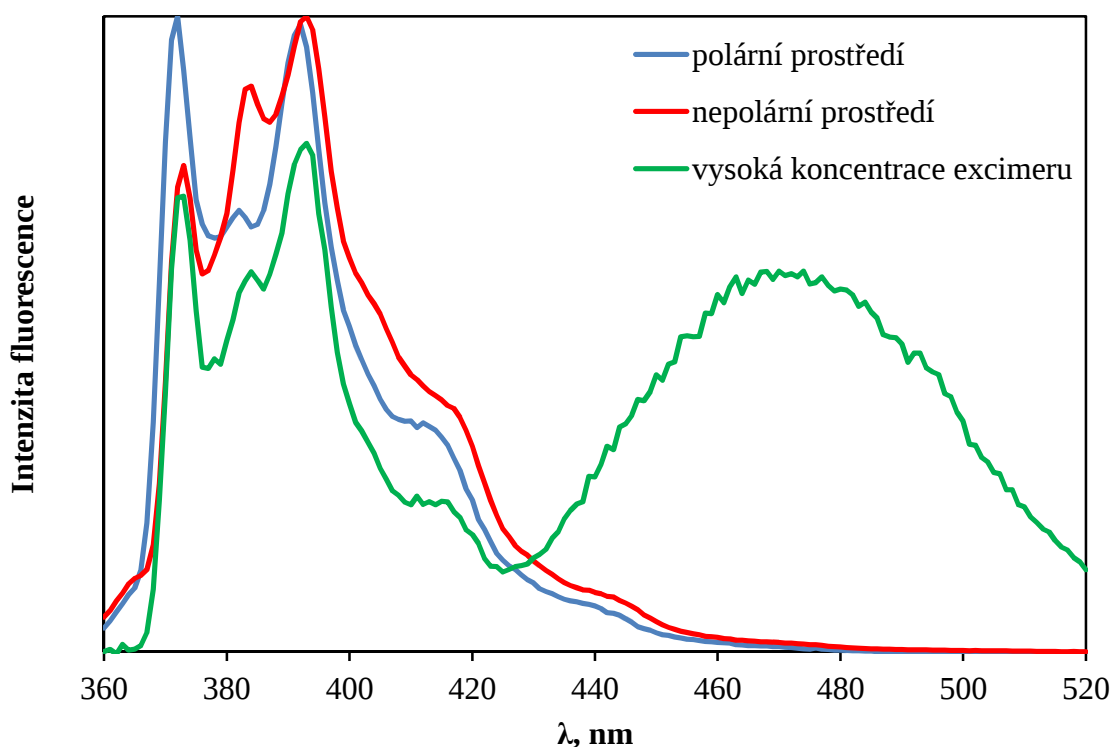
2.5.2.1 Pyren

Pyren je polyaromatický uhlovodík, jehož struktura je vysoce symetrická. Přechod $S_0 \rightarrow S_1$ je u těchto sloučenin zakázaný z hlediska symetrie. Spektrum pyrenu má vibračně rozlišenou strukturu, na polaritě okolí jsou závislé pouze některé vibrační přechody. Přechod 0–0 je silně závislý na polaritě okolí (tzv. Hamův efekt), je značený „1“ a je lokalizován u vlnové délky 373 nm emisního skenu. Přechod 0–2 je označován jako referenční, značený „3“

a lokalizován u vlnové délky 383 nm. Pro vyhodnocení CMC se do grafu vynáší poměr intenzity pásu „1“ k intenzitě pásu „3“ – emisní polaritní index (EmPI) v závislosti na koncentraci tenzidu. Data se vyhodnocují Boltzmannovou závislostí. EmPI dosahuje v silně polárním prostředí hodnot okolo 1,7, v nepolárním prostředí hodnot menších než 1, obvykle i 0,5. Emisní sken pyrenu je vykreslen na **Obr. 09**.

Další charakteristický pás pyrenu se nachází u vlnové délky 470 nm, je nazýván jako pás excimeru. Excitovaný dimer, neboli excimer, je dimer vzniklý spojením dvou molekul stejného druhu, jedné v základním stavu a jedné ve stavu excitovaném. Excimer se může tvořit, je-li v roztoku přebytek molekul pyrenu oproti množství hydrofobních domén v roztoku (tzn. okolo hodnoty CMC, kdy je v roztoku vytvořené malé množství micel). Při vysoké koncentraci excimeru v roztoku stoupá intenzita fluorescence při 470 nm (**Obr. 09**). Do grafu se vynáší závislost poměru intenzity fluorescence pásu excimeru k intenzitě fluorescence pásu monomeru („1“) na koncentraci tenzidu – Ex:Mo.

Charakteristické pásy pyrenu nalezneme i v excitačním (absorpčním) skenu. Poměr intenzity fluorescence při 492 nm s excitací při 333 nm a excitací při 338 nm se nazývá excitační polaritní index – ExPI. Jeho do grafu vynesená závislost na koncentraci tenzidu se vyhodnocuje stejně jako EmPI Boltzmannovou S-křivkou. Získaná „x“-ová souřadnice inflexního bodu odpovídá CMC použitého tenzidu.



Obr. 09 Emisní sken pyrenu v polárním prostředí (—), v nepolárním prostředí (—), při vysoké intenzitě pásu excimeru (—)

2.5.2.2 Nílská červeň

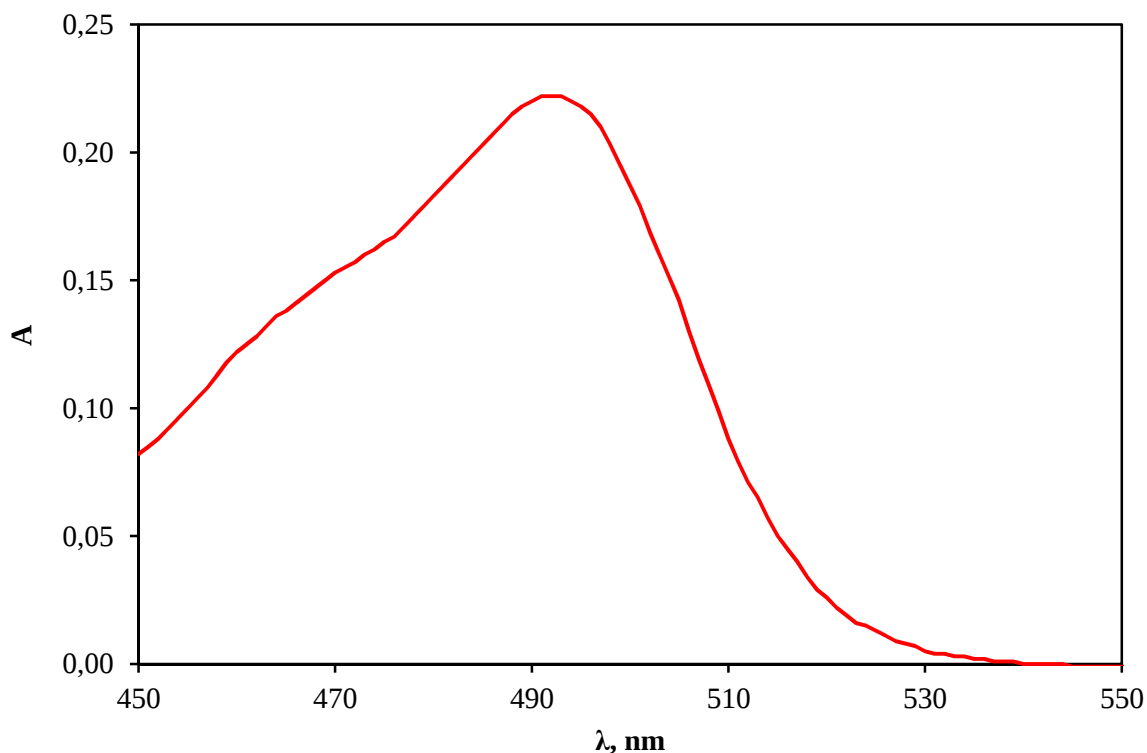
Nílská červeň je další z často využívaných fluorescenčních sond [8, 9, 10]. Na rozdíl od pyrenu ale neemituje záření z vodného prostředí, pouze z hydrofobních domén vytvořených

micel. Intenzita fluorescence z polárního prostředí tedy bude velice nízká, po vytvoření micel dojde k nárůstu intenzity fluorescence. V emisním spektru nilské červeně v nepolárním prostředí nalezneme dva píky s maximem intenzity okolo vlnové délky 525 nm, se vzrůstající polaritou prostředí se maximum posouvá k vlnovým délkám 600–650 nm a druhý pík zaniká.

2.5.2.3 Akridinová oranž

Akridinová oranž je fluorescenční sonda, která se nejčastěji používá ve formě hydrochloridu pro zajištění rozpustnosti ve vodném prostředí. Ve zředěném roztoku se vyskytuje ve formě monomeru, při vyšší koncentraci AO dochází k tvorbě dimeru. Zatímco monomer vykazuje vysokou intenzitu fluorescence, intenzita fluorescence dimeru je nízká, protože je zářivý přechod zakázaný. V přítomnosti kyseliny hyaluronové se tato kationaktivní fluorescenční sonda váže na karboxylové skupiny HYA. Při vyšší koncentraci AO dochází k zakoncentrování AO na vazných místech HYA a tvorbě dimeru AO na HYA. Při určitém poměru P/D jsou právě všechna vazná místa HYA obsazena dimery AO. Poměr P/D vyjadřuje poměr koncentrace vazných míst na HYA ke koncentraci AO. Zde se vychází z předpokladu, že na 400 mol HYA připadá 1 mol vazných míst (karboxylových skupin). Tento poměr P/D, kdy jsou všechny karboxylové skupiny HYA obsazeny dimery AO je roven 3, jak ukázalo měření, avšak měl by být 0,5 při úplné disociaci karboxylových skupin.

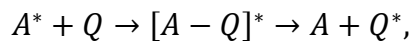
V absorpčním spektru AO nalezneme charakteristické absorpční pásy, při vlnové délce 465 nm se nachází absorpční pás dimeru, při 492 nm absorpční pás monomeru (**Obr. 10**).



Obr. 10 Absorpční spektrum AO

2.5.3 Zhášení

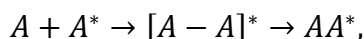
Zhášení je jeden z možných způsobů deaktivace excitovaného stavu. Excitovaná molekula interaguje s molekulou zhášedce a přeneše na něj přebytečnou energii. Schéma procesu zhášení může být znázorněno takto:



kde A^* je excitovaná molekula, Q je molekula zhášedce a A je molekula v základním stavu.

2.5.4 Vnitřní filtrační efekt a excimery

Při vysoké koncentraci látky (fluoroforu) se mnohdy snižuje intenzita fluorescence. Je to zapříčiněno jednak tím, že s rostoucí koncentrací fluoroforu nestoupá intenzita fluorescence lineárně, protože dochází k reabsorpci emitovaného záření, a také tím, že excitovaná molekula může interagovat s molekulou téhož druhu v základním stavu podle schématu (zejména v případě aromatických látek):



kde AA^* je excitovaný dimer, neboli excimer. Tento jev se nazývá vnitřní filtrační efekt.

Dále může být intenzita fluorescence snížena v případě, že některé molekuly neemitují záření směrem k detektoru.

2.5.5 Stanovení agregačního čísla zhášením

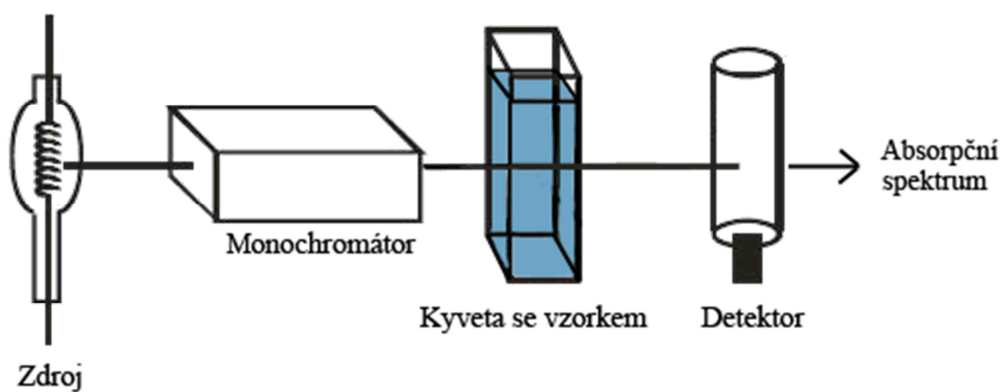
Stanovení agregačního čísla zhášením je poměrně jednoduchá a spolehlivá metoda. Spoléhá se výhradně na měření intenzity fluorescence. Stupeň zhášení fluorescence fluoroforu rozpuštěného v micelách pomocí zhášedce, který je dokonale rozdělen mezi micely, závisí zejména na koncentraci tenzidu, jehož agregační číslo má být určeno [11]. Agregační číslo je vypočteno podle následujícího vzorce:

$$N_{agg} = \frac{c_{tenzidu} - CMC}{\ln \frac{I_0}{I} \cdot [Q]},$$

kde $c_{tenzidu}$ je koncentrace tenzidu ve vzorcích, CMC je kritická micelární koncentrace tenzidu, I_0 a I je intenzita fluorescence měřena jako totální integrál emisního skenu bez a v přítomnosti zhášedce a $[Q]$ je koncentrace zhášedce.

2.6 Absorpční měření

Absorpční měření jsou realizována pomocí spektrofotometru, jenž měří intenzitu světla prošlého vzorkem. Spektrofotometr je složený ze zdroje záření, jímž bývá halogenová žárovka se spojitým spektrem ve viditelné a infračervené oblasti, vodíková nebo deuteriová výbojka jako zdroje ultrafialového záření, případně xenonová výbojka se spektrem ve viditelné, ultrafialové a blízké infračervené oblasti. Dále spektrofotometr tvoří monochromátor, kterým může být vhodný interferenční filtr nebo optické mřížka. Monochromatické světlo pak dopadá na kyvetu se vzorkem, kde je část světla pohlcena, část prochází a dopadá na detektor. Schéma uspořádání je zobrazeno na **Obr. 11**.



Obr. 11 Schéma spektrofotometru

Hodnota absorbance se určí podle vztahu:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I},$$

kde I_0 je intenzita světla vycházejícího ze zdroje, I je intenzita světla prošlého vzorkem.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Eidelman, Blumenthal a Walter studovali složení směsných micel DPPC a oktyl glukosidu novou technikou založenou na měření efektivity přenosu rezonanční energie mezi dvěma lipofilními fluorescenčními sondami, které byly ve vzorcích přítomny ve stopovém množství. Metoda RET (resonance energy transfer) je založena na pravděpodobnosti přítomnosti donoru v micelle bez přítomnosti akceptoru v téže micelle. Tato metoda je pro studium složení směsných micel vhodná, protože studované částice jsou malé a zhášení probíhá buď zcela, nebo neprobíhá vůbec, což závisí pouze na tom, zda je v téže micelle přítomen donor a akceptor zároveň. Stupeň zhášení fluorescence donoru je mírou pravděpodobnosti, zda je v jedné micelle přítomen donor i akceptor, která souvisí s průměrným počtem molekul DPPC ve směsné micelle.

Bylo zjištěno, že stechiometrické složení směsných micel DPPC a oktyl glukosidu je ve studovaném rozsahu koncentrací DPPC nezávislé na jeho koncentraci (0–500 μM). Závislost stechiometrie směsných micel na koncentraci oktyl glukosidu je shodné s předpokladem ideálního smíchávání dvou amfifilních látek ve směsných micelách a tyto směsné micely mohou být považovány za rozlišitelnou fázi [4].

Maza, Lopez a kolektiv zkoumali změny v rozpouštění jednovrstevných liposomů DPPC způsobené skupinou alkylglukosidů (s délkou alkylového řetězce C_8 až C_{12}). Molární zlomky alkyl glukosid-DPPC a rozdělovací koeficient dvojvrstvy/vodná fáze byly stanoveny pozorováním změn během solubilizace pomocí statického rozptylu světla. Nárůst hodnoty CMC (nebo pokles délky alkylového řetězce detergentu) má za následek nárůst schopnosti detergentu saturovat nebo solubilizovat liposomy DPPC a neočekávaný pokles afinity k dvojvrstvám. Celková bilance těchto dvou opačných tendencí ukazuje, že oktyl glukosid má nejvyšší schopnost saturovat a solubilizovat liposomy, zatímco dodecyl glukosid projevuje vysoký stupeň rozdělení v liposomech nebo vysokou afinitu k dvojvrstvě. Z praktického hlediska použití nonyl glukosidu redukuje přibližně 2,5krát koncentraci potřebnou k saturaci nebo solubilizaci 1 mM liposomu DPPC v porovnání s potřebným množstvím oktyl glukosidu [12].

Maza a Parra zkoumali interakce mezi neionogenním tenzidem dodecylmaltosidem a liposomy fosfatidylcholinu (PC). Dodecylmaltosid vykazuje vyšší schopnost saturovat a solubilizovat liposomy PC a vyšší afinitu k těmto strukturám než oktylglukosid. Cílem bylo porušení lamelární struktury PC a formování směsných micel PC-dodecylmaltosid. Zjistili, že koncentrace volného dodecylmaltosidu pod úrovní rozpouštění lamelárních struktur je nižší než jeho CMC a na úrovni rozpouštění vykazuje hodnoty stejné, jako je hodnota jeho CMC. Toto ukazuje, že změny v propustnosti a rozpouštění membrán jsou předem určené působením monomeru tenzidu a utvářením směsných micel [13].

Rupp, Steckel a Müller zkoumali, zda i jiné tenzidy, než jimi již studované žlučové soli, jsou schopné tvořit čiré roztoky v širokém rozsahu koncentrací při vyšším obsahu DPPC. Zvláštním cílem této práce bylo najít systém směsných micel s unimodální distribucí velikostí částic, s tím, že je známo, že tenzidy často tvoří s fosfolipidy vezikuly místo směsných micel.

Na základě převedení konceptu „packing“ parametru, který popisuje molekulární uspořádání jednoho druhu amfifilních látek, k popisu organizace dvou různých druhů

PP > 0,5 (DPPC)	PP < 0,5	Směs
Dvojvrstva	Micela	Směsná micela

Rei, Coutinho a kolektiv studovali interakce mezi DPPC a neionogenním tenzidem polyoxyethylenem 7 lauryl éterem ($C_{12}E_7$) měřením fluorescence pyrenu (konkrétně byl zkoumán poměr Ex:Mo). Projevila se významná preasociace excimeru pyrenu v základním stavu, která byla významnější v micelách než v premicelárních útvarech. Ve směsném systému pyren dokázal zaznamenat změnu uspořádání ze směsných dvojvrstev ve směsné micely [14].

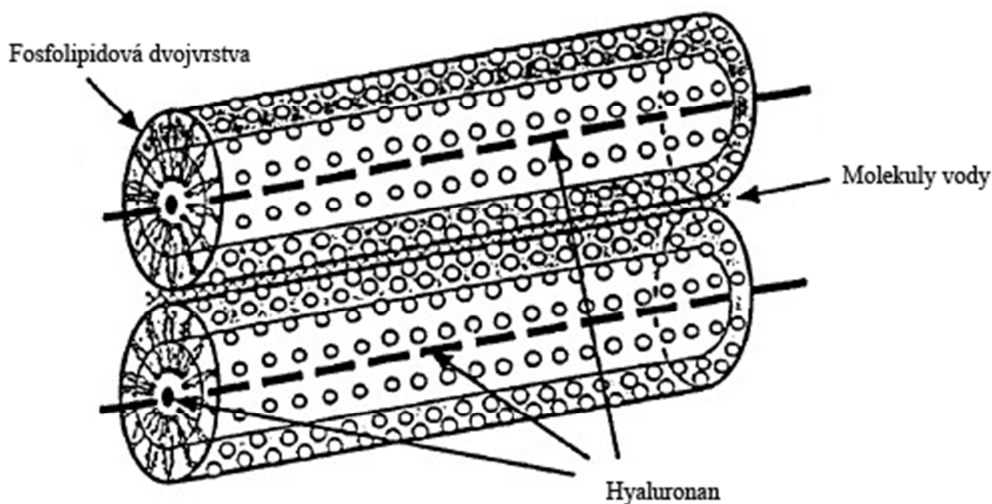
Ve tříložkovém systému DPPC-DG-DM přídavek molekul DM k vezikulám vytvořených ze směsi DPPC-DG indukuje jejich solubilizaci ve směsné micely. S postupným zvyšováním poměru DM-DPPC nastávají 4 hlavní fáze: (i) dvouvrstvé lamelární struktury, (ii) střední oblast, kde vedle sebe koexistují lamelární a micelární shluky, (iii) kompletní nahrazení dvojvrstev směsnými micelami a (iv) vývoj systému směrem k jednofázovým doménám.

Přechod od dvojvrstev ke směsným micelám (nebo obráceně) může být indukován změnou teploty [15].

Ronchetti, Quaglini a kolektiv zkoumali interakci hyaluronan-fosfolipid pomocí negativního barvení a elektronové mikroskopie. K fosfolipidovým suspenzím (DPPC a lecitin) byl přidán hyaluronan o různých molekulových hmotnostech, 0,17 MDa, 0,74 MDa a 1,9 MDa. Po 24 hodinách až sedmi dnech jemného promíchávání a inkubování při různých teplotách byla pozorována změna v uspořádání jednovrstevných i vícevrstevných vezikul v důsledku přidání hyaluronanu. Vzniklé struktury se podobaly perforovaným membránám a 12-nm válečkům s tendencí tvořit listy. Tyto struktury byly pozorovány pouze v přítomnosti vysokomolekulárního hyaluronanu, kdežto přítomnost nízkomolekulárního hyaluronanu způsobila rozpad liposomů a formování několika krátkých válečků.

Uspořádání fosfolipidů bylo výrazně ovlivněno přítomností hyaluronanu a nové struktury vzniklé z interakcí mezi těmito dvěma látkami se zdají být spíše nezávislé na počátečním uspořádání fosfolipidů (jednovrstevné nebo vícevrstevné) i na druhu fosfolipidu (DPPC nebo lecitin), zatímco jsou značně ovlivněny molekulovou hmotností hyaluronanu.

Po inkubaci suspenze DPPC s 1,9 MDa hyaluronanem při 50 °C po dobu delší než 2 hodiny se původní 15 až 30 nm široké jednovrstevné částice DPPC řadily v lineární agregáty a formovaly vzájemně propojené krátké řetězce. Tyto řetězce po čase měly tendenci spojovat se ve vlákna užší, než byla vlákna původní, s téměř konstantní šířkou 12 nm, a seskupovaly se v mřížku (pletivo). Po 48hodinové inkubaci nebyly pozorovány žádné izolované částice. Navržený model pro interakci hyaluronan-fosfolipid je zobrazen na **Obr. 13**, kde molekuly hyaluronanu působí jako centrální vlákno radiálně obklopené dvojvrstvou fosfolipidu [16].



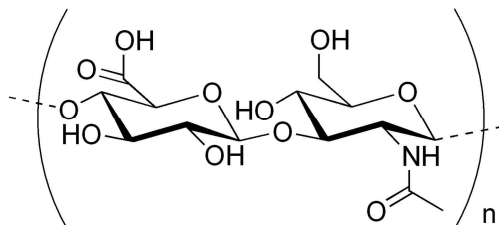
Obr. 13 Navržený model interakce hyaluronan-fosfolipid [9]

Crescenzi, Taglienti a Ronchetti zkoumali interakce mezi vysokomolekulárním hyaluronanem a liposomy DPPC v pufru. Výsledné nadmolekulární struktury byly pozorovány pomocí negativního barvení a elektronové mikroskopie a byly charakterizovány pomocí vodivostních technik. Potvrdila se existence supramolekulárních komplexů DPPC a vysokomolekulárního hyaluronanu. Tyto komplexy se mohou objevovat v synoviální tekutině, kde jsou hyaluronan a DPPC hlavními složkami, a mohou být odpovědné za unikátní fyziologické vlastnosti DPPC [17].

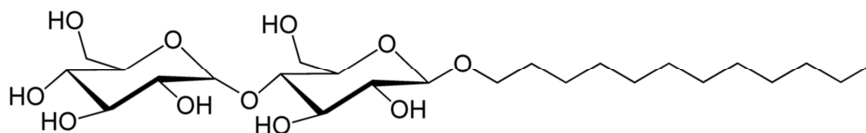
4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Použité chemikálie

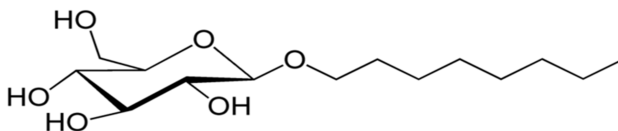
Polyaniont kyselina hyaluronová, 0,31 MDa, CPN spol. s.r.o., č. šarže: 160607-9-D7, dále HYA



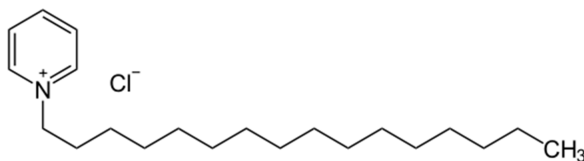
Cukerné tenzidy dodecyl- β -D-maltosid, CAS: 69227-93-6, dále C12Mal
Fluka, $\geq 99,0$ %, č. šarže: 1363358,
Sigma, $\geq 98,0$ %, č. šarže: 109K1053



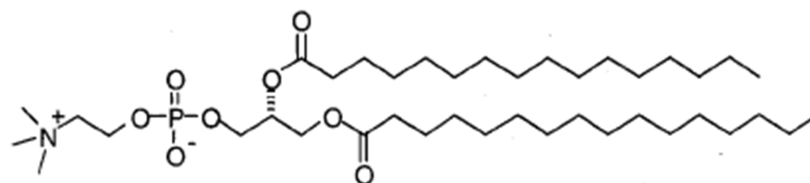
oktyl- β -D-glukopyranosid, CAS: 29836-26-8, dále C8Pyr
Sigma-Aldrich, $\geq 98,0$ %, č. šarže: 107K0715
Sigma-Aldrich, $\geq 98,0$ %, č. šarže: 119K1444



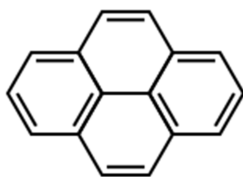
Tenzid hexadecylpyridiniumchlorid monohydrát, CAS: 6004-24-6,
Sigma-Aldrich, $\geq 99,0$ %, SigmaUltra, šarže: 075K0200, dále CPC



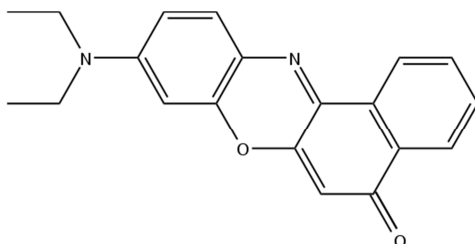
Fosfolipid 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin, CAS: 63-89-8,
Sigma-Aldrich, $\geq 99,0$ %, č. šarže: 078K5203, dále DPPC



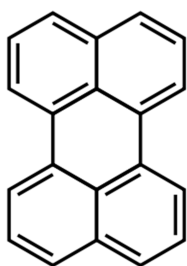
Fluorescenční sondy: pyren, CAS: 129-00-0, Fluka, puriss. p. a. for fluorescence, č. šarže: 430166/1



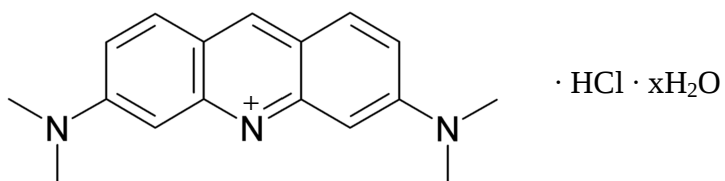
nilská červeň, CAS: 7385-67-3, Fluka, for fluorescence, č. šarže: 1285118



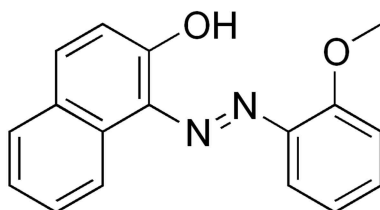
perylene, CAS: 198-55-1, Fluka, puriss for fluorescence, č. šarže: 384079/1



hydrochlorid hydrát akridinové oranže, CAS: 65-61-2, Sigma-Aldrich, č. šarže: 02220TE, dále AO



Hydrofobní barvivo: sudánová červeň G, CAS:1229-55-6, Fluka, č. šarže: 401930/1



Rozpouštědla:

voda (Milli-Q Academic, MiliPore)

nasycený roztok pyrenu (10^{-7} M) ve vodě

chloroform, CAS: 67-66-3, Sigma-Aldrich, for UV-spectroscopy, šarže: PP/2008/05926/0

4.2 Metody

4.2.1 Příprava vzorků

Byly namíchaný zásobní roztoky cukerných tenzidů, CPC, HYA a AO ve vodě, zásobní roztoky DPPC ve vodě, nasyceném roztoku pyrenu a v chloroformu a zásobní roztoky pyrenu, perylenu, sudánové červeně a nilské červeně v acetonu. Koncentrace C12Mal ve vodě činila 0,01 M, C8Pyr 0,1 M, CPC $5 \cdot 10^{-3}$ M, HYA 4 g dm^{-3} a $0,024 \text{ g dm}^{-3}$ a koncentrace DPPC ve vodě, nasyceném roztoku pyrenu i v chloroformu 1 g dm^{-3} . Koncentrace fluorescenčních sond a hydrofobního barviva v příslušném rozpouštědle činila řádově 10^{-4} M.

Zásobní roztok HYA o koncentraci 4 g dm^{-3} byl připraven tak, že bylo naváženo potřebné množství HYA, jež bylo zalito polovičním množstvím vody a ponecháno na laboratorní míchačce dokud nebylo veškeré množství HYA rozpuštěno. Poté byl roztok v odměrné baňce doplněn vodou na příslušný objem. Zásobní roztok HYA o koncentraci $0,024 \text{ g dm}^{-3}$ byl připraven zředěním roztoku HYA o koncentraci 4 g dm^{-3} .

Zásobní roztoky DPPC ve vodě a v nasyceném roztoku pyrenu byly připraveny tak, že příslušné množství DPPC bylo rozpuštěno v 1 ml chloroformu, chloroform byl odpařen a odparek DPPC byl přelit příslušným objemem vody nebo nasyceného pyrenového roztoku. Poté byly tyto zásobní roztoky sonifikovány 30 minut při teplotě 45°C . Vzorky byly připraveny v čirých skleněných vialkách o objemu 10 a 15 ml. Vzorky obsahující AO byly připraveny do plastových zkumavek a překryty PARAFILMEM.

4.2.1.1 Měření CMC cukerných tenzidů

Při přípravě roztoků cukerných tenzidů bylo do vialek napipetováno potřebné množství zásobního roztoku pyrenu v acetonu, aby výsledná koncentrace pyrenu ve vzorcích činila řádově 10^{-6} M. Po odpaření acetonu byly do vialek připraveny roztoky tak, že nejdříve byl napipetován zásobní roztok tenzidu a poté byl doplněn vodou na objem 4 ml. Takto připravené vzorky byly ponechány 12–24 hodin na třepačce při laboratorní teplotě.

4.2.1.2 Měření CMC DPPC

- *S nilskou červení*

Roztoky pro měření CMC DPPC byly připraveny podobně jako roztoky cukerných tenzidů, jejichž příprava je popsána výše. Místo zásobního roztoku pyrenu v acetonu bylo do vialek pipetováno tolik zásobního roztoku nilské červeně v acetonu, aby výsledná koncentrace nilské červeně ve vzorcích činila řádově 10^{-7} M. Jako zásobní roztok DPPC byl použit roztok DPPC ve vodě.

- *V nasyceném roztoku pyrenu*

Byl připraven zásobní roztok DPPC v nasyceném pyrenovém roztoku o koncentraci DPPC 1 g dm^{-3} . Postupně bylo jeho ředěním nasyceným pyrenovým roztokem připraveno 20 vzorků s nejnižší koncentrací DPPC $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ g dm}^{-3}$. Připravené roztoky byly krátce promíchány.

4.2.1.3 Měření vlivu DPPC na agregaci cukerných tenzidů

Do vialek bylo pipetováno tolik zásobního roztoku DPPC v chloroformu, aby výsledná koncentrace DPPC ve vzorcích byla $0,005 \text{ g dm}^{-3}$ (resp. $0,07 \text{ g dm}^{-3}$). Po odpaření chloroformu byly do vialek namíchány roztoky cukerných tenzidů tak, že nejdříve do nich bylo napipetováno příslušné množství zásobních roztoků tenzidů a poté doplněny vodou na objem 4 ml. Takto připravené roztoky byly sonifikovány 30 minut při teplotě 45°C .

Po 12–24 hodinách protřepávání roztoků na třepačce při laboratorní teplotě byly ze vzorků odpipetovány 3 ml do vialek, do nichž bylo předem napipetováno potřebné množství zásobního roztoku pyrenu v acetonu tak, aby po odpaření acetonu a přidání příslušného objemu tenzidu činila výsledná koncentrace pyrenu ve vzorcích řádově 10^{-7} M . Takto připravené vzorky byly opět ponechány 12–24 hodin na třepačce při laboratorní teplotě.

Byly namíchány tři koncentrační řady s rostoucí koncentrací cukerného tenzidu a konstantní koncentrací DPPC.

4.2.1.4 Měření CMC CPC

Pro měření CMC CPC byly namíchány tři řady roztoků s rostoucí koncentrací CPC. Nejdříve byl do prázdných vialek pipetován zásobní roztok sondy, popřípadě hydrofobního barviva. Jedna řada roztoků byla namíchána s perylenem, druhá řada obsahovala nilskou červeně, a třetí řada byla namíchána se sudánovou červení. Koncentrace perylenu, nilské červeně a sudánové červeně byla ve vzorcích řádově 10^{-6} M .

4.2.1.5 Měření agregačního čísla C12Mal, C8Pyr, směsi C12Mal s DPPC a směsi C8Pyr s DPPC zhášením pomocí CPC

Pro měření agregačního čísla C12Mal a C8Pyr byly namíchány roztoky s konstantní koncentrací cukerného tenzidu a rostoucí koncentrací zhášeče. Koncentrace cukerného tenzidu byla vyšší než jeho CMC, koncentrace C12Mal ve vzorcích činila 2 mM, koncentrace C8Pyr 30 mM. Pro měření agregačního čísla směsi C12Mal s DPPC a C8Pyr s DPPC byly obdobně namíchány roztoky s konstantní koncentrací cukerného tenzidu, konstantní koncentrací DPPC a rostoucí koncentrací CPC. Hodnota koncentrace cukerného tenzidu byla vyšší než hodnota CAC směsi cukerného tenzidu a DPPC při koncentraci DPPC $0,005 \text{ g dm}^{-3}$. Koncentrace C12Mal ve vzorcích byla 0,04 mM, koncentrace C8Pyr 5 mM. Jako sonda byl použit pyren s koncentrací v jednotlivých vzorcích 10^{-6} M .

4.2.1.6 Měření vlivu HYA na interakci DPPC s cukernými tenzidy

Do vialek bylo pipetováno potřebné množství zásobního roztoku DPPC v chloroformu, aby výsledná koncentrace DPPC ve vzorcích byla $0,005 \text{ g dm}^{-3}$. Po odpaření chloroformu byly do vialek namíchány roztoky cukerných tenzidů tak, že nejdříve do nich bylo napipetováno příslušné množství zásobních roztoků tenzidů a poté doplněny vodou na objem 3 ml. Takto připravené roztoky byly sonifikovány 30 minut při teplotě 45°C . Po 3 hodinách byl do roztoků přimíchán 1 ml zásobního roztoku HYA o koncentraci 4 g dm^{-3} . Výsledná koncentrace HYA ve všech roztocích byla 1 g dm^{-3} . Byly namíchány vždy 3 koncentrační řady.

Po 20–24 hodinách protřepávání roztoků na třepačce při laboratorní teplotě byly ze vzorků odpipetovány 3 ml do vialek, v nichž bylo po odpaření acetonu potřebné množství pyrenu s výslednou koncentrací ve vzorcích řádově 10^{-6} M. Takto připravené vzorky byly opět ponechány 20–24 hodin na třepačce při laboratorní teplotě.

4.2.1.7 Měření interakcí HYA, C12Mal a DPPC

Do skleněných vialek byly připraveny 4ml roztoky DPPC s C12Mal se vzrůstající koncentrací DPPC i C12Mal za konstantního poměru jejich koncentrací tak, aby u vzorků s koncentrací C12Mal nad jeho CMC připadala na jednu micelu alespoň jedna molekula DPPC. Takto připravené roztoky byly sonifikovány 30 minut při teplotě 45 °C a roztoky byly promíchávány na třepačce do dalšího dne při laboratorní teplotě. Poté bylo do plastových zkumavek napipetováno potřebné množství zásobního roztoku HYA o koncentraci $0,024 \text{ g dm}^{-3}$, a takové množství AO, aby výsledná koncentrace AO ve vzorcích byla $5 \cdot 10^{-6}$ M a poměr P/D byl roven 3. Směs HYA a AO byla promíchána. Poté byly přimíchány 3 ml předem připravených roztoků. Dále byly připraveny roztoky obsahující pouze AO a AO s HYA s výše zmíněnými koncentracemi ve vodě. Připravené roztoky byly během 24 hodin několikrát promíchány.

4.2.2 Zpracování výsledků

4.2.2.1 Pyren

Excitační a emisní spektra pyrenu byla měřena pomocí přístroje AMINCO-Bowman Series 2. Byl měřen emisní sken v rozsahu 360–520 nm a excitační sken v rozsahu 320–340 nm. Pro emisní měření byla použita excitační vlnová délka 335 nm, pro excitační měření byla nastavena emisní vlnová délka na 392 nm. Z emisního skenu byla zaznamenávána intenzita fluorescence I_1 (při 373 nm), I_3 (383 nm) a I_E (470 nm). Z excitačního skenu byly sledovány hodnoty intenzity fluorescence při různých excitačních vlnových délkách (333 nm a 338 nm).

• Stanovení CMC

Do grafu byly vyneseny závislosti $EmPI$, $ExPI$ a $Ex:Mo$ na koncentraci tenzidu (koncentrace tenzidu byla v grafu vynesena v logaritmickém měřítku).

Hodnota kritické micelární koncentrace byla získána proložením závislosti $EmPI$ nebo $ExPI$ na koncentraci tenzidu Boltzmannovou křivkou. Její charakteristické body jsou vykresleny na **Obr. 14a**. Hodnota bodu x_0 odpovídá hodnotě CMC.

Rovnice Boltzmannovy křivky:

$$EmPI, ExPI = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2,$$

kde A_1/A_2 je „y“-ová souřadnice prvního/druhého zlomu, x je nezávisle proměnná, x_0 je hodnota nezávisle proměnné v inflexním bodu a Δx je gradient.

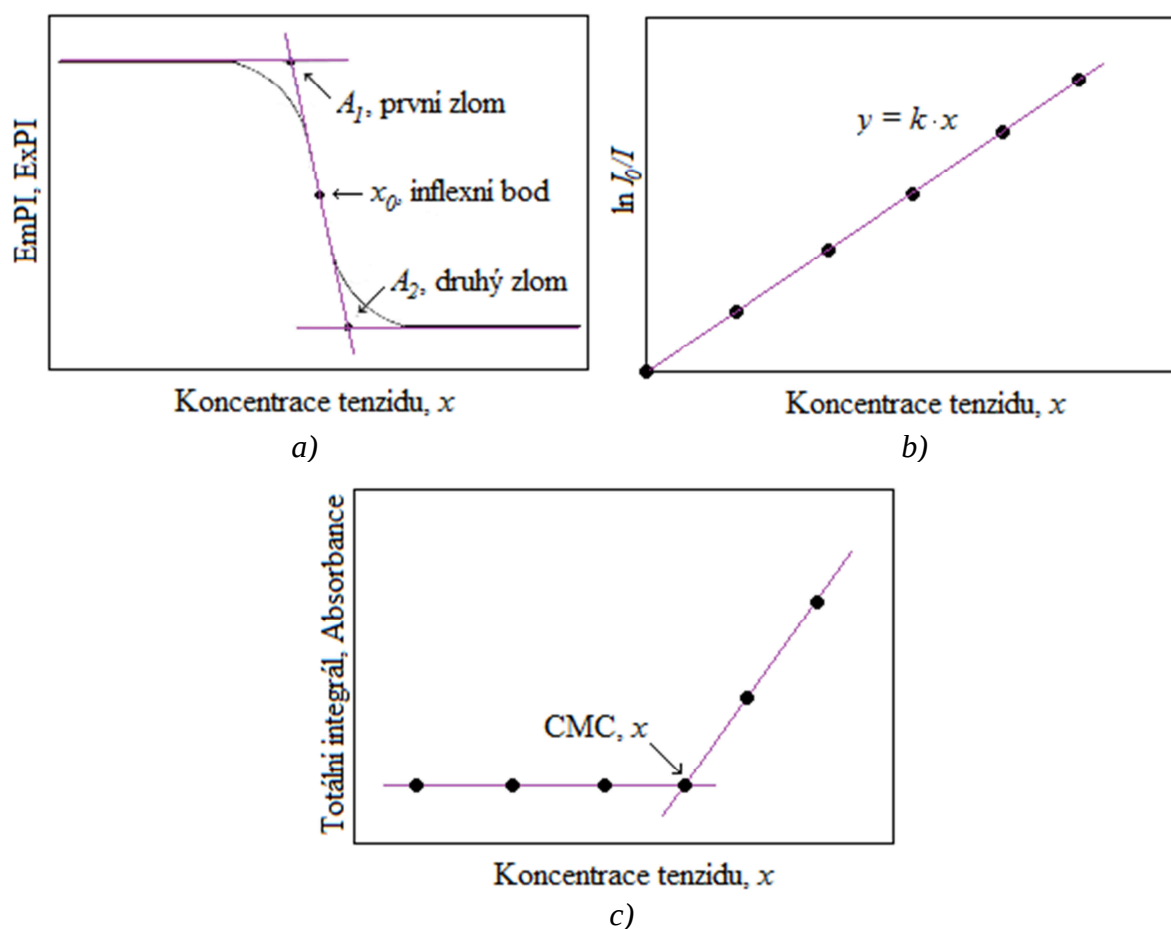
Při měření více shodných koncentračních řad byl vypočten průměr naměřených dat a pomocí funkce SMODCH v programu MSExcell byly vypočteny směrodatné odchylky naměřených dat. Tyto odchylky byly vyneseny do grafů v podobě chybových úseček.

- Stanovení agregačního čísla

Při měření agregačního čísla byla zaznamenávána hodnota totálního integrálu emisního skenu v rozsahu 360–520 nm, do grafu byly vyneseny hodnoty přirozeného logaritmu z poměru intenzity fluorescence bez přítomnosti zhášedce (I_0) a intenzity fluorescence v přítomnosti zhášedce ve vzorku (I). Data byla proložena křivkou procházející bodem [0; 0] jak je uvedeno na **Obr. 14b**. Agregační číslo pak bylo určeno podle vztahu:

$$N_{agg} = \frac{c_{tenzidu} - CMC}{\ln \frac{I_0}{I} \cdot [Q]},$$

kde $c_{tenzidu}$ je koncentrace tenzidu ve vzorcích, I_0 a I je intenzita fluorescence měřená jako totální integrál emisního skenu bez a v přítomnosti zhášedce.



Obr. 14 a) Znázornění Boltzmannovy závislosti pro určení CMC; b) Závislost $\ln I_0/I$ na koncentraci zhášedce, vyhodnocení proložením přímkou procházející bodem [0; 0]; c) Závislost totálního integrálu emisního skenu (absorbance) na koncentraci tenzidu, vyhodnoceno metodou průsečíku

4.2.2.2 Nílská červeně

Emisní spektrum nílské červeně bylo měřeno pomocí přístroje AMINCO Bowmanseries 2. Byl měřen emisní sken v rozsahu 480–750 nm.

Pomocí programu Origin byl zjištěn totální integrál intenzity fluorescence v rozsahu od 525 do 750 nm. Zjištěné hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci tenzidu

a vyhodnoceny metodou průsečíku dvou přímek, jak je uvedeno na **Obr. 14c**. Data před zlomem byla zprůměrována a do grafu byla zakreslena přímka odpovídající vypočtené konstantě. Data za zlomem byla proložena přímkou a byla vypočtena hodnota průsečíku těchto dvou přímek, jenž odpovídá hodnotě CMC.

4.2.2.3 *Sudánová červeň*

Pro určení CMC CPC byla proměřena absorpční spektra připravených vzorků pomocí přístroje Varian Cary Probe 50 v rozsahu od 200 do 800 nm. Do grafu byly vyneseny hodnoty absorbancí při vlnové délce 500 nm v závislosti na koncentraci tenzidu a data byla vyhodnocena metodou průsečíku dvou přímek (**Obr. 14c**), stejně jako v případě dat získaných při měření s nilskou červení.

4.2.2.4 *Perylen*

Protože fluorescence perylenu ve vzorcích byla zhasena přítomným CPC, nebyla pomocí přístroje AMINCO Bowmanseries 2 zaznamenána emise a vzorky byly proměřeny a vyhodnoceny stejným způsobem jako vzorky obsahující sudánovou červeň. Do grafu byly vyneseny hodnoty absorbancí při vlnové délce 440 nm v závislosti na koncentraci tenzidu a data byla vyhodnocena metodou průsečíku dvou přímek (**Obr. 14c**).

4.2.2.5 *Akridinová oranž*

Emisní spektrum akridinové oranže bylo měřeno pomocí přístroje AMINCO Bowman series 2. Byl měřen emisní sken v rozsahu 500–650 nm. Byla zaznamenávána vlnová délka, při níž byla intenzita fluorescence nejvyšší, a intenzita fluorescence při této vlnové délce. Dále byl zaznamenán totální integrál intenzity fluorescence v rozsahu od 500 do 650 nm. Také bylo změřeno absorpční spektrum pomocí přístroje Varian Cary Probe 50 a do grafu byl vynesen poměr absorbance při 465 nm (absorpční pás dimeru) k absorbanci při 492 nm (absorpční pás monomeru).

4.2.2.6 *Korekce dat*

Hodnota intenzity fluorescence může být zkreslena reabsorpcí emitujícího záření. Intenzita záření dopadajícího na detektor je poté nižší. Proto se v případě, kdy jsou vzorky viditelně zakalené, provádí korekce dat podle vztahu

$$F_{kor} = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (OD_{ex} + OD_{em})},$$

kde OD_{ex}/OD_{em} je optická hustota při excitační/emisní vlnové délce, F_{obs} je experimentálně zjištěná intenzita fluorescence.

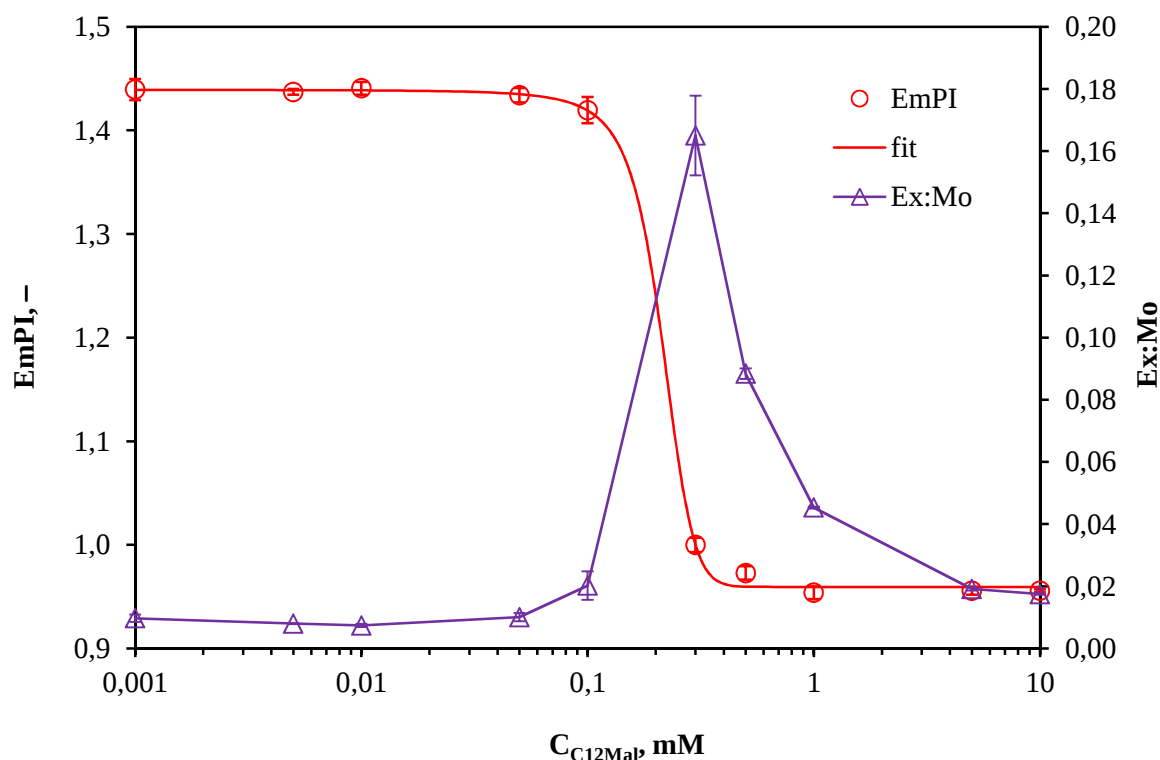
Pomocí přístroje Varian Cary Probe 50 byla naměřena absorpční spektra jednotlivých vzorků v kyvetách o optické dráze 1 cm v rozmezí od 200 do 800 nm. Optická hustota vzorku je v tomto případě rovna absorbanci.

$$F_{kor} = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (A_{ex} + A_{em})},$$

kde A_{ex}/A_{em} je absorbance při excitační/emisní vlnové délce.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení CMC C12Mal



Obr. 15 Závislost $EmPI$ a poměru $Ex:Mo$ na koncentraci $C12Mal$

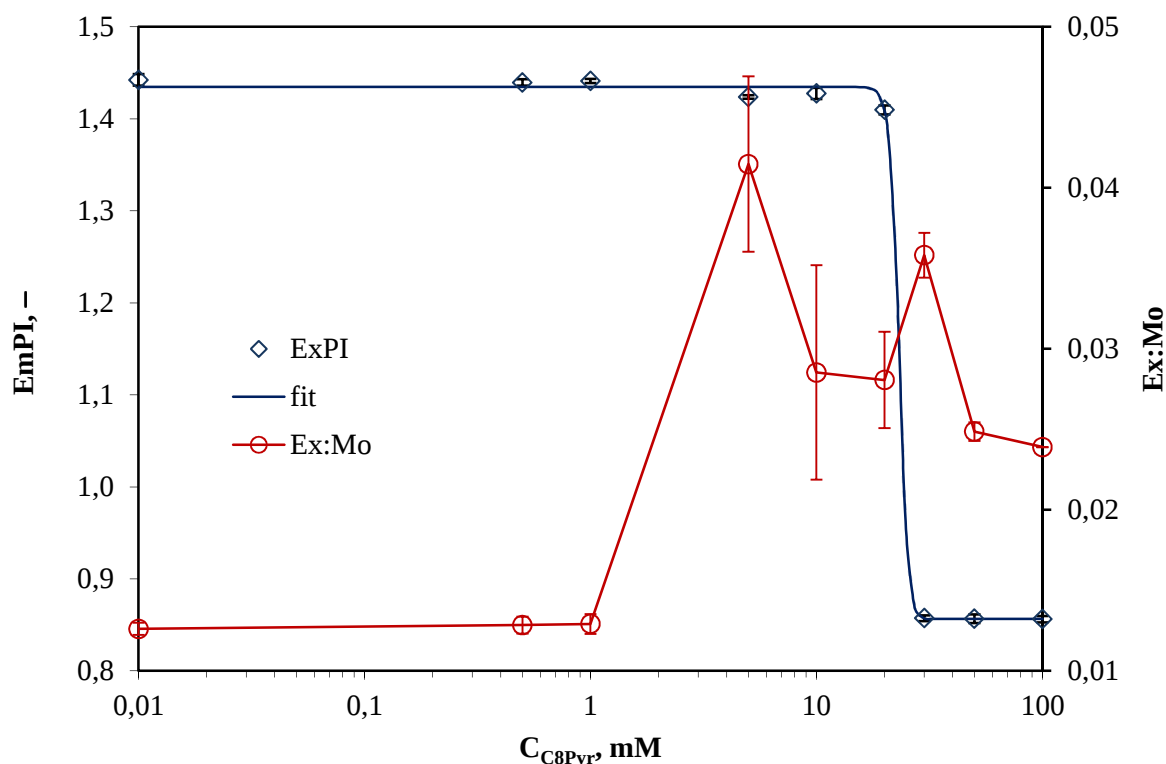
Obr. 15 vykresluje závislosti $EmPI$ na koncentraci $C12Mal$, závislost byla proložena Boltzmannovou křivkou a byla získána hodnota CMC $C12Mal$, jež je uvedena v **Tab. 01**. Dále **Obr. 15** znázorňuje závislost poměru $Ex:Mo$ na koncentraci $C12Mal$, je zaznamenán nárůst poměru v oblasti koncentrací okolo CMC $C12Mal$.

Závislost $ExPI$ na koncentraci $C12Mal$ byla taktéž proložena Boltzmannovou křivkou a získaná hodnota CMC je zaznamenána v **Tab. 01**.

Tab. 01: Naměřené hodnoty CMC $C12Mal$, hodnoty spolehlivosti a tabelovaná hodnota

Naměřené hodnoty			Referenční hodnoty		
Závislost	CMC [mM]	Spolehlivost	CMC [mM]	Zdroj	Metoda
EmPI	0,21	0,9993	0,17	[18]	Fluorimetrie
ExPI	0,19	0,9936	0,17	[19]	ITC
Průměr	$0,20 \pm 0,01$		0,15	[19]	DLS

5.2 Stanovení CMC C8Pyr



Obr. 16 Závislost $EmPI$ a poměru $Ex:Mo$ na koncentraci $C8Pyr$

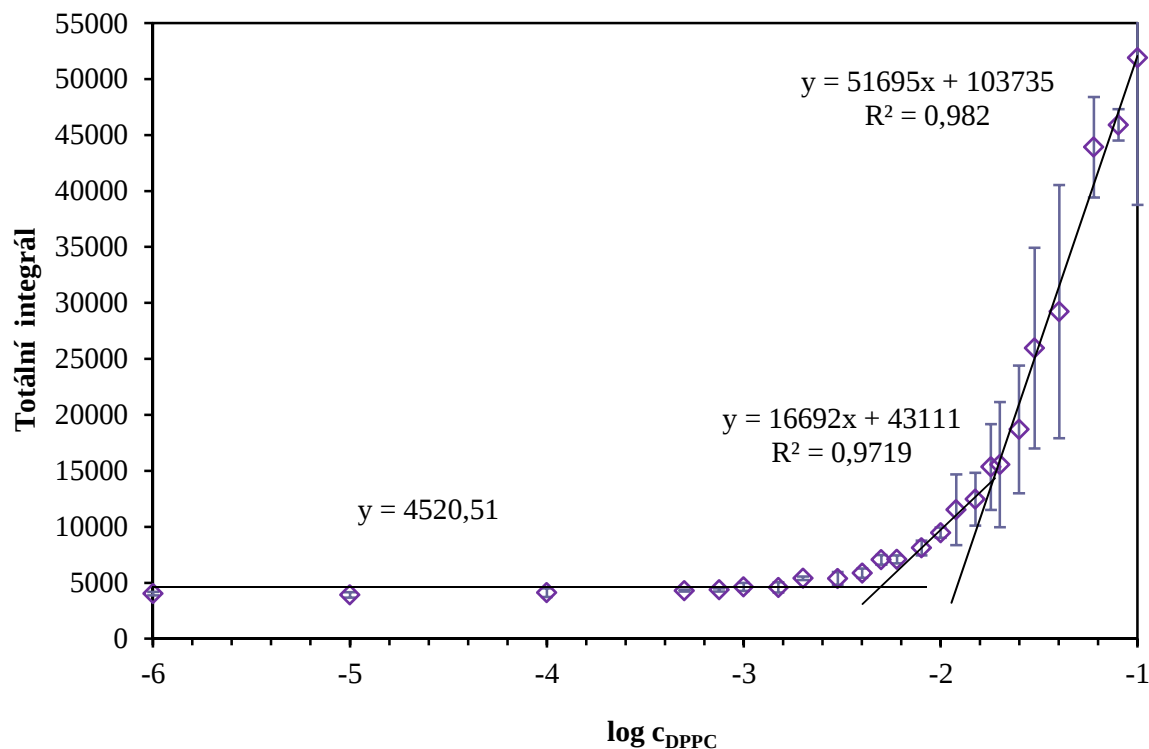
Obr. 16 znázorňuje závislost $EmPI$ a poměru $Ex:Mo$ na koncentraci $C8Pyr$. Závislost $EmPI$ byla proložena Boltzmannovou závislostí a byla získána hodnota CMC $C8Pyr$, jež je uvedena v **Tab. 02**. Závislost poměru $Ex:Mo$ vykazuje vzrůst okolo CMC $C8Pyr$, ale i v oblasti nižších koncentrací. První nárůst může být důsledkem vzniku premicelárních agregátů před vytvořením pravých micel. U závislosti $EmPI$ na koncentraci $C8Pyr$ není pozorován výrazný pokles v oblasti stejných koncentrací $C8Pyr$. V případě $C12Mal$ žádný vzrůst poměru $Ex:Mo$ v oblasti koncentrací před CMC zaznamenán nebyl. U menších molekul $C8Pyr$ tedy pravděpodobně došlo k vytvoření několika hydrofobních domén, a to při koncentraci přibližně desetkrát vyšší než je CMC $C12Mal$ a přibližně desetkrát nižší než je CMC $C8Pyr$. V roztoku je tedy přítomno velké množství molekul, ty by se měly před hodnotou CMC formovat na povrchu hladiny. Z naměřených hodnot je patrné, že i před CMC vznikají v roztoku agregáty, jež před vytvořením pravých micel nezanikají, spíše jich přibývá a poté se shlukují v micely.

Tab. 02: Hodnota CMC $C8Pyr$, hodnota spolehlivosti a tabelovaná hodnota

Naměřená hodnota			Referenční hodnota		
Závislost	CMC [mM]	Spolehlivost	CMC [mM]	Zdroj	Metoda
EmPI	23,22	0,9993	23	[20]	Kalorimetrie

5.3 Studium agregace DPPC

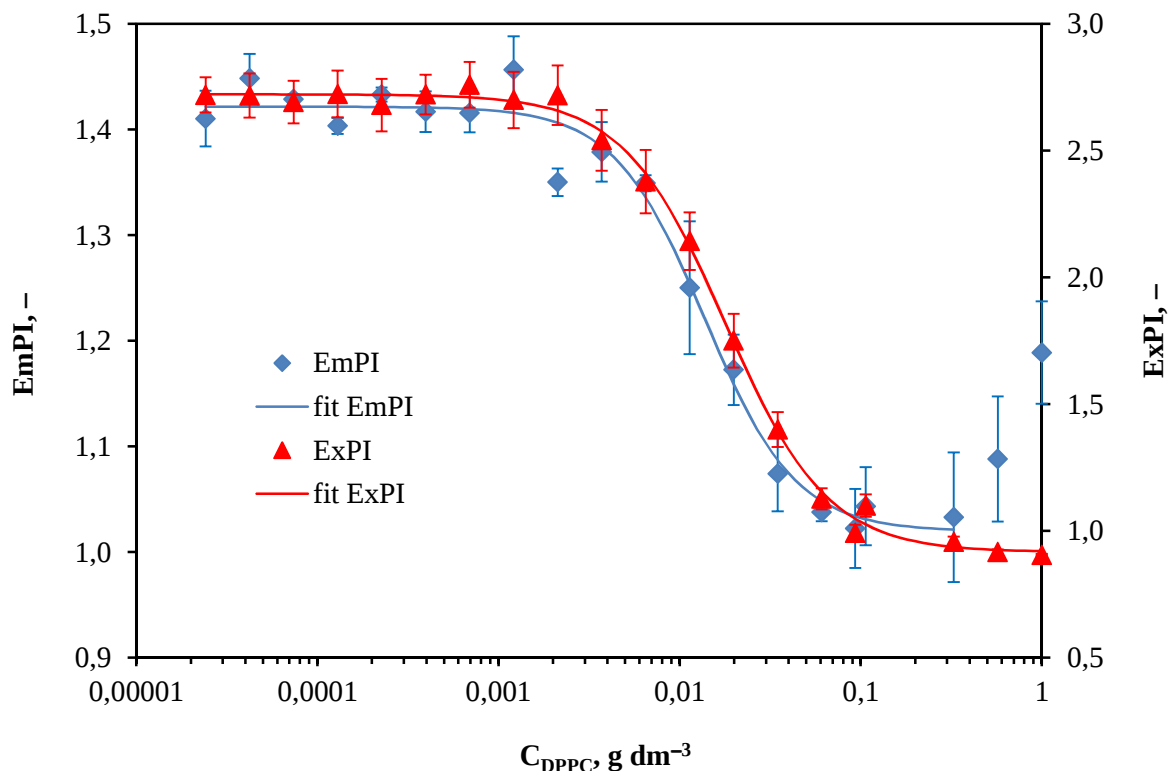
Pro první studium agregace DPPC bylo namícháno celkem 27 vzorků s koncentrací DPPC 10^{-6} g dm⁻³ až 1 g dm⁻³ ve vodě. Jako sonda byla při tomto měření použita nilská červeň.



Obr. 17 Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně na logaritmu koncentrace DPPC.

Obr. 17 znázorňuje závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně v rozsahu od 525 do 750 nm na koncentraci DPPC. Na křivce jsou patrné dva zlomy. Příčinou prvního zlomu může být první změna uspořádání molekul v roztoku, tedy vznik prvních agregátů (CPA – koncentrace počátku agregace). Druhý zlom představuje přeměnu vzniklých agregátů, pravděpodobně v micely (CMC). Data byla vyhodnocena metodou průsečíku dvou přímek. Zjištěné hodnoty CPA a CMC jsou uvedeny v **Tab. 03**.

Pro další měření CMC DPPC bylo postupně namícháno 20 roztoků v nasyceném pyrenovém roztoku v koncentračním rozmezí DPPC $2,4 \cdot 10^{-5}$ g dm⁻³ a 1 g dm⁻³. Postup míchání je uveden v kapitole 4. Byly provedeny korekce naměřených dat, avšak data korigovaná a bez korekcí se příliš nelišila. Data níže uvedená jsou korigovaná.



Obr. 18 Závislost *EmPI* a *ExPI* na koncentraci DPPC.

Obr. 18 znázorňuje závislost *EmPI* a *ExPI* na koncentraci DPPC, data *EmPI* a *ExPI* byla proložena Boltzmannovými křivkami a získané hodnoty CMC DPPC jsou uvedeny v **Tab. 03**. Dále byly z parametrů Boltzmannových závislostí vypočteny koncentrace, jež odpovídají prvnímu zlomu A_1 . Při této koncentraci probíhají první změny v objemu systému, tedy nejen na jeho fázovém rozhraní. Tuto koncentraci označme CPA.

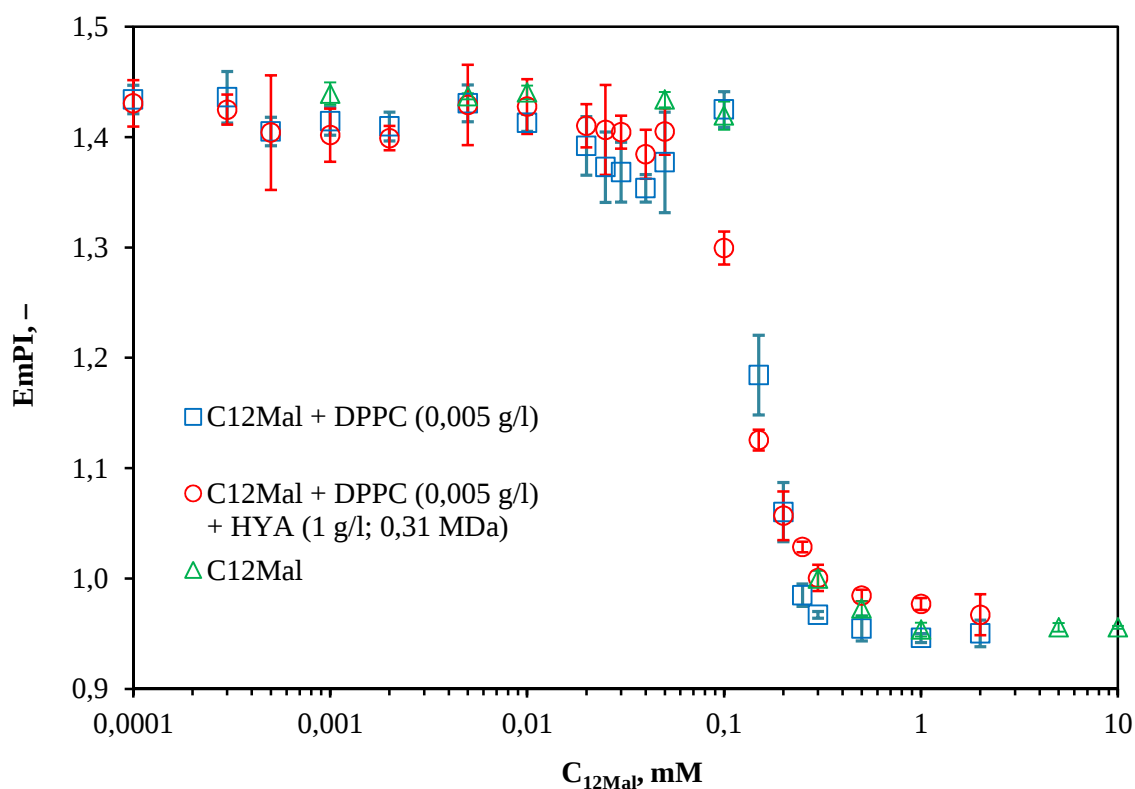
Tab. 03: Naměřené hodnoty CPA A CMC DPPC

Sonda	Závislost	CPA [g dm^{-3}]	CMC [g dm^{-3}]
Pyren	<i>EmPI</i>	0,00434	0,0138
	<i>ExPI</i>	0,00260	0,0110
Nilská červeň	Tot. Integrál	0,00488	0,0185
Průměr		0,0039	0,0144
Odchylka		0,0012	0,0038

Hodnoty CPA DPPC získané ze závislosti *ExPI* na koncentraci DPPC se od dvou ostatních hodnot liší. Pro studium vlivu DPPC na agregaci C12Mal a C8Pyr byla vybrána koncentrace přibližně CPA DPPC, tedy $0,005 \text{ g dm}^{-3}$.

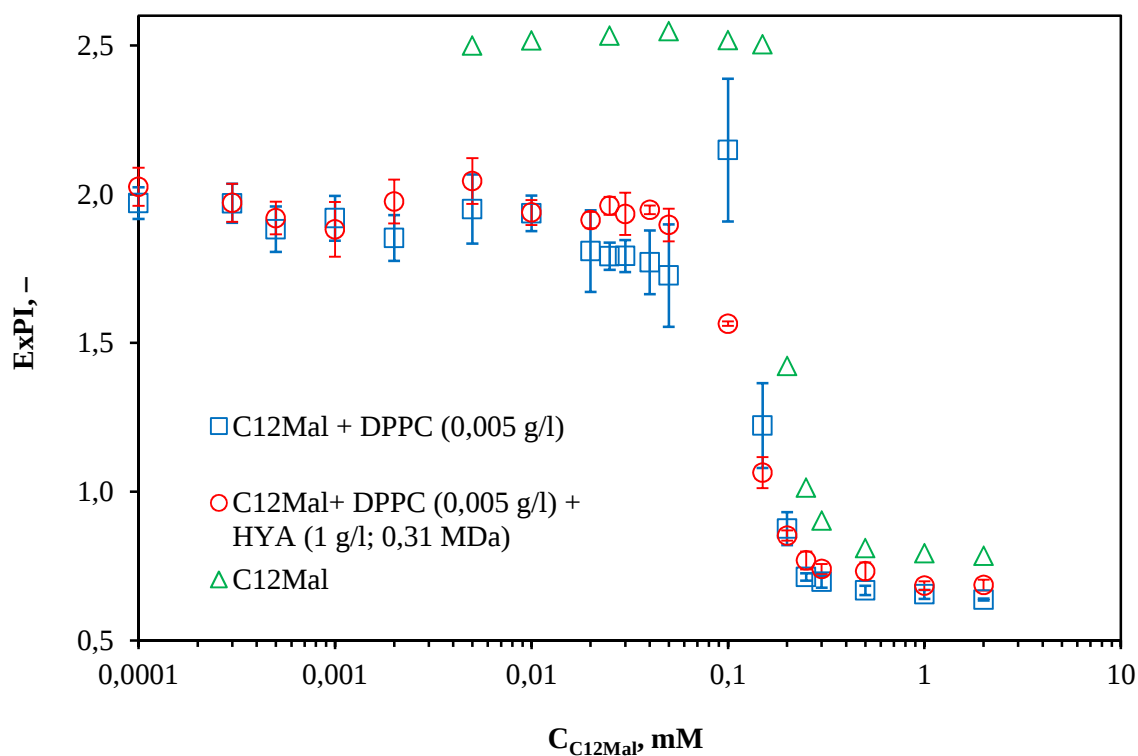
5.4 Studium vlivu DPPC a směsi DPPC a HYA na agregaci C12Mal

Byl studován vliv DPPC a směsi DPPC a HYA na agregaci C12Mal. Následující grafy (**Obr. 19-21**) srovnávají zmíněná měření se závislostmi získanými při měření CMC C12Mal.

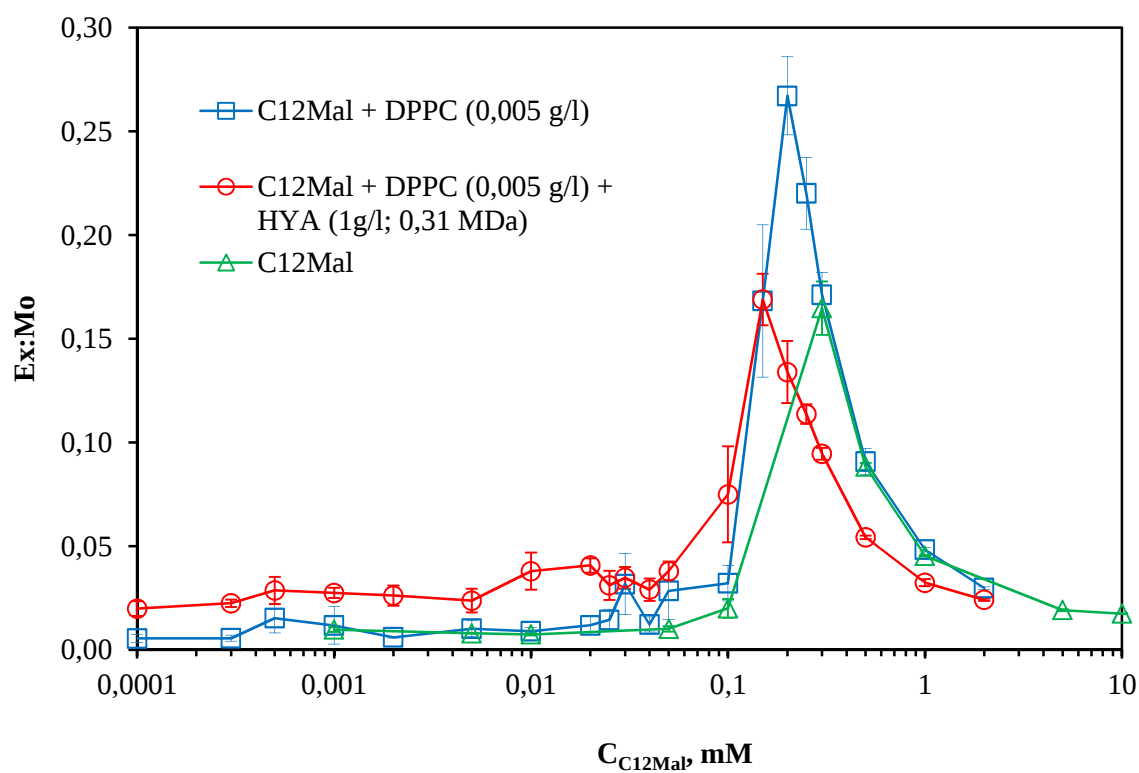


Obr. 19 *EmPI v závislosti na koncentraci C12Mal pro směs C12Mal a DPPC, C12Mal, DPPC a HYA a samotný C12Mal*

Na **Obr. 19** je znázorněno srovnání závislostí EmPI čistého C12Mal, směsi C12Mal a DPPC a směsi C12Mal, DPPC a HYA na koncentraci C12Mal. Směs obsahující C12Mal a DPPC vykazuje pokles EmPI okolo koncentrace C12Mal 0,01 mM a následný nárůst v rozmezí koncentrací 0,04–0,1 mM. Lokální pokles EmPI může znamenat tvorbu premicelárních agregátů, následný vzrůst jejich rozpad před utvořením pravých micel. Následuje pokles EmPI, jehož inflexní bod odpovídá CMC směsi C12Mal a DPPC (při koncentraci DPPC 0,005 g dm⁻³). Po přidavku DPPC k C12Mal došlo k malému snížení hodnoty CMC, což je více patrné z naměřených hodnot uvedených v **Tab. 04**. Závislost EmPI na koncentraci C12Mal pro směs C12Mal a DPPC byla proložena dvěma Boltzmannovými závislostmi. První zlom odpovídá kritické agregační koncentraci (CAC), tedy koncentraci, kdy dochází v systému ke vzniku prvních agregátů s hydrofobním jádrem. Proložení závislosti je zobrazeno v Příloze 1 na **Obr. 29**. Získané hodnoty CAC a CMC jsou uvedeny v **Tab. 04**. V **Tab. 04** jsou také vypsány parametry Boltzmannovy závislosti při proložení závislosti pro směs C12Mal a DPPC pouze jednou Boltzmannovou křivkou. Při proložení jednou Boltzmannovou křivkou mají závislosti nižší spolehlivost a vyšší hodnoty χ^2 . S přidavkem HYA ke směsi C12Mal a DPPC nedošlo k výraznějším změnám v chování celého systému ani k dalšímu poklesu CMC celého systému. Závislost byla proložena Boltzmannovou křivkou a byla zjištěna hodnota CMC směsi, hodnota CAC zjištěna nebyla, protože v oblasti nižších koncentrací C12Mal nemá závislost charakteristický sigmoidní průběh.



Obr. 20 ExPI v závislosti na koncentraci C12Mal pro směs C12Mal a DPPC, C12Mal, DPPC a HYA a samotný C12Mal



Obr. 21 Poměr Ex:Mo v závislosti na koncentraci C12Mal pro směs C12Mal a DPPC, C12Mal, DPPC a HYA a samotný C12Mal

Obr. 20 znázorňuje srovnání závislostí ExPI čistého C12Mal, směsi C12Mal a DPPC a směsi C12Mal, DPPC a HYA na koncentraci C12Mal. Z **Obr. 20** je patrný výrazný pokles ExPI po přidání DPPC k C12Mal. Stejně jako u EmPI i zde dochází u směsi C12Mal s DPPC k lokálnímu poklesu a nárůstu ExPI a to v oblastech stejných koncentrací C12Mal jako u závislosti EmPI na koncentraci C12Mal, což potvrzuje vznik premicelárních agregátů. Stejně jako u závislosti EmPI na koncentraci C12Mal je i zde pokles CMC směsi. Závislost ExPI na koncentraci C12Mal pro směs C12Mal a DPPC byla také proložena dvěma Boltzmannovými závislostmi, získané hodnoty CAC a CMC jsou uvedeny v **Tab. 04**. Závislost ExPI na koncentraci C12Mal pro směs C12Mal, DPPC a HYA byla proložena stejně jako u EmPI pouze jednou Boltzmannovou křivkou, získaná hodnota CMC směsi je uvedena v **Tab. 04**.

Obr. 21 vykresluje závislosti poměru Ex:Mo pro čistý C12Mal, směs C12Mal a DPPC a směs C12Mal, DPPC a HYA na koncentraci C12Mal. Z tohoto grafu je možné usuzovat, že dochází ke snížení CMC s přidavkem DPPC i HYA k C12Mal. Zároveň říká, že s přidavkem DPPC a HYA k C12Mal dojde ke vzniku agregátů v oblasti koncentrací C12Mal 0,02–0,1 mM v případě směsi C12Mal a DPPC, a v oblasti koncentrací C12Mal 0,005–0,1 mM u směsi C12Mal, DPPC a HYA.

Tab. 04: Hodnoty CMC a CAC pro C12Mal a jeho směsi

Směs	Počet Boltz. křivek	Parametr	Závislost	
			EmPI	ExPI
C12Mal	1	CMC [mM]	0,2126	0,1917
		R ²	0,9993	0,9936
		chi ²	4,05 10 ⁻⁵	4,48 10 ⁻⁴
C12Mal + DPPC	2	CAC [mM]	0,01617	0,01489
		R ²	0,9917	0,9916
		chi ²	1,02 10 ⁻⁵	6,81 10 ⁻⁵
		CMC [mM]	0,1557	0,1432
		R ²	0,9891	0,9961
		chi ²	5,35 10 ⁻⁴	1,44 10 ⁻³
	1	CMC [mM]	0,1589	0,1497
		R ²	0,9787	0,9619
		chi ²	8,59 10 ⁻⁴	1,20 10 ⁻²
C12Mal + DPPC + HYA	1	CMC [mM]	0,1286	0,1215
		R ²	0,9935	0,9945
		chi ²	2,38 10 ⁻⁴	1,80 10 ⁻³

Přidavkem DPPC o koncentraci 0,005 g dm⁻³ k C12Mal dochází k výraznému snížení hodnoty CMC. Přidavkem HYA o koncentraci 1 g dm⁻³ ke směsi C12Mal a DPPC k výraznému snížení hodnoty CMC již nedochází. U směsi C12Mal a DPPC dochází k agregaci okolo koncentrace C12Mal 0,015 mM, hodnoty CAC pro směs C12Mal, DPPC a HYA

získány nebyly, protože data nebylo možné proložit Boltzmannovou závislostí. Z **Obr. 21** je však možné usuzovat, že dochází k jejímu snížení (vyšší hodnoty poměru Ex:Mo v oblasti nižších koncentrací než u směsi C12Mal a DPPC).

Pro další měření vlivu DPPC na agregaci C12Mal byly namíchány tři shodné koncentrační řady C12Mal s předchozím měřením, ovšem do roztoků bylo přimícháno větší množství DPPC. Nejdříve byla zjištěna rozpustnost DPPC ve vodě, a to tak, že byly namíchány čtyři roztoky DPPC ve vodě s koncentrací DPPC nad jeho CMC, a to 0,07–0,1 g dm⁻³. Roztoky jsou zobrazeny v Příloze 2 na **Obr. 31** od nejkoncentrovanějšího. Pro další měření byla vybrána koncentrace DPPC v jednotlivých vzorcích 0,07 g dm⁻³.

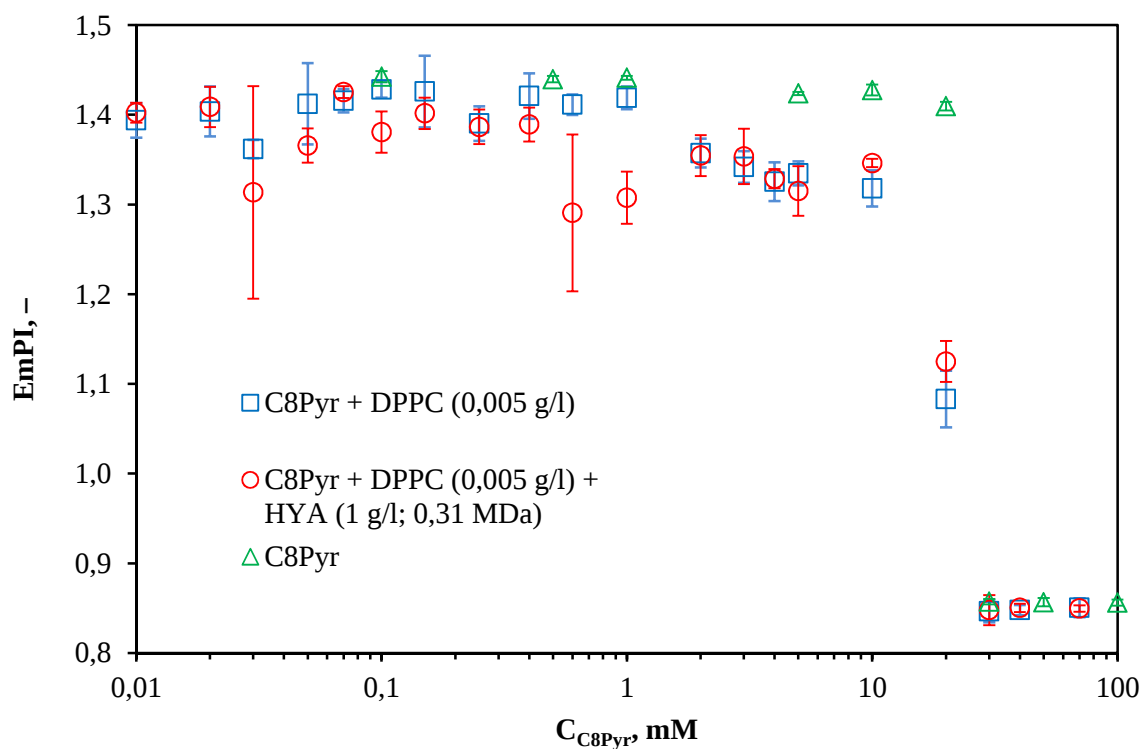
Naměřená data vykazují velké odchylky (**Obr. 32** v Příloze 3), zejména v oblasti nižších koncentrací C12Mal, zároveň nebyl zaznamenán žádný trend závislosti, což bylo způsobeno zákalem roztoků a vysrážením DPPC. V oblasti vyšších koncentrací C12Mal data vykazují velice malé odchylky, a to proto, že roztoky byly dokonale čiré. Z toho je možné usuzovat, že přítomnost C12Mal ve vyšších koncentracích (nad jeho CMC) napomáhá k rozpouštění DPPC. Vzhled vybraných roztoků je vyobrazen na **Obr. 33 a 34** v Příloze 4.

5.5 Studium vlivu DPPC a směsi DPPC a HYA na agregaci C8Pyr

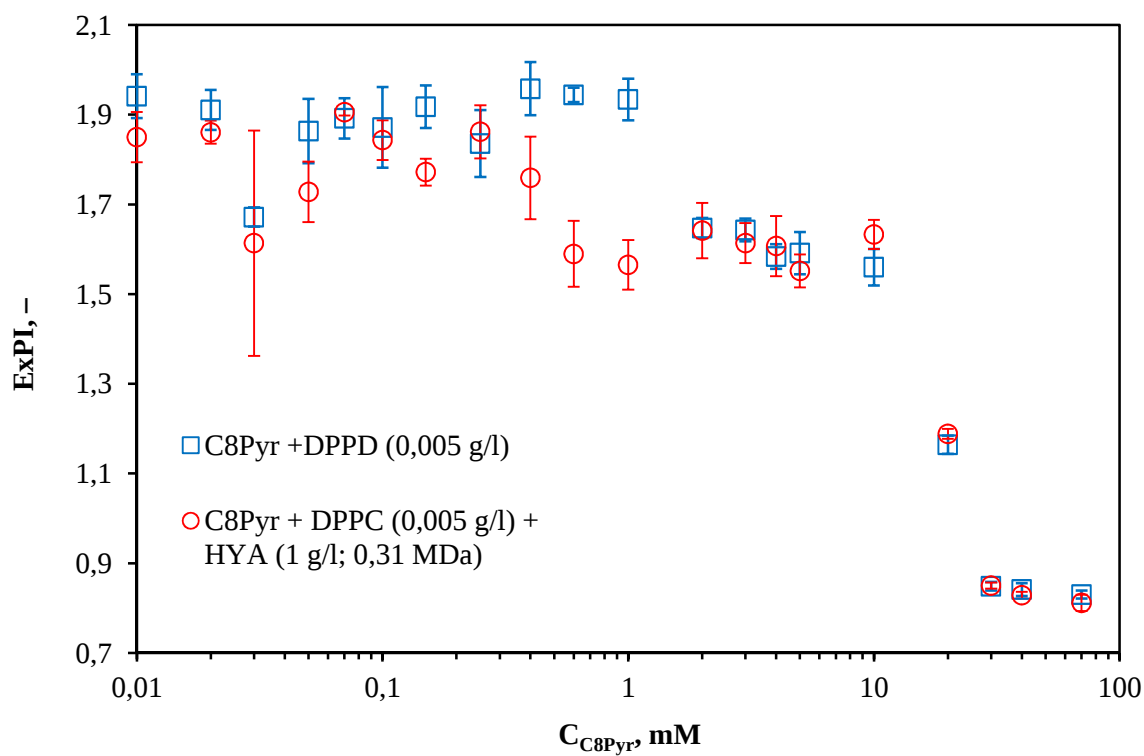
Vliv DPPC a DPPC společně s HYA na agregaci C8Pyr byl studován stejným způsobem jako v případě C12Mal popsáným výše. Koncentrace DPPC i HYA byly také stejné.

Obr. 22 srovnává závislosti EmPI čistého C8Pyr, směsi C8Pyr a DPPC a směsi C8Pyr, DPPC a HYA na koncentraci C8Pyr. Směs obsahující C8Pyr a DPPC vykazuje pokles EmPI okolo koncentrace C8Pyr 2 mM. Mírný pokles EmPI v oblasti koncentrací výrazně před CMC C8Pyr může znamenat tvorbu premicelárních agregátů před utvořením pravých micel. Na rozdíl od směsi C12Mal a DPPC, u směsi C8Pyr a DPPC nedochází k opětovnému nárůstu EmPI, tedy pravděpodobně nedochází k rozpadu vytvořených agregátů. Poté následuje prudký pokles EmPI k hodnotám charakteristickým pro volné micely C8Pyr, jehož inflexní bod odpovídá CMC směsi C8Pyr a DPPC (při koncentraci DPPC 0,005 g dm⁻³). Po přidavku DPPC k C8Pyr také došlo k malému snížení hodnoty CMC, což je více patrné až z parametrů Boltzmannových závislostí uvedených v **Tab. 05**. Pro zjištění hodnot CAC a CMC byla závislost EmPI na koncentraci C8Pyr proložena dvěma Boltzmannovými závislostmi. Toto proložení je znázorněno v Příloze 1 na **Obr. 30**. Získané hodnoty jsou uvedeny v **Tab. 05**. V **Tab. 05** jsou také uvedeny parametry Boltzmannovy závislosti při proložení pouze jednou Boltzmannovou křivkou. Při tomto proložení byla získána data celkově s nižší hodnotou spolehlivosti a vyšší hodnotou χ^2 . S přidavkem HYA ke směsi C8Pyr a DPPC došlo k poklesu hodnoty CAC směsi, zatímco k poklesu CMC celého systému nedošlo. Závislost byla proložena dvěma Boltzmannovými křivkami, jejichž parametry jsou uvedeny v **Tab. 05**.

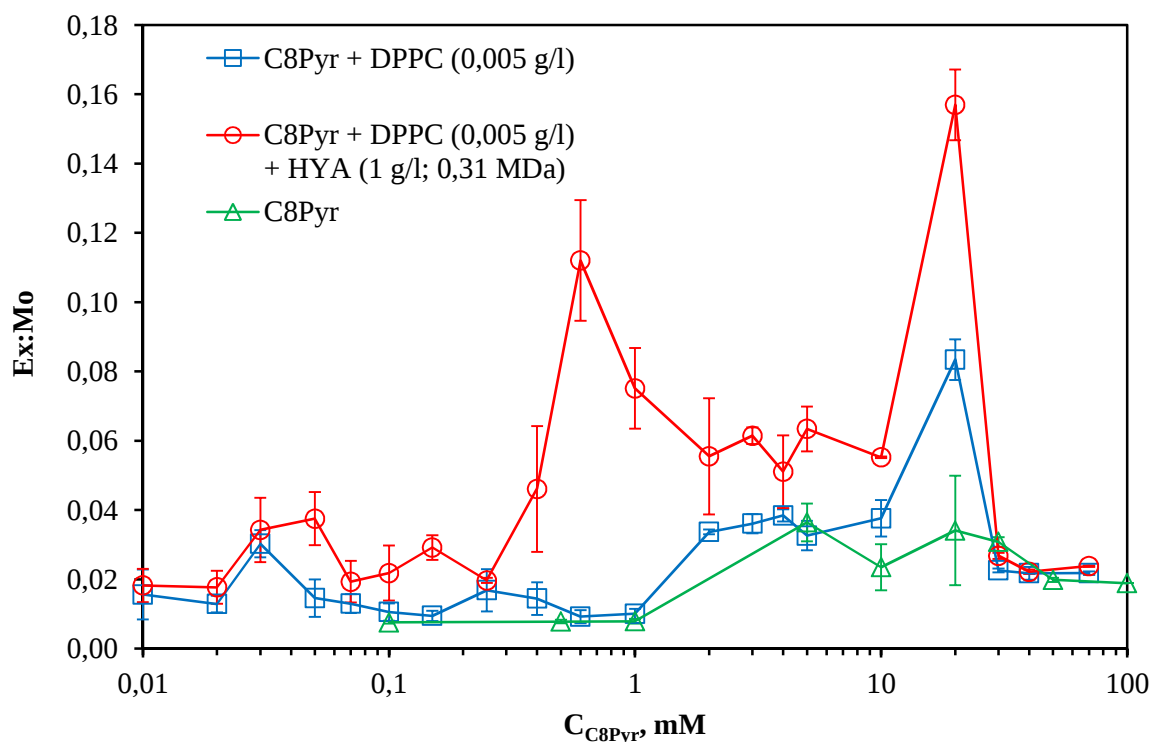
Obr. 23 zobrazuje srovnání závislostí ExPI směsi C8Pyr a DPPC a směsi C8Pyr, DPPC a HYA na koncentraci C8Pyr. Tato závislost potvrzuje vznik premicelárních agregátů okolo koncentrace C8Pyr 2 mM pro směs C8Pyr a DPPC, okolo koncentrace C8Pyr 0,4 mM pro směs C8Pyr, DPPC a HYA. Závislost ExPI na koncentraci C8Pyr pro směs C8Pyr a DPPC byla proložena dvěma Boltzmannovými křivkami, získané hodnoty CAC a CMC jsou také uvedeny v **Tab. 05**. U obou směsí je možné pozorovat první agregaci již u koncentrace C8Pyr 0,03 mM, avšak u směsi C8Pyr, DPPC a HYA vykazují data velké odchylky.



Obr. 22 $EmPI$ v závislosti na koncentrácii C8Pyr pro směs C8Pyr a DPPC, C8Pyr, DPPC a HYA a samotný C8Pyr



Obr. 23 $ExPI$ v závislosti na koncentrácii C8Pyr pro směs C8Pyr a DPPC, C8Pyr, DPPC a HYA a samotný C8Pyr



Obr. 24 Poměr Ex:Mo v závislosti na koncentraci C8Pyr pro směs C8Pyr a DPPC, C8Pyr, DPPC a HYA a samotný C8Pyr

Obr. 24 porovnává závislosti poměru Ex:Mo čistého C8Pyr, směsi C8Pyr a DPPC a směsi C8Pyr, DPPC a HYA na koncentraci C8Pyr. Z tohoto grafu není patrné snížení CMC směsí přidávkem DPPC a HYA. Je zde pozorovatelný výrazný posun vzniku premicelárních agregátů s přidávkem HYA oproti směsi HYA neobsahující k nižším koncentracím C8Pyr.

Tab. 05: Hodnoty CMC a CAC pro C8Pyr a jeho směsi

Směs	Počet Boltz. křivek	Parametr	Závislost	
			EmPI	ExPI
C8Pyr	1	CMC [mM]	23,22	–
		R ²	0,9993	–
		chi ²	5,95 10 ⁻⁵	–
C8Pyr + DPPC	2	CAC [mM]	1,797	1,603
		R ²	0,9513	0,9713
		chi ²	9,37 10 ⁻⁵	9,15 10 ⁻⁴
		CMC [mM]	19,86	19,26
		R ²	0,9989	0,9997
		chi ²	6,39 10 ⁻⁵	3,88 10 ⁻⁵
	1	CMC [mM]	17,34	18,04
		R ²	0,9792	0,9385
		chi ²	8,72 10 ⁻⁴	9,32 10 ⁻³

Směs	Počet Boltz. křivek	Parametr	Závislost	
			EmPI	ExPI
C8Pyr + DPPC + HYA	2	CAC [mM]	0,4380	0,4531
		R ²	0,9168	0,8481
		chi ²	1,87 10 ⁻⁴	2,42 10 ⁻³
		CMC [mM]	20,11	19,94
		R ²	0,9958	0,9921
		chi ²	2,36 10 ⁻⁴	1,14 10 ⁻³
	1	CMC [mM]	20,42	14,47
		R ²	0,9583	0,9043
		chi ²	1,55 10 ⁻³	1,18 10 ⁻²

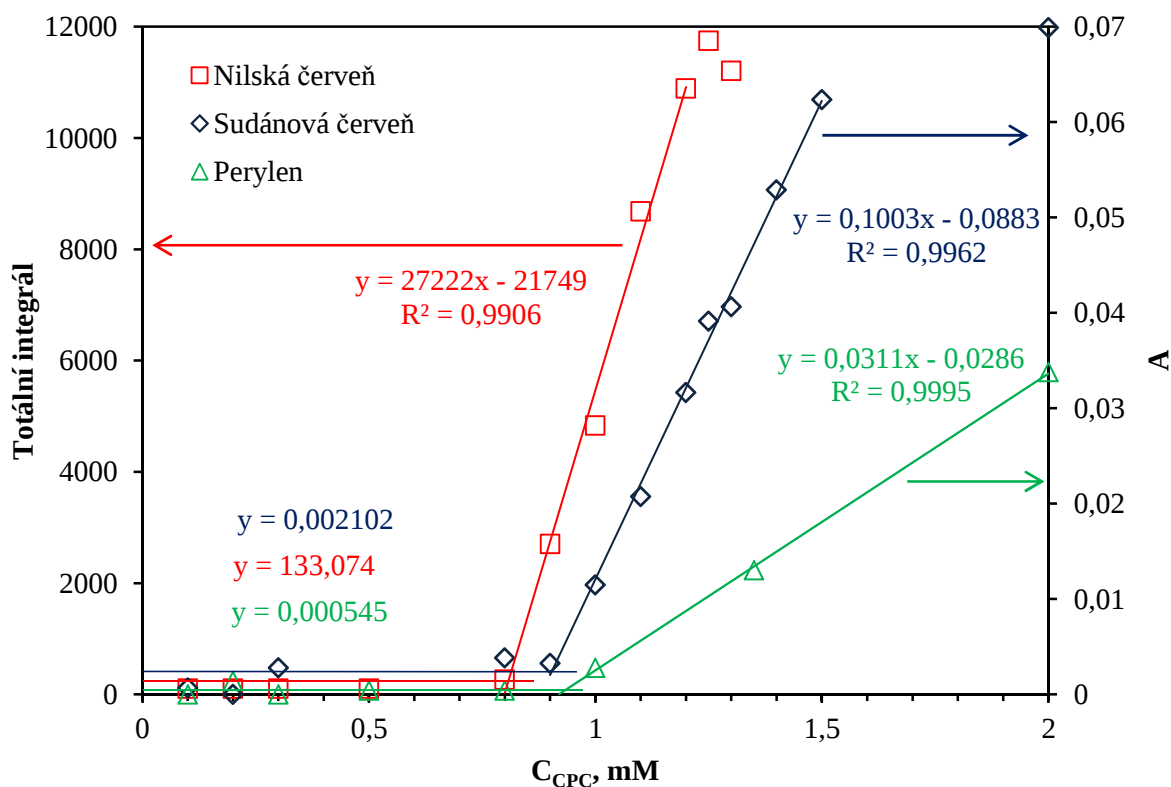
Přidáním DPPC o koncentraci 0,005 g dm⁻³ k C8Pyr dochází ke snížení hodnoty CMC a ke tvorbě premicelárních agregátů s hodnotou CAC 1,70 ± 0,14 mM. S přidavkem HYA o koncentraci 1 g dm⁻³ a molekulové hmotnosti 0,31 MDa ke směsi C8Pyr a DPPC nedochází ke snížení CMC směsi, avšak dochází ke snížení CAC směsi.

Dále byly stejně jako u C12Mal namíchány roztoky s vyšším obsahem DPPC (0,07 g dm⁻³) a rostoucí koncentrací C8Pyr. Vzorky s koncentrací C8Pyr pod jeho CMC opět nebyly čiré, proto nebyly proměřovány, jsou vyobrazeny v Příloze 5 na **Obr. 35**. Vzorky s koncentrací C8Pyr nad jeho CMC zakalené nebyly, lze tedy i zde, podobně jako u C12Mal předpokládat, že C8Pyr o vysoké koncentraci podporuje solubilizaci DPPC.

5.6 Stanovení CMC CPC

Aby bylo možné stanovit hodnoty agregačního čísla cukerných tenzidů a jejich směsí s DPPC, bylo nutné stanovit CMC použitého žhářce CPC, protože se jedná o tenzid. Koncentrace tenzidu v objemu roztoku je nižší než jeho celková koncentrace, jelikož nejprve dojde k nasycení povrchu roztoku tenzidem a tím ke snížení koncentrace tenzidu v objemu roztoku. Tento fakt není možno zanedbat v případě, kdy koncentrace zásobního roztoku je blízká CMC tenzidu a potřebujeme-li dávkovat množství tenzidu zcela přesně.

Pro stanovení CMC CPC byly namíchány celkem tři řady roztoků, v jedné byla použita jako sonda nilská červeň a byl zaznamenán totální integrál emisního skenu, jehož závislost na koncentraci CPC je zobrazena na **Obr. 25**, v další řadě byl použit perylen, avšak jeho fluorescence byla zhasena CPC, proto byla zaznamenána jen jeho absorbance, jejíž závislost na koncentraci CPC je taktéž znázorněna na **Obr. 25**. Ve třetí koncentrační řadě bylo použito hydrofobní barvivo sudánová červeň a byla proměřena absorbance vzorků podobně jako v případě perylenu (**Obr. 25**).



Obr. 25 Závislost totálního integrálu emisního spektra nilské červeně (□) a absorpance sudánové červeně (◇) a peryleny (△) na koncentraci CPC

Stoupající části křivek byly proloženy lineárními regresemi a metodou průsečíku dvou přímk byly stanoveny hodnoty CMC CPC, které jsou zaznamenány v **Tab. 06**. V **Tab. 06** jsou rovněž vypsány tabelované hodnoty CMC CPC, liší se podle použité metody, všechny naměřené hodnoty spadají do intervalu hodnot tabelovaných.

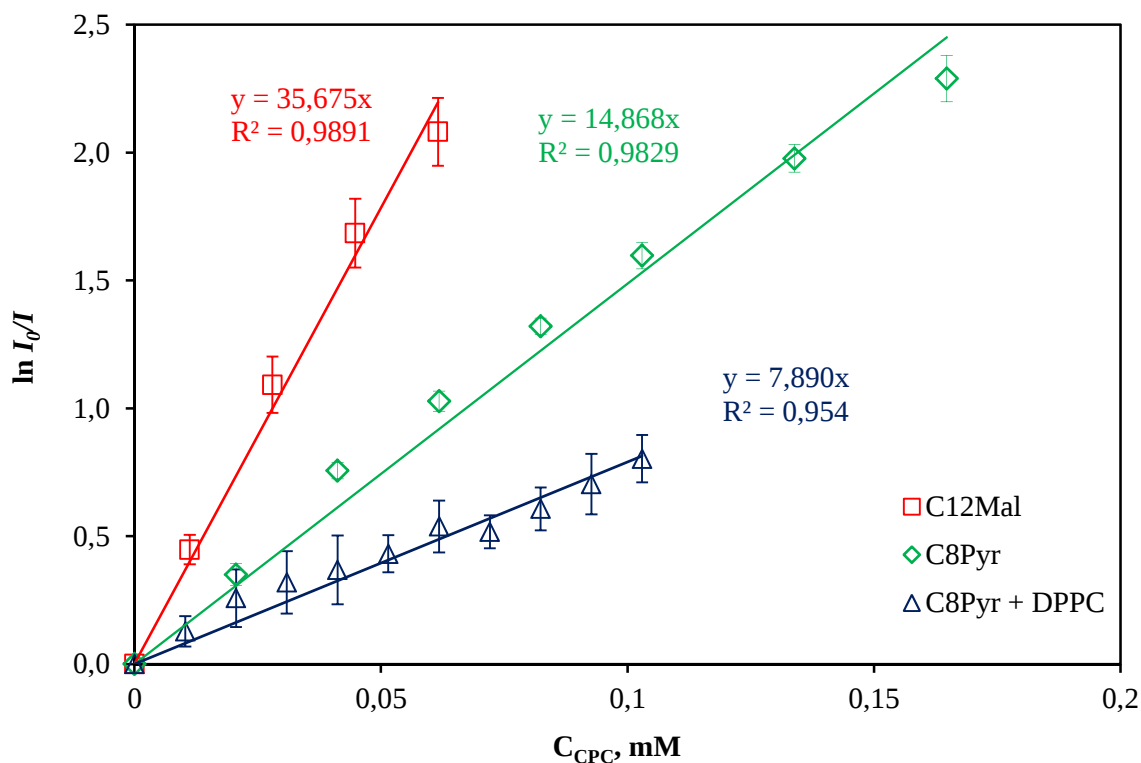
Tab. 06: Naměřené a tabelované hodnoty CMC CPC

Naměřené hodnoty		Tabelované hodnoty		
Sonda/barvivo	CMC [mM]	Metoda	CMC [mM]	Zdroj
Nilská červeně	0,8038	Povrchové napětí	0,82	[21]
Sudánová červeně	0,9013	Vodivost	0,98	[22]
Perylen	0,9371	Spektrofotometrie	0,66	[22]
Průměr	0,8807 ± 0,0690	Povrchové napětí	0,87	[23]

5.7 Stanovení agregačního čísla cukerných tenzidů a jejich směsí s DPPC

Agregační číslo C12Mal a C8Pyr bylo určeno, aby bylo možné zjistit, kolik molekul DPPC připadá na jednu micelu C12Mal nebo C8Pyr při dané koncentraci DPPC. Agregační číslo premicelárních agregátů bylo určeno pro srovnání velikosti micel a premicelárních agregátů.

Byly připraveny roztoky s konstantní koncentrací C12Mal a C8Pyr vyšší než jejich příslušná CMC a vzrůstající koncentrací zhášeče (CPC). Dále byly namíchány směsi cukerného tenzidu (C12Mal a C8Pyr) a DPPC, v nichž byla koncentrace obou složek a tedy i jejich poměr konstantní a v těchto roztocích také vzrůstala koncentrace zhášeče.



Obr. 26 Závislost $\ln I_0/I$ na koncentraci CPC při stanovení agregačního čísla C12Mal, C8Pyr a směsi C8Pyr a DPPC

Ze směrnic přímek, které vznikly proložením získaných závislostí $\ln I_0/I$ na koncentraci zhášedce (CPC), byly vypočteny hodnoty agregačních čísel C12Mal, C8Pyr a agregátů vzniklých smícháním C8Pyr a DPPC. Naměřené hodnoty jsou vypsány v **Tab. 07**. V případě směsi C12Mal s DPPC data nevykazovala žádnou závislost, pravděpodobně díky nestabilitě vzniklých agregátů, proto nebylo určeno agregační číslo agregátů C12Mal a DPPC.

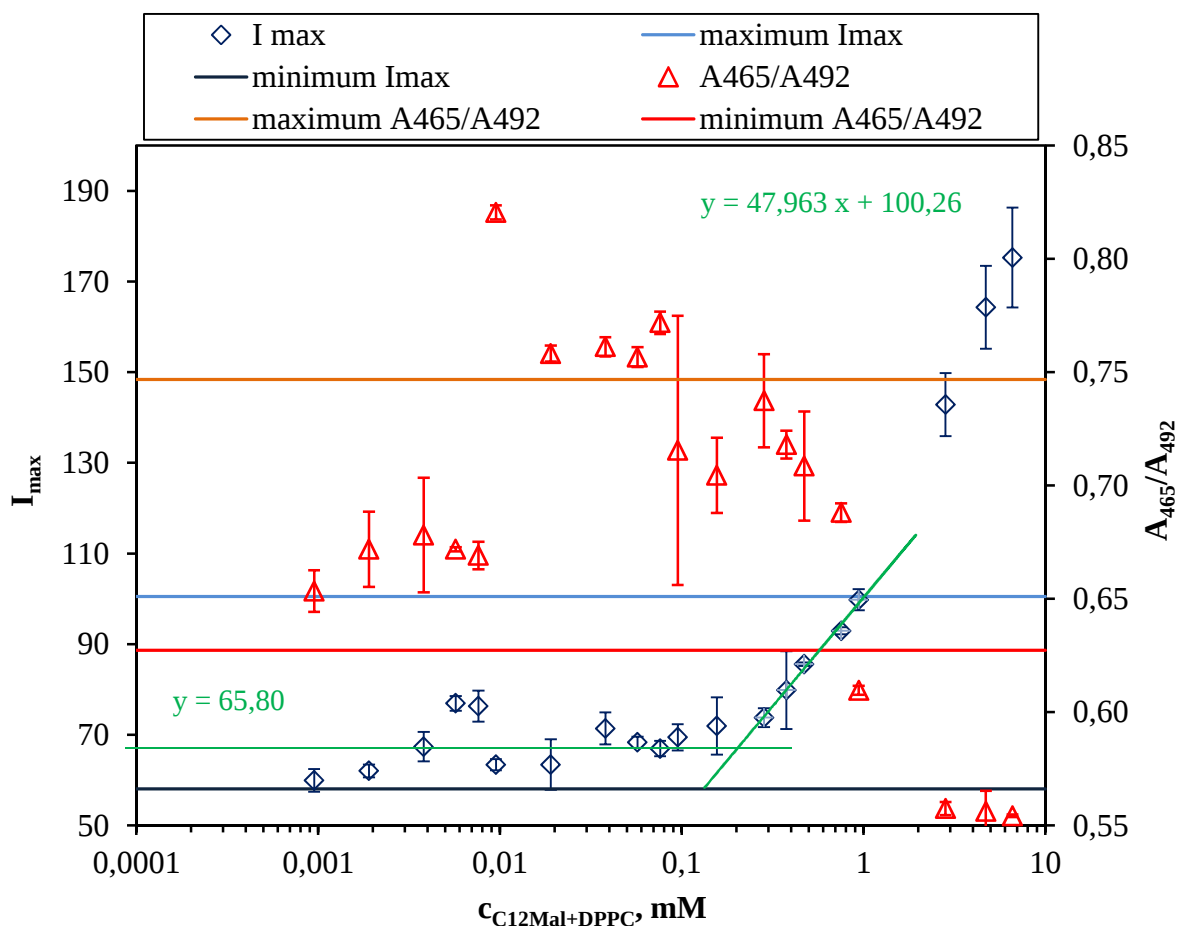
Tab. 07: Naměřené a zjištěné hodnoty agregačních čísel

		C12Mal	C8Pyr	C8Pyr + DPPC
Naměřené hodnoty	N_{agg}	64 ± 6	101 ± 4	26 ± 2
Referenční hodnoty	N_{agg}	132; 70-140	27-100	—
	Zdroj	[24]; [25]	[26]	—

Naměřené hodnoty jsou na hranicích hodnot již dříve zaznamenaných. Široký rozsah agregačních čísel souvisí s množstvím tvarů micel (agregátů), které mohou tenzidy tvořit.

5.8 Studium interakcí HYA, C12Mal a DPPC

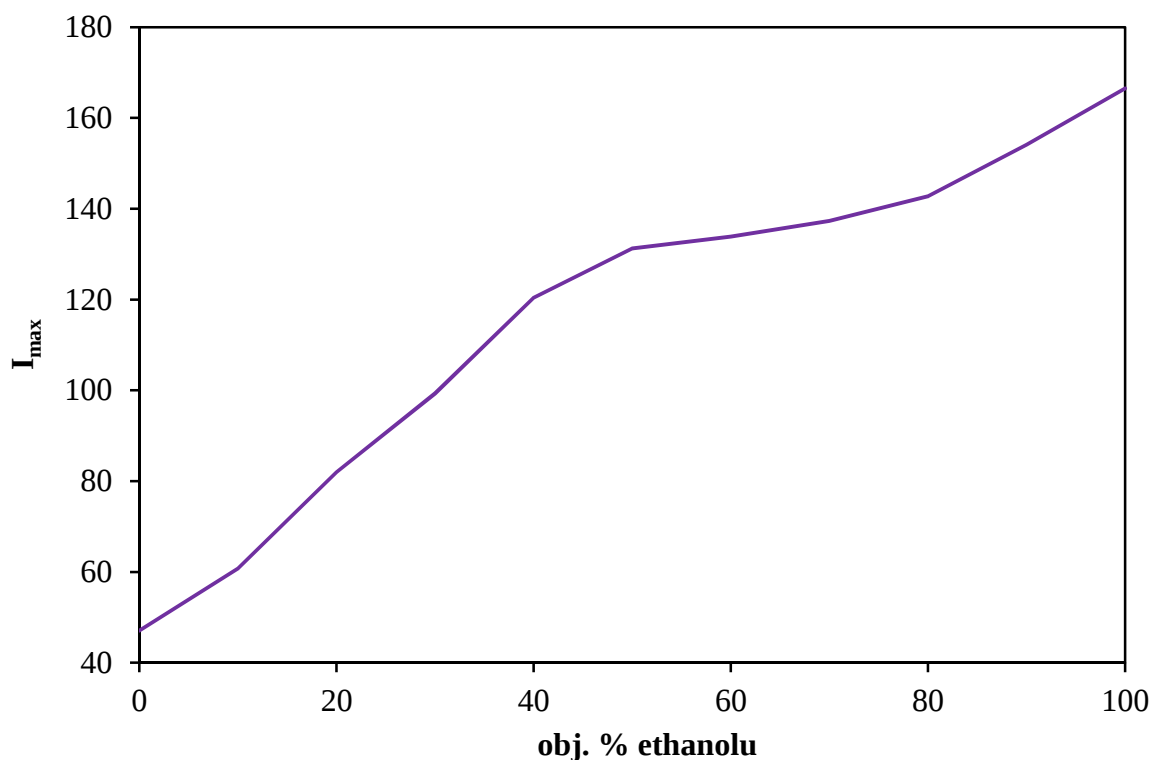
Interakce HYA, C12Mal a DPPC byly studovány za použití AO. Vzorky obsahovaly konstantní koncentraci AO a HYA s poměrem P/D rovným 3. Poměr koncentrací C12Mal a DPPC byl konstantní. Poměr koncentrací byl volen tak, aby při koncentracích nad CMC C12Mal připadala na jednu micelu alespoň jedna molekula fosfolipidu, s ohledem na jeho nízkou rozpustnost.



Obr. 27 Závislost $I_{\max}$ a poměru A_{465}/A_{492} na koncentraci C12Mal a DPPC

Na **Obr. 27** je znázorněna závislost $I_{\max}$ a poměru A_{465}/A_{492} na koncentraci C12Mal a DPPC. Maximum $I_{\max}$ a minimum A_{465}/A_{492} bylo získáno měřením intenzity fluorescence a absorbancí vzorku AO ve vodě, kdy AO je v roztoku ve formě monomeru, minimum $I_{\max}$ a maximum A_{465}/A_{492} bylo získáno měřením intenzity fluorescence a absorbancí vzorku AO ve vodě v přítomnosti HYA, kdy by měla být AO v roztoku převážně v dimerní formě. Intenzita fluorescence stoupá s koncentrací C12Mal a DPPC, v oblasti koncentrací 0,004–0,008 mM dochází k lokálnímu nárůstu a poklesu a v oblasti koncentrací nad 1 mM dochází k prudkému nárůstu nad maximum $I_{\max}$. Lokální nárůst v oblasti nižších koncentrací může znamenat tvorbu premicelárních agregátů, jenž se naváží na HYA a tím dojde k uvolnění AO ve formě monomeru a zvýšení intenzity fluorescence, a které vzápětí zanikají. Ve srovnání s měřením vlivu HYA a DPPC na agregaci C12Mal z kapitoly 5.4 dochází k tvorbě agregátů v oblasti nižších koncentrací C12Mal a navíc s nižší koncentrací DPPC v přítomnosti HYA o nižší koncentraci. Pro vysvětlení prudkého nárůstu u nejvyšších koncentrací C12Mal a DPPC byly namíchány roztoky AO ve vodě a ethanolu a byl zkoumán vliv polaroty prostředí na intenzitu fluorescence AO.

Na **Obr. 28** je znázorněna závislost $I_{\max}$ na objemových procentech ethanolu, neboli na polaritě prostředí. Se vzrůstajícím objemovým podílem ethanolu polarita prostředí klesá a intenzita fluorescence AO stoupá. To může vysvětlovat prudký vzrůst intenzity fluorescence AO na **Obr. 27**, kde zřejmě došlo k fluorescenci AO z hydrofobních jader utvořených micel.



Obr. 28 Závislost $I_{\max}$ na objemových procentech ethanolu

Dále byla závislost $I_{\max}$ na koncentraci DPPC a C12Mal proložena dvěma přímkami a byla zjištěna „x“-ová souřadnice, jež by mohla odpovídat CMC směsi. V **Tab. 08** je uvedena hodnota koncentrace C12Mal při CMC směsi. Tato hodnota je jen o trochu nižší než hodnota CMC čistého C12Mal, což odpovídá malému přídavku DPPC.

Tab. 08: CMC směsi C12Mal a DPPC a čistého C12Mal

Parametr	C12Mal + DPPC	Čistý C12Mal
CMC [mM]	0,1892	0,2022

V závislosti poměru A_{465}/A_{492} , neboli relativní koncentraci dimeru, na koncentraci C12Mal a DPPC na **Obr. 27** je několik zlomů. Nejprve byl zaznamenán prudký nárůst při koncentraci stejné, jako byl zaznamenán nárůst $I_{\max}$. Dále závislost klesá v několika zlomech, avšak zlomy nijak nesouvisejí se zlomy v závislosti $I_{\max}$.

6 ZÁVĚR

Byla provedena rešerše na téma interakce hyaluronan-fosfolipid a na téma tvorba směsných micel v systému neionogenní tenzid-fosfolipid a na jejich základech byly vybrány dva vhodné biokompatibilní neionogenní tenzidy – dodecyl- β -maltosid a oktyl- β -D-glukopyranosid a fosfolipid – DPPC.

Interakce byly zkoumány pomocí fluorescenční spektroskopie. Byly využity fluorescenční sondy pyren, perylen, nilská červen a akridinová oranž a hydrofobní barvivo sudánová červen.

Byly určeny kritické micelární koncentrace zmíněných tenzidů, u DPPC byla určena koncentrace počátku agregace a kritická micelární koncentrace. Dále byl studován systém neionogenní tenzid-fosfolipid a systém neionogenní tenzid-fosfolipid-hyaluronan za konstantní koncentrace fosfolipidu a byly vyhodnoceny kritické agregační koncentrace a kritické micelární koncentrace. Dále byla určena kritická micelární koncentrace cetylpyrimidium chloridu a ten byl následně použit jako zhášec při stanovení agregačního čísla použitých neionogenních tenzidů a jejich agregátů s DPPC.

Na základě stanovení CPA a CMC DPPC byly vybrány dvě koncentrace DPPC, při nichž byl studován vliv DPPC na agregaci C12Mal a C8Pyr – 0,005 g dm⁻³ a 0,07 g dm⁻³. Bylo zjištěno, že přidavkem DPPC o koncentraci 0,005 g dm⁻³ k neionogennímu tenzidu se snižuje CMC tohoto tenzidu a zároveň jsou závislosti EmPI a ExPI na koncentraci tenzidu dvou zlomové. Závislosti byly proloženy nejprve jednou, pak dvěma Boltzmannovými křivkami. Proložení dvěma křivkami vykazovalo vyšší spolehlivost a nižší hodnoty chí kvadrát. První zlomy byly vyhodnoceny jako kritické agregační koncentrace. Při těchto koncentracích dochází pravděpodobně k tvorbě premicelárních agregátů, jež jsou tvořeny molekulami C12Mal (resp. C8Pyr) a DPPC. Byl zde zaznamenán rozdíl v agregaci C12Mal a C8Pyr, zatímco závislosti v případě C8Pyr byly čistě dvou zlomové, u C12Mal dochází po prvním zlomu k opětovnému nárůstu hodnoty EmPI (ExPI). Důvodem může být nízká stabilita agregátů tvořených molekulami C12Mal a DPPC. Přidavkem DPPC o koncentraci 0,07 g dm⁻³ k C12Mal i C8Pyr došlo k vysrážení vzorků s nízkou koncentrací tenzidu, zatímco vzorky s vysokou koncentrací tenzidu (nad jeho CMC) byly čiré. Data nevykazovaly žádnou závislost, proto nebyla dále vyhodnocována. Lze tedy předpokládat, že koncentrace C12Mal (resp. C8Pyr) nad jejich CMC podporuje solubilizaci DPPC.

Přidavkem HYA do systému C12Mal-DPPC nedošlo k výrazným změnám v agregaci. Závislost byla proložena pouze jednou Boltzmannovou křivkou, protože první zlom neměl charakteristický sigmoidní průběh. Porovnáním parametrů při proložení jednou křivkou v tomto systému a v systému C12Mal-DPPC můžeme říct, že došlo k mírnému snížení hodnoty CMC. Pravděpodobně mohlo dojít s přidavkem HYA k rozrušení málo stabilních premicelárních agregátů a proto nebyl zaznamenán charakteristický sigmoidní průběh při poklesu hodnot EmPI (resp. ExPI).

V systému C8Pyr-DPPC došlo přidavkem HYA ke snížení CAC směsi a ke změně hodnoty CMC nedošlo. Přídavek HYA má na systém zřejmě opačný efekt než v případě systému C12Mal-DPPC, tedy podporuje agregaci v systému již při nižších koncentracích C8Pyr.

Bylo stanoveno agregační číslo C12Mal, C8Pyr a jejich směsi C8Pyr-DPPC při koncentraci DPPC $0,005 \text{ g dm}^{-3}$. V případě směsi C12Mal-DPPC agregační číslo stanoveno nebylo, protože data nevykazovala žádnou závislost, pravděpodobně díky nízké stabilitě agregátů, jež byla narušena přítomností zhášedce. Agregační číslo C8Pyr se snížilo po přidání DPPC přibližně na čtvrtinu, utvořené premicelární agregáty budou pravděpodobně výrazně mešší než micely utvořené pouze molekulami C8Pyr.

Pomocí fluorescenční sondy AO byly studovány interakce v systému C12Mal-DPPC-HYA s konstantním poměrem koncentrací C12Mal/HYA a konstantní koncentrací HYA. Byla stanovena CMC systému, tato hodnota se lišila jen minimálně od hodnoty CMC čistého C12Mal. Dále bylo zjištěno, že při vysoké koncentraci DPPC a C12Mal dochází k prudkému zvýšení intenzity fluorescence, AO pravděpodobně fluoreskuje z nepolárního prostředí, tedy z hydrofobních domén utvořených micel.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle práce byly splněny. Práce poskytla informace o vlivu hyaluronanu na systém směsných micel tvořených neionogenním tenzidem a fosfolipidem. Z použitých neionogenních tenzidů se jeví jako vhodnější v systému směsných micel oktyl- β -D-glukopyranosid. Další výzkum by proto mohl být zaměřen na studium kvality hydrofobních domén směsných micel tvořených *sn*-glycero-dipalmitoylphosphatidylcholinem a oktyl- β -D-glukopyranosidem pro použití ve farmacii jako cíleného nosičového systému, popřípadě v kosmetice.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Hargittai, I., Hargittai, M.: Molecular structure of hyaluronan: an introduction, *Journal of Structural Chemistry*, 2008, vol. 19, pp. 697-717
- [2] Hascall, V. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online], last revision 15th of December 1997 [citováno 10. 2. 2011], dostupné z: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>
- [3] Scott, J. E.: *Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences*. [online], last revision 15th of March 1998, [citováno 10. 2. 2011] dostupné z: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>>
- [4] Eidelman, O., Blumenthal, R. Walter, A.: Composition of Octyl Glucoside-Phosphatidylcholine Mixed Micelles, *Biochemistry*, 1988, vol. 27, pp. 2839-2846
- [5] Tanford, Ch., Wiley, J.: *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2nd edition, 1980, IBSN 0471048933
- [6] Rupp, Ch., Steckel, H., Müller, B. W.: Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures, *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, vol. 387, pp. 120-128, ISSN 0378-5173
- [7] Valeur, B.: *Molecular fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. 381 s. ISBN 3-527-29919-X
- [8] Castro, G. R., Larson, B. K., Panilaitis, B., Kaplan, D. L.: Emulsan quantitation by Nile red quenching fluorescence assay, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, vol. 67, pp. 767-770
- [9] Daban, J.-R., Bartolomé, S., Bermúdez, A., Alba, F. J.: Rapid and Sensitive Staining of Unfixed Proteins in Polyacrylamide Gels with Nile Red, *The Protein Protocols Handbook*, 2nd edition, 2002, pp. 243-249, ISSN 0006-2979
- [10] Sutter, M., Oliveira, S., Sanders, N. N., Lucas, B., Hoek, A. van, Hink, M. A., Visser, A. J. W. G., Smedt, S. C. De, Hennink, W. E., Jiskoot, W.: Sensitive Spectroscopic Detection of Large and Denatured Protein Aggregates in Solution by Use of the Fluorescent Dye Nile Red, *Journal of Fluorescence*, 2007, vol. 17, pp. 181-192
- [11] Tummino, P. J., Ganfi, A.: Determination of the aggregation number of detergent micelles using steady-state fluorescence quenching, *Biophysical Journal*, 1993, vol. 64, pp. 1580-1587, ISSN 0006-3495
- [12] Maza, A. de la, Lopez, O., Baucells, J., Gonzalez, P., Parra, J. L.: Solubilization of Phosphatidylcholine Unilamellar Liposomes Caused by Alkyl Glucosides, *Journal of Surfactants and Detergents*, 1998, vol. 1, no. 3, pp. 381-386
- [13] Maza, A. de la, Parra, J. L.: Solubilizing Effects Caused by the Nonionic Surfactant Dodecylmaltoside in Phosphatidylcholine Liposomes, *Biophysical Journal*, 1997, vol. 72, pp. 1668-1675, ISSN 0006-3495
- [14] Rei, M. C., Coutinho, P. J. G., Castanheira, E. M. S., Oliveira, M. E. C. D. R.: C₁₂E₇-DPPC mixed systems studied by pyrene fluorescence emission, *Progress in Colloid and Polymer Science*, 2004, vol. 123, pp. 83-87

- [15] Carion-Taravella, B., Chopineau, J., Ollivon, M., Lesieur, S.: Phase Behavior of Mixed Aqueous Dispersion of DPPC and Dodecyl Glycosides: Aggregation States implicated in the Micelle-to-Vesicle Transition, *Langmuir*, 1998, vol. 14, pp. 3767-3777
- [16] Pasquali-Ronchetti, I., Quaglino, D., Mori, G., Baccheli, B., Ghosh, P.: Hyaluronan-Phospholipid interaction, *Journal of Structural Biology*, 1997, vol. 120, pp. 1-10, ISSN 1047-8477
- [17] Crescenzi, V., Taglienti, A., Pasquali-Ronchetti, I.: Supramolecular structures prevailing in aqueous hyaluronic acid and phospholipid vesicles mixtures: an electron microscopy and rheometric study, *Colloids and Surfaces A*, 2004, vol. 245, pp. 133-135, ISSN 0927-7757
- [18] Hong, W.-X., Baker, K. A., Ma, X., Stevens, R. C., Yeager, M., Zhang, Q.: Design, Synthesis, and Properties of Branch-Chained Maltoside Detergents for Stabilization and Crystallization of Integral Membrane Proteins: Human Connexin 26, *Langmuir*, 2010, vol. 26, no. 11, pp. 8690-8696
- [19] Tsamaloukas, A. D., Beck, A., Heerklotz, H.: Modeling the Micellization Behavior of Mixed and Pure n-Alkyl-Maltosides, *Langmuir*, 2009, vol. 25, no. 8, pp. 4393-4401
- [20] Paula, S., Süss, W., Tuchtenhagen, J., Blume, A.: Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: A high sensitivity titration calorimetry, *The Journal of Physical Chemistry*, 1995, vol. 99, pp. 11742-1751, ISSN 0022-3654
- [21] Favoriti, P., Treiner, C.: Binding of Aromatic Anions to Cetylpyridinium Aggregates Either Adsorbed at Silica/Water, Alumina/Water, Titanium Dioxide/Water Interfaces or in Solution, *Langmuir*, 1988, vol. 14, pp. 7493-7502
- [22] Moulik, S. P., Haque, M. E., Jana, P. K., Das, A. R.: Micellar Properties of Cationic Surfactants in Pure and Mixed States, *The Journal of Physical Chemistry*, 1996, vol. 100, pp. 701-708, ISSN 0022-3654
- [23] Chakraborty, T., Ghosh, S., Moulik, S. P.: Micellization and Related Behavior of Binary and Ternary Surfactant Mixtures in Aqueous Medium: Cetyl Pyridinium Chloride (CPC), Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB), and Polyoxyethylene (10) Cetyl Ether (Brij-56) Derived System, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, vol. 109, pp. 14813-14823, ISSN 1520-5207
- [24] Dupuy, C., Auvray, X., Petipas, C., Rico-Lattes, I., Lattes, A.: Anomeric Effects on the Structure of Micelles of Alkyl Maltosides in Water, *Langmuir*, vol. 13, pp. 3965-3967, ISSN 0743-7463
- [25] Thermo Fisher Scientific Inc.: *n-Dodecyl-beta-D-Matoside*, [citováno 10. 2. 2011] dostupné z: <<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=9AB987DA-C4D4-4713-8312-08A86E51EC6D>>
- [26] Lorber, B., Bishop, J. B., DeLucas, L. J., Purification of octyl [beta]-d-glucopyranoside and re-estimation of its micellar size, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1990, vol. 1023, no. 2, pp. 254-265, ISSN 0005-2736

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

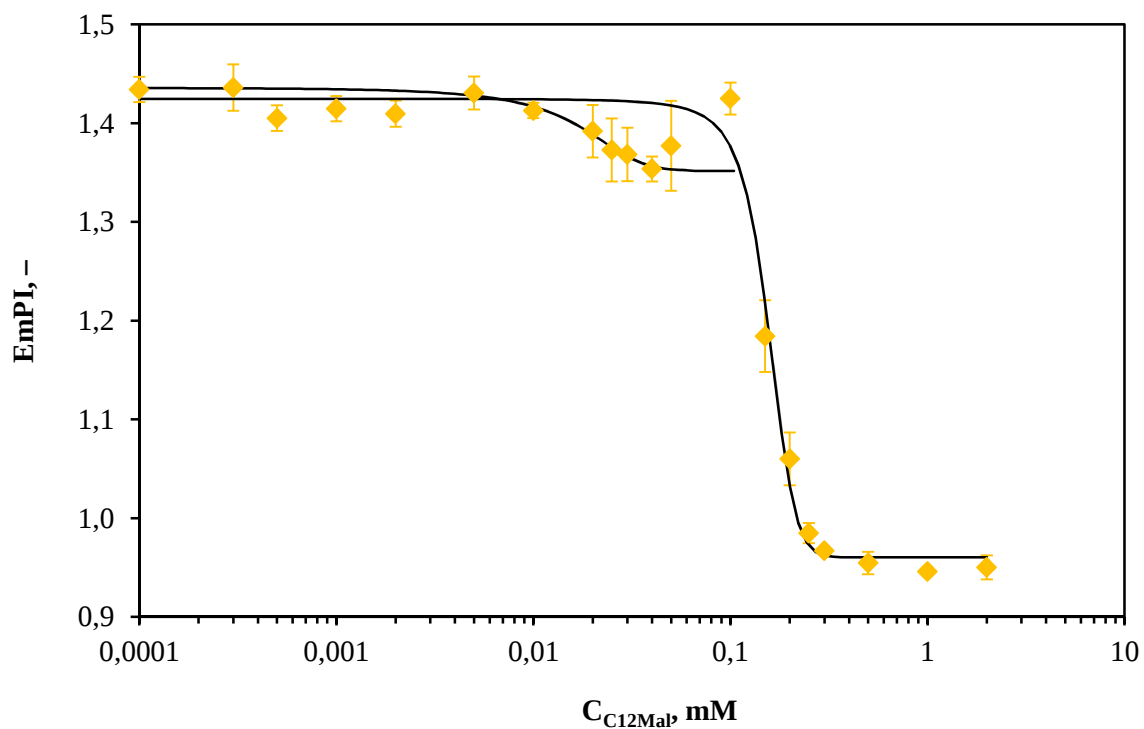
PAL	povrchově aktivní látka
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CPC	cetylpyrimidium chlorid
SDS	dodecyl-sulfát sodný
DPPC	<i>sn</i> -glycero-dipalmitoylphosphatidylcholin
C12Mal	dodecyl- β -maltosid
C8Pyr	oktyl- β -D-glukopyranosid
CMC	kritická micelární koncentrace
S ₀	základní stav molekuly
S _x	excitovaný singletový stav molekuly
T _x	excitovaný tripletový stav molekuly
EmPI	emisní polaritní index
Ex:Mo	excitační pás excimeru : excitační pás monomeru
ExPI	excitační polaritní index
AO	akridinová oranž (hydrochorid hydrát)
HYA	hyaluronan
P	koncentrace vazných míst pro sondu
D	koncentrace fluorescenční sondy
N _{agg}	agregační číslo
M	mol dm ⁻³
mM	mmol dm ⁻³
CPA	koncentrace počátku agregace
CAC	kritická agregační koncentrace

9 SEZNAM PŘÍLOH

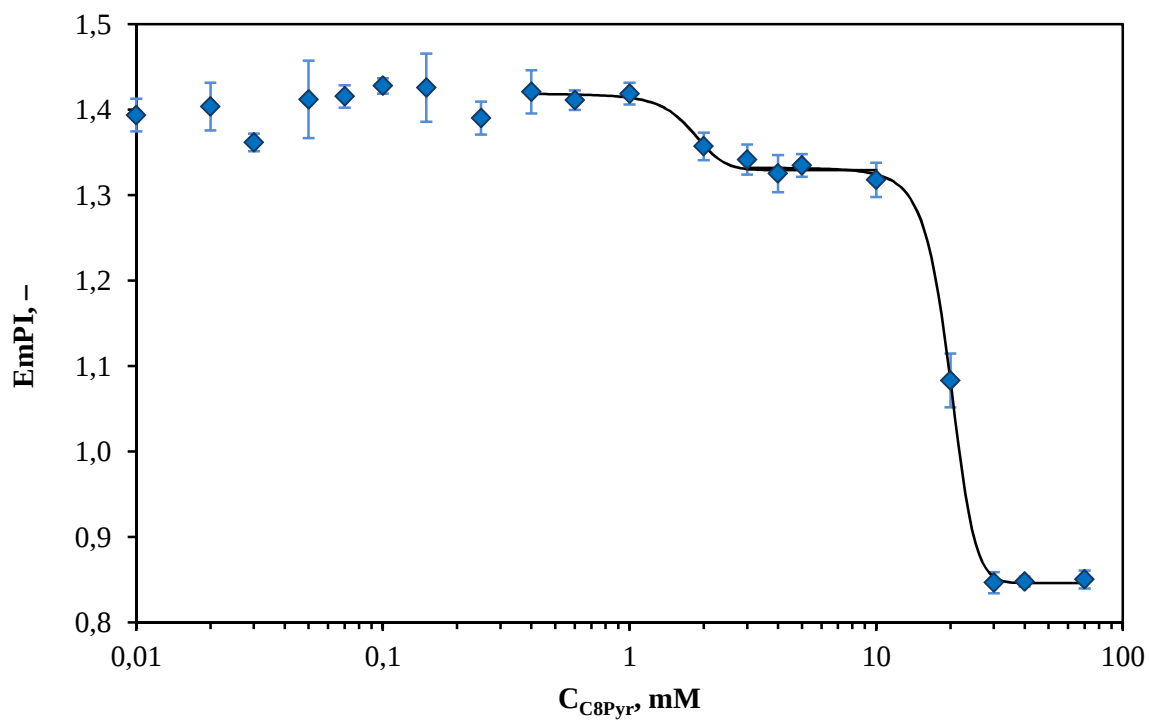
- Příloha 1: Příklady proložení závislostí EmPI na koncentraci C12Mal (C8Pyr) dvěma Boltzmannovými křivkami
- Příloha 2: Fotografie roztoků DPPC s koncentrací DPPC 0,1–0,07 g dm⁻³
- Příloha 3: Graf závislosti EmPI a poměru Ex:Mo na koncentraci C12Mal pro směs C12Mal a DPPC o koncentraci 0,07 g dm⁻³
- Příloha 4: Fotografie vzorků s rostoucí koncentrací C12Mal a koncentrací DPPC 0,07 g dm⁻³ a vzorků s nejnižší, nejvyšší koncentrací C12Mal a stejné koncentraci DPPC 0,07 g dm⁻³
- Příloha 5: Fotografie vzorků s koncentrací DPPC 0,07 g dm⁻³ a koncentrací C8Pyr nejnižší a nejvyšší, střední a nejvyšší

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha 1



Obr. 29 Závislost $EmPI$ na koncentraci C_{12Mal} , příklad proložení dvěma Boltzmannovými křivkami u C_{12Mal}



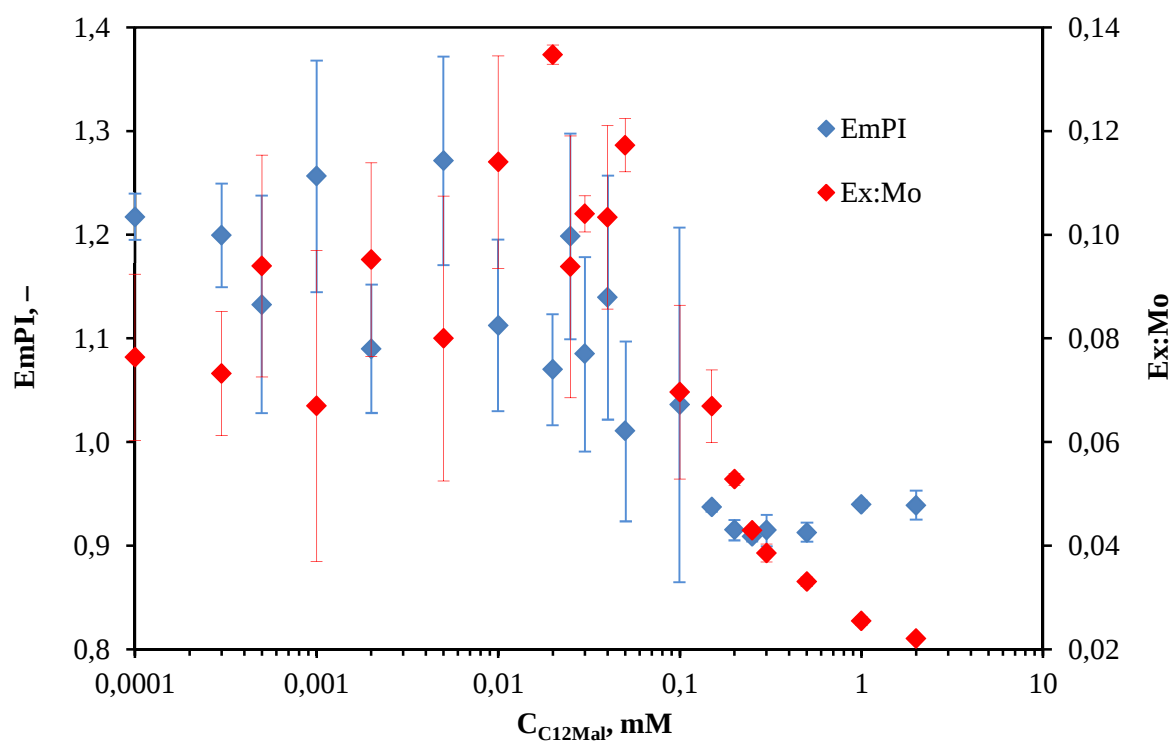
Obr. 30 Závislost $EmPI$ na koncentraci C_{8Pyr} , příklad proložení dvěma Boltzmannovými křivkami u C_{8Pyr}

10.2 Příloha 2



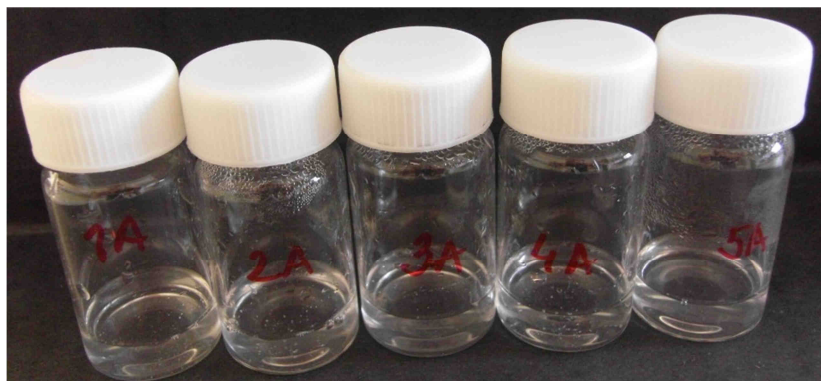
Obr. 31 Roztoky DPPC ve vodě s klesající koncentrací DPPC $0,1-0,07 \text{ g dm}^{-3}$

10.3 Příloha 3

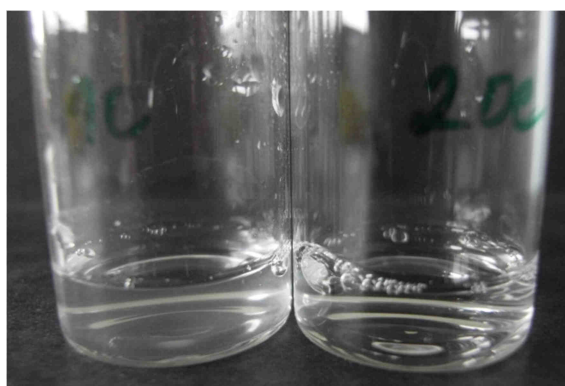


Obr. 32 Závislost $EmPI$ a poměru $Ex:Mo$ na koncentraci $C12Mal$ pro směs $C12Mal$ a DPPC o koncentraci $0,07 \text{ g dm}^{-3}$

10.4 Příloha 4

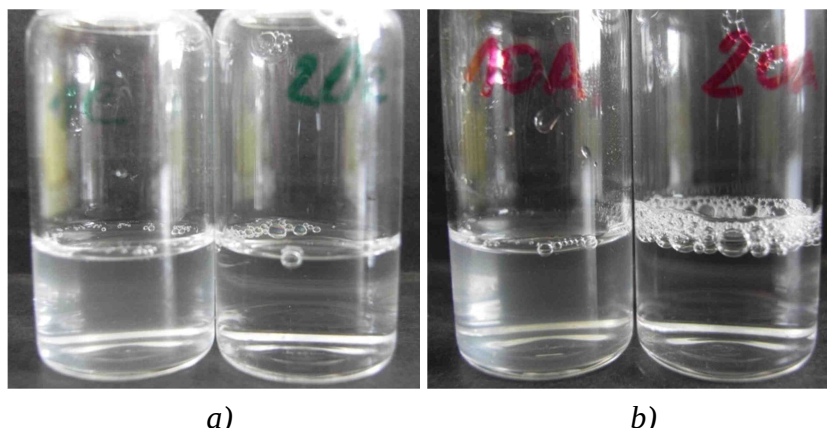


Obr. 33 Vzorky s rostoucí koncentrací C12Mal a s obsahem DPPC o koncentraci $0,07 \text{ g dm}^{-3}$



Obr. 34 Vzorek s nejnižší (1C – $0,0001 \text{ mM}$) a nejvyšší (20C – 2 mM) koncentrací C12Mal a stejné koncentraci DPPC $0,07 \text{ g dm}^{-3}$

10.5 Příloha 5



Obr. 35 Vzorky s koncentrací DPPC $0,07 \text{ g dm}^{-3}$ a koncentrací C8Pyr a) nejnižší (1C – $0,01 \text{ mM}$) a nejvyšší (20C – 70 mM), b) střední (10A – $0,6 \text{ mM}$) a nejvyšší (20A)