

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



Vliv pH na tvorbu agregátů asolectinu

Bakalářská práce

Autor:	Kristýna Novotná
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Chemie pro víceoborové studium - Biologie
Vedoucí bakalářské práce:	Mgr. Jitka Součková, Ph.D.

Olomouc 2015

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Kristýna Novotná
Název práce:	Vliv pH na tvorbu agregátů asolectinu
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Jitka Součková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	V bakalářské práci byly předloženy výsledky studia vlivu pH na tvorbu agregátů asolectinu. Byla určována hodnota kritické koncentrace tvorby různých asolectinových agregátů (micel a liposomů) v roztocích o pH v rozmezí 4,26 až 8,83. Pro studium byla použita elektrochemická metoda, cyklická voltametrie. Měření byla provedena za využití visící rtuťové kapkové elektrody a cyklické voltamogramy byly zaznamenány pomocí programu Polar 4.
Klíčová slova:	Agregace, Asolectin, Cyklická voltametrie, Fosfolipidy, pH, Povrchově aktivní látky
Počet stran:	30
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Kristýna Novotná
Title:	Effect of pH on asolectin aggregate formation
Department:	Department of Analytical Chemistry
Type of thesis:	Bachelor
Supervisor:	Mgr. Jitka Součková, Ph.D.
The year of presentation:	2015
Abstract:	The results of study of effect of pH on asolectine aggregate formation were presented in this thesis. The values of critical micelle concentration of different asolectin aggregate formation (micelles and liposomes) were determined in the solution with pH within the range of 4,26 - 8,83. Electrochemical method, cyclic voltammetry, was used to study of asolectin aggregation. The measurements were realized on hiking mercury drop electrode. Programm Polar 4 was used to voltammogram record.
Keywords:	Aggregation, Asolectin, Cyclic Voltammetry, pH, Phospholipids, Surface active agents
Number of pages:	30
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně a veškeré literární prameny a informační zdroje jsou uvedeny v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry anorganické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci

.....

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Jitce Součkové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, připomínky a trpělivost.

Poděkování patří i mým nejbližším za podporu v době studia.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část	8
2.1 Povrchově aktivní látky	8
2.2 Agregáty povrchově aktivních látek.....	10
2.2.1 Kritická micelární koncentrace a micely.....	10
2.2.2 Liposomy	12
2.3 Metody pro studium agregace povrchově aktivních látek.....	14
2.3.1 Elektrochemické metody.....	14
2.4 Asolectin.....	16
3. Experimentální část.....	17
3.1 Použité chemikálie	17
3.2 Příprava roztoků	17
3.3 Přístroje	18
3.4 Pracovní postup	18
4. Výsledky a diskuze	19
5. Závěr	25
6. Summary	26
7. Seznam zkratk	27
8. Literatura	28

1. Úvod

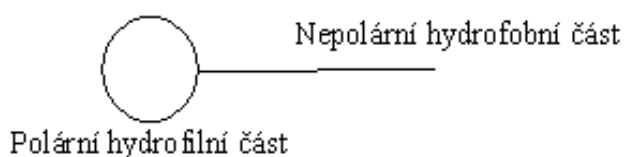
S povrchově aktivními látkami se setkáváme téměř na každém kroku. Používají se pro výrobu produktů užívaných pro osobní hygienu a pro péči o domácnost. Povrchově aktivní látky (PAL), vyznačující se dipolaritou, jsou sloučeniny hromadící se na fázovém rozhraní. Po překročení určité hodnoty koncentrace PAL v roztoku začínají tyto látky vytvářet shluky o různé struktuře. Při nízkých koncentracích PAL v roztoku dochází k tvorbě jednoduchých micel, při vyšších koncentracích se tvoří složitější liposomy. Vzhledem ke svým vlastnostem jsou tyto struktury využívány v chemických i biologických odvětvích jako například v kapalinové chromatografii, jsou vhodnými modely biomembrán a využívají se též jako přenašeče léků. /1/

Asolectin je fosfolipidová směs ze sojových bobů, která je hojně využívána pro tvorbu liposomů a studium vlastností biologických membrán. I přes velké využití nebyl asolectin doposud intenzivně studován z hlediska tvorby agregátů (určování kritické micelární koncentrace, vliv různých podmínek na agregaci apod.). V předložené práci byla studována agregace asolectinu. Výzkum byl zaměřen na závislost tvorby agregátů na pH, kdy byla ke studiu agregace použita metoda cyklické voltametrie.

2. Teoretická část

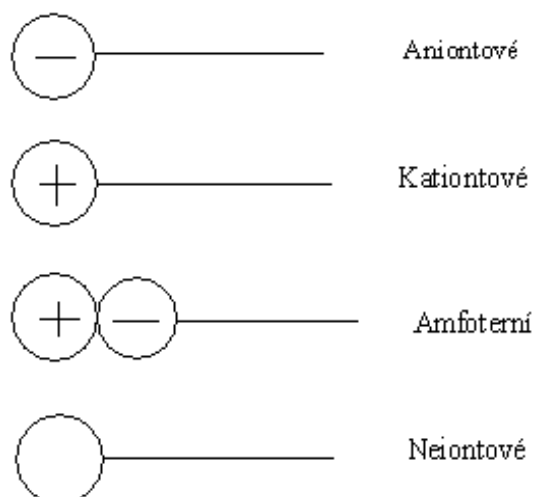
2.1 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (PAL, surfaktanty, tenzidy) jsou organické sloučeniny, které se hromadí v mezifázi polárního a nepochárního rozpouštědla. Svou interakcí s molekulami disperzního prostředí mění reakční podmínky na fázovém rozhraní, které označuje plochy oddělující dvě fáze jako kapalina/kapalina, kapalina/pevná látka či kapalina/plyn. Surfaktanty ovlivňují energetické poměry rozhraní, čímž se snižuje povrchové a mezifázové napětí. Jejich specifické vlastnosti souvisí s fyzikální a chemickou strukturou jejich molekul, které jsou asymetricky dipolární. Tedy obsahují hydrofobní a hydrofilní část (obr. 1). Hydrofilní skupina označuje polární část, která disponuje velkou afinitou k vodě a zvyšuje rozpustnost PAL. Naopak nepolární hydrofobní část odpuzuje vodu a v její přítomnosti vytváří struktury, z nichž jsou molekuly vody vytlačeny. Oproti hydrofilní části rozpustnost snižuje. /2,3,4/



Obr. 1. Schématické znázornění molekuly povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky můžeme klasifikovat z mnoha hledisek. V literatuře se nejčastěji uvádí dělení podle ionicity na dvě základní skupiny, iontové a neiontové (obr. 2). Mezi iontové řadíme aniontové, při adsorpci PAL získává povrch záporný náboj (mýdla, sulfonany, sulfáty, karboxylové kyseliny a jejich soli), dále kationtové naopak s kladným nábojem na povrchu díky adsorpci kationtů (kvartérní amoniové a pyridinové soli) a v neposlední řadě amfoterní PAL, kdy jsou přítomny oba náboje a jeden převládá na základě pH prostředí (alkylbetainy, sulfobetainy, alkylaminokarboxylové kyseliny). Neiontové tenzidy jsou bez výrazného náboje, tedy ve vodě nedisociují. Příkladem mohou být polyhydroxysloučeniny, oxyethylenáty, aminoxidy, alkylpolyglykosidy. /2,3,5/



Obr. 2. Druhy surfaktantů podle ionicity

Po překročení určité koncentrace (tzv. kritické micelární koncentrace) se v roztoku začínají tvořit shluky tzv. micely. Hnací motorem pro tvorbu micel je snížení kontaktu mezi vodou a uhlovodíkovým řetězcem, díky čemuž se snižuje volná energie systému. Pro tvorbu micel však musí PAL splňovat určité podmínky. Důležitá je dostatečně výrazná polární skupina a velký uhlovodíkový řetězec. Při tvorbě agregátů dochází ke zvýšení celkové rozpustnosti, která je za normálních okolností celkem nízká. /2,6/

Povrchově aktivní látky nacházejí uplatnění v téměř každém chemickém průmyslu při výrobě pracích prášků, vláken, plastů, kosmetiky, léčiv, barviv i agrochemikálií. Ovšem jejich využití se týká i biologických systémů, kdy se agregáty PAL, nejčastěji liposomy, používají díky svým vlastnostem jako modely biomembrán. /6,7/

2.2 Agregáty povrchově aktivních látek

2.2.1 Kritická micelární koncentrace a micely

Charakterizujícím prvkem povrchově aktivních látek je kritická micelární koncentrace (CMC), po jejímž překročení se v roztoku začínají tvořit shluky různých struktur a velikostí. CMC vykazuje závislost na hydrofobních částech PAL, tedy čím delší alkylový řetězec surfaktant obsahuje, tím dříve látka dosáhne hodnoty CMC. Snížení kritické micelární koncentrace můžeme docílit i přidáním soli do roztoku, což podporuje agregaci monomerů, resp. molekul PAL. Tato vlastnost má mnohem větší vliv u iontových tenzidů oproti neiontovým, ale i přesto byla potvrzena platnost empirického vztahu

$$\log c_K = konst - k_S c_S \quad (1)$$

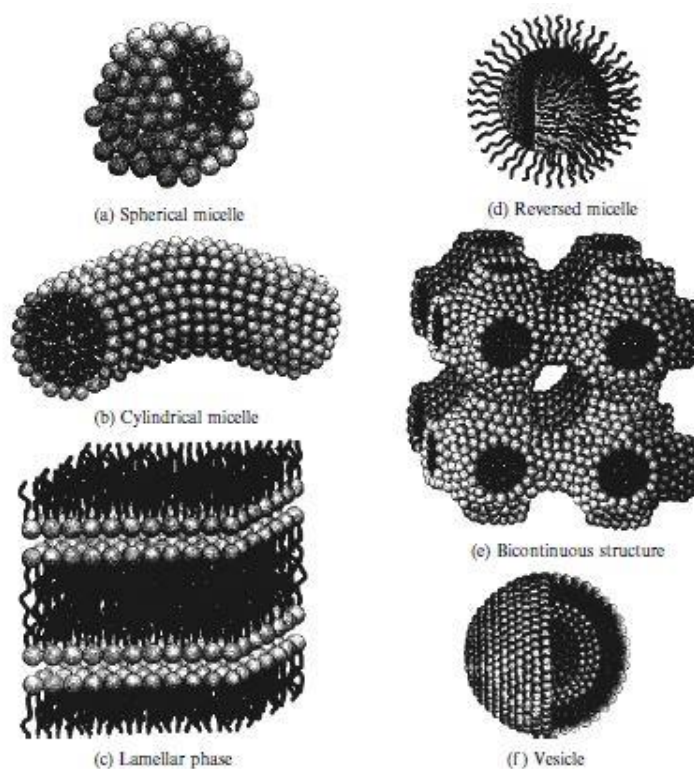
v němž c_K vyjadřuje kritickou micelární koncentraci [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], k_S konstantu solného vlivu a c_S koncentraci ovlivňující soli [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]. /7,8/

Pro výzkum povrchově aktivních látek je důležité znát jejich CMC. K jejímu stanovení se využívá nespočet elektrochemických metod, pro představu konduktometrie /9,10,11/, kapilární elektroforéza /9/, cyklická voltametrie /8,9,12,13,14/. Ovšem využívají se i metody neelektrochemické např. statický světelný rozptyl /9/, spektrofotometrie /10/, solubilizační metody /10/. Mukerjee a Mysels sestavili ve své práci roku 1971 přehled CMC pro různé povrchově aktivní látky zjištěných mnoha metodami. /15/ Pro ukázkou je v tab. 1. uvedeno několik hodnot CMC základních surfaktantů. /6/

Tab. 1. Hodnoty CMC některých povrchově aktivních látek /6/

Surface active agent	C.m.c. (mol dm^{-3})
(A) Anionic	
Sodium octyl-l-sulphate	1.30×10^{-1}
Sodium decyl-l-sulphate	3.32×10^{-2}
Sodium dodecyl-l-sulphate	8.39×10^{-3}
Sodium tetradecyl-l-sulphate	2.05×10^{-3}
(B) Cationic	
Octyl trimethyl ammonium bromide	1.30×10^{-1}
Decetyl trimethyl ammonium bromide	6.46×10^{-2}
Dodecyl trimethyl ammonium bromide	1.56×10^{-2}
Hexacetyltrimethyl ammonium bromide	9.20×10^{-4}
(C) Nonionic	
Octyl hexaoxyethylene glycol monoether C_8E_6	9.80×10^{-3}
Decyl hexaoxyethylene glycol monoether C_{10}E_6	9.00×10^{-4}
Decyl nonaoxyethylene glycol monoether C_{10}E_9	1.30×10^{-3}
Dodecyl hexaoxyethylene glycol monoether C_{12}E_6	8.70×10^{-5}
Octylphenyl hexaoxyethylene glycol monoether C_8E_6	2.05×10^{-4}

Jak již bylo řečeno, PAL tvoří, po překročení určité koncentrace, ve vodných roztocích agregáty. Nejjednoduššími agregáty jsou micely. Jejich molekulové uspořádání zamezuje nežádoucímu kontaktu mezi nepolárními hydrofobními konci PAL a polární vodou. Prvně se o micelách zmínil J. W. McBain v roce 1911, kdy zkoumal mýdlové roztoky měřením vodivosti a osmotického tlaku. Se svým kolegou H. S. Hartleym předpokládali pouze kulovitý tvar těchto agregátů. Pojmenovali dvě základní micelární struktury. Hartleyovy micely, sférické agregáty, v jejichž struktuře hydrofilní části směřují do polárního rozpouštědla a hydrofobní uhlíkové řetězce jsou propleteny uvnitř agregátu. Laminární (McBainovy) micely, tvořící se při vyšších koncentracích PAL v roztoku, vytváří dvouvrstevnou strukturu, kdy polární části opět směřují ven a jednotlivé uhlovodíkové řetězce jsou obráceny k sobě. Avšak dnes známe mnoho micelárních typů (obr. 3). Jejich struktura závisí kromě molekulární struktury (velikosti hydrofilní části, počtu dvojných vazeb, délce uhlovodíkového řetězce) také na koncentraci a teplotě. /3,16,17/

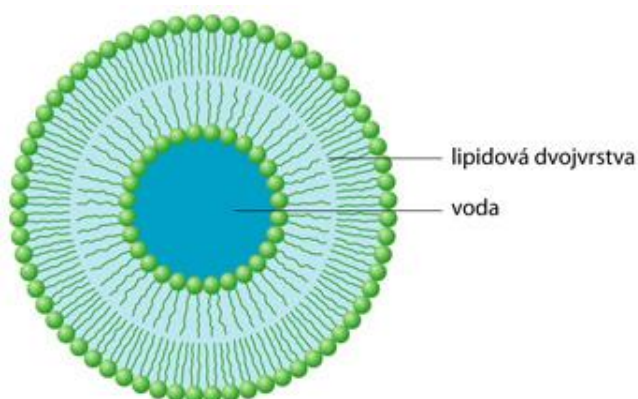


Obr. 3. Struktury agregátů PAL: (a) sférická micela, (b) cylindrická micela, (c) lamelární micela, (d) reverzní micela, (e) bikontinuální struktura, (f) váček /18/

Micely se mohou tvořit i v nevodných roztocích koloidních PAL, například v roztocích PAL v uhlovodících. Rozdíl je v orientaci polárních a nepolárních částí, kdy struktura vypadá opačně než u micel v koloidních roztocích. Hydrofilní části jsou orientovány dovnitř a hydrofobní konce směřují do uhlovodíkového rozpouštědla. /2/

2.2.2 Liposomy

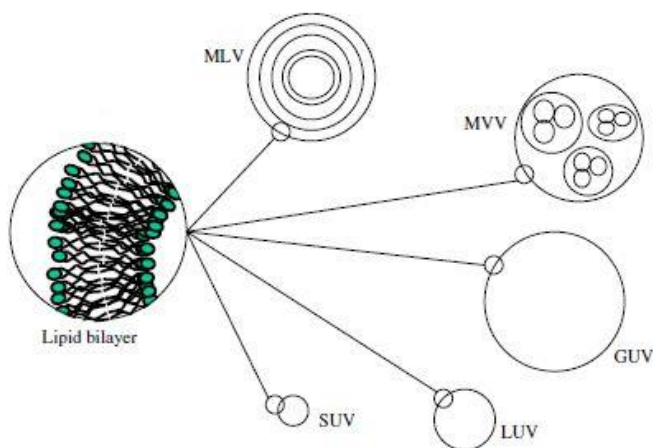
Při vyšších koncentracích (po překročení určité hodnoty koncentrace) už se molekuly PAL neshlukují v jednoduché micely, ale začínají vytvářet uzavřené váčky, sférické vesikuly, naplněné rozpouštědlem, ve kterém se tvoří. Jsou ohraničené jednou dvojnou vrstvou. /17/ V případě, že jsou vesikuly tvořené lipidy, nazýváme tyto struktury jako liposomy (obr. 4) a hodnotu koncentrace tvorby liposomů jako kritickou liposomální koncentraci (CLC).



Obr. 4. Struktura liposomu /19/

Liposomy se dají dělit podle různých kritérií. Nejčastěji se využívá dělení podle počtu lamel a velikosti (obr. 5). Malé unilamelární vesikuly (SUV) tvořené jednou lipidovou dvojvrstvou mají vysoké membránové napětí. Jejich velikost průměru se pohybuje pod 50 nm. Jsou také relativně nestabilní pro vysoký stupeň deformace membrán. Velké unilamelární vesikuly (LUV) dosahují průměru >50 nm. Vykazují větší stabilitu a nízké membránové napětí. Mají v sobě velký podíl rozpouštědla. Gigantické unilamelární vesikuly (GUV) dosahující průměru v rozmezí 1000 až 3000 nm. Velké oligolamelární vesikuly (LOV), které vytvářejí několikavrstvené membrány, vznikají spíše jako vedlejší produkt při tvorbě LUV. Velké multilamelární vesikuly (MLV), mnohvrstvené vesikuly

s průměrem 100-1000 nm obsahující mnoho lipidových dvojvrstev. Multivesikulární vesikuly (MVV), v jednom větším váčku je uloženo více menších vesikul. Také většinou vznikají jako vedlejší produkt při tvorbě jiných druhů. /20,21,22/ Kromě tohoto dělení můžeme najít v literatuře i dělení podle složení, náboje či funkce.



Obr. 5. Typy liposomů podle počtu lamel a velikosti. /23/

Liposomy jsou poměrně stabilní, což určuje rovnováha mezi van der Waalsovou a odpuzující elektrostickou silou. Právě díky stabilitě jsou využívány jako transportéry léků a enzymů do tkání. Pro účely přenašečů jsou užívány liposomy tvořené fosfolipidy. Kromě této vlastnosti se vyznačují propustností a tekutostí (fluidita), neboli schopností pohybu fosfolipidů v membráně. Tekutost zvyšuje obsah nenasycených mastných kyselin a naopak s přítomností cholesterolu se fluidita snižuje. Díky těmto vlastnostem se liposomy používají jako vhodné modely biomembrán. Další charakteristikou je nejednotný náboj liposomů. Podle obsažených lipidů mohou tyto agregáty nést kladný, neutrální či záporný. /7/ Kromě biologického využití se liposomy často využívají i v analytické chemii, například kapalinové chromatografii, kapilární elektroforéze či imunologických testech. /23/

2.3 Metody pro studium agregace povrchově aktivních látek

Ke studiu agregace PAL se využívá mnoha metod. Nejběžnější jsou optické metody, například fluorescenční spektroskopie /24,25/, spektrofotometrie /10,26/ či statický světelný rozptyl /9/, a metody elektrochemické, které jsou podrobněji popsány v dané kapitole. Dalšími metodami studia agregace mohou být měření povrchového napětí, ultrafiltrace, refraktometrie. /15/

2.3.1 Elektrochemické metody

Konduktometrie

Konduktometrie je metoda měření vodivosti založená na pohyblivosti iontů, tedy na schopnosti roztoku elektrolytu vést elektrický proud. Samotné měření probíhá v konduktometrické nádobce se dvěma platinovými elektrodami. Používá se ovšem pouze pro iontové surfaktanty. /27/ Ve vědeckých článcích můžeme nalézt zmínky o stanovení CMC u teicoplaninu /9/, dodecylsulfátu sodného (SDS) /10,11/, Spolaponu AOS 146 /10/, hexadecyltrimethylammonium bromidu (HTAB), tetradecyltrimethylammonium bromidu (TTAB) a cholátu sodného (SC) /11/. Kromě stanovování CMC se využila při studiu procesu formování liposomů /13,28/ či studiu interakcí různých barviv s aniontovými i kationtovými PAL /26,29/.

Tenzametrie

Tenzametrické měření spadá pod polarografické techniky. Přezdívá se jí polarografie se střídavými proudy, jejímž základem je kapková rtuťová elektroda. /3/ A.Szymanski a Z.Lukaszewski stanovovali nepřímou tenzometrií neiontové surfaktanty a adsorpční rozpouštěcí tenzometrií nízké koncentrace tenzidů. /7,30,31,32/ Stanovením povrchově aktivních látek v životním prostředí se zabývali v roce 2011 v Polsku. /33/

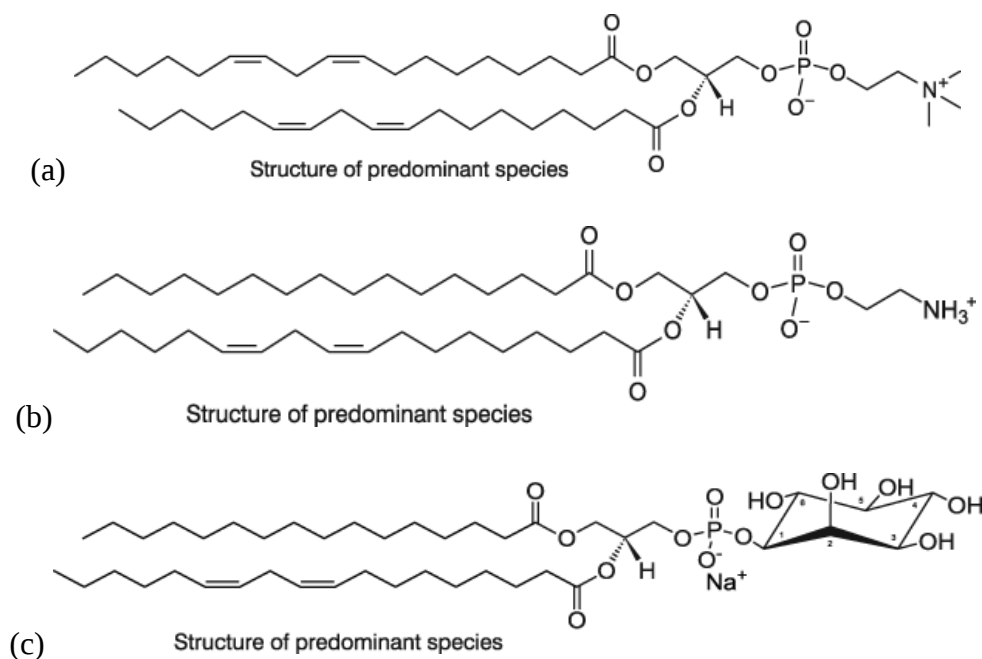
Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie patří mezi nestacionární elektrolytické metody, které se dále dělí na metody galvanostatické, u nichž se kontroluje proud, a metody potenciostatické, kde

sledujeme potenciál a kam patří voltametrické metody. U voltametrie tedy kontrolujeme potenciál a měříme proud. Tvar křivek u nestacionárních voltametrických metod je dán časovou závislostí koncentračního gradientu. Důležitou informací je, že za nestacionárních podmínek je proud výrazně závislý na čase. Při cyklické voltametii vkládáme potenciál trojúhelníkového průběhu na stacionární elektrodu v nemíchaném roztoku s rychlostí polarizace dE/dt . Vzniklé polarizační křivky mají tvar píku. /34/ Cyklická voltametrie je další elektroanalytickou metodou, která může být využita pro studium agregace povrchově aktivních látek. Byla použita při sledování chování směsi CTAB a SDS za přítomnosti ethylenglycolu /35/ a ke zjišťování kritické micelární koncentrace u teicoplaninu /9/, cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB) a cetylpyridinium chloridu (CPC) /12/, Marlophenu NP-10 /8/, 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (DSPC) /13/ nebo za použití borem dopované diamantové (BDD) anody u BRIJ 35, 1-(hexadecyl)trimethylammonium bromidu (CTAB) a dodecylbenzensulfonátu sodného (SDBS) /14/. Cyklická voltametrie našla využití i pro posouzení velikosti a morfologie agregátů, při zkoumání účinků iontových kapalin na povrchovou aktivitu SDS. /36/ Pomocí cyklické voltametrie můžeme studovat i propustnost fosfolipidové vrstvy a její vliv na voltametrickou odpověď uhlíkové elektrody /28/. Zajímavostí může být výzkum použití zapouzdřených liposomů imobilizovaných na elektrodách pro zjištění přítomnosti toxinů tvořících póry. /37/

2.4 Asolectin

Asolectin, povrchově aktivní látka získaná ze sojových bobů, je častou látkou používanou pro výzkum vlastností membrán. Z chemického hlediska ji můžeme popsat jako směs fosfolipidů s přibližným složením 25% fosfatidylcholinu, 25% fosfatidylethanolaminu a 25% fosfatidylinositolu (obr. 6). /38/



Obr. 6. Vzorce hlavních složek asolectinu: (a) fosfatidylcholin, (b) fosfatidylethanolamin, (c) fosfatidylinositol /39/

Využití asolectinu je široké. Kromě studia podmínek tvorby a stability fosfolipidových agregátů (liposomů) byly například asolectinové liposomy podrobeny působení kyseliny α -oleostearové, kdy vědci zkoumali vliv na dynamické vlastnosti liposomů. /40/ V roce 2014 byl asolectin přidán vědci z Georgia Southern University k polymeru tungového oleje (olej lisovaný ze semen tungových ořechů) vyztuženého α -celulosou a zkoumali změny vlastností polymeru. Asolectin se také často využívá při syntéze funkčních membránových proteinů a při tvorbě lipidových dvojvrstev užívaných následně ke studiu transportních procesů Cd^+ a Pb^+ . /38/

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Pro praktické studium agregátů asolectinu byly použity následující chemikálie: asolectin ze sojových bobů s obsahem fosfatidylcholinu minimálně 25% (Fluka, Buchs, Švýcarsko), monohydrát chloristanu sodného (puriss p.a. $\geq 99\%$, Fluka Chemika, Švýcarsko), hydroxid sodný (p.a., Lachner s.r.o. Neratovice), kyselina fosforečná (puriss p.a. $\geq 85\%$, Fluka Analytical, Německo), kyselina boritá (p.a., Lachema n.p. Brno, závod Neratovice), kyselina octová (99,7+%, A.C.S. Reagent, Sigma Aldrich), redestilovaná voda připravená v křemenné aparatuře z destilované vody s přidavkem manganistanu draselného a kyseliny sírové.

3.2 Příprava roztoků

Ze studované látky asolectinu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 8 g/l. Navážka asolectinu byla v odměrné baňce rozpouštěna v redestilované vodě za stálého třepání na třepačce při rychlosti třepání 400 rpm a po dobu alespoň 12 hodin. Poté byl roztok doplněn redestilovanou vodou po rysku odměrné baňky.

Pufry o požadovaném pH a o konstantní iontové síle 0,15 byly připraveny smícháním 20 ml základního roztoku Britton-Robinsonova (B-R) pufru (0,04 M kyselina fosforečná, 0,04 M kyselina boritá, 0,04 M kyselina octová) s vypočítanými objemy 0,2 M roztoku hydroxidu sodného a 1 M roztoku chloristanu sodného v tab. 2.

Tab. 2. Přídavky 1M-NaClO₄ a 0,2M-NaOH

pH	V[ml] 1M-NaClO ₄	V[ml] 0,2M-NaOH
4,1	2,75	5
6,09	2,48	8,5
7	1,98	10,5
7,96	1,66	12
9,15	1,5	14

3.3 Přístroje

Výsledná pH pufrů byla kontrolována pomocí pH metru inoLab 720 se skleněnou elektrodou SenTix 21 (WTW, Weilheim, Německo). Pro přípravu vodného roztoku asolectinu byla použita třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Německo).

Pro experimentální měření byl použit polarograf ECO-TRIBO (Polaro-Sensors, Praha) ovládaný počítačem v programu Polar 4. Měření byla provedena v tříelektrodovém zapojení s pracovní visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE), referentní argentchloridovou elektrodou (Ag/AgCl/1M KCl) a pomocnou platinovou elektrodou. Pro titraci asolectinu do studovaného roztoku, resp. pufru byla využita automatická byreta ABU 80 Radiometer (Radiometer AIS, Kodaň, Dánsko).

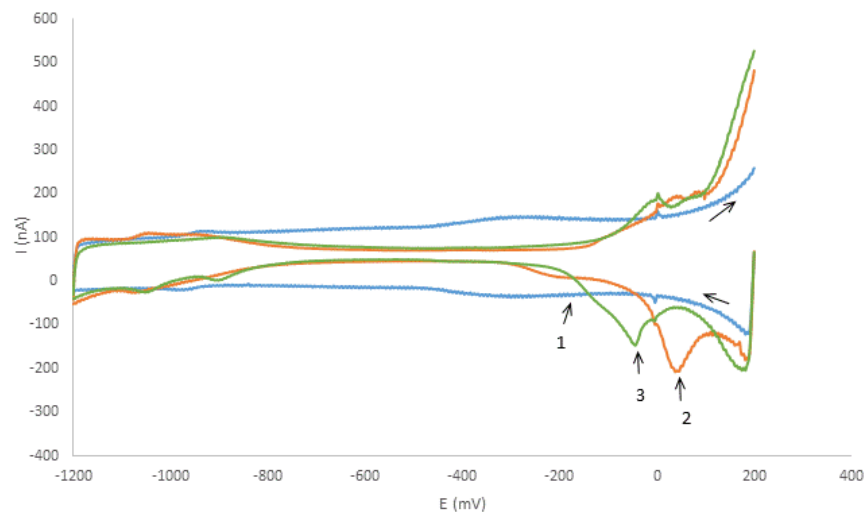
3.4 Pracovní postup

Do polarografické nádoby byl připraven roztok B-R pufru o požadovaném pH o koncentraci 10 mM a objemu 10 ml. Polarografická cela byla připojena k termostatu pro udržení konstantní teploty $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Byly zapojeny elektrody, byreta promyta redestilovanou vodou a následně několikrát zásobním roztokem asolectinu (8 g/l). Základní elektrolyt byl promíchán a probublán dusíkem (10min). Byly nastaveny parametry měření: rozsah potenciálu -1200 až 200 mV, rychlost scanu 500 mV/s a počet cyklů 3. Po zaznamenání cyklického voltamogramu základního elektrolytu byl do studovaného roztoku postupně titrován zásobní roztok asolectinu. Po každém přidavku byl sledovaný roztok důkladně promíchán a probublán dusíkem (1min, po přidavcích o objemu větším než 400 μl 3min) a následně byl zaznamenán cyklický voltamogram.

4. Výsledky a diskuze

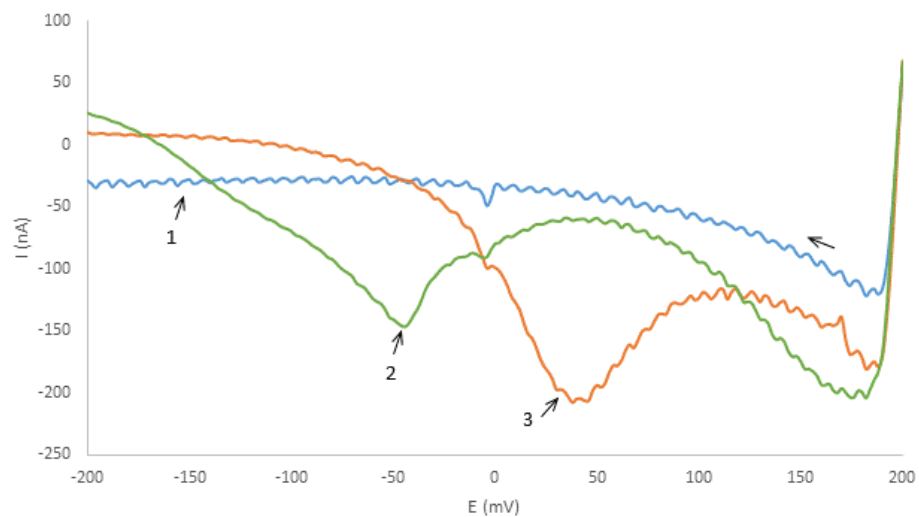
Tvorba asolectinových struktur byla studována pomocí cyklické voltametrie za využití visící kapkové rtuťové elektrody. Na základě vyhodnocení voltametrických dat byly určeny kritické koncentrace pro tvorbu asolectinových agregátů a byl sledován vliv pH na proces agregace daných agregátů. Voltametrická měření byla realizována v rozmezí hodnot pH od 4,26 do 8,83. Hodnocení bylo provedeno vždy ze 3 měření pro každou hodnotu pH.

Cyklickou voltametrií byly zaznamenávány kapacitní proudy odpovídající adsorpci (resp. desorpci) asolectinových agregátů na povrchu rtuťové elektrody. Na obr. 7 jsou uvedeny cyklické voltamogramy naměřené v prostředí pH 4,26, při různých koncentracích asolectinu v roztoku. Z naměřených závislostí je patrné, že se zvyšující se koncentrací asolectinu dochází k výrazným změnám v proudové odezvě elektrody. Změny byly sledovány v obou směrech polarizace elektrody, v oblasti potenciálů od 150 mV do -200 mV (kladných) a od -800 mV do -1200 mV (záporných). Pro účely určování kritických koncentrací tvorby asolectinových agregátů byly využity voltamogramy zaznamenané v katodickém scanu a hodnoceny byly pouze v oblasti kladných potenciálů. Při nižších koncentracích asolectinu v roztoku (přibližně 0,5 g/l) si můžeme povšimnout nárůstu píku (křivka 2) v kladné potenciálové oblasti (kolem 50 mV). Se zvyšující se koncentrací asolectinu ve studovaném roztoku tento pík klesá. Při koncentraci nad 1 g/l asolectinu v roztoku se začíná objevovat nový pík v oblasti okolo -47 mV, který dále se vzrůstající koncentrací asolectinu roste (křivka 3).



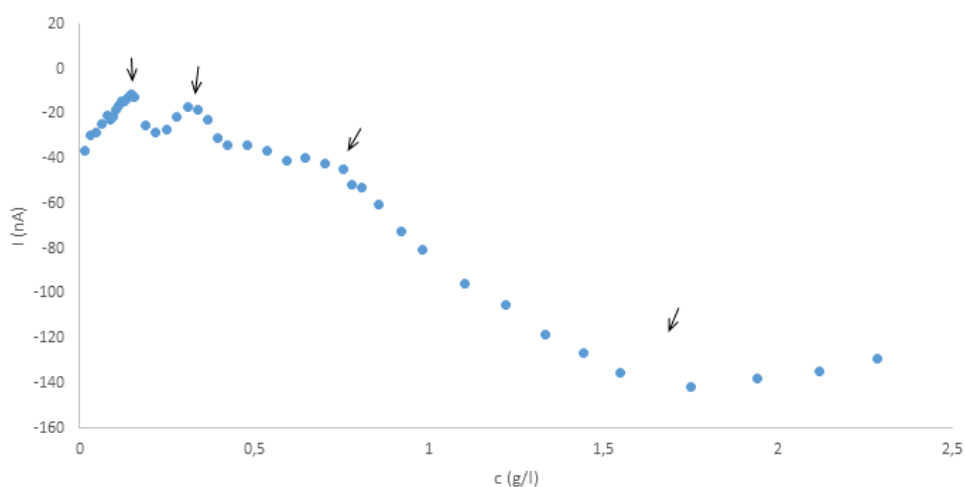
Obr. 7. Cyklické voltamogramy asolectinu v 10 mM B-R pufru pH 4,26: 1 – základní elektrolyt, 2 – 0,54 g/l asolectinu, 3 – 1,33 g/l asolectinu.

Sledované změny jsou lépe patrné z obr 8.



Obr. 8. Cyklické voltamogramy asolectinu v 10 mM B-R pufru pH 4,26 (katodická oblast polarizace): 1 – základní elektrolyt, 2 – 0,54 g/l asolectinu, 3 – 1,33 g/l asolectinu.

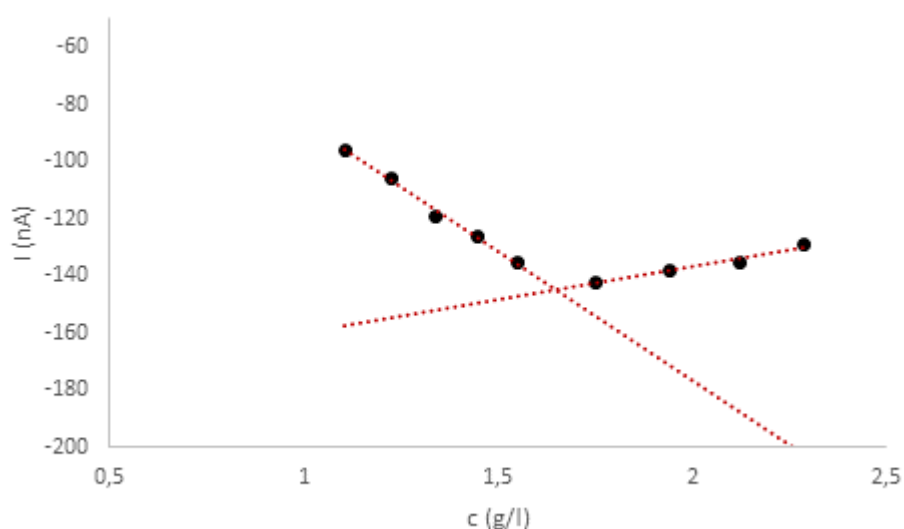
Pro určování hodnot kritických koncentrací tvorby asolectinových agregátů byly využity píky objevující se v katodickém směru polarizace v oblasti potenciálů 150 mV až - 200 mV. Na obr. 9 je vynesena závislost kapacitních proudů na koncentraci asolectinu ve studovaném roztoku o pH 7,52. Kapacitní proudy pro určování hodnoty koncentrace tvorby asolectinových agregátů byly odečteny při zvoleném potenciálu - 62 mV, kde docházelo během titrace (změny koncentrace asolectinu v roztoku) k největším změnám v proudové odezvě. Na zmíněném obrázku si můžeme všimnout čtyř změn (na obrázku vyznačeny šipkami). V koncentrační oblasti od 0 do 1 g/l si můžeme všimnout tří změn, které pravděpodobně souvisí se vznikem micelárních struktur různých typů (od sférických micel k micelám složitějších tvarů). Další výrazná změna se objevuje při koncentraci asolectinu nad 1 g/l, kdy dochází nejdříve k prudkému poklesu kapacitního proudu a následně k jeho pozvolnému nárůstu. Tato změna souvisí opět s tvorbou nových složitějších asolectinových struktur, pravděpodobně liposomů.



Obr. 9. Závislost kapacitních proudů při potenciálu -62 mV na koncentraci asolectinu v roztoku 10 mM B-R pufru o pH 7,52.

Kritické koncentrace tvorby různých typů agregátů byly určeny jako průsečíky přímek proložených lineárními částmi koncentrační závislosti. Při nízkých koncentracích asolectinu ve sledovaném roztoku byly určeny 3 hodnoty kritických koncentrací (CMC1, CMC2, CMC3) odpovídající tvorbě různých micelárních útvarů. Při vyšších koncentracích asolectinu v roztoku byla určena hodnota kritické liposomální koncentrace.

Určení CLC v prostředí B-R pufru s pH 7,52 je graficky naznačeno na obr. 10. Hodnoty kritických koncentrací byly určovány také jako průsečíky polynomických regresních křivek. Vzhledem k nepatrným odchylkám mezi výsledky získanými pomocí lineární a polynomické regrese jsou v práci uváděny pouze hodnoty kritických koncentrací určených lineární regresí.

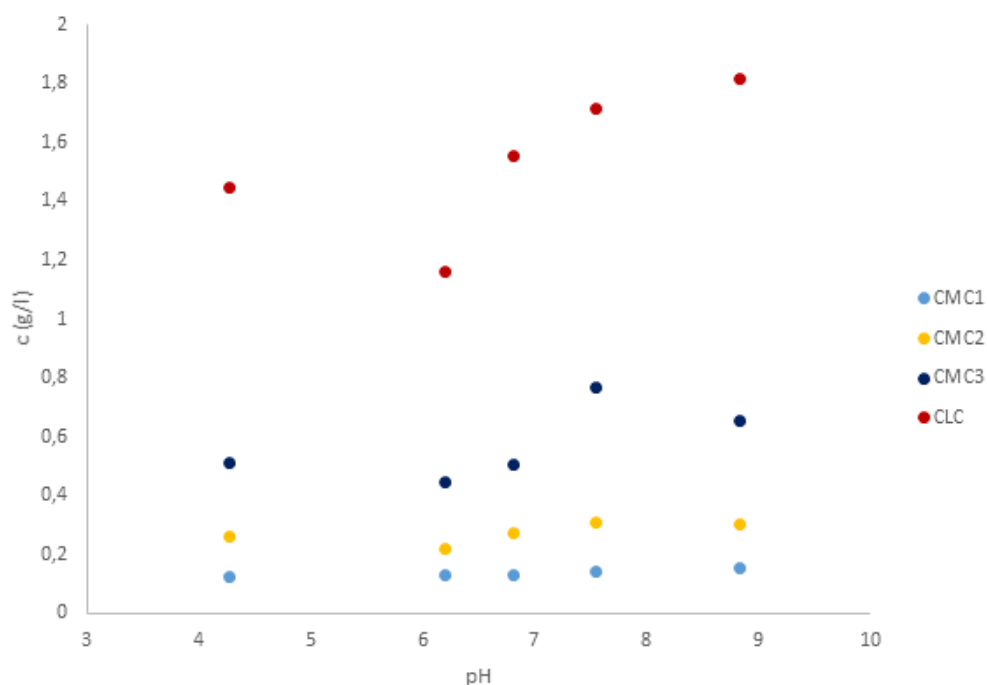


Obr. 10. Závislost kapacitního proudu při potenciálu -62 mV na koncentraci asolectinu v 10 mM B-R pufru pH 7,52.

Vypočtené hodnoty kritických micelárních (CMC1, CMC2, CMC3) a liposomálních (CLC) koncentrací se směrodatnými odchylkami jsou shrnuté ve výsledné tab. 3. Při porovnání hodnot kritických koncentrací pro různá pH jsou patrné rozdíly. Vliv pH na tvorbu malých, jednodušších micelárních útvarů je minimální, s rostoucí velikostí micelárních útvarů a jejich složitější strukturou vliv pH na tvorbu roste. Nejvíce je hodnotou pH prostředí ovlivňována tvorba liposomů, jak je patrné především z obr. 11.

Tab. 3. Kritické micelární a liposomální koncentrace pro různá pH.

pH	CMC1	CMC2	CMC3	CMC4
4,26	0,130 ± 0,012	0,265 ± 0,026	0,517 ± 0,038	1,448 ± 0,212
6,20	0,135 ± 0,001	0,224 ± 0,019	0,446 ± 0,058	1,162 ± 0,112
6,80	0,134 ± 0,012	0,274 ± 0,074	0,506 ± 0,093	1,556 ± 0,157
7,52	0,145 ± 0,008	0,313 ± 0,030	0,769 ± 0,020	1,719 ± 0,072
8,83	0,158 ± 0,011	0,308 ± 0,010	0,660 ± 0,004	1,820 ± 0,092

**Obr. 11.** Závislost kritických micelárních a liposomálních koncentrací na pH prostředí.

Z obr. 11 je patrné, že tvorba asolectinových agregátů, micel i liposomů, probíhá nejsnadněji v roztocích o pH blízkém 6,2 (nejnižší hodnota kritické koncentrace). Tato hodnota koresponduje s hodnotou pH 6,5, při které byla sledována minimální hydrolýza fosfolipidů v liposomech z nasyceného sojového fosfatidylcholinu. /41,42/ V rámci uvedených prací byl studován vliv pH na rychlost hydrolýzy fosfolipidů v liposomech různého chemického složení. Rychlost hydrolýzy, resp. hodnota rychlostní konstanty, vzrůstala od pH 6,5 log lineárně ve směru k nižším i vyšším hodnotám pH.

Závislost kritických koncentrací asolectinových agregátů na pH získaná v rámci této práce (obr. 11) vykazuje velmi podobný trend, který byl sledován ve výše zmíněných pracích. Na základě těchto výsledků lze říci, že tvorba asolectinových agregátů, především asolectinových liposomů, je značně ovlivněna hydrolytickými reakcemi fosfolipidů, jejichž rychlost se zvyšuje směrem k nižším i vyšším hodnotám pH ve srovnání s pH 6,2. Je tedy pravděpodobné, že díky rychlejší degradaci fosfolipidů při nižších a vyšších pH musí být pro tvorbu asolectinových agregátů v těchto pH dosaženo mnohem vyšší koncentrace asolectinu ve studovaném roztoku.

5. Závěr

V předložené bakalářské práci je popsáno studium tvorby asolectinových agregátů v závislosti na pH metodou cyklické voltametrie. Agregace asolectinu byla sledována v prostředí o pH 4,26 až 8,83. Vyhodnocením naměřených dat byly získány 4 hodnoty kritických koncentrací pro každé měřené pH. První i druhá kritická koncentrace CMC1 a CMC2, pohybující se v rozmezí 0,130 – 0,158 g/l, resp. 0,224 – 0,313 g/l ve zvoleném rozsahu pH, odpovídaly pravděpodobně tvorbě micelárních struktur jednoduššího typu. Třetí kritická koncentrace CMC3, objevující se v koncentrační oblasti 0,446 – 0,769 g/l (v daném rozmezí pH), náležela podle předpokladu tvorbě strukturně složitějších asolectinových micel. Poslední kritická koncentrace CLC pravděpodobně odpovídala tvorbě liposomů a pohybovala se v rozmezí 1,162 – 1,820 g/l ve zvoleném rozsahu pH. Z výsledků je patrné, že tvorba asolectinových agregátů různé struktury, resp. hodnoty kritických koncentrací, jsou více či méně ovlivněny hodnotou pH prostředí, ve kterém k agregaci asolectinových molekul dochází. U jednodušších agregačních struktur tvořících se při CMC1 a CMC2 nebyl pozorován tak výrazný vliv pH jako v případě složitějších asolectinových útvarů, které se tvoří při CMC3 a CLC. Dále bylo zjištěno, že agregace fosfolipidových molekul a tvorba asolectinových agregátů probíhala nejjednodušší v roztoku o pH pohybujícím se kolem hodnoty 6,2. K tomuto dochází pravděpodobně v souvislosti s hydrolytickými reakcemi fosfolipidů, které probíhají v pH blízkém 6 v minimální míře. Naopak je tomu v roztocích o pH nižším i vyšším (ve srovnání s pH 6), kde dochází k hydrolyze rychleji. Z tohoto důvodu se začínají tvořit asolectinové agregáty až při vyšších koncentracích asolectinu ve studovaném roztoku.

6. Summary

In the present thesis is described the effect of pH on asolectin aggregate formation using cyclic voltammetry. Asolectin aggregation was monitored in a medium with pH 4,26 to 8,83. Evaluation of the measured data were obtained 4 values of the critical concentration for each measured pH. The first and second critical concentration CMC1 and CMC2, ranging from 0,130 - 0,158 g/l, respectively 0,224 - 0,313 g/l in the selected pH range, corresponded presumably formation of micellar structures of a simpler type. The third critical concentration CMC3, appearing in concentration region 0,446 - 0,769 g/l (in this pH range), belonged by assuming the formation of a structurally complex asolectin micelles. The last critical concentration CLC probably corresponded formation of liposomes and ranged from 1,162 to 1,820 g/l in the selected pH range. The results show that the formation of asolectin aggregates of different structures, respectively values for the critical concentration, are more or less influenced by the pH of the environment in which occurs to aggregation of asolectin molecules. For simple aggregation structures forming at CMC1 and CMC2 wasn't observed as significant as the effect of pH in the case of complex asolectin formations, which are formed at CMC3 and CLC. Furthermore, it was found that the aggregation of phospholipid molecules and formation of asolectin aggregates most readily conducted at a pH ranging around the value 6,2. This is probably due to hydrolysis reactions of phospholipids which extend at a pH close to 6 to a minimal extent. Conversely, it is in solutions having a pH of lower and higher (compared to pH 6), wherein the hydrolysis occurs faster. For this reason begin to form asolectin aggregates at higher asolectin concentrations in studying solution.

7. Seznam zkratek

BDD	borem dopovaná diamantová (elektroda)
Brij 35	polyoxyethylen-23-dodecyl ether
B-R pufr	Britton-Robinsonův pufr
CLC	kritická liposomální koncentrace
CMC	kritická micelární koncentrace
CPC	cetylpyridinium chlorid
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
GUV	gigantické unilamelární vesikuly
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HTAB	hexadecyltrimethylammonium bromid
LOV	velké oligolamelární vesikuly
LUV	velké unilamelární vesikuly
MLV	velké multilamelární vesikuly
MVV	multivesikulární vesikuly
PAL	povrchově aktivní látky
SC	cholát sodný
SDBS	dodecylbenzensulfonát sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
SUV	malé unilamelární vesikuly
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromid

8. Literatura

1. Pilemand Ch.: *Surfactants: Their abilities and important physico-chemical properties*, Arbejdsmiljøinstituttet, København 2002.
2. Vojuckij S. S.: *Kurs koloidní chemie*, SNTL, Praha 1984.
3. Blažej A. a kol.: *Tenzidy*, Alfa, Bratislava 1977.
4. Bareš M., Zajíc J.: *Chemie a technologie tensidů a detergentů*, SNTL, Praha 1982.
5. Součková J.: *Studium liposomů fyzikálně-chemickými metodami*, Disertační práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2011.
6. Tadros T. F.: *Applied Surfactants: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
7. Švecová H.: *Studium agregace fosfolipidových molekul*, Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2011.
8. Němcová I., Nesměrák K., Tománková V.: *Určení hodnoty kritické micelární koncentrace Marlophenu NP-10 metodou cyklické voltametrie*, Chem. Listy 94, 195-196 (2000).
9. Tesařová E., Tuzar Z., Nesměrák K., Bosáková Z., Gaš B.: *Study on the aggregation of teicoplanin*, Talanta 54, 643-653 (2001).
10. Müllerová M., Šváb M., dos Santos M. M.: *Měření kritických micelárních koncentrací tensidů ve vodných roztocích*, Chem. Listy 101, 509-514 (2007).
11. Fuguet E., Ràfols C., Rosés M., Bosch E.: *Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems*, Anal. Chim. Acta 548, 95-100 (2005).
12. Mandal A. B., Nair B. U.: *Cyclic Voltammetric Technique for the Determination of the Critical Micelle Concentration of Surfactants, Self-Diffusion Coefficient of Micelles, and Partition Coefficient of an Electrochemical Probe*, J. Phys. Chem. 95, 9008-9013 (1991).
13. Švecová H., Součková J., Skopalová J., Novotný R., Barták P.: *Studium agregace fosfolipidových molekul*, Chem Listy 106, 200-205 (2012).
14. Racaud Ch., Serrano K. G., André S.: *Voltammetric determination of the critical micellar concentration of surfactants by using a boron doped diamond anode*, Appl. Electrochem. 40, 1845-1851 (2010).
15. Mukerjee P., Mysels K. J.: *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*, Nat. Stand. Ref. Data Ser., Nat. Bur. Stand. (US), Washington 1971.

16. Pramauro E., Pelezetti E.: *Surfactants in Analytical Chemistry: Applications of Organized Amphiphilic Media*, Elsevier, Amsterdam 1996.
17. Voet D., Voet J. G.: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha 1995.
18. Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B.: *Surfactants and polymers in aqueous solution*, John Wiley & Sons, Chichester 2003.
19. Kodíček M.: *Biochemické pojmy*, Vydavatelství VŠCHT, Praha 2007.
20. <http://www.skin-care-forum.basf.com/en/articles/skin/galenic-principles-of-modern-skin-care-products/2001/04/15?id=81fb2fb5-f040-4e82-9f6f-8f4b20e9e05f&mode=Detail> , staženo 13. dubna 2015
21. Hadašová E.: *Lipozomální lékové formy*, Remedica 16, 433-437 (2006).
22. Bacia K., Schweizer J.: *Practical course: Giant Unilamellar Vesicles*, Institut für Biophysik Fachrichtung Physik, Dresden (2005).
23. Hens A. G., Romero J. M. F.: *The role of liposomes in analytical processes*, Trends in Anal. Chem. 24, 9-19 (2005).
24. Chovancová R.: *Studium procesu agregace a fyzikální stability polymerních micel pomocí metody fluorescenční sondy*, Bakalářská práce, Vysoké učení technické, Brno 2013.
25. Winnik F. M., Regismond S. T. A.: *Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers*, Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 118, 1-39 (1996).
26. Muntaha S. T., Khan M. N.: *Study of changes in conductivity and spectral behaviour before and after micelle formation in the dye-surfactants system*, J. Mol. Liq. 197, 191-196 (2014).
27. Bartušek M.: *Úvod do elektroanalytických metod*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1984.
28. Megová M., Müller L., Barták P.: *Příprava a studium liposomů a jejich využití jako modelů biomembrán*, Acta Univ. Palacki Olomouc, Fac. Rerum Natur. Chemica 47, 1-4 (2007).
29. Ali A., Uzair S., Malik N. A., Ali M.: *Study of interaction between cationic surfactants and cresol red dye by electrical conductivity and spectroscopy methods*, J. Mol. Liq. 196, 395-403 (2014).
30. Szymanski A., Lukaszewski Z.: *Indirect tensammetric method for the determination of non-ionic surfactants*, Anal. Chim. Acta 273, 313-321 (1993).

31. Szymanski A., Lukaszewski Z.: *Tensammetric studies of separation of surfactants*, Anal. Chim. Acta 281, 443-449 (1993).
32. Szymanski A., Lukaszewski Z.: *Indirect tensammetric method for the determination of non-ionic surfactants*, Anal. Chim. Acta 293, 77-86 (1994).
33. Olkowska E., Polkowska Z., Namieśnik J.: *Analytical procedures for the determination of surfactants in environmental samples*, Talanta 88, 1-13 (2012).
34. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha 2005.
35. Sohrabi B., Moallemi M., Amani R., Kiasadegh M.: *Electrolyte-cosolvent effects on the properties of micellar and monolayer phases in the cationic-rich region of catanionic mixture: The phase transition between microstructures and nanostructures*, Fluid Phase Equilibria 375, 168-175 (2014).
36. Javadian S., Nasiri F., Heydari A., Yousefi A., Shahir A. A.: *Modifying Effect of Imidazolium-Based Ionic Liquids on Surface Activity and Self-Assembled Nanostructures of Sodium Dodecyl Sulfate*, J. Phys. Chem. B 118, 4140-4150 (2014).
37. Edwards K. A., Baeumner A. J.: *Liposomes in analyses*, Talanta 68, 1421-1431 (2006).
38. Johns A., Morris S., Edwards K., Quirino R. L.: *Asolectin from soybeans as a natural compatibilizer for cellulose-reinforced biocomposites from tung oil*, J. Appl. Polym. Sci. 41833, 1-9 (2015).
39. <http://www.avantilipids.com/>, staženo 14. dubna 2015.
40. des Sousa R. S., de Moraes Nogueira A. O., Maques V. G., Clementin R. M., de Lima V. R.: *Effects of α -eleostearic acid on asolectin liposomes dynamics: Relevance to its antioxidant activity*, Bioorg. Chem. 51, 8-15 (2013).
41. Vernooij E. A. A. M., Kettenes – van den Bosch J. J., Underberg W. J. M., Crommelin D. J. A.: *Chemical hydrolysis of DOTAP and DOPE in a liposomal enviroment*, J. Control. Release 79, 299-303 (2002).
42. Guit M., Underberg W. J. M., Crommelin D. J. A.: *Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions*, J. Pharm. Sci. 82, 362-366 (1993).