

Interakce kolagenu I se směsí surfaktantů

Bc. Jaroslava Kucejová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslava KUCEJOVÁ**
Osobní číslo: **T080354**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**

Téma práce: **Interakce kolagenu I se surfaktanty**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vypracování krátké literární studie zaměřené na interakci surfaktantů s bílkovinami.

II. Praktická část

1. Příprava kolagenních vláken z byčích Achillových šlach.
2. Sledování interakce mezi kolagenními vlákny vybraných anionických a neionických tenzidů a jejich směsí. Stanovení navázaného množství surfaktantů a změny v botnání kolagenních vláken. Vyhodnocení.
3. Diskuze získaných výsledků.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1]KREJČÍ,J. Interaction of mixture of anionic surfactants with collagen,Int.J.Cosmetic Science,2007,29,121-129.

[2]KŘIVINKA,M. Heterogenní interakce povrchově aktivních látek s polyelektrolyty a polyelektrolytovými komplexy,Disertační práce,VUT FT Zlín,1995.

[3]GODDARD,E.D.,K.P.ANANTHAPADMANABHAN,Interactions of surfactants with polymers and proteins,CRC Press,Boca Raton,FL,1993.

[4]HENRIQUEZ,M.LISSI,E.,ABUIN,E.and CIFFERI,A.Assembly of amphipilic compounds and rigid polymers,1.Interaction of sodium dodecyl sulfate with collagen,Macromolecules,1994,27,6834-6840.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Krejčí, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

22. února 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

14. května 2010

Ve Zlíně dne 22. února 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na heterogenní reakce anionických a neionických PAL a jejich směsí s kolagenem typu I. Úvodní část práce pojednává o struktuře kolagenu a jeho fyzikálně chemických vlastnostech. Další část se zabývá ionickými a neionickými tensidy. V následující části jsou charakterizovány heterogenní interakce s kolagenem a vliv reakčních podmínek na mechanismus reakce.

V experimentální části byly studovány interakce anionického dodecylsulfátu sodného a neionického igepalu CA 720 s kolagenem typu I při různých pH (pH=4 a pH=6). Jako kolagen typu I byly použity býčí achillovy šlachy (BAT). Interakce byly hodnoceny pomocí adsorpčních izoterm a hmotnostních stupňů zbotnání po interakci.

Bylo prokázáno, že bez ohledu na pH prostředí dochází k současné adsorpci obou tensidů. Celkové naadsorbované množství je silně ovlivněno složením výchozích směsí tensidů.

Klíčová slova: kolagen, tensid, dodecylsulfát sodný, igepal CA 720, adsorpční izoterma, hmotnostní stupeň zbotnání kolagenu

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on heterogenous reactions of anionic and nonionic PAL and their mixture with collagen of type I. The first part of thesis deals with the structure of collagen and its physico-chemical characteristics. Next part deals with ionic and nonionic surfactants. The following part describes heterogenous interactions with collagen and the influence of reactive conditions on the mechanism of the reaction.

In the experimental part there were studied interactions of anionic sodium dodecylsulfate and nonionic igepal CA 720 with a collagen type I at different pH (pH=4 and pH=6). As the collagen type I were used beef Achilles tendon (BAT). Interactions were evaluated by adsorption isotherms and mass degrees of swelling.

It was demonstrated that regardless to the surrounding pH there is simultaneous adsorption of the both surfactants. Total adsorpted quantity is strongly influenced by the structure of the starting mixture of surfactants.

Keywords: collagen, surfactant, sodium dodecylsulfate, igepal CA 720, adsorption isotherm, mass degree of collagen swelling

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Jiřímu KREJČÍMU, CSc. za odborné vedení a cenné rady v průběhu mojí práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	8
1 TEOTRETICKÁ ČÁST	9
1.1 KOLAGEN A JEHO VLASTNOSTI	9
1.1.1 Struktura kolagenu	9
1.1.2 Fyzikálně - chemické vlastnosti kolagenu	11
1.2 SURFAKTANTY (PAL) A JEJICH VLASTNOSTI	12
1.2.1 Ionické surfaktanty	12
1.2.1.1 Anionické tenzidy	12
1.2.1.2 Kationické tenzidy	13
1.2.1.3 Amfoterní tenzidy	13
1.2.2 Neionické surfaktanty	13
1.2.3 Vlastnosti povrchově aktivních látek	14
1.3 INTERAKCE PAL S KOLAGENEM.....	16
1.3.1 Mechanismus heterogenní interakce PAL s bílkoviny.....	16
1.3.2 Vliv reakčních podmínek na mechanismus reakce	19
1.3.2.1 Vliv pH	19
1.3.2.2 Vliv iontové síly.....	20
1.3.2.3 Vliv teploty reakčního prostředí	20
1.3.3 Objemové změny kolagenu při interakci s PAL	21
1.3.4 Interakce se směsí PAL	22
1.3.5 Zhodnocení teoretické části.....	23
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	24
2.2 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ	24
2.3 POUŽITÉ POSTUPY	25
2.3.1 Příprava BAT	25
2.3.2 Stanovení sušiny BAT.....	25
2.3.3 Příprava zásobních roztoků PAL	26
2.3.4 Spektrofotometrické stanovení SDS metodou methylenové modře	26
2.3.5 Spektrofotometrické stanovení igevalu CA 720	27
2.3.6 Příprava BAT před interakcí	28
2.3.6.1 Kondicionování BATu.....	28
2.3.6.2 Rozmáčení BATu	28
2.3.7 Příprava pracovních roztoků SDS a igevalu pro vlastní interakci s BAT	28
2.3.8 Stanovení reakční doby interakce PAL –BAT	29
2.3.9 Vlastní interakce BAT s tenzidy	30
3 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE	32
3.1 INTERAKCE PŘI PH 6.....	32
3.1.1 Interakce samotných tenzidů.....	32
3.1.2 Interakce směsí tenzidů	36
3.2 INTERAKCE PŘI PH 4.....	41
3.2.1 Interakce samotných tenzidů.....	41
3.2.2 Interakce se směsí SDS igeval v poměru 1:1	44

3.3	VLIV REAKČNÍCH PODMÍNEK NA CHOVÁNÍ KOMPLEXŮ BAT – TENZID	46
ZÁVĚR		51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		53
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		55
SEZNAM OBRÁZKŮ		57
SEZNAM TABULEK		58

ÚVOD

Tenzidy jsou látky se speciální chemickou strukturou ovlivňující jejich chování. Jsou součástí řady běžně používaných prostředků, jako jsou např. prostředky bytové chemie, kosmetické přípravky a detergenty. Významné je i jejich využití v řadě průmyslových odvětví jako je textilní, papírenský nebo potravinářský průmysl. Ve formě především hygienických, kosmetických a čisticích prostředků, přichází do styku s lidskou pokožkou, proto je důležité znát jejich chování ve styku s pokožkou, případně s lidskou kůží. Je známo, že nejběžnější tenzidy patří mezi tzv. iritanty, protože mohou poškozovat především epidermis kůže.

Kolagen I patří k základním bílkovinám kůže. Je hlavní součástí dermis a je zodpovědný především za pevnost kůže. Na rozdíl od keratinu, který je dominující bílkovinou epidermis, patří kolagen mezi málo zesíťované bílkoviny, což znamená, že snadněji reaguje na změny prostředí většinou změnami uspořádání ve své nadmolekulární struktuře. Tyto změny ovlivňují celkové chování kůže.

Při aplikaci prostředků obsahujících tenzidy nelze vyloučit zejména v případě různého povrchového poškození kůže přímou interakci mezi tenzidy a kolagenními vlákny. Proto je důležité znát případné interakce mezi kolagenem a různými typy tenzidů v závislosti na reakčních podmínkách. Tato práce by měla být příspěvkem k poznání těchto interakcí a to zejména při působení směsí nejběžnějších tenzidů obsažených v kosmetických prostředcích, nebo v prostředcích bytové chemie.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kolagen a jeho vlastnosti

Kolagen je jednou z hlavních složek spojovacích tkání, kostí, chrupavek, šlach, vaziva a kůže. Patří do skupiny tzv. vláknitých bílkovin [1]. V současné době je známo nejméně 27 rozdílných typů kolagenu [2]. Kůže se skládá z epidermis, dermis a podkožního vaziva. Dermis je nejtlustší část kůže. Hlavní součástí dermis je především kolagen typu I (tvoří základ dermis) a kolagen typu III. Kolagen typu III se vyskytuje převážně v kůži malých dětí. Kolem 25. roku života jeho syntéza pomalu ustupuje a kolem 40. – 50. roku mizí z dermis úplně. Kolagen je méně zesíťovaný a tudíž méně odolný vůči chemikáliím, než např. keratin, který je hlavní bílkovinou epidermis [3].

1.1.1 Struktura kolagenu

Kolagen (stejně jako většina bílkovin) je charakteristický svou primární, sekundární, terciární a kvartérní strukturou. Kolagen typu I je jeden z typů kolagenu, u kterého je známá primární struktura a jsou také jasné principy molekulární struktury [1,2].

Specifické vlastnosti a struktura kolagenu je dána jeho aminokyselinovým složením a pořadím aminokyselin v polypeptidickém řetězci, což udává primární struktura [4]. Především se zde nachází nejjednodušší aminokyselina glycin, dále pak prolin a hydroxyprolin, což jsou cyklické kyseliny dodávající peptidickému řetězci tuhost - rigiditu. Glycin je v molekule rozložen pravidelně a tvoří každou třetí aminokyselinu v sekvenci jednotlivých řetězců Gly-X-Y (kde X, Y představují zbytek libovolné aminokyseliny). Toto chemické složení, včetně pořadí AMK v polypeptidických řetězcích umožňuje organizaci polypeptidických řetězců do vyšších nadmolekulárních struktur s výraznými sklony k tvorbě vláknité struktury. Studium primární struktury polypeptidických řetězců kolagenu bylo zjištěno, že v této bílkovině dochází k pravidelnému střídání dvou oblastí, nepolárních a polárních. Nepolární oblasti jsou relativně uniformní, pravidelně se v nich střídají sekvence Gly-Pro-Y. Místo Y je možné dosadit různé AMK, jako jsou hydroxyprolin, alanin, arginin, kyselina asparagová, fenylalanin, treonin nebo serin. V polárních oblastech převažují kyselé a bazické AMK. Pro tyto oblasti je typické, že postrádají pravidelnost opakování Gly-X-Y [1,2,4].

Pro sekundární a terciární strukturu kolagenu má velký význam tripeptid Gly-Pro-Hyp, který zahrnuje asi 10 % celé sekvence AMK. Tripeptid Gly-Pro-Y zahrnuje asi 33 % celkové molekuly kolagenu [2].

Sekundární struktura kolagenu udává konformaci hlavního polypeptidického řetězce v prostoru. Sekvence aminokyselinových zbytků je v L-konformaci spojena peptidickými vazbami. V tomto dlouhém polypeptidickém řetězci je jediným zdrojem konformačních změn rotace kolem vazeb N - C_α a C_α - CO, které vycházejí z α uhlíkového atomu. Velikost těchto úhlů, které byly u kolagenu typu I označeny Φ a Ψ, je blízká průměrné hodnotě Φ = -60° a Ψ = 160°. Velikost těchto úhlů vede také ke vzniku pravidelné levotočivé šroubovice protáhlého typu, kde připadá 3,3 aminokyselinového zbytku na 1 závit stoupání. Tato šroubovice protáhlého typu se vyskytuje jen u kolagenu nebo u některých polypeptidů s podobnou aminokyselinovou sekvencí, u jiných bílkovin se vyskytuje jen výjimečně. Nemůže být stabilizována intrařetězcovými vodíkovými vazbami, jako se to děje u Paulingovy α-šroubovice. Izolovaný řetězec v této konformaci nemůže existovat bez interakce s dalšími sousedními řetězci podobných vlastností, a proto ke stabilizaci dochází pomocí interřetězcových vazeb [2,5,6].

Terciární strukturou je označována tropokolagenová molekula, kterou tvoří tři navzájem kolem sebe ovinuté řetězce se společnou osou. Tyto tři řetězce jsou udržovány při sobě vodíkovými vazbami mezi sousedními řetězci a mohou vznikat jen tehdy, přiblíží-li se všechny tři řetězce k sobě. U kolagenu je to umožněno výskytem AMK glycinu v každé třetí poloze, což je AMK bez vedlejšího řetězce. Tropokolagenová molekula, která má tvar tyčinky, je 290 nm dlouhá a její průměr je 1,4 nm [1,2].

V rámci kvartérní struktury mají tropokolagenová vlákna schopnost vytvářet vysoce uspořádané vláknité struktury tzv. vláknité fibrily. Orientace a osově uspořádání tropokolagenových molekul ve fibrilách ukazuje příčné pásování s periodou 67 nm, což bylo odvozeno z elektronmikroskopického pozorování. Původ tohoto pásování vychází z předpokladu, že jsou tropokolagenové molekuly ve fibrile uspořádány paralelně a jsou vůči sobě posunuty o vzdálenost 67 nm. Čím více kolagenové fibrily stárnou, tím více se stávají nerozpustnými, až můžou být rozpustné jen v silně hydrolytických prostředích [2,4,5].

1.1.2 Fyzikálně - chemické vlastnosti kolagenu

Fyzikální vlastnosti kolagenu jsou určeny víceméně uspořádáním ve vyšších strukturních celcích. Naproti tomu chemické vlastnosti kolagenu udává jeho primární struktura, tedy sekvence AMK zbytků v polypeptidickém řetězci [4].

Bílkoviny jsou polyamfolyty, stejně tak i kolagen. Polyamfolyty jsou látky, které ve své molekule obsahují zároveň kyselé i bazické funkční skupiny schopné disociace. Bazické skupiny mají funkční skupinu buď součástí postranního řetězce, nebo funkční skupiny obsahují v hlavním polymerním řetězci. Z bazických skupin patří mezi nejdůležitější především guanidinová a lysinová skupina Z kyselých skupin patří mezi nejvýznamnější karboxylové skupiny AMK asparagové a glutamové [7]. Isoelektrický bod (IB) je charakteristickou konstantou, na níž je závislá reaktivita kolagenu. U nativního kolagenu se IB pohybuje kolem hodnoty $\text{pH} = 7$. Při tomto pH nesou polypeptidické řetězce minimální množství nábojů, přičemž kladné a záporné náboje jsou v rovnováze. Kolagen získává v kyselém prostředí kladný náboj (polykation) a v zásaditém prostředí záporný náboj (polyanion). Síla těchto polyiontů je dána charakterem bočních skupin a množstvím přidané kyseliny nebo zásady [1,4].

Bylo zjištěno, že v oblasti IB kolagenu dochází ke snížení hydrofilnosti, kolagen je v této oblasti pH nejméně rozpustný. Snížení hydrofilnosti je způsobeno poklesem počtu volných nábojů v polypeptidických řetězcích. Kolagen v oblasti IB vykazuje minimální zbotnění. Přídavkem kyseliny se botnění zvyšuje vzhledem ke změně poměru nábojů. Jestliže roste koncentrace kyseliny, roste i zbotnění kolagenu. Nejvíce botnění ovlivňují např. minerální nebo vícesytné kyseliny (H_2SO_4). Zvyšující se koncentrace u zásad nemá na botnění tak velký vliv jako je tomu u kyselin, protože molekula kolagenu obsahuje větší počet bazických skupin. Stupeň zbotnění lze také ovlivnit přídavkem elektrolytu. Osmotické zbotnění nastává tehdy, jestliže voda proniká do tuhé fáze následkem gradientu osmotického tlaku vzniklého rozdílnou koncentrací pohyblivých iontů v tuhé a kapalné fázi. Toto zbotnění je považováno za reverzibilní. Vedle osmotického botnění existuje také lyotropní (hydrotropní) botnění kolagenu. Tento stav nastává tehdy, jestliže je dosaženo extrémních hodnot pH nebo přídavkem lyotropních látek. Vlivem těchto podmínek dojde k rozrušení stabilizujících vodíkových vazeb kolagenu, což vyvolá další zbotnění kolagenu, které vede k úplnému zhroucení šroubovicové konformace a tím k denaturaci struktury [1,4,5,6].

1.2 Surfaktanty (PAL) a jejich vlastnosti

Povrchově aktivní látky (surfaktanty, tenzidy) se používají především v kosmetickém, textilním, kožedělném, papírenském, potravinářském průmyslu. Tvoří širokou skupinu různorodých látek snižující povrchovou či mezifázovou energii a proto se samovolně koncentrují ve fázovém rozhraní. Mají bipolární neboli amfipatickou strukturu. Jejich molekula se skládá ze dvou částí: hydrofilní (polární) a hydrofobní (nepolární). Povrchově aktivní látky jsou obvykle klasifikovány podle povahy jejich hydrofilní skupiny na ionické a neionické a mají schopnost více či méně pronikat do svrchní vrstvy kůže (epidermis) [7].

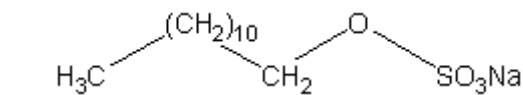
1.2.1 Ionické surfaktanty

Ionické surfaktanty jsou podle druhu iontu, který je nositelem povrchové aktivity, ještě dále děleny na anionaktivní, kationaktivní a amfoterní [7]. Mají na svém hydrofilním konci tedy ionizovanou skupinu. Ve vodném prostředí je hydrofilní část schopna disociovat na ionty. Umožňuje také rozpustnost PAL ve vodném prostředí. Ionické tenzidy dosahují hodnot hydrofilně - lipofilní rovnováhy HLB > 20 , podle čehož je určeno jejich praktické využití [8].

1.2.1.1 Anionické tenzidy

Nositelem povrchové aktivity je u těchto typů tenzidů anion. Jako protiont se zde nejčastěji uplatňují kationty sodné, draselné nebo amonné. Je to jedna z nejstarších skupin PAL, ale doposud stále nejvyužívanější. Aby vykazovaly maximální účinnost, musí se vyskytovat v mírně alkalickém prostředí. Jejich využití je především v hygieně (mýdla), ale používají se také jako smáčedla, emulgátory, detergenty, penetrátory aj. Podle charakteru polární skupiny jsou klasifikovány na: PAL s karboxylovou skupinou (mýdla), sulfáty, sulfonany a minoritní PAL s jinými skupinami (např. fosfáty aj.) [9].

Jeden ze zástupců ionických anionaktivních tenzidů sulfátového typu je dodecylsulfát sodný (SDS), jehož vzorec je uveden na obr. 1. SDS je modelový iritant kůže. Je poměrně levný, má výborné odmašťovací a čistící schopnosti. Avšak velkou nevýhodou je jeho velká prostupnost do pokožky. Z jeho charakteristik je nejdůležitější kritická micelární koncentrace, která má hodnotu 7 mmol/l. Hodnota HLB se pohybuje kolem 40.



Obrázek 1: Vzorec dodecylsulfátu sodného

1.2.1.2 Kationické tenzidy

Ve své molekule mají jednu nebo více funkčních skupin schopných ve vodě vytvářet organické kationty odpovědné za povrchovou aktivitu. Jednou z jejich typických vlastností je jejich silná adsorpce na všechny negativně nabitě povrchy (celulóza, sklo, bílkoviny, aj.), jejichž povrchové vlastnosti výrazně modifikuje [8]. Jsou většinou horší detergenty, než ostatní třídy PAL. Nejčastěji jsou využívány jako antistatické přípravky, inhibiční prostředky koroze, součást baktericidních přípravků, textilní změkčovadla, vlasové kondicionéry, apod [7]. Z chemického hlediska je pro skupinu kationických tenzidů charakteristická přítomnost dusíku v molekule. Nachází se ve formě primárních až kvarterních aminů. I z důvodu silné ionizace jsou nejdůležitějšími zástupci kationických tenzidů kvarterní aminy [8,9].

1.2.1.3 Amfoterní tenzidy

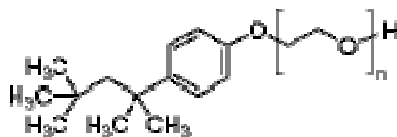
Skupina PAL, u nichž nositelé povrchové aktivity nesou náboj dle prostředí, ve kterém jsou použity. Jestliže je pH~4,0 lze hovořit o látkách kationtických, jestliže je pH nad 8,0 hovoříme o látkách aniontického charakteru. Do této skupiny jsou zařazovány jak amfoterní tak zwitterionické PAL. Chování klasických amfoterních tenzidů je stejné jako chování amfolytů. Náboj kyselých i bazických skupin je závislý na hodnotě pH prostředí. Zwitterionické tenzidy mají kladný náboj v celém rozmezí pH. Jeho zánik je spojen se zničením struktury molekuly. Náboj karboxylové skupiny je závislý na pH prostředí. Největší zástupci zwitterionických tenzidů jsou betainy [8,9].

1.2.2 Neionické surfaktanty

Jejich povrchová aktivita není zabezpečena ani kladně ani záporně nabitou skupinou. U neionických surfaktantů není schopná hydrofilní část tvořená z atomů disociovat na ionty, vytváří ale navzájem dipól, schopný orientovat molekuly rozpouštědla (vody) a tím dosahovat rozpustnosti PAL především ve vodném prostředí. Zejména pro tento druh tenzidů je důležitá hodnota HLB [8,9].

Igepal CA720 je často využívaný tenzid zejména jako emulgátor pro emulze typu O/V. Pro tuto práci byl vybrán záměrně, protože umožňuje poměrně snadné stanovení ve směsi se

SDS. Jeho kritická micelární koncentrace se pohybuje kolem 0,4 mmol/l a HLB = 14. Vzorec igevalu je uveden na obr. 2.



Obrázek 2: Vzorec igevalu CA 720, kde $n = 12$

1.2.3 Vlastnosti povrchově aktivních látek

Vlastnosti PAL jsou do značné míry dány poměrem velikosti jejich hydrofilní a hydrofobní části molekuly. Vzájemný poměr polární a nepolární části je charakterizován hydrofilně-lipofilní rovnováhou (HLB-hydrophilic-lipofobic-balance). Tato veličina má aditivní charakter a její velikost rozhoduje o praktickém využití tenzidů [8]. Nejdůležitější skupinové hodnoty HLB a možnosti praktického využití jsou uvedeny v tabulce 1 a 2. Hodnotu HLB vypočteme nejčastěji podle Griffinova vztahu:

$$\text{HLB} = \sum(\text{HLB}_{\text{hydrofil.}}) - \sum(\text{HLB}_{\text{hydrofob.}}) + 7 \quad (1)$$

Tabulka 1: Skupinové hodnoty HLB

SKUPINA	HLB	SKUPINA	HLB
-SO ₄ Na	38,7	-OH	1,9
-COOK	21,1	-O-	1,3
-COONa	19,1	-CH-	0,475
-O-SO ₃ ⁻	11,0	-CH ₂ -	0,475
Terciální amin	9,4	-CH ₃	0,475
-COO-R	2,4	-CH=	0,475
-COOH	2,1	-(CH ₂ -CH ₂ -O)-	0,33

Tabulka 2: Praktické využití tenzidů v závislosti na HLB

Vzhled disperze	HLB	Použití
netvoří disperzi ve vodě	0	emulgátory V/O
	2	
	4	
mlékovitá nestabilní disperze	6	smáčedla
	8	
mlékovitá stabilní disperze	10	detergenty
	12	
čiré disperze	14	solubilizátory
	16	
	18	

Molekula PAL je složena z hydrofilní a hydrofobní části. V roztocích se mohou vyskytovat molekuly PAL v různém uspořádání, zaleží však na jejich koncentraci. Pokud je koncentrace PAL v roztoku nízká, vyskytují se molekuly PAL jak ve formě povrchového filmu, tak ve formě jednotlivých molekul volně se pohyblivých v rozpouštědle. Při dosažení c.m.c. se PAL shlukují na základě hydrofobních interakcí mezi nepolárními řetězci do nadmolekulárních agregátů – micel. Hydrofobní části PAL mají tendence minimalizovat jejich styk s vodou, což způsobuje prakticky neprostupnost molekul vody do jádra. V oblasti c.m.c. tenzidu v roztoku dochází ke skokovým změnám řady vlastností (např. hustoty, povrchového napětí, osmotického tlaku, měrné vodivosti apod.). Řada z těchto vlastností je technicky významná, a proto je věnována zjišťování c.m.c. roztoků tenzidů značná pozornost. Vliv na velikost c.m.c. má řada faktorů, mezi něž patří např. struktura PAL, teplota, tlak a iontová síla [8,10].

Tvorba micel a hodnoty HLB ovlivňují technické vlastnosti PAL jako jsou např. solubilizace nebo detergence. Solubilizace vyjadřuje převádění původně nerozpustných látek do roztoku, kdy dojde k vestavení původně nerozpustných částic do útvarů tvořených solubilizačním činidlem. Solubilizačním činidlem je většinou ionický nebo neionický tenzid o $HLB > 16$. Proces, kdy je odstraňována nečistota ponořená do vhodné kapaliny ze substrátu se nazývá detergence. Látky, které se běžně používají ke snižování adheze nečistoty k substrátu, se nazývají detergenty. Jejich hodnota HLB je vyšší než 13 [8].

1.3 Interakce PAL s kolagenem

1.3.1 Mechanismus heterogenní interakce PAL s bílkovinami

Interakce tenzidů s proteiny se stávají předmětem zvýšeného zájmu vzhledem k stále častějším průmyslovým aplikacím. V praxi jsou využívány jak homogenní tak heterogenní interakce [11]. Vzhledem k povaze práce je další část zaměřena především na heterogenní interakce. Lze říci, že při těchto interakcích platí stejná pravidla jako pro homogenní interakce, avšak u mechanismu heterogenní interakce lze očekávat komplikace spojené s transportními procesy a hydrotrpním chováním PAL [11].

Heterogenní interakce jsou výrazně ovlivněny reakčními podmínkami, jako je doba interakce a rovnovážná hodnota pH. Dále je také ovlivňuje charakter PAL (ionogenita), přítomnost nízkomolekulárního elektrolytu v roztoku, koncentrace PAL v roztoku, teplota reakčního prostředí a typ substrátu [6].

Při reakci neionogenního tenzidu s bílkovinou (kožním práškem) bylo zjištěno, že je tato reakce poněkud specifická. Interakce neprobíhá při žádné hodnotě pH v intervalu 2 – 12. K interakci dochází jen tehdy, pokud je substrát předem modifikován anionaktivní PAL. Navázané množství neionické PAL se zvyšuje postupně se zvyšujícím se navázaným množstvím anionaktivní PAL, dokud není ukončena primární adsorbce. Jestliže dochází k dalšímu zvyšování navázaného množství anionaktivní PAL, dojde k poklesu rozsahu heterogenní reakce [12].

Obvyklejší jsou interakce kolagenu s anionickými PAL a jejich směsmi. Podrobněji se zabýval reakcí anionických povrchově aktivních látek s bílkovinami, zejména kolagenního typu, Pankhurst [13]. Potvrdil, že velikost navázaného množství povrchově aktivní látky ovlivňuje jednak pH reakčního prostředí a též přítomnost elektrolytů. Vycházel z předpokladu, že celý tento proces interakce probíhá postupně a sorpci PAL na bílkovinu lze popsat dvoustupňovým mechanismem, tzv. primární a sekundární sorpcí. Pojem primární adsorbce je uveden jako Coulombická interakce mezi PAL a polárními funkčními skupinami postranních řetězců nebo iont-dipólová interakce s peptidickými vazbami. Vytvořený stechiometrický komplex PAL-bílkovina odpovídá množství nabitých reakčních míst kolagenu. Pod pojmem sekundární adsorbce je uváděný vznik další vrstvy PAL na této primární vrstvě pomocí hydrofobních interakcí mezi nepolárními částmi molekul povrchově aktivní látky navázané na kolagen a PAL volné. Hydrofilní skupiny molekul PAL se při

vytváření sekundární vrstvy interakcí neúčastní. Primární sorpcí je zvyšována hydrofobita povrchu vzniklého komplexu, sekundární sorpcí naopak hydrofilita. Předpokládá se, že pokud není primární vrstva kompletní, tak k sekundární sorpci nedochází.

Ernerth [14], zabývající se hydrotrpním působením PAL na kolagen, vyslovil názor, že interakce PAL-bílkovina a s ní spojený proces botnání kolagenu, je zapříčiněn reakcí nepolárních řetězců PAL s hydrofobními postranními řetězci AMK zbytků kolagenu.

Heterogenními interakcemi kolagenu s různými typy PAL se v nedávných letech zabýval i Maldonado [15-17]. Konkrétně se jednalo o studium heterogenní reakce PAL s nečiněným kožním práškem, tedy poměrně čistým kolagenem I. I on vycházel z Pankhurstovy teorie primární a sekundární sorpce, ale od původních Pankhurstových názorů se částečně odlišuje. Maldonado souhlasil, že je primární sorpce stechiometrická a je založena na elektrostatické interakci mezi funkčními skupinami PAL a kolagenem. Předpokládal však, že dochází ke sklopení nepolární části řetězce již vázané PAL, což vede k interakci s nepolárními AMK zbytky bílkoviny. Dochází k fixaci povrchově aktivní látky na vázaný substrát. Sekundární sorpce (druhá fáze) je založena na zvýšení hydrofility polypeptidického řetězce. Toto je důsledkem již navázaných molekul PAL s hydrofobním úsekem polypeptidického řetězce. Tvrzení o charakteru takto pojaté sekundární sorpci je podmíněno předchozím navázáním ionické PAL a tedy získáním hydrofobního charakteru kolagenního řetězce [4, 15-17].

Závislost navázaného množství PAL (na substrát) na rovnovážné koncentraci PAL je vyjádřeno graficky za pomoci sorpční izotermy. Během studia interakce ionických PAL s proteiny dospěli autoři k různým závěrům při určování typu izotermy. V některých případech byly brány za výsledek klasické Freundlichovy a Langmuierovy izotermy, avšak nejčastějším výsledkem bývá tzv. „S- izoterma“, která je charakteristická tvarem písmene S. Tuto sorpční izotermu lze rozdělit na dva úseky. V prvním úseku, kde je koncentrace PAL menší než je c.m.c. dané PAL, navázané množství PAL na substrát zpočátku velmi rychle roste. Pak dojde k postupnému ustálení, kdy maximum sorpce spadá do oblasti těsně pod c.m.c. a navázané množství přibližně odpovídá stechiometrickému komplexu kolagen – PAL. Tento úsek lze označit jako primární sorpce. Při překročení c.m.c. dochází k dalšímu nárůstu navázaného množství PAL vlivem hydrofobních interakcí. Tento úsek lze nazvat jako sekundární sorpce.

Maldonado [15-17] potvrdil S-izotermu pro interakci kolagenu se SDS, avšak v případě anionického tenzidu SDBS (dodecylbenzensulfonan sodný) nedosáhl izotermu ve tvaru S, ale logaritmické křivky s limitní hodnotou 1,25 mmol/l SDBS/g kolagenu.

Křivinka [4], který ve své práci jako substrát použil BAT a jako povrchově aktivní látky např. SDS, SDBS, CPB (cetylpiridinium bromid) uvádí, že ve všech případech měly křivky tvar S-izotermem s charakteristickou lagovou fází v oblasti kolem c.m.c.. Zároveň potvrdil, že navázané množství ionických PAL je významně závislé na reakčních podmínkách.

Pro bližší objasnění způsobu vazby ionických PAL na kolagen navrhl Křivinka [4] tzv. parametr vázání (p). Definoval ho, jako poměr počtu molekul PAL vázaných Coulombovskými silami k celkovému navázanému množství. Při odvozování parametru vázání vycházel z úvah, že v první fázi, kdy je PAL vázána na základě Coulombovských sil ($c < c.m.c.$), bude koncentrace protiiontů reagující PAL před a po interakci stejná vzhledem k tvorbě iontových párů PAL-bílkovina. Jestliže reakce proběhne na základě hydrofobních interakcí, nedojde ke vzniku iontových párů PAL-bílkovina a důsledkem toho bude postupné zvyšování koncentrace protiiontů v kolagenu a tedy jejich úbytek v roztoku. Tato skutečnost však platí jen za předpokladů, jako jsou např.: neschopnost vázání protiiontů na substrát, dostatečná čistota PAL, úplná disociace PAL v roztoku, vedení reakce do rovnováhy atd. Pokud je $p \sim 0$ je pravděpodobnost vazby iontovým mechanismem minimální a hovoří se o interakcích hydrofobních. Jestliže je $p \sim 1$, lze předpokládat především vazbu s iontovým mechanismem. Ze závislosti p na rovnovážné koncentraci ionických PAL, Křivinka zjistil, že se zvyšující se hodnotou rovnovážných koncentrací dochází k postupnému snižování parametru p . Nezaznamenal výraznější zlom v oblasti $c.m.c._{SDBS}$, z čehož usoudil, že striktně oddělovat oba rozdílné způsoby vázání na substrát nelze.

S mechanismem vazby PAL-bílkovina úzce souvisí pojem reverzibilita či ireverzibilita vazby. Maldonado [15-17] předpokládá, že při vhodném pH ($pH \sim 3$) a koncentraci PAL pod její c.m.c. je veškerá anionaktivní PAL vázána na nečiněný kožní prášek ireverzibilně. Pokud je však koncentrace PAL větší než c.m.c., lze při stejném pH vydesorbovat tu část PAL, která odpovídá rozdílu v navázaném množství PAL mezi hodnotou při koncentraci PAL větší a menší než c.m.c.. Pokud hodnota pH roste, klesá postupně množství anionaktivní PAL navázané v podkritické oblasti. Pokud je hodnota pH vysoká, nedochází v této oblasti prakticky k žádnému navázání anionaktivní PAL, v nadkritické oblasti ale přesto dochází k vázání jistého množství anionaktivní PAL. Z toho vyplývá, že při těchto poměrně vysokých hodnotách pH izoelektrického bodu je veškeré navázané množství vázáno

reverzibilně. Křivinka [4] tuto teorii nepotvrdil. Podle očekávání velký počet praní vede k postupné desorpci PAL, které je vázané na bázi elektrostatických sil.

1.3.2 Vliv reakčních podmínek na mechanismus reakce

Interakce PAL s kolagenem jsou významně ovlivněny reakčními podmínkami, ale hlavně výběrem vhodné PAL. Z reakčních podmínek se nejčastěji diskutuje o těchto vlivech: vliv rovnovážné hodnoty pH, vliv iontové síly, vliv rovnovážné koncentrace PAL, vliv doby interakce, vliv teploty prostředí atd.

1.3.2.1 Vliv pH

Heterogenní interakce anionaktivních a kationaktivních PAL, jsou ovlivněny pH reakčního prostředí výrazně. Množství, které bylo navázáno, pak odpovídá stupni protonizace PEL. Bylo zjištěno, že pro amfolyty, mezi něž patří i kolagen, dochází k největší interakci s anionaktivními PAL v kyselé oblasti, kde se PEL vyskytuje jako polykationt. Naopak k největší interakci s kationaktivními PAL dochází v alkalické oblasti, kde se PEL vyskytuje jako polyaniont. Shodně bylo popsáno, že pokud se rovnovážná hodnota pH z kyselé či alkalické oblasti blíží hodnotě pH isoelektrického bodu, klesá celkové množství navázané PAL na substrát. Tuto skutečnost potvrdil i Pankhurst [13], jenž sledoval interakci anionaktivní SDS a kationaktivní CPB s želatinou a kolagenem. Bylo zjištěno, že při pH~2 se pro řadu sulfátů C₈ – C₁₆ naváže vždy stejné množství PAL (0,87 PAL/g želatiny), což odpovídá ekvivalentu bazických skupin v bílkovině. Jestliže se přídavek PAL zvyšoval, zvyšovalo se navázané množství asi na 1,4 mmol SDS na 1 g želatiny. Kationaktivní PAL jsou vázány v rozsahu 1,0 – 1,7 mmol na 1 g želatiny při pH~12 - 13. Při heterogenní interakci PAL s kolagenem došel Pankhurst k obdobným závěrům.

Maldonado [15-17] také studoval interakce s anionaktivními a kationaktivními PAL. Došel k závěru, že v případě anionaktivních PAL hodnota navázaného množství s poklesem pH roste a při pH~2 dosahuje hodnoty 1,8 mmol/g. V případě kationaktivních PAL je tomu naopak. Navázané množství roste s rostoucím pH na hodnotu 0,6 mmol/g.

Studiem interakcí PAL – BAT při různých hodnotách pH Křivinka [4] zjistil, že k navázání maximálního množství SDS na BAT dochází v kyselé oblasti při pH~3 tj. 1,5 mmol/g. Tyto výsledky potvrzují teorii, že s rostoucím pH klesá navázané množství pro SDS i SDBS vlivem klesající protonizace kolagenu.

Štekerová [5] studovala vliv pH na charakter sorpční izotermy SDBS - BAT při pH~3 a pH~6,5. Maximální navázané množství se při pH~3 pohybovalo kolem hodnot 1,5 mmol/g, avšak při pH~6,5 to bylo pouze kolem 0,8 mmol/l. Výsledky nejsou z pohledu tvaru izotermy tak jednoznačné.

1.3.2.2 Vliv iontové síly

Pankhurs [13], Maldonado [15-17] a řada dalších, kteří se zabývali problematikou iontové síly, došli k závěru, že se zvýšením iontové síly v roztoku, vzroste i navázané množství PAL na kolagen. Toho lze dosáhnout přidávkem nízkomolekulárního elektrolytu např. NaCl. Jako důvod uvádí, že je navázáno zvýšené množství PAL na kolagen již při primární sorpci. Dále uvádí, že zvýšením iontové síly roztoku dochází také k poklesu hodnoty c.m.c. dané PAL, takže jsou pak v roztoku přítomny agregáty PAL již při menší koncentraci než je c.m.c. a vlivem této skutečnosti pak dochází k interakci PAL s kolagenem. To zároveň vysvětluje teorii, že navázané množství PAL na daný substrát roste i při nižší koncentraci než je c.m.c. dané PAL.

Křivinka [4] se touto problematikou zabýval také a zjistil, že s rostoucí iontovou silou skutečně zpočátku vzrůstá navázané množství PAL na kolagen. Křivky prochází maximem při iontových silách 60-80 mmol/l a s dalším nárůstem iontové síly následně dochází k poklesu navázaného množství. Také zde upozorňuje na změnu chování PAL při vysokých iontových silách, jejichž následkem by mohlo dojít k jejich vysolení z roztoku.

V případě Štekerové [5] byl zjišťován vliv iontové síly na průběh izoterem jak v kyselém (pH~3) tak i v téměř neutrálním prostředí (pH~6,5). Iontová síla byla dána jednak solemi tvořící pufr a jednak přidávkem NaCl. Získané výsledky jsou zatíženy poměrně velkým rozptylem hodnot, což značně ztěžuje posouzení vlivu iontové síly. Dle Štekerové by k posuzování vlivů pH viz kapitola 1.3.2.1. a iontové síly na celkové navázané množství SDBS na BAT mělo pravděpodobně docházet při nižších teplotách, aby se zamezilo změnám ve vlastnostech BAT (rozpustnost).

1.3.2.3 Vliv teploty reakčního prostředí

Křivinka [4] se zabýval i tímto reakčním faktorem a zjistil, že při teplotě 25°C nelze stanovit izotermu SDBS-BAT, protože dochází k výraznému poklesu navázaného množství SDBS při vyšších rovnovážných koncentracích SDBS v roztoku. Při nižších teplotách již bylo možno izotermu stanovit.

Henriquez [18] se zabýval vlivem teploty reakčního prostředí v kyselé oblasti (pH 2,5) při teplotách 20 a 70°C. V rovnovážném naabsorbovaném množství však při těchto teplotách nezjistil žádné rozdíly. K mnohonásobnému zvýšení navázaného množství PAL však při teplotě 70°C dochází v isoelektrických podmínkách (pH~6). Rozdíly vysvětluje pomocí stabilizační funkce SDS vázaného při pH = 2,5, zatímco při pH = 6 zvýšením teploty dochází k zvětšení počtu reakčních míst umožňujících hydrofobní vazbu dalších molekul SDS.

1.3.3 Objemové změny kolagenu při interakci s PAL

Změna objemu kolagenních vláken je jednou z nejčastějších fyzikálních změn. Loewe a Otto [19] zjistili, že v neutrálním prostředí způsobují PAL hydrotropní botnání kolagenu. Pankhurst prokázal, že nejvíc ovlivňuje zbotnání kolagenu délka řetězce hydrofobní části PAL, kdy maximálního účinku je dosaženo při délce řetězce C₁₄.

Henriquez [18] se zabýval změnou objemu kolagenních vláken při interakci SDS-kolagen. Pracoval při pH 2,5 a pH 6 a při teplotách 22 a 44°C. Výsledky srovnával s chováním BAT v roztocích NaCl a methylsulfátu sodného. Z jeho výsledků vyplývá, že v isoelektrických podmínkách dochází ke zbotnání BAT. Zbotnání při T = 44°C je přibližně třikrát větší než při laboratorních podmínkách. Methylsulfát sodný má na botnání zanedbatelný vliv. Se vzrůstem botnání v izoelektrických podmínkách zároveň výrazně klesá teplota smrštění a to nejvíce při koncentracích SDS blízké c.m.c.. Zvýšené botnání při vyšších teplotách než je teplota smrštění, vysvětluje zvýšeným vázáním SDS v důsledku otevření struktury kolagenu a rovněž zpřístupnění nepolárních částí řetězce kolagenu nepolárními interakcím s hydrofobní částí řetězce SDS. Již relativně malý přídavek SDS (cca 1 mmol roztoku) k nabotnalému BAT v kyselé oblasti (pH~2,5) způsobuje jeho odbotnání. To může být spojeno s kolapsem kolagenní sítě.

Štekerová [5] ve své práci vyjadřovala proces botnání jako hmotnostní (α_m) nebo objemový (α_v) stupeň zbotnání. Uvádí, že α_v je ve většině případů větší než α_m . To mohlo být pravděpodobně způsobeno různou metodikou stanovení, částečným rozpuštěním kolagenu apod. Tendence ve změnách hodnot obou stupňů jsou v závislosti na podmínkách interakce stejné. Z uvedených závislostí je zřejmé, že v kyselé oblasti při nízké iontové síle dochází k vysokému zbotnání BAT ($\alpha_m = 17,7$; $\alpha_v = 15,4$ pro $c_{SDBS} = 0$). Zvyšováním c_{SDBS} docházelo k razantnímu snížení obou stupňů. α_m klesl až na hodnotu $\alpha_m \sim 4$, této hodnoty bylo dosaženo přibližně při c.m.c. SDBS tj. 1,85 mmol/l. Postupným zvyšováním c_{SDBS} se ve

zkoumaném rozsahu α_m dále výrazně nemění. V isoelektrických podmínkách je α_m nižší a pohybuje se pod hodnotou 4. Zvyšováním koncentrace SDBS dochází jen k nepatrnému zvyšování α_m na hodnotu kolem 4.

1.3.4 Interakce se směsí PAL

Turečková [6] se zabývala studiem dvou anionických tenzidů (SDS, SDBS) v molárních poměrech $x = 0,2$ a $x = 0,8$. Porovnávala průběh sorpce vyjádřené sorpční izotermou, jak pro samotné SDS a SDBS, tak i pro jejich směsi a různé iontové síly. Zároveň porovnávala různé hmotnostní stupně zbotnění při pH 6. Z výsledků jejích měření je zřejmé, že celkové navázané množství tenzidů při daných poměrech je výrazně ovlivněno tím tenzidem, který ve směsi převládá. Naadsorbované množství v těchto poměrech není výrazně ovlivňováno iontovou silou dané směsi.

Turečková [6] se také zabývala hmotnostními změnami (α_m) BAT po interakci s PAL. Práci prováděla pouze v pufru o pH~6. Podle očekávání nedocházelo k tak výrazným změnám α_m jako v kyselé oblasti. Uvádí, že v první fázi při nízkých koncentracích PAL a vysoké iontové síle ($I = 0,4$ mol/l), dochází k poklesu α_m z hodnoty $\alpha_m = 3,5$ na hodnoty kolem $\alpha_m = 3,0$ a méně. K tomuto malému poklesu došlo ve všech případech. Při použití nižší iontové síly ($I = 0,06$ mol/l) došlo při vyšších rovnovážných koncentracích (c_R) téměř k 100% nárůstu α_m oproti použití vyšší iontové síly.

Interakcí směsí anionických tenzidů s kolagenními vlákny při různých reakčních podmínkách (iontová síla, pH) se zabýval Krejčí [20]. Zjistil, že v případech s vyššími koncentracemi SDS v reakčních směsích mají izotermy tvar S-izoterm. Dále zjistil, že celkové navázané množství ve směsích je ovlivněno výchozím složením reakční směsi. Na rozdíl od Turečkové [6] zjistil, že navázané množství se zvyšuje se zastoupením SDS ve směsi. Uspořádání interakcí umožnilo měřit i změny ve složení reakčního roztoku po provedené interakci. Ukázalo se, že při nižším zastoupením SDS v reakční směsi ($x_{SDS} = 0,2$) není významně ovlivňováno složení reakční směsi v celém rozsahu interakcí, zatímco při vyšším obsahu SDS ($x_{SDS} = 0,8$) lze pozorovat, že se zvyšující se rovnovážnou koncentrací tenzidů v roztoku, tzn. že se zvyšujícím se navázaným množstvím obou tenzidů, dochází k postupnému poklesu molárního zlomku x_{SDS} z hodnoty kolem 0,8 na hodnotu 0,7, což svědčilo o určité preferenční sorpci SDS při vyšších koncentracích SDS ve směsi. S interakcí směsí tenzidů je spojeno i botnění kolagenních vláken bez ohledu na přítomnost elektrolytů v roztoku. Při pH 6 docházelo vždy k zvyšování stupně botnění z původních 3,5

až na hodnoty $\alpha_m = 12$ (nízká iontová síla) resp. $\alpha_m \sim 7$ (vyšší iontová síla). Bylo prokázáno, že k maximálnímu botnání kolagenu dochází při maximálním navázání tenzidu na kolagenní vlákno.

Studiem interakce směsi anionických a neionických tenzidů se zabýval Maldonado [15-17]. Potvrdil známou skutečnost, že kolagen v rozmezí pH 4 – 7 prakticky nereaguje s žádným neionickým tenzidem, ani jejich směsí. Jinak se chová kolagen při interakci se směsí anionických a neionických tenzidů. Množství navázaného neionického tenzidu je podle Maldonada závislé na množství navázaného anionického tenzidu. Závislost však není jednoznačná. Množství navázaného neionického tenzidu se zvyšuje s navázaným množstvím anionického tenzidu pouze do určitého množství navázaného anionického tenzidu, které odpovídá tzv. primární sorpci tj. vazbě elektrostatickými silami. Při dalším zvyšování navázaných anionických tenzidů dochází podle Maldonada k postupnému poklesu navázaného množství neionického tenzidu. Maldonado [15-17] předpokládá, že neionický tenzid se váže až v oblasti, kdy je zaručena zvýšená hydrofobita kolagenního vlákna (primární sorpce). Při výraznějším množství anionického tenzidu v reakční směsi dochází při adsorpci na kolagen k určité konkurenci mezi daným anionickým a neionickým tenzidem při vazbě hydrofobními interakcemi (sekundární sorpce).

1.3.5 Zhodnocení teoretické části

Interakce tenzidů s kolagenem byly studovány velmi intenzivně již od poloviny minulého století. Byly sledovány především interakce anionického a v menší míře kationického tenzidu a to velmi často při extrémních hodnotách pH (pH 2 a pH 4), které je při běžném styku lidské kůže s prostředky obsahující tenzidy neobvyklé. Interakce byly sledovány velmi často v homogenní fázi buďto s rozpustným kolagenem, případně se želatinou. Tyto interakce jsou schopny posoudit rozsah vázání tenzidu na kolagen, ale nejsou schopny postihnout změny ve vyšších strukturách kolagenu, které se projevují částečnou denaturací kolagenních vláken nebo jejich botnáním. Při literárním studiu bylo nalezeno pouze málo prací, které by se zabývaly interakcí směsi ionického a neionického tenzidu s kolagenem. Tyto práce byly navíc prováděny s tzv. kožním práškem a nebyly u nich sledovány změny ve vyšších strukturách kolagenu.

Cílem této práce bylo určité zaplnění nedostatečných informací o těchto interakcích a měla by být považována za počátek souboru prací, které by se měly danou problematikou zabývat.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

- dodecylsulfát sodný (98%), SIGMA – ALDRICH CHEMIE, s.r.o.
- igepal CA 720, SIGMA – ALDRICH CHEMIE, s.r.o.
- chloroform p.a., PENTA – Chrudim
- modř methylenová p.a., LACHEMA – CHEMAPOL a.s., Brno
- Kyselina sírová p.a., PENTA – Chrudim
- Kyselina citrónová p.a., PENTA – Chrudim
- Hydrogenfosforečnan sodný p.a., LACHEMA – CHEMAPOL a.s., Brno
- Kyselina fosforečná (85%), LACHEMA – CHEMAPOL a.s., Brno
- Kyselina octová (99%), PENTA – Chrudim
- Kyselina boritá p.a., LACHEMA – CHEMAPOL a.s., Brno
- Hydroxid sodný p.a., LACHEMA – CHEMAPOL a.s., Brno
- Dusičnan stříbrný p.a., LACHEMA – CHEMAPOL a.s., Brno
- Kyselina dusičná p.a., PENTA – Chrudim
- Kolagen typu I – BAT (Beef Achille Tendon)

2.2 Použitá zařízení

- KOLORIMETR SPEKOL 11 – Carl Zeis Jena
- SPEKTROFOTOMETR CECIL 3041, Instruments Oxford
- Odstředivka – EBA 20, Hettich

Ostatní zařízení jsou běžným vybavením laboratoře.

2.3 Použité postupy

2.3.1 Příprava BAT

BAT (kolagen typu I) byl získán preparací achillových šlach (Beef Achilles Tendon) z mladých býků. Samotná preparace byla provedena tak, že nejprve byly odděleny elastinové obaly a pak za pomoci skalpelu děleny na menší vlákna o tloušťce cca 1,5 mm a délce kolem 8 cm. Takto připravená vlákna kolagenu byla uložena v 10% solném roztoku NaCl, aby se rozpustily rozpustné bílkoviny.

Vytažená vlákna ze solného roztoku se 8 krát proplachovala destilovanou vodou, aby se vyprala sůl. Důkaz na chloridy byl prováděn tak, že se do zkumavky dalo 5 ml vyprané vody, 1 kapka kyseliny dusičné a 1 kapka 1% roztoku dusičnanu stříbrného. Jestliže vzniknul zákal, pokračovalo se v proplachování destilovanou vodou dál.

Dále byly BATy promývány 96% ethanolem (4 krát), protože etanol je schopen na sebe vázat vodu. Aby byla voda odstraněna úplně, propláchly se BATy ještě 2 krát acetonem. Poté byla vlákna sušena volně na filtračním papíře při běžné laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Vysušená vlákna byla dlouhodobě skladována v mikrotenových sáčkách při teplotě -18 °C.

2.3.2 Stanovení sušiny BAT

Do předem vysušených a zvážených váženek byly naváženy BATy o hmotnosti 0,15 – 0,17 g a při laboratorní teplotě ponechány 48 hodin kondicionovat v exsikátoru nad nasyceným roztokem NH_4NO_3 , což odpovídá 60% relativní vlhkosti. Takto kondicionované BATy byly zváženy s přesností na 4 desetinná místa a ponechány sušit v sušárně při teplotě 104 °C do konstantní hmotnosti.

Sušina kondicionovaného vzorku je definována hmotnostním zlomkem W_{BAT} :

$$W_{\text{BAT}} = \frac{m_2}{m_1} \quad (2)$$

kde

W_{BAT} – sušina kondicionovaného vzorku BAT [g]

m_1 – hmotnost BAT po kondicionování před vysušením [g]

m_2 – hmotnost BAT po vysušení [g]

Hmotnost kondicionovaného BATu byla přepočtena na sušinu podle vztahu:

$$m_0 = m_1 \cdot W_{\text{BAT}} \quad (3)$$

Kde

m_0 – hmotnost BAT přepočteného na sušinu [g]

m_1 – hmotnost kondicionovaného BAT před vysušením [g]

W_{BAT} – sušina kondicionovaného BAT [g]

2.3.3 Příprava zásobních roztoků PAL

V kádince bylo rozpuštěno 0,2564 g SDS, roztok kvantitativně převeden do 0,2 l odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Výsledný zásobní roztok měl koncentraci 4 mmol/l.

Zásobní roztok igepalu CA 720 o koncentraci 4 mmol/l byl připraven rozpuštěním 2,94 g v malém množství destilované vody a následně byl tento roztok kvantitativně převeden do 1 l odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

2.3.4 Spektrofotometrické stanovení SDS metodou methylenové modře

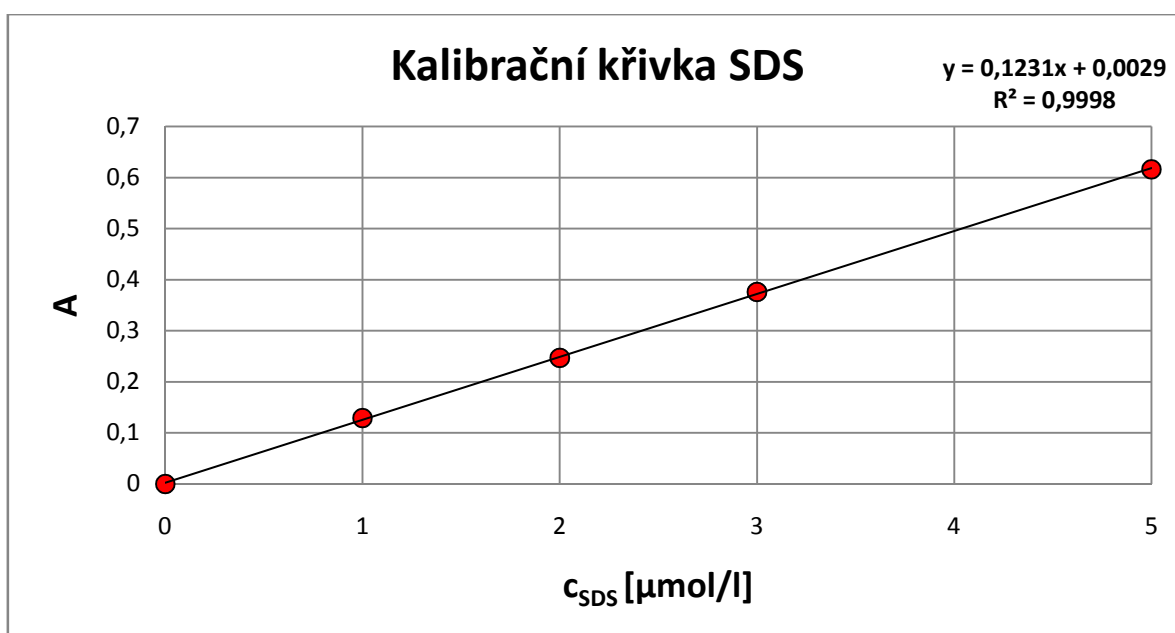
Spektrofotometrické stanovení SDS bylo provedeno metodou, která je uvedena v práci Křivinky [4]. Metoda byla mírně modifikována, a proto je zde uveden celý postup.

Bylo rozpuštěno 0,623g methylenové modře v destilované vodě, poté bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny sírové a roztok doplněn destilovanou vodou do 0,5 l odměrné baňky po rysku.

V destilované vodě bylo rozpuštěno 52,535 g kyseliny citrónové, roztok převeden do 0,5 l odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Do další 0,5 l odměrné baňky byl převeden roztok dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (naváženo 35,814 g). Smícháním těchto dvou roztoků v poměru 1:1 byl připraven pufr, potřebný ke stanovení PAL spektrofotometricky pomocí methylenové modře.

Ze zásobního roztoku SDS viz kapitola 2.3.3. bylo odpipetováno 10 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku (standardní roztok). Ze standardního roztoku se odpipetovalo 5 ml do 100 ml odměrné baňky a roztok byl opět doplněn destilovanou vodou po rysku (pracovní roztok). Do 5 dělicích nálevek bylo postupně odpipetováno 0, 1, 2, 3 a 5 ml pracovního roztoku SDS a doplněno destilovanou vodou na objem 20 ml. Ke

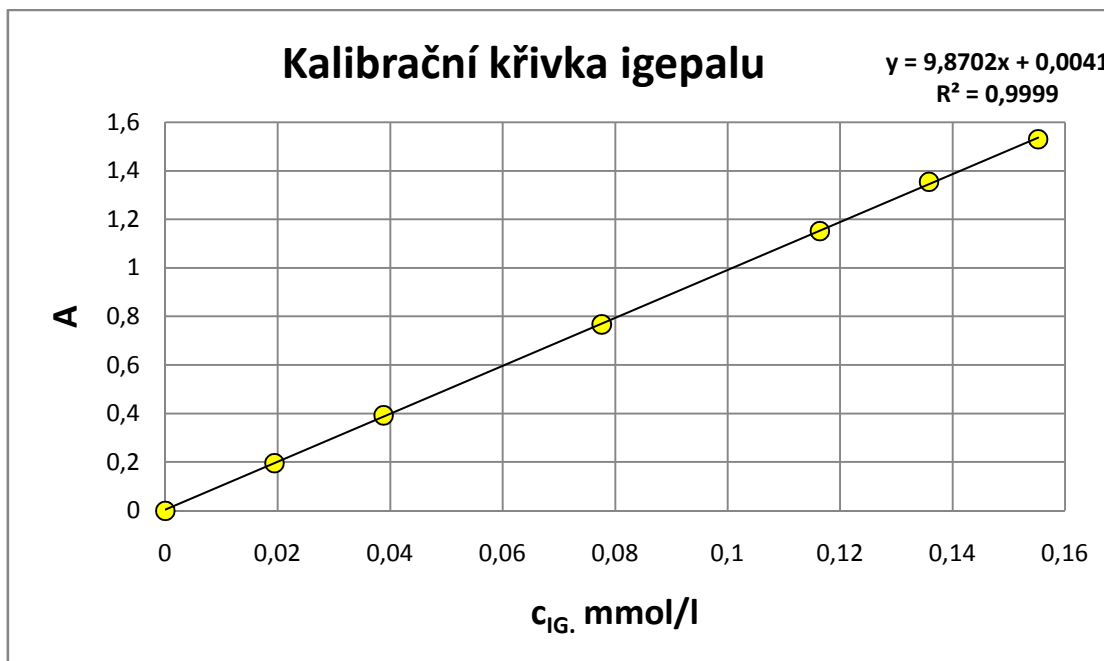
každému roztoku v děličce byl přidán 1 ml methylenové modře, 5 ml pufru (kys. citrónová + hydrogenufosforečnan sodný) a 15 ml chloroformu. Obsah v děličce se cca 2 minuty intenzivně protřepával. Děličky se nechaly zhruba 15 minut odstát. Chloroformová vrstva byla opatrně přepuštěna do odstředivacích zkumavek a odstředována na laboratorní odstředivce při 1000 otáčkách za minutu po dobu 2 minut. Z odstředivacích zkumavek byla čirá chloroformová vrstva postupně převedena pomocí stříkací jehly do kyvety spektrofotometru a proměřena její absorbance při vlnové délce 652 nm proti slepému pokusu (0 ml SDS) na spekolu 11. Z naměřených absorbancí a známých koncentrací SDS byla sestrojena kalibrační přímka. Kalibrační přímka SDS včetně rovnice přímky je uvedena na obrázku 3.



Obrázek 3: Kalibrační křivka SDS

2.3.5 Spektrofotometrické stanovení igepalu CA 720

Vzhledem k chemickému složení igepalu lze stanovit jeho obsah v roztoku spektrofotometricky v UV oblasti. Ze zásobního roztoku viz kapitola 2.3.3. bylo do 100 ml odměrných baněk napipetováno různé množství igepalu od 0,5 - do 4 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Následně byla proměřena koncentrace na spektrofotometru CECIL 3041. Měření proběhlo při vlnové délce 221,5 nm v křemenných kyvetách o optické délce $l = 1$ cm. Kalibrační přímka igepalu včetně rovnice přímky je uvedena na obrázku 4.



Obrázek 4: Kalibrační křivka IGEPALU CA 720

2.3.6 Příprava BAT před interakcí

2.3.6.1 Kondicionování BATu

Bylo naváženo 10 vzorků BATu v rozmezí hmotností 0,15 – 0,17 g. Vzorky byly vloženy do exsikátoru s nasyceným roztokem NH_4NO_3 , který vykazuje relativní vlhkost 60 %. Kondicionování probíhalo 48 hodin při laboratorní teplotě.

2.3.6.2 Rozmáčení BATu

Zvážené kondicionované BATy byly vloženy do kádinek s 20 ml destilované vody nebo pufru o příslušném pH a uzavřeny alobalem. Rozmáčení trvalo 24 hodin při laboratorní teplotě. Po rozmáčení byly BATy důkladně osušeny na filtračním papíře a zváženy.

2.3.7 Příprava pracovních roztoků SDS a igepalu pro vlastní interakci s BAT

Pro vlastní interakci BAT byly připraveny pufrы o pH 6,0 a pH 4,0. Smícháním kyseliny fosforečné, octové, borité v požadovaném množství byl připraven první zásobní roztok (Britton-Robinsonův roztok). Rozpuštěním vypočteného množství hydroxidu sodného byl připraven druhý 0,2 M zásobní roztok. Potřebného pH bylo dosaženo smícháním zásobních roztoků standardním způsobem, který je uveden v chemických tabulkách [21]. Výsledné

pH bylo proměřeno a upraveno pomocí digitálního pH metru na požadovanou hodnotu pH 6,0 a pH 4,0.

Zásobní roztok SDS byl připraven rozpuštěním 6,3454 g v malém množství příslušného pufru, roztok kvantitativně převeden do 1 l odměrné baňky a doplněn puftrem po rysku. Stejně tak byl připraven i zásobní roztok igepalu CA 720 s tím rozdílem, že ho bylo naváženo 14,7852 g.

Ze zásobního roztoku SDS a igepalu v pufru o pH 6,0 nebo 4,0 a koncentraci 20 mmol/l byly připraveny pracovní roztoky SDS v rozmezí o koncentraci 0,05 – 15 mmol/l (0,05; 0,1; 0,5; 1; 3; 5; 7; 9; 12; 15 mmol/l) následujícím postupem. Do 100 ml odměrných baněk bylo napipetováno příslušné množství SDS a baňky doplněny puftrem o příslušném pH po rysku. Množství SDS bylo vypočteno dle vzorce:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (4)$$

Kde

c_1 – příslušná koncentrace pracovního roztoku [mmol/l]

V_1 – objem odměrné baňky [ml]

c_2 – koncentrace zásobního roztoku SDS [mmol/l]

V_2 – vypočtený objem pipetovaný ze zásobního roztoku [ml]

Stejný postup byl proveden i u přípravy pracovních roztoků igepalu.

Dále bylo připraveno 10 pracovních roztoků směsi SDS a igepalu v poměru 3:1 (koncentrace roztoků SDS 0,05 – 15 mmol/l). Např. 15 milimolární pracovní roztok SDS obsahoval 5 mmol/l igepalu. Tato směs byla připravena jen v pufru o pH 6,0.

Následně bylo připraveno 10 pracovních roztoků obou PAL v poměru 1:1, kde byla koncentrace roztoků upravena na 0,05 – 10 mmol/l (0,05; 0,1; 0,5; 1; 3; 4; 5; 7; 9; 10 mmol/l).

2.3.8 Stanovení reakční doby interakce PAL –BAT

Literární zdroje uvádí rozdílné údaje o dosažení určité rovnováhy mezi PAL – BAT, a proto bylo nutné před vlastním měřením stanovit optimální reakční dobu tzv. kinetiku sorpce. Ze zásobních roztoků viz. kapitola 2.3.3. byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci 2 mmol/l a 4 mmol/l pro obě PAL. Do erlenmayerových baněk bylo napipetováno 50 ml příslušného pracovního roztoku. Do nich byl vpraven kondiciovaný viz kapitola 2.3.6.1. a

rozmáčený (24 hodin) BAT v 20 ml destilované vody. Baňky se nechaly stát a vždy zhruba po 24 hodinách byl odebrán vzorek, vhodně naředěn a následně byla spektrofotometricky stanovena rovnovážná koncentrace obou PAL. Třetí a čtvrtý den se rovnovážné koncentrace téměř nelišily. Pátý den byla rovnovážná koncentrace u obou PAL stejná jako čtvrtý den, a proto byla stanovena čtyřdenní optimální reakční doba.

2.3.9 Vlastní interakce BAT s tenzidy

Kondicionované viz kapitola 2.3.6.1. a rozmáčené viz kapitola 2.3.6.2. BATy byly vytaženy z pufru a důkladně osušeny na filtračním papíře. Všechny vzorky byly zváženy s přesností na 4 desetinná místa a postupně vpraveny do erlenmayerových baněk s 50 ml pracovního roztoku o příslušné známé počáteční koncentraci tenzidů (c_P). Směs se nechala stát v baňkách 4 dny, což je nutná reakční doba k ustálení koncentrace. Po 4 dnech byly BATy znovu za pomoci pinzety vytaženy, důkladně osušeny na filtračním papíře a zváženy (hmotnost m_c). U těchto BATů byl stanoven stupeň zbotnění α a zároveň stanovena rovnovážná koncentrace (c_R) SDS a igepalu.

Rovnovážná koncentrace SDS byla stanovena spektrofotometricky metodou methylenové modře viz kapitola 2.3.4., s tím rozdílem, že ze zásobního roztoku PAL v pufru bylo do děličky napipetováno vždy 20 ml PAL. Vzorky však musely být vhodně naředěny tak, aby jejich koncentrace byla v rozsahu koncentrací kalibrační přímky (0 do 5 $\mu\text{mol/l}$). Pro eliminaci případných chyb se vzorky ředily na koncentraci kolem 3 $\mu\text{mol/l}$. Byla zjištěna hodnota absorbance a z ní za pomoci kalibrační křivky vypočtena hodnota rovnovážné koncentrace c_R .

Rovnovážná koncentrace igepalu byla stanovena podle postupu v kapitole 2.3.5.. Vzorky byly naředěny tak, aby hodnota koncentrace byla v rozsahu kalibrace, což bylo 0 – 0,152 mmol/l. Z předchozích prací provedených na Technologické fakultě ve Zlíně je známo, že hodnotu adsorbance ovlivňuje samotný pufr, a proto bylo stanovení provedeno tak, že místo klasického slepého pokusu (destilovaná voda), byl slepý pokus, pufr, naředěn stejně jako měřený vzorek. Nakonec bylo vypočteno navázané množství Q_t a hmotnostní stupeň zbotnění α .

Hmotnostní stupeň zbotnění BAT α

$$\alpha = \frac{m_c}{m_0} \quad (5)$$

Kde

 α – hmotnostní stupeň zbotnění BAT m_c – hmotnost BAT po interakci se SDS, popř. igepalu [g] m_0 – hmotnost kondicionovaného BATu přepočteného na sušinu [g]**Výpočet navázaného množství Q_t**

$$Q_t = \frac{(c_P - c_R) \cdot V}{m_0} \quad (6)$$

Kde

 Q_t – navázané množství SDS na BAT [mmol/g] c_P – počáteční koncentrace SDS v roztoku přidanému k BAT [mmol/l] c_R – rovnovážná koncentrace SDS v roztoku po interakci s BAT [mmol/l] V – objem pracovního roztoku přidaný ke kondicionovanému BATu [l] m_0 – hmotnost kondicionovaného BATu přepočteného na sušinu [g]

Podle stejného vztahu bylo vypočteno navázané množství igepalu.

Celkové navázané množství PAL $\sum Q_t$ bylo vypočteno:

$$\sum Q = Q_{t \text{ SDS}} + Q_{t \text{ ig.}} \quad (7)$$

Kde

 $Q_{t \text{ SDS}}$ – navázané množství SDS [mmol/g] $Q_{t \text{ ig.}}$ – navázané množství igepalu [mmol/g]**Molární zlomek x_{SDS} byl vypočten:**

$$x_{\text{SDS}} = \frac{c_{R \text{ SDS}}}{c_{R \text{ SDS}} + c_{R \text{ IG.}}} \quad (8)$$

Kde

 x_{SDS} – molární zlomek SDS $c_{R \text{ SDS}}$ – rovnovážná koncentrace SDS [mmol/l] $c_{R \text{ IG.}}$ – rovnovážná koncentrace igepalu [mmol/l]

3 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

Byla sledována interakce mezi kolagenními vlákny ve formě BAT se SDS, igepalem CA 720 a jejich směsmi v poměru 3:1 a 1:1 při pH 4 a 6. Byly stanoveny sorpční izotermy a hmotnostní stupně zbotnění (viz kapitola 2.3.9.). Vzhledem k izoelektrickému bodu kolagenu ($pI \sim 7$) se v obou případech kolagen jeví jako polykationt. Při pH 4 je nábojová hustota u kolagenních vláken vyšší, a proto se předpokládá, že interakce s anionickým SDS bude taktéž vyšší. Druhé zvolené pH, tj. pH 6, bylo vybráno záměrně s ohledem na praktické využívání prostředků obsahujících anionické tenzidy při styku s lidskou kůží. Podle předpokladu by rozsah interakcí měl být nižší než v případě interakcí při pH 4. Vzhledem k této skutečnosti bude provedena diskuse výsledků podle hodnot pH, při kterých byly interakce prováděny.

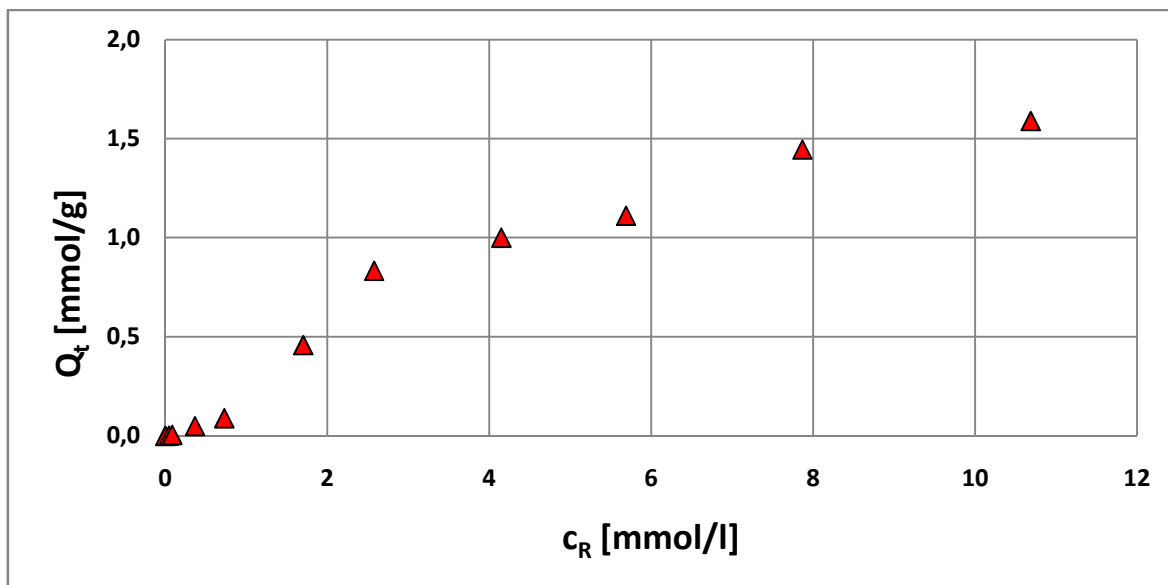
3.1 Interakce při pH 6

3.1.1 Interakce samotných tenzidů

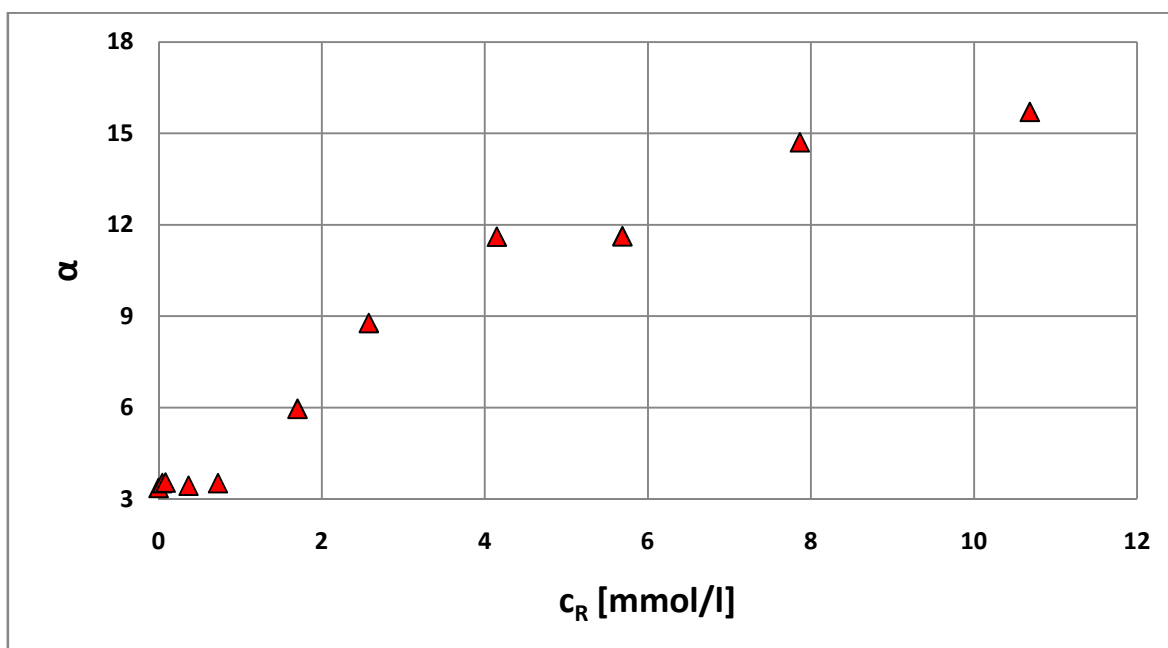
Výsledky ve formě tabulek a obrázků znázorňujících průběh sorpčních izoterem a hmotnostních stupňů zbotnění, budou diskutovány nejprve pro samotné tenzidy a posléze pro jejich směsi 3:1 a 1:1. Výsledky pro SDS jsou uvedeny v tabulce 1 a na obrázcích 5 a 6.

Tabulka 3: Souhrnné výsledky pro interakci kolagenu se SDS při pH 6

č.	m_0 [g]	c_P SDS [mmol/l]	c_R SDS [mmol/l]	Q_t SDS [mmol/g]	α
0	0,1466	0	0	0	3,3588
1	0,1395	0,05	0,045	0,0018	3,5213
2	0,1389	0,1	0,085	0,0054	3,5376
3	0,1352	0,5	0,366	0,0495	3,4315
4	0,1526	1	0,728	0,0891	3,5166
5	0,1416	3	1,703	0,4580	5,9585
6	0,1448	4,99	2,578	0,8329	8,7743
7	0,1421	6,99	4,149	0,9999	11,6042
8	0,1486	8,99	5,689	1,1104	11,6191
9	0,1424	11,98	7,867	1,4444	14,7034
10	0,1352	14,98	10,687	1,5880	15,6999



Obrázek 5: Sorpční izoterma pro čisté SDS při pH 6



Obrázek 6: Hmotnostní stupeň zbotnění pro čisté SDS při pH 6

Z obrázku 5 je zřejmý tvar izotermy. Ukazuje se, že podobně jako v případě homogenních interakcí anionický tenzid - kolagen (želatina), existuje určité rozmezí rovnovážných koncentrací SDS, při kterých je adsorpce na BAT velmi nízká. V našem případě rovnovážná koncentrace leží těsně pod 1 mmol/l. Tuto část adsorpční křivky lze přičíst především sorpci SDS na základě elektrostatických sil (primární sorpce). Výsledky jsou v dobrém souladu s obdobnými výsledky, které byly dosaženy při interakci anionických surfaktantů

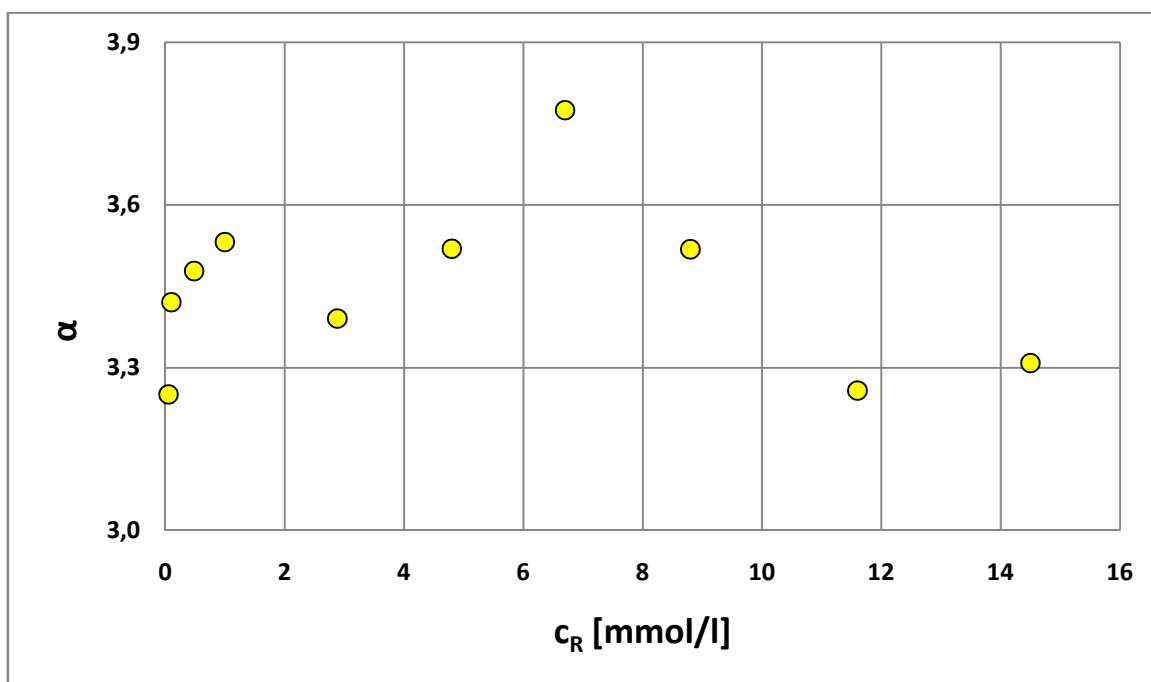
(SDS, SDBS) při obdobných reakčních podmínkách [4,20]. Tomu odpovídá i navázané množství SDS, které se pohybuje na úrovni cca $Q_t = 0,1$ mmol/g. Při zvyšování rovnovážné koncentrace dochází k postupnému nárůstu navázaného množství, až do hodnoty Q_t cca 1,6 mmol/g. Výsledná hodnota navázaného SDS odpovídá výsledkům dosažených při obdobných měřeních [6,20]. Nutno podotknout, že výsledné navázané množství je často ovlivňováno stavem vlastního substrátu (stáří, způsob přípravy apod.). To je důvodem, proč se hodnoty maximálně navázaného množství mohou případ od případu lišit [4].

Závislost hmotnostního stupně zbotnání na rovnovážné koncentraci SDS (obr. 6) v podstatě kopíruje adsorpční izotermu samotného SDS. Podobně, jako v případě izotermy existuje určitá lagová fáze, při které kolagenní vlákna prakticky nebotnají. Tato část závislosti odpovídá té části izotermu, která byla označena jako primární sorpce. Rovnovážná koncentrace je tedy prakticky stejná a je menší než 1 mmol/l, na rozdíl od naadsorbovaného množství, které postupně i při těchto nízkých rovnovážných koncentracích SDS vzrůstá viz tab. 1. Hmotnostní stupeň zbotnání má tendenci být až do koncentrace 1 mmol/l prakticky konstantní. Nízký stupeň zbotnání v této oblasti lze přičíst postupné adsorpci SDS na kolagenní vlákno, která zabezpečuje vysoký stupeň hydrofobnosti daného vlákna. Další zvyšování rovnovážné koncentrace SDS vede k postupnému nárůstu hmotnostního stupně zbotnání až na hodnotu přibližně 15. Tento nárůst lze přičíst postupné adsorpci dalších molekul SDS na základě hydrofobních interakcí (sekundární adsorpce), která postupně zvyšuje hydrofilitu vláken a tím umožňuje zvýšené botnání.

Výsledky interakce igepalu s BAT pro pH 6 jsou uvedeny v tabulce 2 a na obrázku 7.

Tabulka 4: Souhrnné výsledky pro interakci BAT s igepalem při pH 6

č.	m_0 [g]	c_P [mmol/l]	c_R [mmol/l]	Q_t [mmol/g]	α
0	0,1466	0,026	0,033	-0,0024	3,3588
1	0,1521	0,048	0,051	-0,0010	3,2509
2	0,1373	0,095	0,098	-0,0011	3,4209
3	0,1513	0,475	0,48	-0,0017	3,4783
4	0,1475	0,95	0,995	-0,0153	3,5319
5	0,1466	2,85	2,88	-0,0102	3,3908
6	0,1504	4,75	4,8	-0,0166	3,5193
7	0,1436	6,65	6,7	-0,0174	3,7748
8	0,1534	8,55	8,8	-0,0815	3,5184
9	0,1373	11,4	11,6	-0,0728	3,2578
10	0,1532	14,25	14,5	-0,0816	3,3086



Obrázek 7: Hmotnostní stupeň zbotnění igepalu při pH 6

Na rozdíl od adsorpce SDS není uvedena adsorpční izoterma igepalu. Z tabulky 2 je zřejmé, že navázané množství igepalu je ve všech případech záporné. Je ovšem vidět, že hodnoty Q_t jsou velmi nízké zejména při nižších počátečních a tedy i rovnovážných koncentracích igepalu. Se zvyšující se rovnovážnou koncentrací dochází ovšem i k nárůstu navázaného množství (v absolutní hodnotě). Podle našeho názoru, je tento výsledek dán jednak

chybou metody měření, ale také při vyšších koncentracích igepalu, se může uplatňovat i jeho případný hydrotropní efekt. Ten však nebyl jednoznačně prokázán a ani v literatuře nebyla nalezena zmínka o takovém chování neionických tenzidů. Je možné, že vyšší koncentrace igepalu mohou vést k uvolňování některých složek z BAT, které jsou schopny adsorpce v UV oblasti při podobných vlnových délkách jako igepal. Tomuto problému bude na pracovišti věnována podrobnější pozornost později. Přesto se zdá, že za daných podmínek není samotný igepal schopen významnější adsorpce na BAT. To je v souladu s výsledky uváděnými např. Maldonadem [15-17].

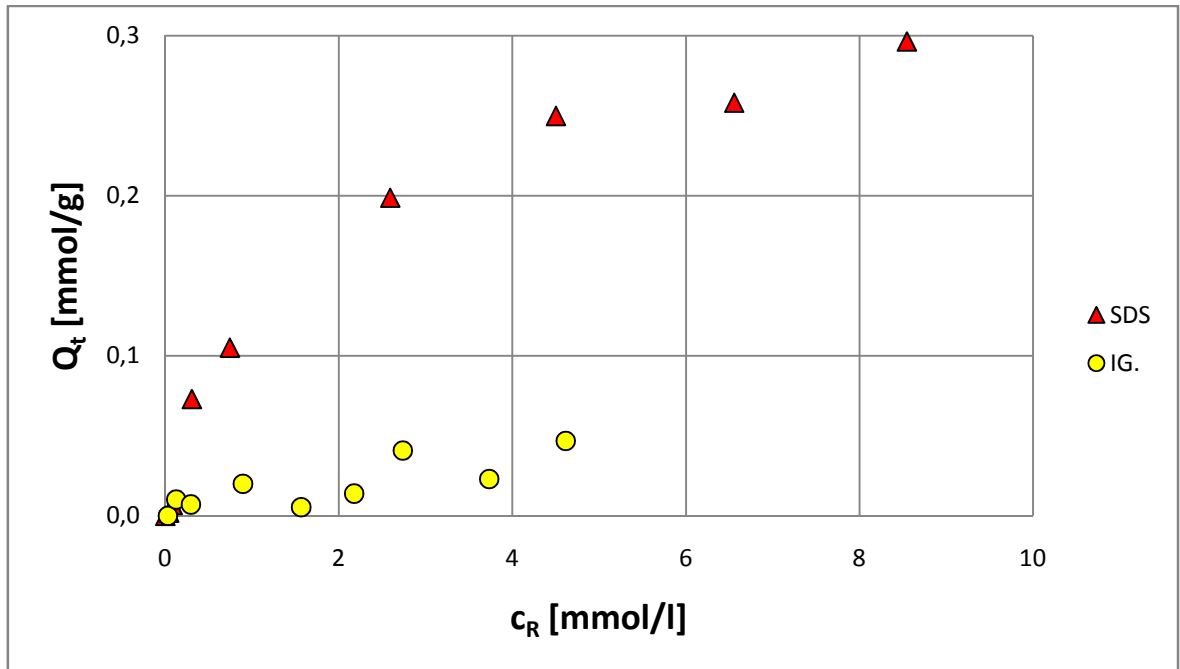
Průběh a velikost hmotnostního stupně zbotnění BATu v případě přítomnosti igepalu je uveden na obrázku 7. Z obrázků je zřejmé, že stupeň zbotnění se pohybuje bez ohledu na velikost rovnovážné koncentrace igepalu mezi hodnotami 3,2 až 3,55. To je hodnota, která je velmi blízká botnění kolagenu v čistém pufru o pH~6 (3,25). Rozptyl hodnot zjištěných v průběhu měření není podle našeho názoru příliš významný vzhledem ke způsobu stanovení hmotnostního stupně zbotnění viz kapitola 2.3.9. Lze tedy tvrdit, že samotný igepal v rozmezí použitých koncentrací a při daných reakčních podmínkách nezpůsobuje významnější botnění kolagenních vláken.

3.1.2 Interakce směsí tenzidů

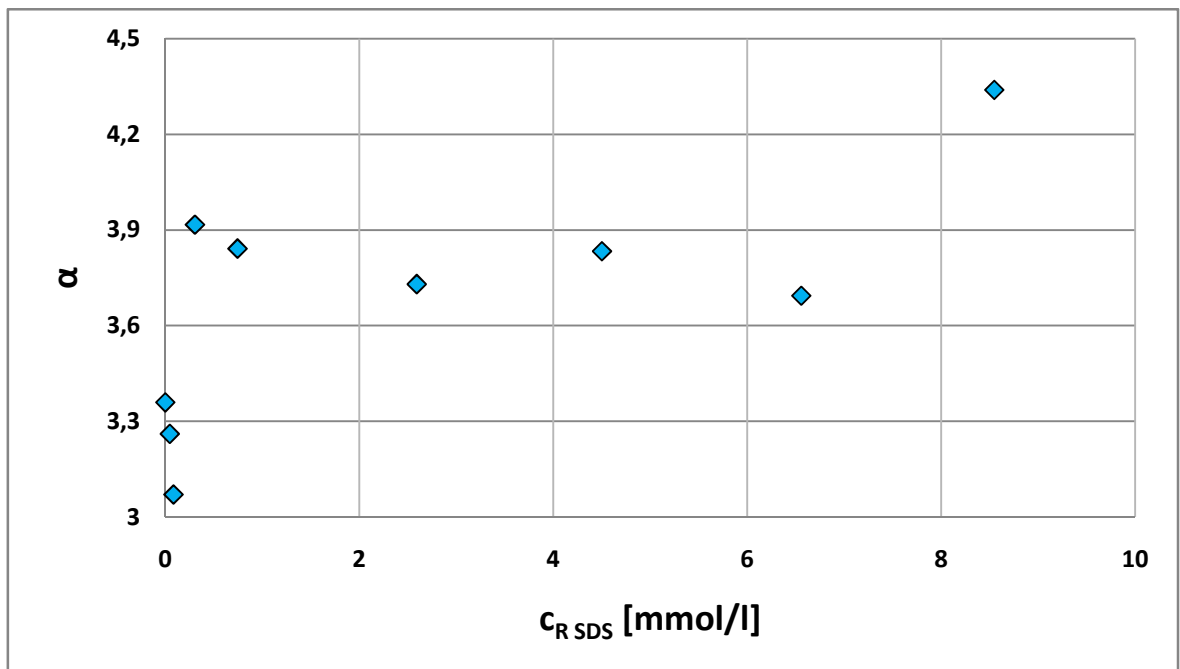
Při pH 6 byly hodnoceny interakce se směsmi SDS a igepalu v poměrech 3:1 a 1:1. V první fázi bude provedena diskuze chování směsi 3:1, která má vyšší obsah SDS ve směsi a kde by se dalo předpokládat, že projevy chování směsi budou větší než u směsi 1:1. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 3 a na obrázcích 8 a 9.

Tabulka 5: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se směsí 3:1

č.	m_0 [g]	c_P SDS [mmol/l]	c_P IG. [mmol/l]	c_R SDS [mmol/l]	c_R IG. [mmol/l]	Q_t SDS [mmol/g]	Q_t IG. [mmol/g]	α	$x_{SDS r}$
0	0,1466	0	0,026	0	0,033	0	-0,0024	3,3588	-
1	0,1517	0,052	0,016	0,046	0,023	0,0020	-0,0023	3,2601	0,6667
2	0,1488	0,104	0,032	0,084	0,035	0,0067	-0,0010	3,0700	0,7059
3	0,1474	0,52	0,158	0,305	0,128	0,0730	0,0102	3,9165	0,7044
4	0,1409	1,04	0,317	0,744	0,297	0,1051	0,0071	3,8414	0,7147
5	0,1328	3,12	0,95	2,592	0,897	0,1987	0,0199	3,7300	0,7429
6	0,1397	5,2	1,583	4,502	1,568	0,2499	0,0054	3,8330	0,7417
7	0,1401	7,28	2,217	6,557	2,178	0,2581	0,0139	3,6935	0,7507
8	0,1372	9,36	2,85	8,547	2,738	0,2963	0,0408	4,3391	0,7574



Obrázek 8: Sorpční izoterma pro směs SDS a igepalu v poměru 3:1



Obrázek 9: Hmotnostní stupeň zbotnění BAT ve směsi 3:1

Způsob vyhodnocování rovnovážných koncentrací SDS a igepalu umožnil stanovit adsorpci obou tenzidů samostatně a zároveň umožnil zjistit změny ve složení směsi tenzidů po adsorpci. Z obrázku 8 sorpční izotermy je zřejmé, že SDS sorbuje na BAT významně více než igepal. Na druhou stranu je ovšem nutné podotknout, že na rozdíl od adsorpce samotného igepalu dochází v této směsi i k pozitivní sorpci igepalu. Na tvaru izotermy pro SDS

této směsi nelze na rozdíl od adsorpce samotného SDS pozorovat lagovou fázi izotermy. Zdá se tedy, že ze směsi SDS igepal dochází k adsorpci SDS na základě jednoduché izotermy. Navázané množství SDS je ovšem výrazně nižší, než navázané množství SDS v případě čistého SDS a dosahuje přibližně 0,3 mmol/g, tzn. přibližně 20 % z navázaného množství samotného SDS. Maximální množství navázaného igepalu dosahuje asi 0,04 mmol/g. Je otázkou, na kolik je toto množství ovlivněno chováním igepalu k BAT, jak bylo diskutováno při interakci BAT igepal viz kapitola 3.1.1.

Jak již bylo řečeno, způsob vyhodnocování interakce umožnil zjistit změny ve složení roztoku směsi tenzidů po interakci. Aktuální složení směsi pro každý bod závislosti byl vyjádřen pomocí molárního zlomku x_{SDS} a je uveden v tabulce 3. Molární zlomek x_{SDS} v počáteční reakční směsi byl vždy konstantní. x_{SDS} počáteční měl vždy hodnotu 0,75. Z tabulky 5 je patrné, že složení rovnovážné směsi se odlišuje od počátečního x_{SDS} . Je zřejmé, že při nižších počátečních koncentracích jsou hodnoty x_{SDS_r} nižší, než odpovídá počátečnímu x_{SDS} . Se zvyšujícími se počátečními koncentracemi obou tenzidů ve směsi postupně roste x_{SDS_r} a při vysokých počátečních koncentracích, kdy dochází k postupnému ustalování navázaného množství, přesahuje svojí hodnotou x_{SDS} počáteční. Z tohoto průběhu změn ve složení rovnovážných koncentrací tenzidů vyplývá, že při adsorpcích s nižšími počátečními koncentracemi obou tenzidů dochází k přednostní adsorpci SDS. To je v částečném rozporu se zjištěními, které uvádí Maldonado [15-17], protože z našich výsledků vyplývá, že ve směsi dochází k současné adsorpci obou tenzidů a zároveň se zvyšujícími se počátečními koncentracemi obou tenzidů narůstá i jejich navázané množství. Maldonado [15-17] totiž předpokládá, že k adsorpci neionického tenzidu dochází až po navázání dostatečného množství anionického tenzidu. Po dosažení množství převyšující primární adsorpci dochází k postupnému poklesu vázání neionického tenzidu.

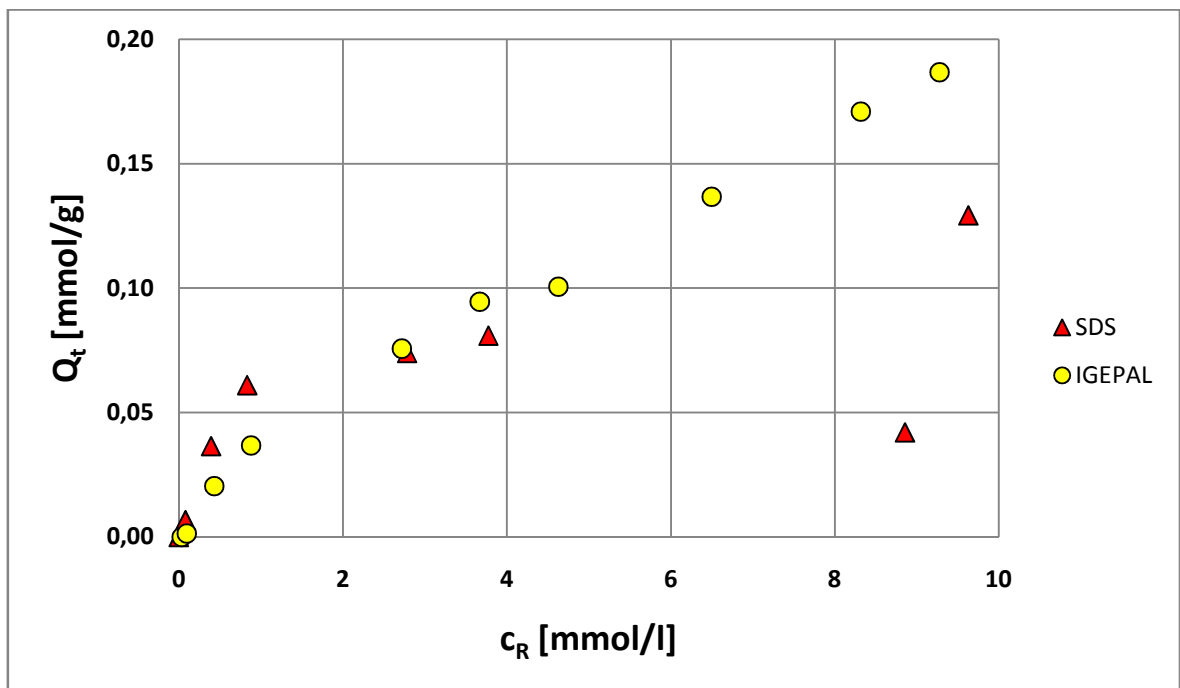
Na obrázku 9 je znázorněna závislost hmotnostního stupně zbotnění na rovnovážné koncentraci SDS ve směsi. Tato závislost je uvedena proto, že SDS daleko výrazněji ovlivňuje zbotnění kolagenních vláken než igepal. Z obrázku 9 je patrné, že již při velmi nízkých koncentracích SDS dojde ke vzrůstu α z hodnot přibližně 3,2 na hodnoty kolem 3,9. V dalším průběhu se zvyšuje hmotnostní stupeň zbotnění na hodnotu přibližně 4,4. Ukazuje se, že podobně jako v případě adsorpce samotného SDS a směsi SDS igepal 3:1 i hmotnostní stupeň zbotnění výrazně poklesl na hodnotu kolem 35 % z hodnoty samotného SDS. Pokud bychom vyjádřili závislost hmotnostního stupně zbotnění na \sum rovnovážných koncentrací

obou tenzidů ve směsi, nedojde přirozeně k ovlivnění hodnot hmotnostního stupně, pouze se mírně posune jejich závislost na rovnovážné koncentraci tenzidů.

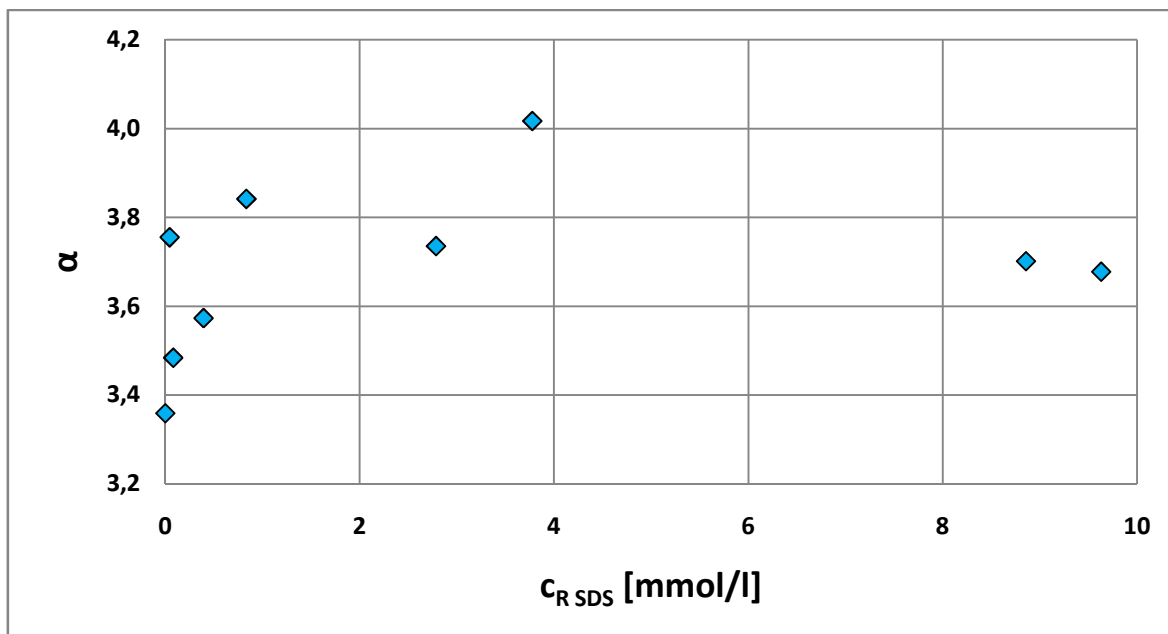
Výsledky pro interakci směsi SDS igepal 1:1 jsou uvedeny v tabulce 4 a na obrázcích 10 a 11.

Tabulka 6: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se směsí SDS igepal 1:1

č.	m_0 [g]	c_P SDS [mmol/l]	c_P IG. [mmol/l]	c_R SDS [mmol/l]	c_R IG. [mmol/l]	Q_t SDS [mmol/g]	Q_t IG. [mmol/g]	α	$x_{SDS r}$
0	0,1466	0	0,026	0	0,033	0	-0,024	3,3588	-
1	0,1328	0,05	0,049	0,044	0,052	0,0023	-0,0011	3,7549	0,4583
2	0,1413	0,1	0,098	0,081	0,094	0,0067	0,0014	3,4837	0,4629
3	0,1466	0,5	0,49	0,393	0,43	0,0365	0,0205	3,5729	0,4775
4	0,1360	1	0,98	0,834	0,88	0,0610	0,0368	3,8413	0,4866
5	0,1453	3	2,94	2,785	2,72	0,0740	0,0757	3,7352	0,5059
6	0,1322	3,99	3,92	3,776	3,67	0,0809	0,0946	4,0166	0,5071
7	0,1343	4,99	4,9	5,011	4,63	-0,0078	0,1005	3,7011	0,5198
8	0,1316	6,99	6,86	7,102	6,5	-0,0426	0,1367	3,6775	0,5221
9	0,1463	8,98	8,82	8,857	8,32	0,0420	0,1709	4,0031	0,5156
10	0,1393	9,99	9,8	9,63	9,28	0,1293	0,1867	3,6128	0,5093



Obrázek 10: Sorpční izoterma pro směs SDS a igepalu v poměru 1:1 při pH 6



Obrázek 11: Hmotnostní stupeň zbotnání BAT ve směsi 1:1 při pH 6

Adsorpční izoterma pro oba tenzidy je uvedena na obrázku 10. Z hlediska SDS se chovala tato směs poněkud anomálně a to zejména pro některé vybrané koncentrace. Z tabulky 4 je vidět, že pro počáteční koncentrace přibližně 5 a 7 mmol/l došlo k propadu navázaného množství SDS do záporných hodnot. Oba body této závislosti byly několikrát proměřovány a vždy došlo k obdobnému propadu Q_t SDS. Pro toto chování směsi nemáme žádné vysvětlení. Z obrázku 10 je vidět, že při nižších koncentracích obou tenzidů dochází k nepatrně zvýšené sorpci SDS ve srovnání s adsorpcí igepalu. Zatímco v další fázi izotermy dochází k postupnému narůstání naadsorbovaného množství igepalu, které je od rovnovážné koncentrace cca 4 mmol/l větší než odpovídající hodnoty pro SDS. Tomu odpovídají i změny ve složení roztoků tenzidů po interakci, které jsou opět vyjádřeny jako x_{SDSf} . Podobně jako v předchozím případě je z průběhu těchto hodnot zřejmé, že při počátečních koncentracích obou tenzidů dochází k preferenčnímu vázání SDS. Tato preferenční sorpce trvá až do hodnoty Q_t SDS kolem 0,07 mmol/g, což odpovídá přibližně množství SDS, který může naadsorbovat na kolagenní vlákna při pH 6 a blízké iontové síle pomocí elektrostatických interakcí [20]. Zdá se, že v další fázi, kdy se začínají uplatňovat hydrofobní interakce se může vázat větší množství neionického tenzidu. Tomu odpovídají i vyšší hodnoty x_{SDSf} ve výše uvedené tabulce. Celkové navázané množství obou tenzidů v rovnováze lze předpokládat někde na úrovni 0,3 – 0,35 mmol/g, což odpovídá přibližně navázanému množství obou tenzidů pro směs 3:1.

Průběh hmotnostního stupně zbotnění v závislosti rovnovážné koncentrace je uveden na obrázku 11. Z výsledků je patrné, že při dosažení rovnovážné koncentrace přibližně 1 mmol/l dochází k určitému ustálení hodnot hmotnostního stupně zbotnění. Rovnovážné hodnoty kolísají v rozmezí 3,7 – 4,0, což odpovídá způsobu stanovení této veličiny. Výsledný rovnovážný stupeň zbotnění je pouze nepatrně menší, než hmotnostní stupeň zbotnění směsi 3:1. Zdá se tedy, že přítomnost igepalu podstatně ovlivňuje hmotnostní stupeň zbotnění. Množství igepalu ve zkoumaných směsích, tj. 3:1 a 1:1, však už výrazněji tento stupeň neovlivňuje.

3.2 Interakce při pH 4

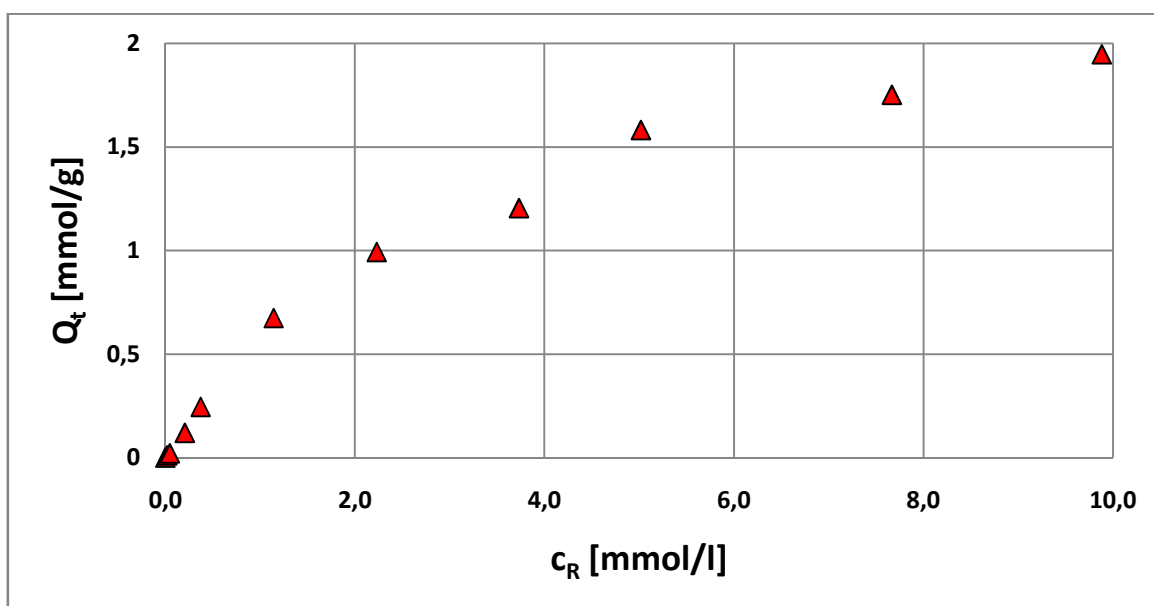
3.2.1 Interakce samotných tenzidů

Vzhledem k tomu, že literární údaje i naše výsledky interakce neionického tenzidu s kolagenem byly nevýznamné, nebylo provedeno stanovení adsorpční izotermy a stanovení hmotnostního stupně zbotnění v plném rozsahu koncentrací. Bylo zjištěno, že pro nízké počáteční koncentrace je Q_t rovno prakticky nule, zatímco pro koncentraci 12 mmol/l, bylo překvapivě zaznamenáno poměrně vysoké navázání igepalu ($Q_t \sim 0,3$ mmol/g). Vzhledem k nedostatku času nebylo možno stanovit již kompletní sorpční izotermu a hmotnostní stupeň zbotnění. Na rozdíl od roztoku SDS, popřípadě jeho směsi s igepalem nezpůsobil tento přídavek igepalu snížení stupně zbotnění, naopak došlo k jeho mírnému zvýšení z hodnoty $\alpha \sim 20$ na $\alpha \sim 24$. Z toho lze usoudit, že samotný igepal i přes určitou interakci s kolagenem v kyselé oblasti pravděpodobně zvyšuje dále hydrofilitu kolagenních vláken, popřípadě jinak působí na nadmolekulární struktury vláken, což se projeví jejich zvýšením α .

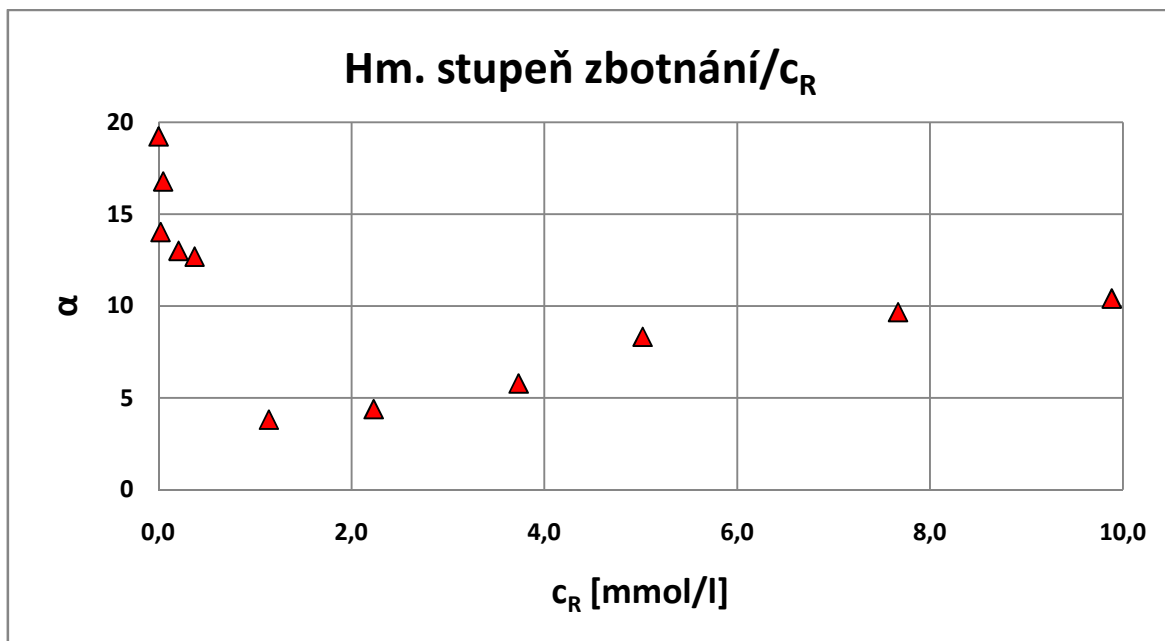
Výsledky pro interakci SDS s BAT při pH 4 jsou uvedeny v tabulce 7 a na obrázcích 12 a 13. Z obrázku 12 je zřejmé, že na rozdíl od adsorpce SDS při pH 6 má adsorpční izoterma prakticky klasický tvar. Toto je poněkud překvapující zjištění vzhledem k tomu, že při pH 4 je kolagen ve formě polykationtu a že by tedy v první fázi adsorpce tzn. při nižších počátečních koncentracích mělo docházet k interakcím převážně na bázi elektrostatických sil. To by se mělo projevit lagovou fází při navázaném množství Q_t asi 1 - 1,1 mmol/g [4]. Na druhé straně je pravdou, že obdobný tvar adsorpční izotermy získali i jiní autoři [15-17]. Maximální navázané množství $Q_{t \text{ SDS}}$ je přibližně 1,95 mmol/g, což je v dobrém souladu s výsledky dosažených Křivinkou [4] a jsou jen nepatrně vyšší než podobná stanovení prováděná Maldonadem [15-17].

Tabulka 7: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se SDS při pH 4

č.	m_0 [g]	c_P SDS [mmol/l]	c_R SDS [mmol/l]	Q_t SDS [mmol/g]	α
0	0,1464	0	0	0	19,2219
1	0,1445	0,051	0,0200	0,0107	14,0246
2	0,1354	0,103	0,0470	0,0207	16,7746
3	0,1282	0,513	0,2060	0,1197	13,0032
4	0,1332	1,025	0,3730	0,2447	12,6851
5	0,1433	3,075	1,1430	0,6739	3,8216
6	0,1458	5,125	2,2300	0,9926	4,3887
7	0,1429	7,175	3,7320	1,2043	5,7869
8	0,1330	9,225	5,0180	1,5816	8,3239
9	0,1323	12,3	7,6660	1,7516	9,6666
10	0,1411	15,375	9,8810	1,9469	10,4097



Obrázek 12: Adsorpční izoterma pro SDS při pH 4



Obrázek 13: Hmotnostní stupeň zbotnění pro SDS v pufru 4

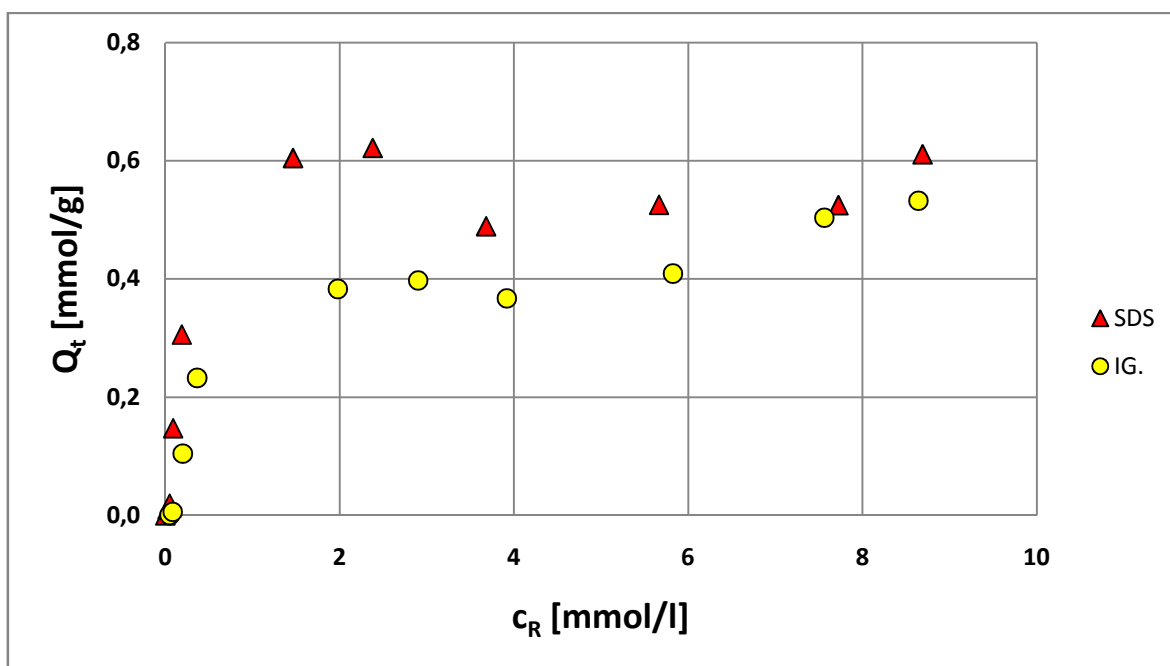
Závislost hmotnostního stupně zbotnění v závislosti na rovnovážné koncentraci SDS je uveden na obrázku 13. Z obrázku je zřejmé, že v kyselém prostředí dochází k vysokému zbotnění kolagenu ($\alpha \sim 20$). Při postupném zvyšování koncentrace SDS v roztoku dochází k prudkému poklesu hmotnostního stupně zbotnění až na hodnoty α_m kolem 4. Je zajímavé, že této hodnoty je dosahováno při rovnovážné koncentraci SDS mezi 1,2 - 2,2 mmol/l, které odpovídají navázanému množství SDS 0,7 - 1 mmol/g. Toto jsou hodnoty Q_t , které odpovídají přibližně množství tenzidů vázaného elektrostatickými silami [4]. Tento pokles lze vysvětlit zvýšením hydrofobity kolagenních vláken, popřípadě tzv. kolapsí sítě [11]. Dalším zvyšováním rovnovážné koncentrace SDS v roztoku dochází k mírnému nárůstu hmotnostního stupně zbotnění. Jeho hodnota se ustaluje přibližně na $\alpha = 10$. Obdobnou závislost získala i Štekerová [5], která sledovala interakci SDBS s BAT. Ustálené rovnovážné stupně zbotnění jsou však v jejím případě nižší a pohybují se kolem $\alpha \sim 5$. To může být dáno jednak druhem použitého anionického tenzidu i případnou rozdílností použitého BAT. Přesto je charakter dané závislosti hmotnostního stupně zbotnění identický našemu zjištění.

3.2.2 Interakce se směsí SDS igepal v poměru 1:1

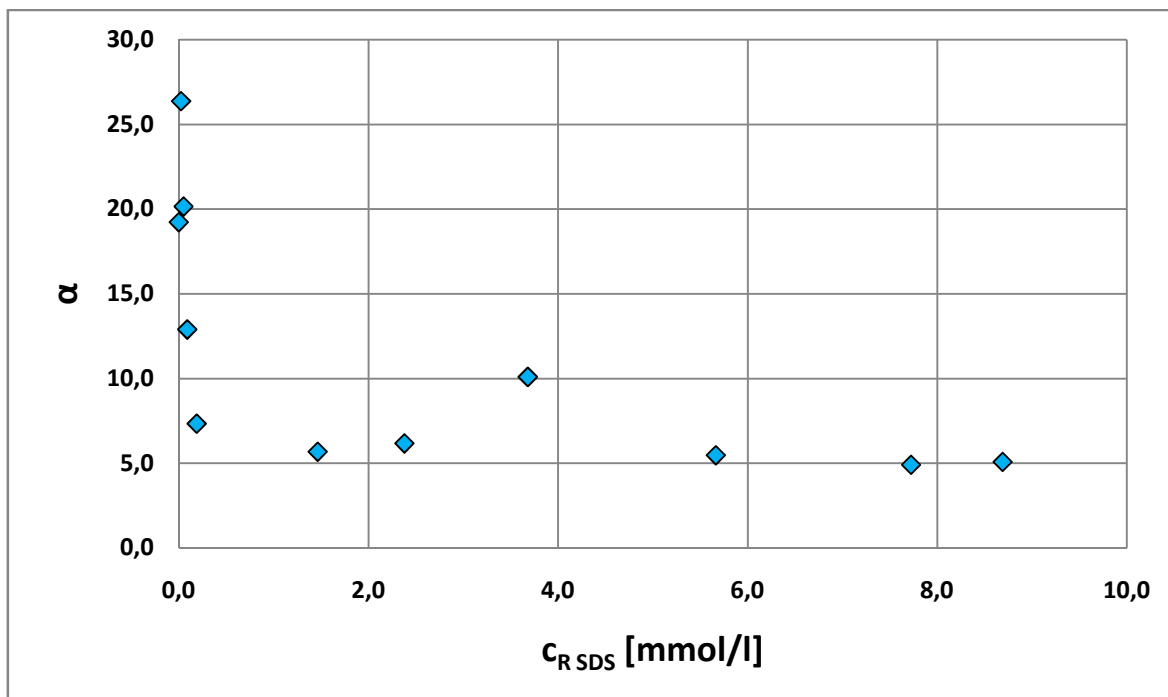
V praktických aplikacích připadajících v úvahu při styku různých prostředků s kůží je hodnota pH interakce (pH = 4) neobvyklá. Toto pH interakce bylo použito pouze pro srovnání s interakcemi při pH 6. Na rozdíl od interakcí v slabě kyselém prostředí byla studována pouze chování jedné směsi a to SDS igepal 1:1. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 8 a na obrázcích 14 a 15.

Tabulka 8: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se směsí 1:1 v pH 4

č.	m_0 [g]	c_P SDS [mmol/l]	c_P IG. [mmol/l]	c_R SDS [mmol/l]	c_R IG. [mmol/l]	Q_t SDS [mmol/g]	Q_t IG. [mmol/g]	α	$x_{SDS\ r}$
0	0,1464	0	0,044	0	0,051	0	-0,0024	19,2219	-
1	0,1322	0,051	0,05	0,0240	0,048	0,0102	0,0008	26,3653	0,3333
2	0,1334	0,103	0,1	0,0500	0,084	0,0199	0,0060	20,1457	0,3731
3	0,1437	0,513	0,5	0,0890	0,2	0,1475	0,1044	12,8916	0,3080
4	0,1366	1,025	1	0,1890	0,365	0,3060	0,2324	7,3333	0,3412
5	0,1332	3,075	3	1,4650	1,98	0,6045	0,3830	5,6758	0,4253
6	0,1385	4,1	4	2,3790	2,9	0,6215	0,3972	6,1652	0,4507
7	0,1476	5,125	5	3,6810	3,917	0,4892	0,3669	10,0913	0,4845
8	0,1437	7,175	7	5,6650	5,825	0,5255	0,4089	5,4683	0,4930
9	0,1430	9,225	9	7,7240	7,56	0,5247	0,5034	4,9090	0,5054
10	0,1278	10,25	10	8,6890	8,64	0,6108	0,5321	5,0794	0,5014



Obrázek 14: Adsorpční izoterma SDS igepal 1:1 při pH 4



Obrázek 15: Hmotnostní stupeň zotnění pro směs 1:1 při pH 4

Na obrázku 14 jsou uvedeny sorpce obou dvou složek směsi. Z obrázku 14 vyplývá, že při nízkých počátečních koncentracích směsi dochází k vyšší adsorpci anionického tenzidu. Maximální navázané množství SDS je dosaženo při relativně nízkých rovnovážných koncentracích SDS ($c_{R\text{ SDS}} \sim 1,5 - 2,5 \text{ mmol/l}$), což je ve srovnání s adsorpční izotermou samotného SDS při stejných podmínkách prakticky čtvrtinová až pětina hodnota. Je zajímavé, že obdobně se chová i neionický tenzid, kde je dosaženo výraznějšího navázání na BAT jen při nepatrně vyšších koncentracích, než v případě SDS. Hodnoty maximálního navázaného množství igepalu se pohybují při jeho dostatečně vysokých rovnovážných koncentracích jen nepatrně pod hodnotami navázaného množství SDS ($Q_{t\text{ IG.}} \sim 0,5 \text{ mmol/g}$). Lze tedy říct, že při vyšších rovnovážných koncentracích obou tenzidů je jejich sorpce prakticky v poměru 1:1, tedy ve stejném poměru jako je počáteční složení reakční směsi. Celkové maximální navázané množství obou tenzidů se pohybuje kolem 1,1 mmol/g a je zhruba poloviční vůči maximálnímu navázanému množství samotného SDS při stejném pH. Zdá se tedy, že množství SDS v reakční směsi výrazně ovlivňuje celkové navázané množství obou tenzidů na BAT. Pro přesnější závěry je ovšem nutno provést další měření pro různé složení adsorpčních směsí. V tabulce 8 jsou vypočteny molární zlomky x_{SDS_r} po reakci pro jednotlivé počáteční koncentrace obou tenzidů. Při nižších počátečních koncentracích je x_{SDS_r} menší, než x_{SDS} před reakcí ($x_{\text{SDS}} = 0,5$). To potvrzuje

předchozí tvrzení o preferenci sorpci SDS při nízkých počátečních koncentracích obou tenzidů.

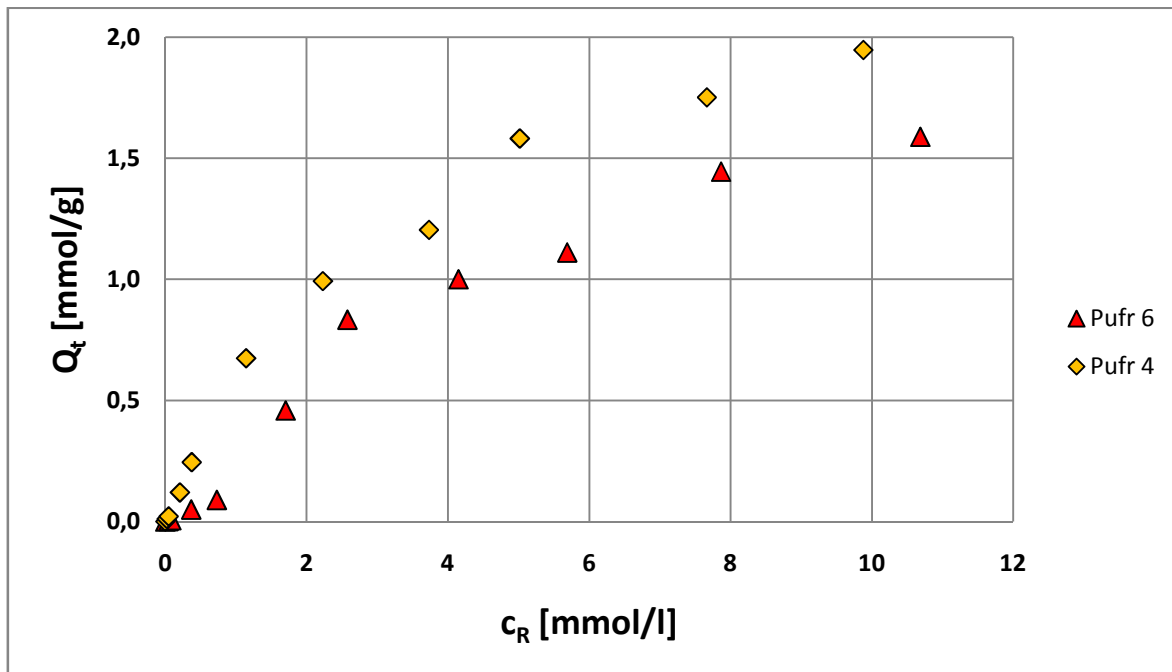
Na obrázku 15 je uvedena závislost hmotnostního stupně zbotnání na rovnovážné koncentraci SDS ve směsi. K vytvoření této závislosti nás vedla skutečnost, že samotný igePAL stupeň zbotnání při tomto pH výrazněji neovlivňuje. Průběh změny hmotnostního stupně zbotnání v této směsi je obdobný chování samotného SDS. Již při nízkých přídavcích směsi, tedy i SDS, dochází k výraznému poklesu hmotnostního stupně zbotnání z původní hodnoty $\alpha \sim 20$ až na hodnotu kolem $\alpha \sim 5$. Minimálních hodnot stupně zbotnání je opět dosaženo při rovnovážné koncentraci $c_R \sim 2$ mmol/l, což odpovídá navázanému množství $Q_t \sim 0,6$ mmol/g. To jsou hodnoty, které velmi blízce korespondují s hodnotami při adsorpci samotného SDS. Je zajímavé, že hodnota $Q_{t \text{ SDS}} 0,6$ mmol/g, která velmi přibližně odpovídá adsorpci SDS na základě elektrostatických sil je v tomto případě zároveň i prakticky maximální hodnotou $Q_{t \text{ SDS}}$. Ze získaných výsledků je vidět, že další nárůst celkového navázaného množství při vyšších rovnovážných koncentracích obou tenzidů je zabezpečován především adsorpcí neionického tenzidu. To svádí k závěru, že při vyšších koncentracích se uplatňuje především sekundární adsorpce samotného igePALu a že SDS se jí pravděpodobně zúčastňuje ve velmi omezeném rozsahu. Na rozdíl od interakce samotného SDS, ve směsi SDS igePAL 1:1 při zvyšování koncentrace SDS nedochází k zvyšování hmotnostního stupně zbotnání.

3.3 Vliv reakčních podmínek na chování komplexů BAT – tenzid

Měření interakcí mezi tenzidy, jejich směsí a BAT při různých pH umožňuje jednoduché srovnání chování BAT. Lze srovnávat interakce SDS - BAT pro různé pH vyjádřené ve formě adsorpčních izoterm a hmotnostních stupních zbotnání a interakce směsi SDS igePAL 1:1 pro různé pH.

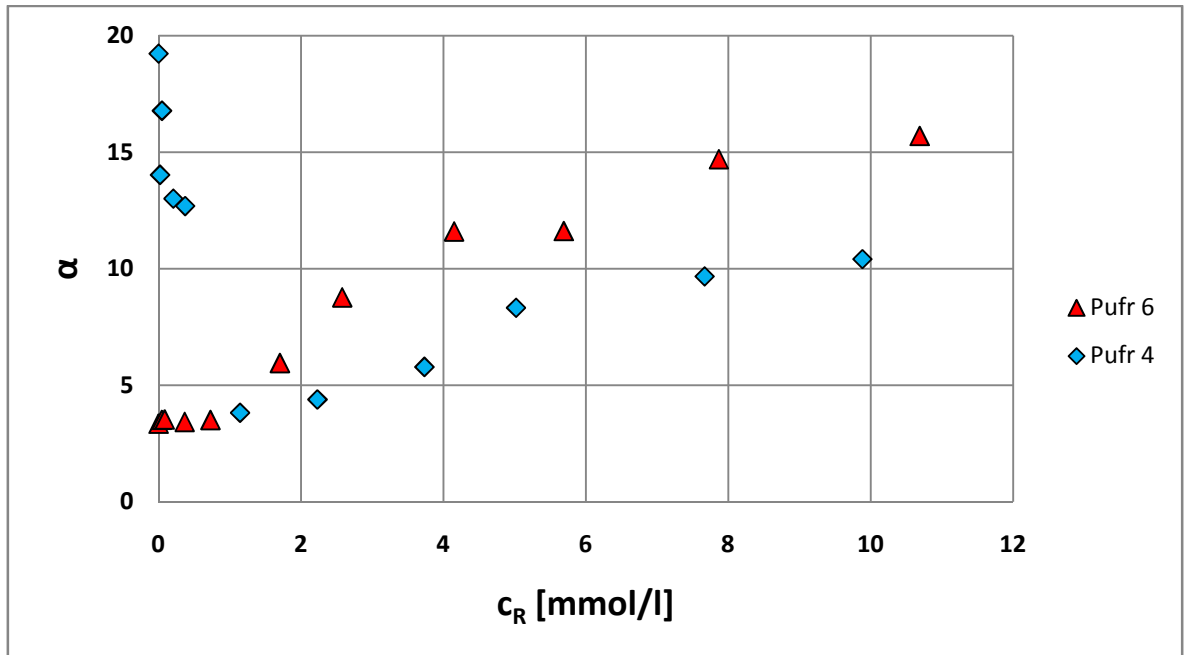
Srovnání sorpčních izoterm SDS pro obě pH je uvedeno na obrázku 16. Podle očekávání je sorpce v pufru o pH 4 vyšší než v pufru o pH 6. To je dáno především větším rozsahem elektrostatických interakcí při nižším pH, protože nábojová hustota kolagenu se se snižujícím pH výrazně zvyšuje. Maximální nábojová hustota kolagenu je dosahována při pH asi 2,8 - 3. Při takto nízkých pH ovšem již dochází k postupné hydrolyze kolagenu a měření při těchto pH musí probíhat rychle. Výsledná hodnota Q_t pro pH 4 ($Q_{t \text{ SDS}} \sim 2$ mmol/g) odpovídá výsledkům jiných autorů. Maximální navázané množství SDS při pH 6 je přibližně $Q_t 1,6$ mmol/g. I tyto hodnoty byly zaznamenány při interakcích SDS s BAT při

nízkých iontových silách prostředí roztoku [6]. Výsledky potvrzují, že hodnoty maximálního navázaného množství na kolagen jsou blízké hodnotám, které se obecně uvádějí při adsorpci anionický tenzid – bílkovina [22].



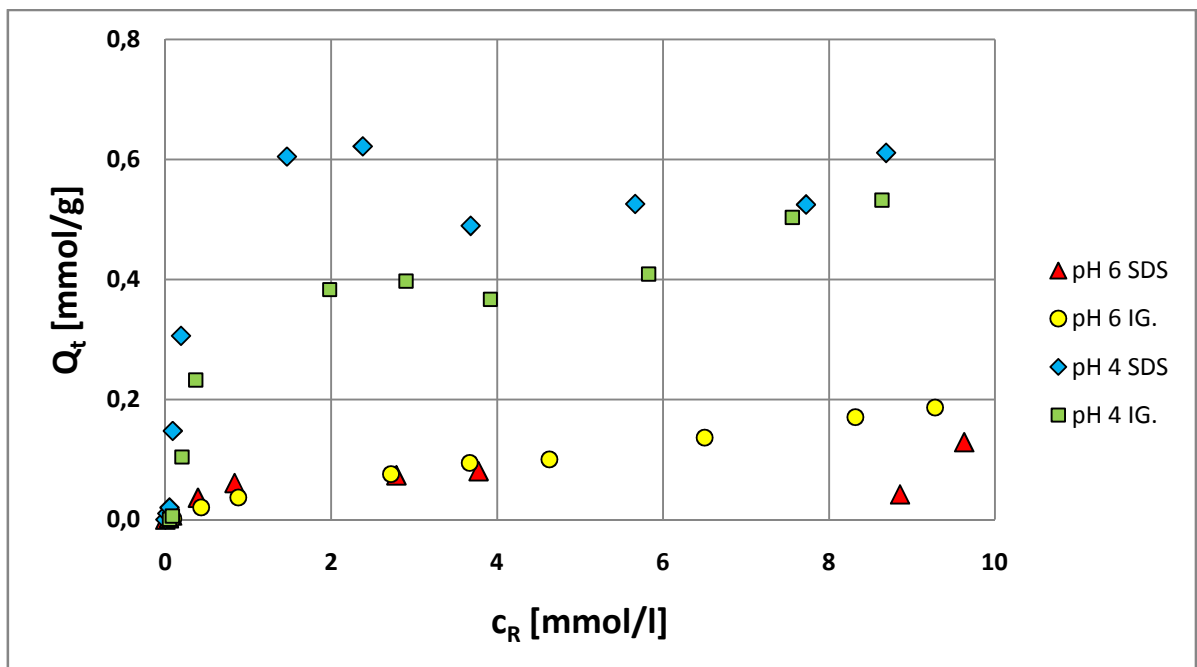
Obrázek 16: Srovnání adsorpčních izoterm SDS pro pH 4 a pH 6

Srovnání změn hmotnostních stupňů zbotnění pro obě prostředí jsou uvedeny na obrázku 17. Z průběhu je zřejmé odlišné chování kolagenních vláken a závislosti na pH prostředí. Toto odlišné chování platí pouze při nízkých koncentracích použitého SDS. Od rovnovážné koncentrace $c_{R\text{ SDS}} \sim 1$ mmol/l je chování BAT v přítomnosti SDS již podobné pro obě pH. To znamená, že v obou případech dochází k postupnému zvyšování hmotnostního stupně zbotnění na hodnoty $\alpha = 10$ pro prostředí o pH 4, respektive $\alpha = 15$ pro prostředí o pH 6. Podle našeho názoru jsou zvýšené hodnoty α_m pro pH 6 dány pravděpodobně menším množstvím navázaného SDS na bázi elektrostatických sil, což resultuje zvýšenou hydrofilu kolagenních vláken, která je zřejmě zodpovědná za zvýšené botnění.



Obrázek 17: Srovnání hmotnostních stupňů zbotnání SDS pro pH 4 a 6

Srovnání sorpčních izoterem u směsi SDS igepal v poměru 1:1 při obou použitých pH je na obrázku 18. Vzhledem k použitému způsobu měření koncentrací obou tenzidů v roztoku jsou pro obě pH uvedeny izotermy SDS a igepal samostatně.



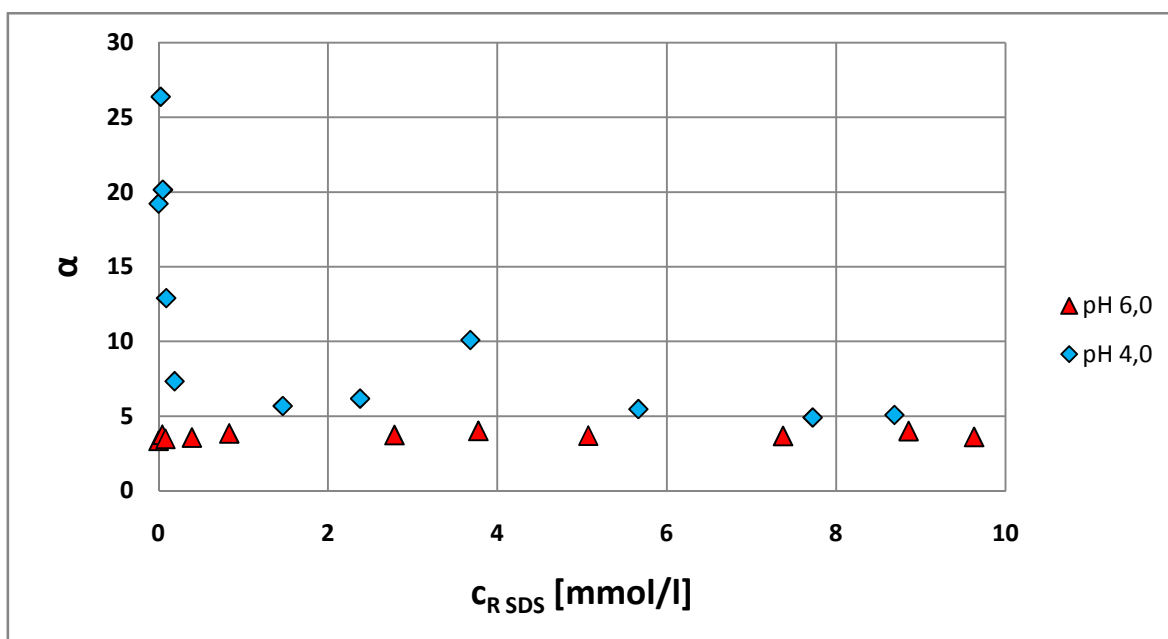
Obrázek 18: Srovnání adsorpčních izoterem směsí SDS igepal 1:1 při obou pH

Z obrázku 18 je evidentní, že adsorpce obou tenzidů při pH 4 je daleko větší než adsorpce tenzidů při pH 6. Jak už bylo řečeno, je celková Σ naadsorbovaných tenzidů přibližně po-

loviční vzhledem k maximálnímu naadsorbovanému množství SDS. Poměr adsorbovaných tenzidů je od určitých rovnovážných koncentrací ($c_R \sim 5$ mmol/l) přibližně stejný jako poměr tenzidů v počáteční směsi.

Srovnání adsorpčních izoterm obou tenzidů při pH 6 je poněkud problematické vzhledem již k uvedenému anomálnímu chování některých koncentrací SDS v dané směsi (viz kapitola 3.1.2.). Přesto se zdá, že při některých koncentracích je množství navázaného igepalu a navázaného SDS přibližně v poměru 1:1. Pro podporu tohoto tvrzení bude ovšem nezbytné zopakovat měření těchto interakcí se stávajícím BAT. Zajímavé je srovnání navázaného množství obou tenzidů při tomto pH s navázaným množstvím samotného SDS při pH 6. Zatímco v případě pH 4 odpovídalo celkové navázané množství obou tenzidů přibližně $\frac{1}{2}$ navázaného množství samotného SDS, v případě sorpce směsi obou tenzidů je při pH 6 výrazně nižší než navázané množství samotného SDS při uvedeném pH. Navázané množství směsi tenzidů činí pouze 20 % z navázaného množství samotného SDS. Navíc se zdá, že v případě směsí SDS igepal použitých při našich pokusech (pH 6) se celkové navázané množství obou tenzidů bez ohledu na složení směsi příliš neliší (viz kapitola 3.2.1.). Určení případného vlivu složení směsi tenzidů na celkové navázané množství vyžaduje proměření interakce s dalšími směsmi SDS igepal.

Srovnání hmotnostních stupňů zbotnání pro směs SDS igepal 1:1 v obou pufrch je uvedeno na obrázku 19.



Obrázek 19: Srovnání hmotnostních stupňů zbotnání obou směsí při různých pH

Rovnovážné koncentrace v obrázku 19 jsou vyjadřovány v c_R SDS, protože jak už bylo řečeno igepal stupeň zbotnění výrazněji neovlivňuje. Závislost α_m pro tuto směs je obdobná závislosti hmotnostního stupně zbotnění pro samotné SDS v obou pufrech (obrázek 17). Podobně, jako na výše uvedeném obrázku, se průběh hmotnostního stupně zbotnění v závislosti na pH liší do c_R SDS 1 mmol/l. Od této koncentrace se hmotnostní stupeň zbotnění ustaluje na hodnotách kolem α_m mezi 3,5 – 5. Na rozdíl od chování samotného SDS však v této směsi nedochází k postupnému nárůstu α_m v závislosti na zvyšující se rovnovážné koncentraci. To lze podle našeho názoru přičíst již diskutované adsorpci neionického tenzidu v tzv. sekundární adsorpci. Ta na rozdíl od adsorpce samotného SDS udržuje hydrofilitu kolagenního vlákna na přibližně stejné úrovni. Z porovnání hmotnostních stupňů zbotnění samotného SDS a jeho směsi s igepalem při pH 6 vyplývá vhodnost využití směsi anionického a neionického tenzidu při aplikaci na kůži, respektive kolagenní vlákno. Dochází nejen k podstatně nižší adsorpci obou tenzidů na kolagenní vlákno, ale zejména nedochází ke zvyšování hmotnostního stupně zbotnění kolagenu. To totiž může mít za následek změny v nadmolekulárních strukturách kolagenu, které se mohou promítat do celkových změn kůže.

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na interakci kolagenu I s anionickým tensidem (SDS) a neionickým tensidem (igepalem CA 720) a jejich směsích. Jako kolagen I byly použity býčí achilovy šlachy (BAT). Interakce byly prováděny při dvou různých pH (pH=4,0 a pH=6,0). Byly použity směsi SDS a igepalu v poměrech 3:1 ($x_{\text{SDS}}=0,75$) a 1:1 ($x_{\text{SDS}}=0,5$). Interakce byly hodnoceny pomocí adsorpčních izoterem a změnami hmotnostního stupně zbotnění BAT.

Důležitou charakteristikou interakce je tvar izoterem a maximální navázané množství $Q_{t \text{ max}}$. Bylo zjištěno, že maximální navázané množství SDS je závislé na pH v prostředí, při kterém interakce probíhá. Při pH 4 se $Q_{t \text{ max, SDS}}$ pohybuje kolem 2 mmol/g. Při pH 6 se maximální navázané množství $Q_{t \text{ max}}$ snižuje přibližně na 1,6 mmol/g. Samotný igepal se při obou pH na kolagen prakticky neváže. Při interakci SDS byla zjištěna pro pH 6 izoterma ve tvaru S – izotermy. Pro pH 4 byla lagova fáze izotermy velmi málo výrazná.

Interakce směsí tensidů se liší v závislosti na pH prostředí. Při pH 6, což je pH, při kterém lze očekávat případné interakce tensidů v běžné praxi, je tvar sorpčních izoterem klasický. Výběr tensidů ve směsích umožnil stanovení maximálního navázaného množství jednotlivých tensidů a tedy i celkové maximální navázané množství. Bez ohledu na počáteční složení směsi se pohybuje celkové navázané množství kolem 0,3 mmol/g a je výrazně menší, než navázané množství samotného SDS. Zastoupením naadsorbovaného množství SDS a igepalu se liší ovšem podle složení směsi. Zatímco u směsi 3:1 výrazně převládá adsorpce SDS, v případě směsi 1:1 jsou maximální naadsorbované množství obou tensidů přibližně stejné. Při pH 4 byla sledována pouze jedna směs SDS igepal, a to směs 1:1. Izoterma měla opět tvar běžné izotermy. Celkové navázané množství obou tensidů se pohybuje kolem 1,1 mmol/g a odpovídá zhruba $\frac{1}{2}$ maximálního navázaného množství SDS při stejném pH. Rovněž poměr maximálního naadsorbovaného množství obou tensidů je přibližně 1:1.

Prakticky u všech směsí bylo na základě hodnocení rovnovážného složení směsí prokázáno, že při nižších počátečních koncentracích směsí dochází k preferenční adsorpci SDS. S rostoucími počátečními koncentracemi, a tedy i rostoucími rovnovážnými koncentracemi, dochází k postupnému přibližování rovnovážného $x_{\text{SDS}r}$ k hodnotě x_{SDS} před reakcí.

Hmotnostní stupeň zbotnění BAT po interakci je závislý především na pH prostředí. Při pH 6 dochází v závislosti na složení lázně většinou pouze k mírnému nárůstu hodnot α_m . Tento nárůst je závislý částečně na složení směsi. Nejvyšších hodnot je dosaženo pro čistý SDS.

Se zvyšující se koncentrací igepalu ve směsi nárůst α_m se stoupajícími rovnovážnými koncentracemi klesá.

Při pH 4 dochází již při velmi nízkých rovnovážných koncentracích tenzidů ve směsi k výraznému poklesu hmotnostního stupně zbotnění, a to z hodnot $\alpha_m \sim 20$ na hodnoty $\alpha_m \sim 5$. Bez ohledu na složení reakční lázně dochází k ustálení minimálních hodnot α_m při rovnovážných koncentracích SDS přibližně na 1,5 mmol/l.

Dosažené výsledky z hlediska naadsorbovaného množství a botnění kolagenu potvrdily, že SDS patří k výrazným iritantům lidské kůže, a že přídavek neionického tenzidu může škodlivé působení SDS výrazně omezit.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BLAŽEJ, A., GALATÍK, J., MLÁDEK, M. *Technologie kůže a kožešin*. Praha: SNTL 1984.
- [2] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-04-21]. Dostupné z [www: <http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0>](http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0)
- [3] Internetové stránky. [on-line]. [cit. 2010-04-22]. Dostupné z [www: <www.collagenpoint.com/cz/download/pro_profesionaly.ppt>](http://www.collagenpoint.com/cz/download/pro_profesionaly.ppt)
- [4] KŘIVINKA, M. *Heterogenní interakce povrchově aktivních látek s polyelektrolyty a polyelektrolytovými komplexy*. [Disertační práce]. Zlín: VUT Fakulta technologická 1995.
- [5] ŠTEKEROVÁ, I. *Studium dodecylbenzensulfonanu sodného s kolagenem*. [Diplomová práce]. Zlín: VUT Technologická fakulta, 2000.
- [6] TUREČKOVÁ, O. *Interakce kolagenu se směsí anionaktivních tenzidů*. [Diplomová práce]. Zlín: UTB Fakulta technologická, 2004.
- [7] ANDRÉ, O., MARS PAYE, HOWARD I. MAILBACH, *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 2001 by Marcel Decker, Ing., ISBN: 0-8247-0292-1
- [8] UTB ve Zlíně. *Fyzikální, chemické a technické vlastnosti povrchově aktivních látek*. Vzdělávací portál [on-line], 2007, [cit. 2007-03-23]. Dostupné z WWW: [<http://utb.cepac.cz/screens/default.aspx>](http://utb.cepac.cz/screens/default.aspx)
- [9] MC CLEMENTS, D.J. *Food Emulsions*. 2nd Editio, Boca Raton, CRC Press, 2005. 609 p. ISBN 0-8493-2023-2.
- [10] BLAŽEJ, A. a kol.: *Tenzidy*. Bratislava, ALFA 1977.
- [11] KREJČÍ, J. *Tenzide Surfactants Detergens*, 2001, vol. 38, s.299
- [12] LANGMAIER, F., KREJČÍ, J. a kol: *Základní výzkum koželužských mazadel III*. Zlín, FT VUT 1984.
- [13] PANKHURST, K.G.A.J. *Soc. Leather Technol. Chem.*, 1953, vol.37, s.312
- [14] ERNERTH, M. *Über die Einwirkung von Alkylsulfaten definienter Kettlenlägen und Gelatine*, [Doctoral thesis]. Darmstadt: Universität Darmstadt, 1954.
- [15] MALDONADO, F., OTERO, A., ALMELA, M., COSTA, J. *Bol. Asoc. Equim. Ind. Cuero*, 1989, vol.40, s.199

- [16] MALDONADO, F., OTERO, A., ALMELA, M., COSTA, J. *Das Leder*, 1991, vol.42, s.61
- [17] MALDONADO, F., OTERO, A., ALMELA, M., COSTA, J. *Protein Chem.*, 1991, vol.10, s.189
- [18] HENRIQUEZ, M., LISSI, E., ABUIN, E. *Colloid Interface Sci.*, 1996, vol.27, s.6834
- [19] LOEWE, H., OTTO, G. *Das Leder*, 1960, vol.11, s.215
- [20] KREJČÍ, J. *Interaction of mixture of anionic surfactants with collagen*, Int. D. Cosmetic Science, 2007, vol.29, s.121-129.
- [21] SÝKORA, V., ZÁTKA, V. *Příruční tabulky pro chemiky*, SNTL Praha, 1960.
- [22] GODDARD, E.D., K. P. ANANTHAPADMANABHAN, *Interactions of surfactants with polymers and proteins*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance
α_m	Hmotnostní stupeň zbotnění
α_v	Objemový stupeň zbotnění
AMK	Aminokyselina
BAT	Býčí achillové šlachy
c	Koncentrace
c_R	Rovnovážná koncentrace tenzidů
c_P	Počáteční koncentrace tenzidů
c.m.c.	Kritická micelární koncentrace
CPB	Cetylpiridium bromid
Gly	Glycin
HLB	Hydrolylní lipofilní rovnováha
Hyp	Hydroxiprolin
I	Iontová síla
IB	Isoelektrický bod
Ig.	Igepal CA 720
m_0	Hmotnost kondicionovaného BAT přepočteného na sušinu
m_1	Hmotnost BAT po kondicionování před vysušením
m_2	Hmotnost BAT po vysušení
m_c	Hmotnost BAT po interakci s PAL
p	Parametr vázání
PAL	Povrchově aktivní látka
PEL	Polyelektrolyt
Pro	Prolin

Q_t	Navázané množství PAL na BAT
$Q_{t \max}$	Maximální navázané množství tenzidu
SDBS	Dodecylbenzensulfát sodný
SDS	Dodecylsulfát sodný
W_{BAT}	Sušina kondicionovaného vzorku BAT
x_{SDS}	Molární zlomek SDS

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vzorec dodecylsulfátu sodného	13
Obrázek 2: Vzorec igepalu CA 720, kde $n = 12$	14
Obrázek 3: Kalibrační křivka SDS	27
Obrázek 4: Kalibrační křivka IGEPALU CA 720	28
Obrázek 5: Sorpční izoterma pro čisté SDS při pH 6	33
Obrázek 6: Hmotnostní stupeň zbotnění pro čisté SDS při pH 6	33
Obrázek 7: Hmotnostní stupeň zbotnění igepalu při pH 6	35
Obrázek 8: Sorpční izoterma pro směs SDS a igepalu v poměru 3:1	37
Obrázek 9: Hmotnostní stupeň zbotnění BAT ve směsi 3:1	37
Obrázek 10: Sorpční izoterma pro směs SDS a igepalu v poměru 1:1 při pH 6	39
Obrázek 11: Hmotnostní stupeň zbotnění BAT ve směsi 1:1 při pH 6	40
Obrázek 12: Adsorpční izoterma pro SDS při pH 4	42
Obrázek 13: Hmotnostní stupeň zbotnění pro SDS v pufru 4	43
Obrázek 14: Adsorpční izoterma SDS igepal 1:1 při pH 4	44
Obrázek 15: Hmotnostní stupeň zbotnění pro směs 1:1 při pH 4	45
Obrázek 16: Srovnání adsorpčních izoterm SDS pro pH 4 a pH 6	47
Obrázek 17: Srovnání hmotnostních stupňů zbotnění SDS pro pH 4 a 6	48
Obrázek 18: Srovnání adsorpčních izoterm směsí SDS igepal 1:1 při obou pH	48
Obrázek 19: Srovnání hmotnostních stupňů zbotnění obou směsí při různých pH	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Skupinové hodnoty HLB	14
Tabulka 2: Praktické využití tenzidů v závislosti na HLB	15
Tabulka 3: Souhrnné výsledky pro interakci kolagenu se SDS při pH 6	32
Tabulka 4: Souhrnné výsledky pro interakci BAT s igepalem při pH 6.....	35
Tabulka 5: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se směsí 3:1.....	36
Tabulka 6: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se směsí SDS igepal 1:1	39
Tabulka 7: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se SDS při pH 4	42
Tabulka 8: Souhrnné výsledky pro interakci BAT se směsí 1:1 v pH 4.....	44