# Kationos tenzidek membrán affinitásának jellemzése lipid monoréteg modell segítségével

**Szakdolgozat**

**Kémia Alapszak**

**Szerző:**

**Kelemen Orsolya**

**Témavezető:**

**Dr. Kiss Éva egyetemi tanár**

**Eötvös Loránd Tudományegyetem**

**Természettudományi Kar**

**Kémiai Intézet**

**Fizikai Kémiai Tanszék**

**Budapest, 2013.**

# Köszönetnyilvánítás

*Ezúton szeretnék köszönetet mondani,*

*Témavezetőmnek* **Dr. Kiss Éva** *egyetemi tanárnak a munkám során nyújtott sok segítségért, tanácsért, és javaslatért, türelméért és, hogy mindig fordulhattam hozzá;*

**Hórvölgyi Zoltánnénak** *a gyakorlati munkában való önzetlen segítségéért, jó tanácsaiért, türelméért és barátságáért;*

**Dr. Gilányi Tibor** *egyetemi tanárnak, a Határfelületi és Nanoszerkezetek Laboratórium vezetőjének, hogy lehetővé tette a laboratóriumban való munkámat;*

**Dr. Császár Attila** *egyetemi tanárnak, a Fizikai Kémiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette a tanszéken való munkámat;*

*Köszönöm a családomnak és barátaimnak a szellemi, lelki, erkölcsi és anyagi támogatást.*

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés…….....3
2. Irodalmi áttekintés…….....4
2.1 Határfelületek…….....4
2.1.1 A határfelületek……4
2.1.2 Lipid monoréteg kialakulása levegő/víz határfelületen……..4
2.1.3 A felületi feszültség és annak mérése Wilhelmy-lemez módszerrel…….....5
2.2 Langmuir-technika…….....6
2.2.1 Langmuir-filmek…….....6
2.2.2 Lipid Langmuir-film……..……6
2.2.3 DPPC unimolekuláris lipid film ……..……7
2.3 Penetráció Langmuir-filmeken…….....9
2.3.1 Penetráció……9
2.3.2 Penetrációs modell anyagok: felületaktív anyagok……10
2.3.3 A penetráció hatására bekövetkező változás a lipid film oldalnyomásában……..10
3. Célkitűzések.....…….....13
4. Kísérleti anyagok és módszerek ……14
4.1 Kísérleti anyagok…….....14
4.1.1 Lipid - kationos tenzid kölcsönhatás vizsgálata……..……14
4.2 Kísérleti módszerek…….....16
4.2.1 Langmuir-mérleges mérések…….....16
4.2.1.1 Unimolekuláris DPPC lipid film izotermájának felvétele…….....17
4.2.1.2 Unimolekuláris DPPC lipid film stabilitásának vizsgálata……...……17
4.2.1.3 Penetráció……17
4.2.2 Felületi feszültség meghatározása Wilhelmy-lemez módszerrel……..18
5. Eredmények és kiértékelésük…….....20
5.1 Kationos tenzid vizes oldatainak felületi feszültsége és a levegő/víz határfelületen történő adszorpciója…….……..20
5.2 A DPPC lipid monoréteg izoterma…….....…..……..……22
5.3 A DPPC lipid monoréteg stabilitása…….....23
5.4 Penetráció……24
5.4.1 A penetráció során bekövetkező oldalnyomás változás és annak értelmezése…….....25
5.4.1.1 A Langmuir izotermás közelítés…….....26
5.4.1.2 A Frumkin izotermás közelítés……27
5.4.2 A DTAB penetrációjának jellemzése az izoterma modellek alapján……....28
5.4.3 A DTAB és TTAB penetrációjának összehasonlítása..…….……31
6. Szakdolgozat összefoglaló…….……..…..…….....33
7. Summary……..…..…….....34
8. Irodalomjegyzék……..……..…….....35

# 1. Bevezetés

Az élő szervezetek igen komplex rendszerek, melyek működése számos összehangolt és harmonikusan működő folyamat összessége. Az egyes szerveződési szintekben felfelé haladva egyre nagyobb mértékű a komplexitás, amely megnehezíti az ilyen rendszerek vizsgálatát, tanulmányozását. A gyógyszeripar az egyik legjobban fejlődő iparágnak tekinthető a világon. Ahhoz, hogy egy új gyógyszerhordozót, vagy hatóanyagot kifejlesszünk, illetve vizsgáljuk annak lehetőségét, hogy egy adott anyag alkalmazható-e a gyógyszeriparban, számos kutatást kell elvégeznünk.

A sejt az élő szervezet legkisebb szerveződési szintje, és mint ilyen, már önmagában is egy összetettebb rendszer. A sejtben fontos kiválasztási és szervezési folyamatok zajlanak (pl. fehérjék szintézise), emellett a sejtmembránon keresztül lezajló transzportfolyamatok lényeges szerepet töltenek be az élő szervezet működésének fenntartásában (pl. idegműködés, impulzusátvitel, érzékelés). A transzportfolyamatok és a biológiai folyamatok jelentős része határfelületeken zajlik (pl. tápanyag felszívódás, enzimatikus lebontás, lizoszómális lebontás). A határfelület minősége befolyásolja, hogy milyen természetű anyagok képesek kölcsönhatásba lépni, adszorbeálódni, áthatolni rajta. A sejtmembránon való áthatolást számos tényező befolyásolja, akár csak azok kísérleti modelljei esetében.

Az egyes anyagok membránnal való kölcsönhatásának vizsgálatára alkalmas modell rendszert használ a Langmuir-technika.[1], [2] Ebben az esetben a modell membrán karakterisztikája, a kísérleti paraméterek, mint hőmérséklet, felületi feszültség szabályozható, és könnyen változtatható. Előnyös a rendszer egyszerűsége, könnyű alkalmazhatósága és ugyanakkor kis anyagigénye. Segítségével jól definiált körülmények között kaphatunk a molekulák kölcsönhatásáról információt. Kialakíthatunk egy vagy két molekularétegből álló lipid filmet szilárd hordozón is, és ezek vizsgálatával (AFM, fluoreszcens spektroszkópia, stb.) további információkhoz juthatunk.[3] Ezen indokok alapján döntöttem én is a Langmuir-technika mellett, hiszen a korszerű kísérleti módszerek gyakori bonyolultsága mellett ez egy jól kezelhető rendszer, mégis értékes eredményekkel szolgál ahhoz, hogy következtethessünk a rendszerünk viselkedésére.

A Langmuir-technika megjelenése óta széles körben hódított teret az ilyen jellegű vizsgálatokban. A kutatások kiindulópontját általában egyszerű és jól jellemezhető, viszonylag könnyen modellezhető rendszer képezi. A vizsgálandó anyag és a molekulafilm kölcsönhatása, a membrán affinitás kvantitatíve meghatározható. Az ilyen jellegű kölcsönhatás szerepet játszik a hatóanyag transzport mellett az antibakteriális hatás, vagy a sejt toxicitás jelenségében is.

Munkám során kationos tenzidek membrán affinitását vizsgáltam víz/levegő határfelületen lipid monoréteggel. A modell rendszer kialakítása Langmuir-kádban történt, és a kísérleteket is itt végeztem el. A sejtmembrán egyszerűsített modelljét egy ikerionos szerkezetű lipid (dipalmitoil-foszfatidilkolin, DPPC) rendezett, unimolekuláris rétege képezte. A kísérletekhez az alkil-ammóniumsók családjába tartozó dodecil-trimetil-ammónium-bromidot (DTAB) és tetradecil-trimetil-ammónium-bromidot (TTAB), mint felületaktív anyagokat választottam. A membránnal való kölcsönhatást több koncentráció esetén vizsgáltam penetrációs mérésekkel. Tanulmányoztam a lipid film tömörségének hatását a penetráció mértékére, és elemeztem a felületaktivitás és membrán affinitás kapcsolatát.

# 2. Irodalmi áttekintés

## 2.1 Határfelületek

### 2.1.1 A határfelületek

A heterogén rendszerekben közös, hogy a jellemzőiket ugyanazok a tulajdonságok határozzák meg, mint a fázisok jellemzői, az összetétel, a szerkezet és a határfelületi kölcsönhatások. Heterogén rendszer legegyszerűbb kialakításának módja, ha termodinamikailag két inkompatibilis, egymással nem elegyedő, véges kiterjedésű makroszkópikus fázis érintkezik egymással. Elegyedés tehát nem jön létre, de a fázisok érintkezésekor kialakul egy sok esetben kicsiny (legalább atomi, maximálisan 10 nm) vastagságú határréteg, melyben a tulajdonságok az egyik fázis belsejéből a másik fázis belseje felé hirtelen, de nem ugrásszerűen változnak. A kis kiterjedés miatt nevezhetjük őket határfelületeknek is, amelyekben az előbbi okból kifolyólag a tulajdonságok eltérnek a tömbfázisbeli tulajdonságoktól.

Többféle határfelületet különböztetünk meg az érintkező fázisok típusa alapján. A határfelületek vizsgálata számos esetben lehetséges modellek segítségével, mint például membránok transzportfolyamatainak tanulmányozása, gyógyszerhordozók szabályozott hatóanyag leadása, gyógyszer hatásmechanizmus vizsgálata, stb. Ebből kifolyólag nagy kutatási jelentőséggel rendelkeznek a természettudományok számos területén is, pl. az elválasztástudományban, vagy emulziók előállítása, stabilizálása során.

### 2.1.2 Lipid monoréteg kialakulása levegő/víz határfelületen

A határfelületen történő unimolekuláris film kialakítására leggyakrabban alkalmazott anyagok az úgynevezett amfipatikus molekulák. Ezek jellemzően rendelkeznek különböző szénatomszámú, apoláris tulajdonságú, hidrofób lánccal, amely garantálja, hogy a molekula ne legyen vízoldható, és egy hidrofil fejcsoporttal, ami biztosítja a molekula határfelületen történő szétterülését. Az ilyen típusú molekulák felületre történő jutásának oka a rendszer szabadenergia-csökkenése, amelynek következtében a molekulák felületen való adszorpciója önként végbemenő folyamat. A szabadenergia-csökkenés oka, hogy a vízmolekulák egymás közötti intenzív kölcsönhatása lényegesen nagyobb, mint a lánc és a víz közötti kicsiny, de pozitív kohézió. A határfelületre jutva az alkilláncok között is pozitív, de gyenge vonzás figyelhető meg.[1] Mivel az alkilláncchosszának növekedésével a vízben való oldékonyság egyre csökken (pl. zsírsavak, alkoholok), a hosszú alkilláncú molekulák esetében új technikára van szükség a monoréteg kialakításához. Ebben az esetben illékony oldószerrel (általában vízzel nem elegyedő, szerves oldószerrel) terítik szét a molekulákat a határfelületen. Az így kialakított felületi réteg a víz felületi feszültségét csökkenti és oldalnyomást fejt ki (Agnes Pockles, 1891.).[2] Az adott molekula felületi feszültség csökkentő hatásából következtethetünk az adszorpció mértékére. Mivel a felületi feszültség csökkent, ezért egyértelmű, hogy a molekulák felhalmozódtak a felületen, így az adszorpció pozitív. A molekuláknak a felületen felhalmozódott mennyiségét Gibbs nyomán *Gibbs-féle adszorpciós többletkoncentrációnak* ($\Gamma_i$) nevezzük, és érteke a felületi feszültség csökkenéséből a következőképpen számítható [4]:

$$-\frac{d\gamma}{RT} = \sum_i \Gamma_i * d\ln a_i \ . \qquad (2.1.2.1)$$

ahol $\gamma$ a folyadék felületi feszültsége, $a_i$ az i-edik komponens aktivitása, $\Gamma_i$ pedig az i-edik komponens Gibbs-féle adszorpciós többletkoncentrációja felületegységre vonatkoztatva. Az

egyenlet két komponensű oldatra, amikor az oldószer felületi többletkoncentrációja 0, és híg oldat esetén, amikor az aktivitás közelíthető a koncentrációval ($a \approx c$):

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} * \frac{d\gamma}{dlna} \approx -\frac{1}{RT} * \frac{d\gamma}{dlnc}. \qquad (2.1.2.2)$$

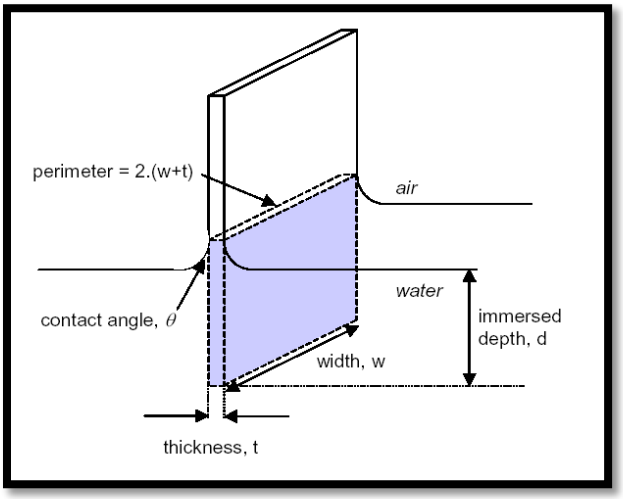
### 2.1.3 A felületi feszültség és annak mérése Wilhelmy-lemez módszerrel

Egy homogén fluid fázis esetében, a felszínen elhelyezkedő folyadékrészecskéknek felülről nincsenek szomszédjaik, ezért kevesebb kölcsönhatásban vesznek részt, mint a tömbfázisban lévő társaik. Ebből kifolyólag a felszínen lévő részecskékre ható erők nem egyenlítik ki egymást, tehát a felszínen lévő részecskékre a tömbfázis irányába mutató eredő erő hat. Az erő következtében a felszíni folyadékrészecskék a tömbfázisba szeretnének behúzódni, emiatt a folyadék felülete mindig a lehető legkisebb lesz. A folyadék felületének növelésekor az eredő erővel szemben, részecskét szeretnénk juttatni a felszínre, amihez munkát kell végezni. A felületnek tehát tulajdoníthatunk energiát, és nyilván ez az energia arányos lesz a felület nagyságával. Az arányossági tényező pedig a felületi feszültség, amely ebből kifolyólag definiálható, mint a felület izoterm, reverzibilis körülmények között történő egységnyi megnöveléséhez szükséges munka.

A felületi feszültség mérésére számos módszer ismeretes, ilyen az általam is alkalmazott, erőmérésen alapuló, Wilhelmy-lemez módszere. Ezzel a módszerrel mérik a felületi feszültséget a Langmuir-technika esetén is. A módszer lényege, hogy a mérendő oldatba egy elektromérlegen függő, platinalemezt merítünk állandó sebességgel, körülbelül a lemez kétharmadáig. Ezt követően a lemezt a bemerítési sebességgel kihúzzuk a folyadékfázisból, amíg az ki nem szakad a folyadékfelszínből. A lemezre ható erőkből számítható a folyadékfázis felületi feszültsége:

$$F = F_G - F_B + 2(t + w) * \gamma_{L/V} cos\theta, \qquad (2.1.3.1)$$

ahol $F_G$ a lemez súlyából, $F_B$ pedig a felhajtóerőből származó erő, $t$ a Wilhelmy-lemez vastagsága, míg $w$ a szélessége, $\gamma_{L/V}$ a folyadék felületi feszültsége, $\theta$ pedig a peremszög.




*2.1.3.1 ábra: A folyadékba merülő Wilhelmy-lemez és fontosabb paraméterei*

A lemez kiszakításakor mérhető erő a $2(t + w)\gamma_{L/V} cos\theta$ kifejezésre egyszerűsödik, ami a nedvesedési feszültség és a peremvonal hossz szorzata. A peremszög teljes nedvesedés esetén nulla, így a kiszakításkor mérhető erőből a felületi feszültség adódik. A mérés során a lemezre

ható erőt érzékeny elektromérleggel mérjük, a kiértékeléshez számítógépes program áll rendelkezésünkre.

## 2.2 Langmuir-technika

### 2.2.1 Langmuir-filmek

Az oldhatatlan unimolekuláris filmek történelme egészen az ókorig nyúlik vissza. Plinius az ókori görög tudós és filozófus már jegyzett fel megfigyeléseket, miszerint a szél által feltarajosodó vizet a hozzáöntött olaj lecsendesíti. A múlt században Agnes Pockels és Lord Rayleigh javasolták először, hogy az lipid film lehet unimolekuláris vastagságú, és Agnes Pockels bizonyította először, hogy a molekulák a felületre merőlegesen helyezkednek el. Az áttörést ezen a területen és az unimolekuláris filmek tanulmányozásának lehetőségét 1917-ben Langmuir által bemutatott új koncepciók tették lehetővé. 1937-ben már sikerült az unimolekuláris filmet szilárd hordozóra vinni, szintén Langmuir és Blodgett által.[2]

A Langmuir-filmek előállításának alapvető felszerelése a Langmuir-kád néven ismertté vált eszköz. A Langmuir-kád fő része a szubfázist (pl. víz) tartó, inert anyagból (pl. Teflonból) készült kád, amely nem szennyezi a szubfázist, tisztasága elengedhetetlen a filmmel való munkához. A szubfázis felületén hozzuk létre az unimolekuláris filmet, az erre alkalmas anyag szétterítésével. A kád további fontos része egy felületi feszültség mérésére alkalmas szenzor, egy, esetlegesen két mozgatható gát és a gát pozícióját érzékelő detektor. A gát mozgatásával lehetőségünk van a kialakított unimolekuláris film összenyomására és tanulmányozására különböző film oldalnyomások mellett. Szilárd hordozó (pl. üveg, fém, félvezető lap) bemerítésével, miközben a gáttal történő összenyomással a felületet csökkentjük, a film a hordozó felületére vihető.

A film létrehozásakor az unimolekuláris film anyagát a megfelelő szerves, illékony oldószerben (pl. kloroform) feloldjuk, és az oldatot a szubfázis felületén szétoszlatjuk. Az oldószer elpárolgását követően a molekulák a szubfázis felületén terülnek szét. A megfelelő film képzést számos tényező befolyásolja, köztük a filmet létrehozó molekula természete (részecske-részecske kölcsönhatások), a szubfázis tulajdonságai (pH, ionerősség, hőmérséklet, stb.).

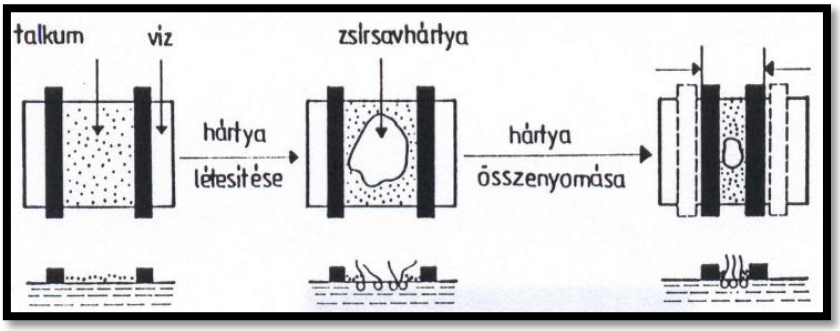
Mára számos természet- és orvostudományi kutatásban alkalmazzák az oldhatatlan unimolekuláris filmek hagyományos, valamint továbbfejlesztett változatait (pl. nanorészecskés filmek), és segítségükkel új felfedezésekre jutnak, melyek elősegítik a tudomány és az ipar fejlődését.

### 2.2.2 Lipid Langmuir-film

A különböző, Langmuir-technikában is alkalmazott modellanyagok, mint a lipidek jellemzően az apoláris szénlánc hosszának növekedésével egyre kevésbé oldódnak vízben. Az unimolekuláris film kialakítása a víz/levegő határfelületen ezen esetekben gyorsan párolgó oldószerrel történik. A terítés és az oldalirányú összenyomás következtében keletkező unimolekuláris film molekuláinak határfelületi orientációja a kapilláraktív vagy felületaktív anyagok viselkedéséhez hasonló módon írható le. A határfelületen történő felhalmozódásuk szintén a felületi feszültség csökkenését eredményezi, melynek mértéke a lipid felületi koncentrációjával arányosan változik. A lipidek határfelületi koncentrációjának növelése a felvitt anyag mennyiségének növelésével, illetve a határfelületen orientálódott molekulák összenyomásával is megvalósítható. A Langmuir-technika esetében ez igen egyszerűen, a kádat

teljesen átérő korlát mozgatásával történik. A molekulák rendelkezésére álló terület csökkentésével az oldalnyomás nő, amelynek számértéke a felületi feszültség ($\gamma$) csökkenésével egyenlő.[1] Az oldalnyomás növekedése annak köszönhető, hogy a rendszer szabadenergiája csökken, mivel a kisebb felületi feszültségű folyadékfelszín igyekszik kiterjedni a nagyobb felületi feszültségű felület rovására. A molekulák oldalirányú összezsúfolása a gáz állapotból a kondenzált folyadék analóg állapoton keresztül a „szilárd" filmek kialakulásához vezethet. Az összenyomás hatására bekövetkező filmrétegben történő változásokra az oldalnyomás-terület (egyetlen molekulára jutó felület) izotermákból nyerhetünk információt. A lipid filmek ilyen izotermája nagymértékben függ a lipid típusától (pl. alkilláncosszúsága, semleges vagy töltéssel rendelkező csoport). Évekkel ezelőtt Stallberg-Stenhagen és Stenhagen kezdte el a lipid monorétegek ilyen vizsgálatát, majd a későbbiekben számos kutató igazolta az eredményeket az izotermák analízisének segítségével és egyéb technikákkal (pl. fluoreszcens mikroszkópia).[5]

Az izotermák felvételének módja, bármely kialakított lipid monoréteg esetében megegyezik. A lipid megfelelő oldószerben, általában kloroformban, diklórmetánban elkészített oldatát szétterítjük a szubfázis felületén és várunk, amíg az oldószer elpárolog, majd összenyomjuk a filmet a kívánt oldalnyomásig a megfelelő sebességgel, amely elegendően kicsi ahhoz, hogy bármilyen kinetikus hatást elkerüljünk, de ugyanakkor elegendően gyors ahhoz, hogy a kísérleti idő ne befolyásolja a mérést. Az első izoterma felvétele Agnes Pockels nevéhez fűződik (1891), aki víztartó kádként egy lapostányért, míg a felületi feszültség mérésére egy gombot alkalmazott. Sztearinsav filmet hozott létre, és az egyszerű eszközökkel is sikerült korrekt izotermát felvennie.[5]




*2.2.2.1 ábra: A Pockels-féle kísérlet, a filmmérleg elve*

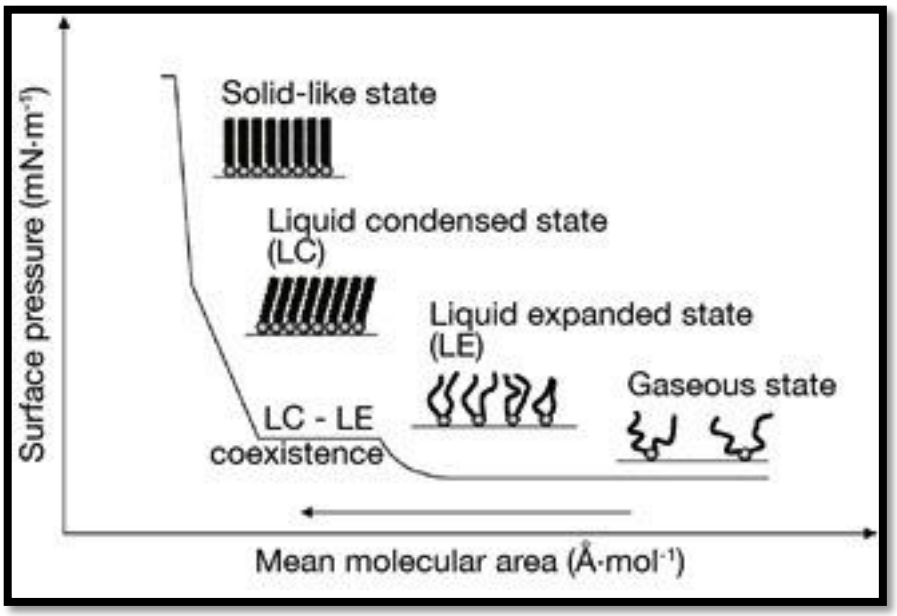
### 2.2.3 DPPC unimolekuláris lipid film

A foszfokolinok a sejtmembrán legfőbb komponensei, így a különböző kémiai anyagok sejtmembránnal való kölcsönhatásának tanulmányozására érdemes kémiailag hasonló, vagy megegyező csoporttal rendelkező molekulákkal dolgoznunk. Az ilyen vegyületek egyik tökéletes példája az általam is vizsgált dipalmitoil-foszfatidil-kolin (DPPC), de számos más lehetőség is adódik, mint például a dioleoil-foszfatidil-kolin (DOPC).

A DPPC monomolekuláris filmek egy bizonyos oldalnyomás tartományban jellegzetes alakú szigetekből (doménekből) állnak. Ezek a szigetek lehetnek bab, S-betű, vagy karéj formájúak, amely formák eloszlása nagyon érzékeny a molekulasűrűségre, amiből arra következtethetünk, hogy a lipid monoréteg nem egyensúlyi rendszer. Ugyanakkor megfigyelték, hogy elegendő időt (12 h) hagyva a lipid filmnek, a DPPC domének közel cirkulárissá alakulnak, és, hogy az egyes formák uralkodóvá válását befolyásolja az összenyomás sebessége. A kísértekből kiderült az is, hogy az oldalnyomásban bekövetkező

csökkenés összefüggésbe hozható azzal, hogy mennyi időt hagyunk a DPPC lipidrétegnek a relaxációra.[5]

A DPPC 23°C-on meghatározott oldalnyomás-terület izotermáját szemlélteti a 2.2.3.1 ábra.




*2.2.3.1 ábra: Egy unimolekuláris lipid film tipikus π-A izotermája* [6]

Az izotermán megfigyelhetőek a jellegzetes szakaszok. A kezdeti tartományban, kis felületi sűrűség esetén, a film gáz analóg módon viselkedik, a felületen elhelyezkedő lipid molekulák között nincs kölcsönhatás. A terület csökkenésével fokozatosan kialakul a lipid molekulák orientációja, és a hidrofób kölcsönhatásnak köszönhető kisebb molekulatársulások, „szigetek” képződnek. Ekkor az egy molekulára eső terület csökkentésével (az oldalnyomás növelésével), a lipid molekulák az LE (expandált folyadék) fázisba kerülnek. Ebben a fázisban nem figyelhető meg röntgen diffrakciós jel, feltételezhetően a molekulák fejcsoportja még rendezetlen, és az egyes láncok konformációs különbségeket mutatnak. A további összenyomásra figyelhető meg az LE-LC átmenet, amelyet az izotermán egy plató jelöl. Ez a plató nem minden esetben teljesen vízszintes, amelyet különböző okokra vezetnek vissza, mint például a kisméretű aggregátumok jelenlétére. A két fázis közötti átmenettel járó entrópiaváltozás a következő képlettel fejezhető ki:

$$\Delta S = \frac{d\pi_c}{dT}\Delta A \qquad (2.2.3.1)$$

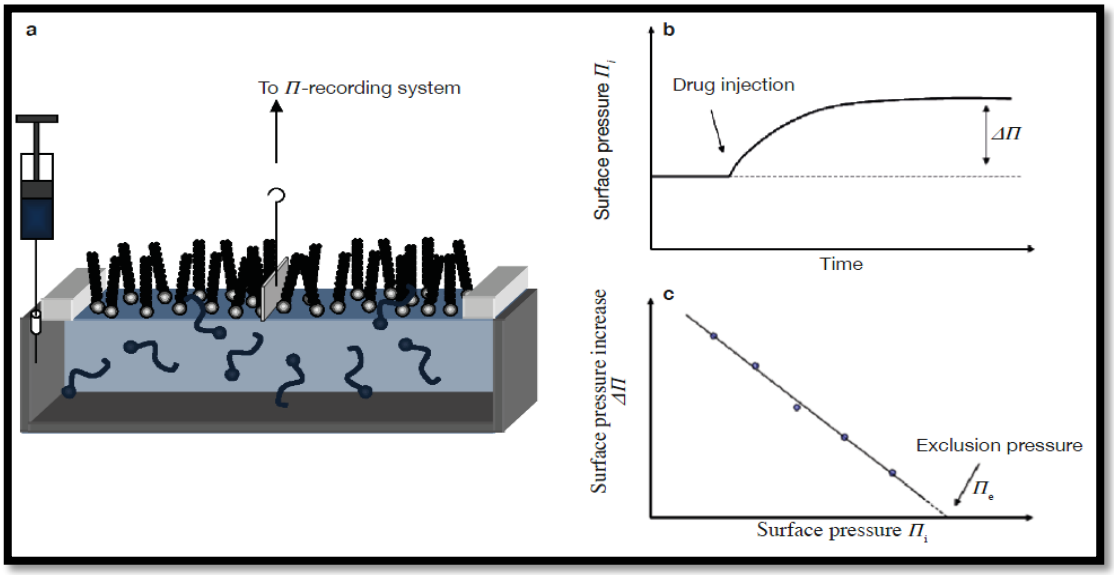
ahol $\pi_c$ ($T$) az átmenet oldalnyomása. A lipid film molekuláinak az LC (kondenzált folyadék) fázisba való kerülésével egyre kevésbé lesz összenyomható a kialakított film, az oldalnyomás meredeken növekszik. A filmet a lipid molekulák tömör illeszkedése és rendezettsége jellemzi. A további összenyomás eredménye a kollapszus, amikor a monorétegnek 3 dimenziós tulajdonságai jelennek meg, mert a molekulák a felület fölé torlódnak, és a kis távolság miatt fellép a taszító kölcsönhatás. A molekuláris felületigény az izoterma „szilárd” monorétegre jellemző szakaszából határozható meg extrapolációval.[7]

## 2.3 Penetráció Langmuir-filmeken

### 2.3.1 Penetráció

A biológiai membránok igen komplex rendszerek, amelynek fő alkotói a foszfolipidek és a fehérjék. A membrán tulajdonságok, struktúrák és folyamatok tanulmányozására az utóbbi évtizedekben számos modell született. A legtöbbet tanulmányozott modellek a biomimetikus lipid monorétegek, vezikulumok és lipid kettősrétegek. A különböző rendszerek egyaránt rendelkeznek előnyökkel és hátrányokkal, de ezek állnak a legközelebb a biológiai membránokhoz. A lipid monoréteg előnyös tulajdonságai a többi rendszerrel összehasonlítva, hogy a paraméterek többsége, mint a kémiai felépítésük, a molekulák elhelyezkedése, a szubfázis tulajdonságai (pH, ionerősség) és a hőmérséklet változtatható és jól szabályozható a vizsgálatok során. Ebből kifolyólag igen hasznosnak bizonyultak gyógyszerhatóanyagok, gyógyszerhordozók, különböző természetes és szintetikus anyagok, mint felületaktív anyagok lipiddel való kölcsönhatásának leírására. A kölcsönhatás jellemzése a fentebb említett oldalnyomás-terület izotermák összehasonlítása alapján történik.

Penetrációs mérések végzése során különböző, az alsó fázisban oldott molekulák membránnal való kölcsönhatását tanulmányozzuk. Ehhez a Langmuir-kádban létrehozott oldhatatlan monoréteg alá injektáljuk a vizsgálandó anyagok megfelelő oldószerben elkészített oldatát. Az injektálást követően, a kölcsönhatás erősségének mértékétől függően az oldalnyomás ($\pi$) növekedését tapasztaljuk, ahogy a 2.3.1.1 ábra mutatja. Minél nagyobb az oldalnyomásban tapasztalt változás ($\Delta\pi$), annál nagyobb a penetráció hatékonysága. Meghatározva a különböző kezdeti oldalnyomású lipid filmbe való penetráció mértékét, és ezt a kezdeti oldalnyomás függvényében ábrázolva, $\Delta\pi$ =0-ra extrapolálva megkaphatjuk, az un. penetrációs küszöb ($\pi_e$) értéket. Ez annak a filmnek az oldalnyomása, amibe még képes penetrálni az adott anyag.




*2.3.1.1 ábra: Modellanyagok penetrációja, sematikus ábra és kísérleti görbe* [6]

### 2.3.2 Penetrációs modell anyagok: felületaktív anyagok

A lipid monorétegeknek számos vegyülettel vizsgálták a kölcsönhatását a Langmuir-technika megszületése óta. Az amfipatikus tulajdonságú anyagok penetrációs modellanyagként való használata széles körben elterjedt, hiszen az apoláris alkillánc jó eséllyel biztosítja a membrán kettős foszfolipid rétegén való átjutást, míg a fejcsoport lehetőséget nyújt a vizes fázisban való tartózkodásra, aminek abból a szempontból van jelentősége, hogy az emberi test nagy százalékban tartalmaz vizet és az intracelluláris térben is víz található. De fontos megjegyezni, hogy az amfipatikus tulajdonság mellett egyéb feltételek is adódnak, amiket érdemes figyelembe venni, mint kémiai egyszerűség, felületi aktivitás, aggregációs tulajdonságok, biológiai aktivitás, alacsony toxicitás és nagymértékű biodegradábilitás.

A felületaktív anyagok négy nagy családba sorolhatóak jellemzően a fejcsoport tulajdonsága alapján: nemionos, kationos, anionos, amfoter. Ezen típusok közül elsőként a nemionos felületaktív anyagok, mint pl. a Triton X-100 kölcsönhatását vizsgálták kettős- és monorétegekkel egyaránt. A tapasztaltak szerint ez a felületaktív anyag rendelkezik penetrációs hatékonysággal. A monoréteggel való kölcsönhatása a penetrációnál leírt hatással jelentkezik, vagyis növeli az oldalnyomást [8], míg kettősréteggel való kölcsönhatásakor a kölcsönhatás három szakaszra bontható (az egyes szakaszok a koncentráció tartományokat jelölik). Az első szakaszban a penetráló anyag asszociálódott a kettősréteggel, de eltávolítható volt pufferrel történő mosás hatására, épségben hagyva a kettősréteget. A második szakaszban már kötődött a kettősréteghez, és egy határértéket elérve az adszorpció megállt, és a lipid kettős réteg eltűnt, feltehetően szolubilizálódott. A hatás a koncentráció növelésével gyorsabb volt. A harmadik szakaszban a lipidréteg azonnal eltűnt, és helyette a felületaktív fedőréteg alakult ki, amely már pufferrel sem volt teljes mértékben eltávolítható. [9]

A kationos felületaktív anyagok családjából is számos példa található, mint például különböző alkil-ammónium-sók, ezen belül az általam is vizsgált DTAB dodecil-trimetil-ammónium-bromid és ennek kisebb, ill. nagyobb szénatomszámú társai TTAB, OTAB, CTAB, stb., és az arginin alapú kationos felületaktív anyagok. Számos biológiai vizsgálat mutatja azt is, hogy a kationos felületaktív anyagok fertőtlenítő, antibakteriális hatását a nagymértékű, membránroncsoló tulajdonságukkal van összefüggésbe. Ugyanakkor lipid monoréteggel való kölcsönhatás kísérleti talumányozása alig található az irodalomban. Az arginin alapú kationos felületaktív anyagok esetében megfigyelték, hogy anionos lipid monorétegbe könnyebben jutnak be, mint ikerionos szerkezetűekbe.[10]

Ahogy arról több közleményben beszámolnak [11-14], a penetráló anyagok, függően az alkilláncchosszától, a fejcsoport töltésétől, a molekula szerkezetétől, konformációjától, eltérő módón befolyásolják a membrán tulajdonságokat (fluiditás, diffúzió, stb.), és hatolnak be a membránba, alakítják az unimolekuláris lipidfilm szerkezetét. Penetrációjuk mértéke ugyanúgy eltérő egymáshoz képest, és egy adott anyag esetén a különböző koncentrációknál. Így minden újabb anyag vizsgálatával kapott eredmény új lehetőséget is hordoz magában.

### 2.3.3 A penetráció hatására bekövetkező változás a lipid film oldalnyomásában

A lipid filmben a penetráció hatására bekövetkező oldalnyomás változás értelmezésére kidolgozott modellek alapja az, hogy a penetráló anyag molekuláinak határfelületen való adszorpciója a különböző adszorpciós izotermákkal leírható. A két adszorpciós izoterma, amelyet leggyakrabban alkalmaznak a Langmuir- és a Frumkin-izoterma [15,16]. Az adszorpció hajtóereje a modellek esetében a már ismertetett hidrofób kölcsönhatás. A Langmuir izotermás

modellek esetében a hajtóerőt konstansnak, míg a Frumkin izoterma modellek esetében a felület borítottságával lineárisan növekvőnek tekintik. A Langmuir izotermás modell elhanyagol minden kölcsönhatást a penetráló molekulák és a határfelületi rétegben adszorbeálódott molekulák között, így a penetráció hatékonyságát a felület borítottságának mértéke szabja meg. A Frumkin modell figyelembe veszi az esetlegesen fellépő párkölcsönhatásokat a rendszerben, amelyek rendre a lipid-lipid, tenzid-tenzid, lipid-tenzid molekulák között léphetnek fel. Ugyanakkor vizsgálja azt, hogy a penetráció hatékonyságát ezen kölcsönhatások közül melyik befolyásolja legnagyobb mértékben, és milyen hatással van a penetrációs modellrendszerre.
A Gibbs-féle adszorpciós egyenlet kétkomponensű rendszer esetén:

$$-d\gamma = d\pi = \Gamma_1 d\mu_1 + \Gamma_2 d\mu_2 \qquad (2.3.3.1)$$

ahol γ ($Nm^{-1}$) a határfelületi feszültség, $\pi$ ($Nm^{-1}$) az oldalnyomás, $\Gamma_i$($mol/m^2$) az i-edik komponens felületi koncentrációja, $\mu_i$az i-edik komponens kémiai potenciálja.
A monoréteg parciális molekuláris területigénye a következő egyenlettel adható meg:

$$\overline{A_1} = \left(\frac{d\mu_1}{d\pi}\right)_{A,n_1} = A_1^{\circ} \qquad (2.3.3.2)$$

ahol $A_1^{\circ}$ a tiszta monoréteg határfelületi molekuláris területigénye $\pi$ oldalnyomás mellett. $A$ pedig a határfelület teljes területe, $n_1$ (mol) a monoréteg molekuláinak anyagmennyisége a határfelületen. A 2.3.3.1 és a 2.3.3.2 egyenletek kombinálásával megadható a penetráló molekulák felületi koncentrációja:

$$\Gamma_2 = \left(\frac{1}{RT}\right)\left(\frac{A_1 - A_1^{\circ}}{A_1}\right)\left(\frac{\partial\pi}{\partial \ln C_2}\right)_{A,n_1} \qquad (2.3.3.3)$$

A Gibbs-adszorpciós egyenlet (2.3.3.1) módosításával, megadható a 2-s komponens, penetrációs anyag kémiai potenciáljának teljes differenciálja:

$$d\left(\mu_1 + \frac{\gamma}{\Gamma_1}\right) = \gamma d\left(\frac{1}{\Gamma_1}\right) - \frac{\Gamma_2}{\Gamma_1} d\mu_2 \qquad (2.3.3.4)$$

$$d\mu_2 = \left(\frac{d\mu_2}{dC_2}\right)_{T,P} dC_2 \qquad (2.3.3.5)$$

A 2.3.3.4 és 2.3.3.5 egyenletek felhasználásával a penetráció fundamentális egyenletéhez jutunk:

$$d\Phi = d\left(\mu_1 + \frac{\gamma}{\Gamma_1}\right) = \frac{\Gamma_2}{\Gamma_1}\left(\frac{d\mu_2}{dC_2}\right)_{T,P} dC_2 + \gamma d\left(\frac{1}{\Gamma_1}\right) \qquad (2.3.3.6)$$

A penetrációs anyag és a monoréteg molekuláinak egyaránt van maximális felületi koncentrációja $\Gamma_{2\infty}$ és $\Gamma_{1\infty}$, továbbá az egyes komponensek határfelületből elfoglalt frakciója:

$$x_i = \Gamma_i \,/\, \Gamma_{\infty i} \qquad (2.3.3.7)$$

Az adszorpció fluxusa:

$$j_a = \beta C_{2s}[1 - (x_1 + x_2)] \qquad (2.3.3.8)$$

ahol $C_{2s}$ a penetrációs anyag diffúziós alrétegben lévő koncentrációja, $\beta$ az adszorpció kinetikus konstansa. A deszorpció fluxusa:

$$j_d = \alpha x_2 \qquad (2.3.3.9)$$

ahol $\alpha$ a deszorpció kinetikus konstansa. Egyensúlyban az adszorpció és a deszorpció kiegyenlíti egymást. A kinetikus konstansok Arrhenius-egyenlet jellegű alakja:

$$\beta = \beta_0 e^{E_a/RT} \qquad (2.3.3.10)$$

$$\alpha = \alpha_0 e^{E_d/RT} \qquad (2.3.3.11)$$

ahol $E_a$, $E_d$ az adszorpció és a deszorpció kinetikus energiája. Ha a kinetikus energiák függetlenek a két speciesz felületi koncentrációjától, akkor az adszorpció a Langmuir adszorpciós izoterma egyenlettel írható le:

$$\frac{x_2}{1-x_1} = \frac{k}{k+1} \qquad (2.3.3.12)$$

ahol $k$ a koncentrációval arányos mennyiség.

Ellenkező esetben, amikor a kinetikus energiák függnek a két speciesz felületi koncentrációjától, vagyis a felületaktív penetrációs anyag taszító vagy vonzó kölcsönhatásban van a monoréteg molekuláival, a kinetikus energia az átlagos kinetikus energiával adható meg:

$$E_{a,d} = E^{\circ}_{a,d} + \sum_{i-1,2} v_{a,d_i}\Gamma_i \qquad (2.3.3.13)$$

Az adszorpciót pedig a módosított Frumkin izoterma egyenlet írja le:

$$\frac{x_2}{1-x_1} = \frac{k}{k+e^{K_1 x_1}} \qquad (2.3.3.14)$$

ahol $K$ a párkölcsönhatási paraméter:

$$K_i = \frac{\left(v_{a_i} - v_{d_i}\right)\Gamma_{\infty i}}{RT} \qquad (2.3.3.15)$$

Az $i$ megfelelő komponensek jelölésével lehet 1-2 ill. 2-2. Az 1-2 jelölés a monoréteg molekulái és a felületaktív penetráló anyag közötti kölcsönhatást jelöli, míg a 2-2 jelölés a tenzidmolekulák egymással való kölcsönhatására vonatkozik. A vonzó kölcsönhatás esetében $K_i$<0, tasztító kölcsönhatás esetében $K_i$>0. Ha a Langmuir adszorpciós izoterma modell teljesül, akkor $K_i$=0.

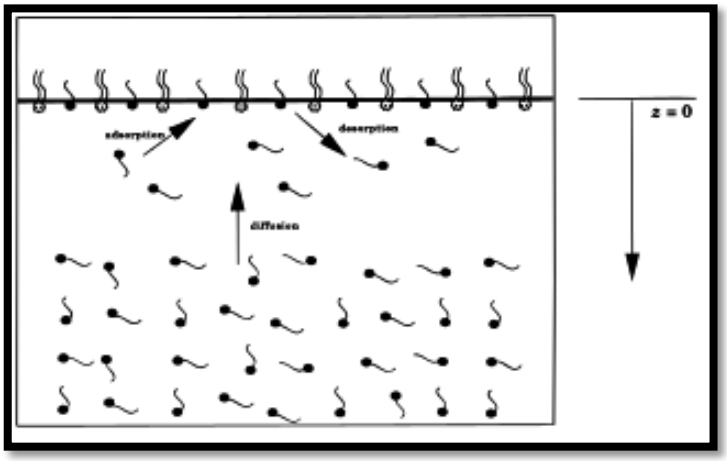
A Langmuir izoterma modell esetében az oldalnyomás-változás:

$$\Delta\pi = -RT\Gamma_{\infty 2} ln\left[1 - \frac{x_2}{1-x_1}\right] \qquad (2.3.3.16)$$

A Frumkin izoterma modell esetében az oldalnyomás változás 1-2 párkölcsönhatásnál:

$$\Delta\pi = -RT\Gamma_{\infty 2} ln\left[\left(1 - \frac{x_2}{1-x_1}\right) - K_1 x_1 x_2\right]^{[10]} \qquad (2.3.3.17)$$

Mindezek alapján, a penetráció során bekövetkező oldalnyomás növekedés koncentrációval és a monoréteg komprimáltságával bekövetkező változásának tendenciája alapján megállapítható a felületaktív anyag penetrációs viselkedése az alkalmazott lipid monoréteg jelenlétében.




*2.3.3.1 ábra: A penetráció során kialakuló adszorpciós-deszorpciós* egyensúly [15]

## 3. Célkitűzések

A szakdolgozat célja a biológiai szempontból fontos membrán affinitás tanulmányozása, illetve modellezése volt fluid határfelületen. Ehhez penetrációs méréseket végeztem kationos, és ezen belül az alkil-ammónium-bromidok családjába tartozó tenzidekkel, lipid oldhatatlan unimolekuláris filmen. A kísérleteimhez az intuíciót egy 2012-ben publikált cikk adta [14].

Mivel az egyes anyagok membrán affinitása több paramétertől függ (alkillánchossz, fejcsoport töltése, alkalmazott koncentráció, oldhatóság, stb.) az ilyen vizsgálatokat több aspektusból is meg lehet közelíteni. A modellmembrán jellegétől (alkillánchossz, fejcsoport töltése, lánckonformáció, stb.) függően a penetrációs anyag és a mono- vagy kettősréteg molekulái között felléphet például a töltéssel rendelkező fejcsoportok miatt elektrosztatikus kölcsönhatás, vagy a határfelületen lévő lipid molekulákkal történhet aggregátumképzés, emellett a tenzid akár ki is szoríthatja a lipid molekulákat a határfelületi rétegből, ezzel egy új fedőréteget alakítva ki.

Az idézett munkában antibakteriális hatást mutató, kationos polielektrolitok membrán affinitását vizsgálták. A különböző hidrofobicitású molekula sorozatot úgy hozták létre, hogy a polielektrolitra (polietilénimin, PEI) további, pozitív töltéssel rendelkező csoportokat (kvaterner-ammóniumsók), eltérő hosszúságú alkilláncokat ($C_8$-$C_{16}$), valamint az oldhatóság elősegítése érdekében polietilén-oxid láncokat (PEO) kapcsoltak. Az eredmények azt mutatták, hogy az amfitpatikus polieletrolitok rendkívül nagy penetrációs képességgel rendelkeznek, így felmerült a kérdés, hogy ezért a molekulák mely részei a felelősek. Ennek vizsgálatához érdemesnek látszott a kis molekulás, kationos felületaktív anyagok membrán affinitásával való összehasonlítás. További, érdekes tapasztalat volt, hogy az adott sorozatban a növekvő hidrofobicitással a molekula felületaktivitása, illetve membrán affinitása egyaránt csökkent.[14]

Az én célkitűzésem az volt, hogy a hidrofobicitás változása miatt bekövetkező felület- és membránaktivitás változást vizsgáljam, egy egyszerűbb molekula esetében. Ehhez az alkil-ammónium-bromidok családjába tartozó tenzideket választottam. A penetrációs anyagként gyakran alkalmazott ilyen típusú tenzidek a következőek: OTAB ($C_8$), DeTAB ($C_{10}$), DTAB ($C_{12}$), TTAB ($C_{14}$), HTAB ($C_{16}$). Mivel a rendelkezésemre álló idő nem lett volna elegendő az 5 tenzid több koncentrációban való vizsgálatára, ezért kiválasztottam közülük egyet ahhoz, hogy tanulmányozzam, ezen tenzidek milyen membrán affinitással rendelkeznek, illetve, hogy a membrán affinitás változásából következtetéseket vonhassak le arra, hogy a koncentráció növekedésével csökken vagy nő a penetrációs hatékonyság. Ez az anyag célszerűen a DTAB volt, a szénatomszám mediánjaként, bízva abban, hogy a penetrációs hatékonysága elegendően intenzív, és a mérések reprezentatív eredményeket adnak. Ehhez ezen anyag öt koncentrációjában, és minden koncentráció esetén négy különböző oldalnyomáson végeztem penetrációs méréseket.

A hidrofobicitás növelésével bekövetkező változásokat is szerettem volna megmutatni. Ehhez a DTAB közvetlen szomszédját választottam, a nagyobb szénatomszámú TTAB-t. Az elvárásaim a két anyag egymáshoz viszonyított viselkedésére az volt, hogy a hosszabb alkillánccal, a hidrofobicitás növelésével, ugyanolyan mérési körülmények között, a TTAB felület- és membránaktivitása a DTAB-éhoz képest nagyobb lesz. Ehhez a DTAB-dal végzett mérések közül kiválasztottam két koncentrációt, és a TTAB ugyanilyen koncentrációjú oldataival is elvégeztem a penetrációs méréseket.

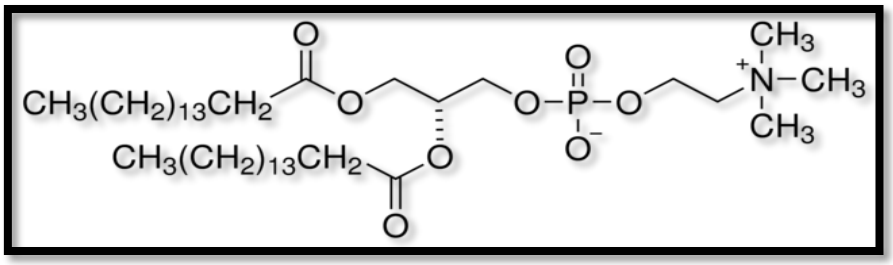
# 4. Kísérleti anyagok és módszerek

## 4.1 Kísérleti anyagok

### 4.1.1 Lipid-kationos tenzid kölcsönhatásának vizsgálata

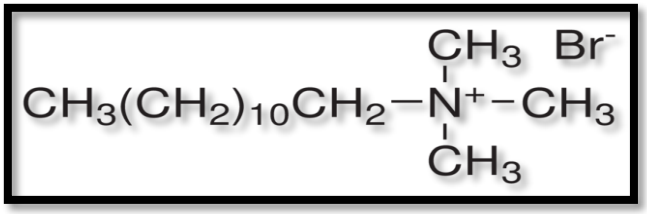
Kationos tenzidek egyszerű unimolekuláris lipid modell membránnal való kölcsönhatásának vizsgálata során, és a kölcsönhatás alkilláncholsztól való függésének reprezentálásához az alábbi anyagokat használtam.

A lipid film kialakításához:
dipalmitoil-foszfatidil-kolin: (DPPC, M=734,04 g/mol), ≥99 % tisztaságú lipid (Sigma Aldrich Kft., Magyarország).



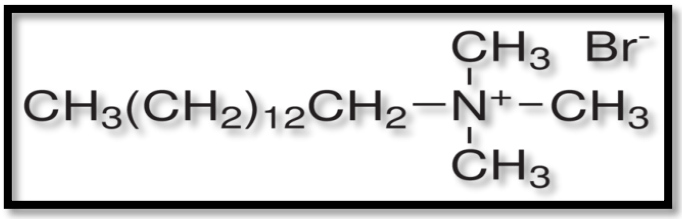

*4.1.1.1 ábra: DPPC molekula, Sigma Aldrich Kft.*

Penetrációs modellanyag:
kationos tenzid: dodecil-trimetil-ammónium-bromid (DTAB, M=308,34 g/mol), ≥98 % tisztaságú tenzid (Sigma Aldrich Kft., Magyarország). Kritikus micellaképződési koncentráció (cmc): 4,6 g dm-$^{3}$,




*4.1.1.2 ábra: DTAB molekula, Sigma Aldrich Kft.*

kationos tenzid: tetradecil-trimetil-ammónium-bromid (TTAB, M=336,39 g/mol), ≥98 % tisztaságú tenzid (Sigma Aldrich Kft., Magyarország). Kritikus micellaképződési koncentráció (cmc): 1,09 g dm-$^{3}$.




*4.1.1.3 ábra: TTAB molekula, Sigma Aldrich Kft.*

A tenzideket tisztítás nélkül alkalmaztam.

A vizsgált koncentrációkat a 4.1.1.1 táblázat foglalja össze.

| **Penetrációs modell anyag** | **Koncentráció** | |
|---|---|---|
| | **(g dm$^{-3}$)** | **(cmc)** |
| DTAB | 0,046 | 0,01 |
| | 0,092 | 0,02 |
| | 0,92 | 0,2 |
| | 1,84 | 0,4 |
| | 3,68 | 0,8 |
| | 4,6 | 1 |
| TTAB | 0,0218 | 0,02 |
| | 0,218 | 0,2 |
| | 1,09 | 1 |

4.1.1.1 táblázat: A vizsgált DTAB és TTAB oldatok koncentrációja g dm$^{-3}$-ben, illetve az adott felületaktív anyag kritikus micellaképződési koncentrációjának többszöröseként kifejezve.

A kísérlet során felhasznált oldószerek, tisztítószerek fontosabb adatait a 4.1.1.2 táblázat tartalmazza.

| **Név** | **Összegképlet** | **Moláris tömeg *M* / g/mol** | **Forráspont *T*/°C** | **Sűrűség *ρ*/ g cm$^{-3}$** | **Tisztaság %** | **Gyártó** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kloroform | $CHCl_3$ | 119,38 | 61,2 | 1,48 | 99,8 | Fischer Chemicals |
| Metanol | $CH_3OH$ | 32,04 | 64,7 | 0,792 | 99,9 | Sigma-Aldrich Kft. |
| Diklórmetán | $CH_2Cl_2$ | 84,93 | 40 | 1,33 | 99,9 | Spektrum-3D Kft. |

4.1.1.2 táblázat: Az alkalmazott oldószerek fontosabb adatai

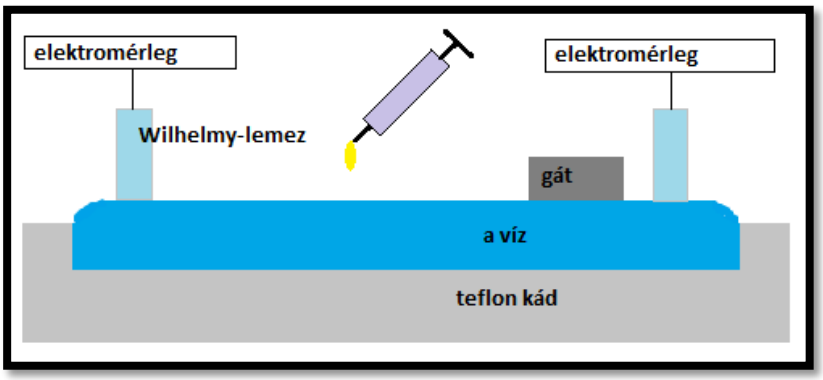
Az oldatok elkészítéséhez és a Langmuir-kád tisztításához kétszer desztillált vizet használtam. Ennek vezetőképessége <5 μS, felületi feszültsége 23,0±0,5 °C-on >72,0 mN m$^{-1}$.

## 4.2 Kísérleti módszerek

### 4.2.1 Langmuir-mérleges mérések

A lipid - kationos tenzid kölcsönhatás vizsgálatához az oldhatatlan lipid unimolekuláris filmet Langmuir-mérlegben állítottam elő. A mérleg részei a teflon kád (25x6x0.3cm), a felületi feszültség mérésére szolgáló bal- ill. jobb oldali elektromérleg és a hozzájuk kapcsolódó bal- ill. jobb oldali Wilhelmy-lemezek, valamint a teflon kádon elhelyezkedő mozgatható gát (4.2.1.1 ábra).

A Langmuir-mérleg két erőmérő egysége Nima gyártmányú (Coventry, Anglia), melyek érzékenysége: 50μN/m.
A kád tervezése és kivitelezése a ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriuma és az MTA MFA együttműködésében történt.




*4.2.1.1 ábra: Langmuir-mérleg sematikus ábrája*

Az egyszer használatos Wilhelmy-lemez a mérések során előzetesen kétszer desztillált vízben kiáztatott, majd levegőn szárított, kromatográfiás szűrőpapír (Whatman Chrl) volt, ugyanis a mérés igen érzékeny a szennyezésekre, emellett a Wilhelmy-lemezként általában alkalmazott platina lemez folytonos tisztítása nehézséget jelentett volna. A két elektromérlegre közel azonos (csak mg-ban eltérő) tömegű, szűrőpapír lapka került. A felhelyezést követően körülbelül 5 perc várakozási időt hagytam, hogy a lapok a kapilláris hatás révén telítődjenek a kétszer desztillált vízzel.

A mérések előtt a kádat alapos tisztításnak vetettem alá, amely magába foglal legalább négy oldószeres mosást, a kád esetében diklórmetános, a gát esetében metanolos tisztítást. Az oldószeres mosásokat követően a kádat kétszer desztillált vízzel töltöttem fel. Két mosás között negyedóránként cseréltem a vizet a kádban. A kétszer desztillált víz pH-ja normál laboratóriumi körülmények között pH= 5,6-5,8 értékre áll be. A kád tisztaságát a mérések előtt a víz felületi feszültségének mérésével ellenőriztem, a mérések hőmérsékletén, 23±0,5°C-on. A mérés hőmérsékletét nem termosztáttal, hanem a laboratórium légkondícionálásával biztosítottam, és higanyos hőmérővel ellenőriztem. Az adatok rögzítése számítógépes szoftver segítségével történt (LBS project1).

Az így előkészített Langmuir-mérlegen a következő méréseket végeztem el:

1. DPPC unimolekuláris filmek oldalnyomás-terület izotermáinak felvétele
2. DPPC unimolekuláris film stabilitásának vizsgálata
3. DPPC kölcsönhatása katinos tenzidekkel: penetráció mérés

#### 4.2.1.1 Unimolekuláris DPPC lipid film izotermájának felvétele

A DPPC unimolekuláris lipid film kialakításához a kétszer desztillált víz, mint szubfázis felületén a lipid 0,2 mg/ml koncentrációjú oldatát terítettem szét. A lipid oldatának elkészítésekor a tömeget $10^{-4}$ g pontossággal, analitikai mérlegen mértem be, közvetlenül a kupakos folyadékedénybe. Az oldószer kloroform és metanol elegye volt, amelynek térfogatszázalékos összetétele: 95% kloroform és 5% metanol. A hozzáadás sorrendje 5% metanol, majd 95% kloroform. Az oldószerek bemérését Hamilton fecskendővel végeztem. Az így elkészített oldatot legalább fél óráig állni hagytam, állás közben néha-néha összeráztam.

A mérések kezdetén beállítottam a referencia felületi feszültség értékeket, és a hőmérsékletet. A lipid oldatot kloroformmal átmosott Hamilton fecskendővel cseppenként juttattam a szubfázis felületére. A teljes terített mennyiség 65 µl volt. Ezt követően az oldószer elpárolgására 15 percet hagytam, majd a szoftver paramétereinek beállítása után a gát lassú, konstans sebességgel történő mozgatásával felvettem a lipid film oldalnyomás-terület izotermáját. Egy-egy felvett izoterma ciklusa, egy kompressziós és expanziós szakaszból áll. Minden mérés esetén két izotermát vettem fel. A gát mozgatási sebessége: 33,9 mm/perc (0,005 $Å^2$ / (molekula*perc)) volt. Az izotermákat a 0-25 $mNm^{-1}$ oldalnyomás tartományban vettem fel.

#### 4.2.1.2 Unimolekuláris DPPC lipid film stabilitásának vizsgálata

Az előbbiekben leírtakkal megegyező módón tisztítottam meg a kádat a méréshez, és készítettem el az alkalmazott DPPC 0,2 mg/ml-es oldatát. A szubfázisra való szétterítés során is azonos módon jártam el. A gát mozgatási sebessége: 33,9 mm/perc (0,005 $Å^2$ / (db*perc)) volt. Az izotermák felvételét követően, a szoftver paramétereit stabilitás mérésére állítottam át.

A stabilitás vizsgálatokra azon oldalnyomásokon került sor, amelyen a penetrációkat terveztem végezni. Ennek megfelelően, a stabilitás vizsgálat során felvettem a lipid film kompressziós izotermáját a korábban is alkalmazott sebességgel, majd a kívánt oldalnyomás, 10, 15, 20, illetve 25$mNm^{-1}$ elérésekor megállítottam a gátat, és a gát konstans pozíciója mellett, 70 percen keresztül követtem az oldalnyomásban bekövetkező változásokat.

#### 4.2.1.3 Penetráció

Az előbbiekben leírtakkal megegyező módón tisztítottam meg a kádat a méréshez, és készítettem el az alkalmazott DPPC 0,2 mg/ml-es oldatát. A lipid szubfázisra való terítését követően megvártam az oldószer elpárolgását, majd két izotermát vettem fel. A gát mozgatási sebessége: 33,9 mm/perc (0,005 $Å^2$ / (db*perc)) volt. Az izotermák felvételét követően, a szoftver paramétereit penetráció mérésére állítottam át.

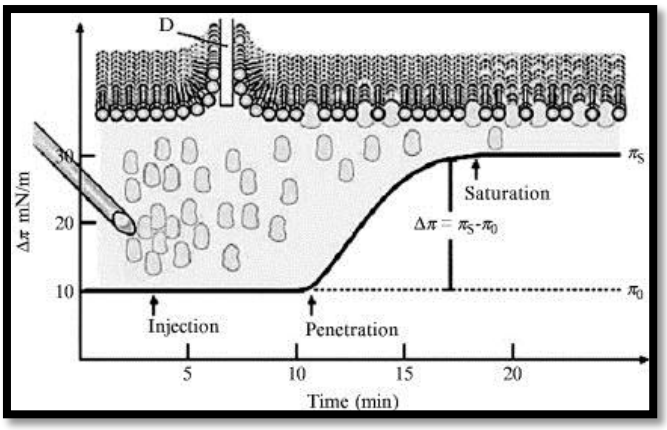
A penetrációhoz, vagyis a lipid film és a kationos tenzid közötti kölcsönhatás vizsgálatához a tenzideket analitikai mérlegen mérten be, a kívánt koncentrációnak megfelelően, majd mérőlombikban kétszer desztillált vízben oldottam fel. Az oldatokat legalább egy napos állás után használtam fel. A penetrációs méréseket 10, 15, 20, illetve 25 $mNm^{-1}$ oldalnyomással jellemzett lipid filmmel végeztem.

Első lépésként felvettem a kompressziós izotermát. A kompressziós izoterma felvétele után a program indította el a penetrációs mérést. Az első 10 percben a DPPC oldat stabilitását vizsgáltam, vagyis azt, hogy az adott gátpozíció mellett mennyit csökken az oldalnyomás. Ha a 10 perc alatt a DPPC elég stabilnak bizonyult, akkor a 10 perc leteltekor a kád oldalán lévő

lyukon keresztül, műanyagfecskendő (2,5 ml-es) segítségével a szubfázisba injektáltam a tenzid megfelelő koncentrációjú oldatát. Az injektált mennyiség 2,4 ml volt. Ezt követően pedig 60 percig detektáltam az oldalnyomásban bekövetkező változást az erőmérő segítségével.

A kádat minden mérés kezdetén 93 ml kétszer desztillált vízzel töltöttem fel, amelyből kb. 5 ml mennyiségét a felület tisztításakor leszívtam. Ez több, mint a kád teljes térfogata (45 ml), mivel a méréseket domború vízfelszín mellett végeztem. A szubfázisra terített DPPC µl-es mennyisége az oldószer elpárologtatását követően, nem okoz a mérés szempontjából olyan mértékű térfogatváltozást, amit figyelembe kellene venni az eredmények értékelésekor. Hasonlóan a penetrációs anyag injektált mennyisége is elhanyagolható emelkedést okoz a vízszintben, amely a kád adatai (25x6x0,3 cm) alapján kiszámolva mindössze 0,016 cm.

Mivel a Langmuir-technika nagyon érzékeny méréstechnika, ezért a penetrációs körülményekben bármely kismértékű változás is eltérést okoz az eredményekben. A kapott eredmények alátámasztására parallel méréseket végeztem. A parallel mérési eredmények alapján megadható, hogy egy adott koncentráció esetében a külön mérésekből származó eredmények mennyire térnek el, ez az érték átlagosan a $\Delta\pi$-re nézve: $\approx$0,50.




*4.2.1.3.1 ábra: Lipid filmbe penetráló molekulák: sematikus ábra és penetrációs görbe* [17]

### 4.2.2 Felületi feszültség meghatározása Wilhelmy-lemezzel módszerrel

A tenzidek különböző koncentrációjú oldatainak felületi feszültségét a Langmuir-mérleges mérésektől függetlenül határoztam meg. A méréshez a tenzideket analitikai mérlegen mértem be, és mérőlombikban kétszer desztillált vízben oldottam fel. Az oldatokat legalább egy napos állás után használtam fel. A felületi feszültségeket tenziometrikusan határoztam meg. Az érzékelő egy elektromérleghez kapcsolt, platinából készült Wilhelmy-lemez volt, a folyadéktartó edény motorral mozgatott asztalkán helyzekedett el. A lemez paraméterei: szélessége: 20,5 mm, vastagsága: 0,2 mm, a bemerítés sebessége 1,19 cm/perc volt. A lemezt a folyadékfelszín alá merítettem be, majd a lap kiszakadásáig húztam ki. A lemez kiszakításához szükséges erőből számítottam a felületi feszültséget. Az erőmérőt a mérés előtt ismert tömegű lemezekkel kalibráltam. A mérés során minden oldattal való munka előtt kétszer desztillált víz felületi feszültségét mértem meg, az edény és a mérőlap tisztaságának ellenőzése érdekében. A vizsgált oldatok mennyisége minden esetben 50 ml volt. A kétszer desztillált víz mérését követően, a mérőedényben kicseréltem a vizet a mérendő oldatra, és a Wilhelmy-lemezzel 10 és 20 közötti párhuzamos mérést végeztem minden oldat esetében. A felületi feszültség értékek szórása $\leq$0,2 $mNm^{-1}$ volt.

A mérés körülményeit a 4.2.2.1 táblázatban foglaltam össze.

| | | |
|---|---|---|
| **Hőmérséklet *T* / °C** | | 23 |
| **Bemerítési sebesség *v*/ cm/min** | | 1,19 |
| **Adatgyűjtési frekvencia *f* / 1/sec.** | | 20 |
| **Platina lemez** | **szélesség / mm** | 20,5 |
| | **vastagság / mm** | 0,2 |

4.2.2.1 táblázat: Wilhelmy-lemezzel végzett felületi feszültség mérés paraméterei

A felületi feszültségeket, több esetben megmértem a gyűrűkiszakításos módszerrel (Du Noüy) is, és jó egyezést kaptam a két módszerrel meghatározott értékek között.

# 5 Eredmények és értékelésük

## 5.1 Kationos tenzid vizes oldatainak felületi feszültsége és a levegő/víz határfelületen történő adszorpciója

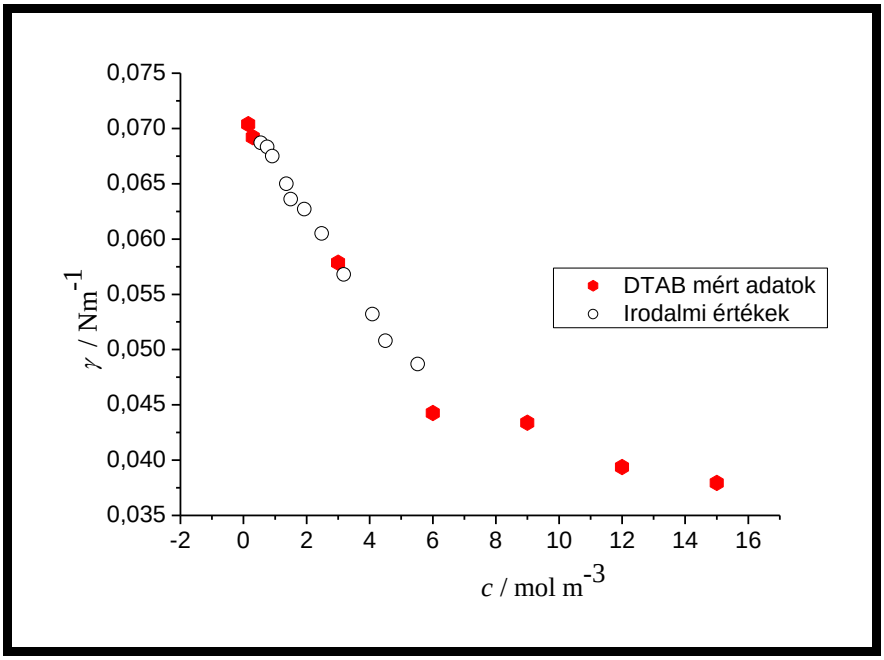
Az alkalmazott tenzidek felületaktivitásáról, azaz az oldat/levegő határfelületen való megkötődésükről, vizes oldataik felületi feszültségének értékéből nyerhetünk információt. Ehhez a kationos tenzidek penetrációs méréseknél alkalmazott, különböző koncentrációjú vizes oldatainak felületi feszültségét határoztam meg. A mérések elvégzése a penetráció hőmérsékeletén 23±0,5 °C-on történt, tisztított platina lemezzel, amelyet a mérendő folyadék tökéletesen nedvesített, vagyis a peremszög értéke nullának tekinthető.

A tenzid oldatok felületi feszültség értékeit az 5.1.1 táblázatban foglaltam össze.

| **A vizsgált oldat** | **Kationos tenzid koncentrációja** | | | **Az oldat felületi feszültsége $\gamma$ / mNm$^{-1}$** |
|---|---|---|---|---|
| | ***c* / g dm$^{-3}$** | ***c* / mol m$^{-3}$** | ***c* / cmc** | |
| **Kétszer desztillált víz** | 0 | 0 | 0 | 72,1 |
| **DTAB** | 0,046 | 0,15 | 0,01 | 70,4 |
| | 0,092 | 0,3 | 0,02 | 69,2 |
| | 0,92 | 3 | 0,2 | 57,9 |
| | 1,84 | 6 | 0,4 | 44,3 |
| | 2,76 | 9 | 0,6 | 43,4 |
| | 3,68 | 12 | 0,8 | 39,4 |
| | 4,6 | 15 | 1 | 38,0 |
| **TTAB** | 0,022 | 0,065 | 0,02 | 65,1 |
| | 0,22 | 0,65 | 0,2 | 60,8 |
| | 1,09 | 3,24 | 1 | 38,6 |

5.1.1 táblázat: A kationos tenzidek koncentrációinak és felületi feszültségeinek összefoglaló táblázata

Az 5.1.1 ábra a DTAB kationos tenzid felületi feszültségének koncentráció függését mutatja, a saját és irodalmi adatok együttes ábrázolásával [18]:




*5.1.1 ábra: A DTAB felületi feszültsége a koncentráció függvényében összehasonlítva irodalmi értékekkel* [18]

Az ábrán jól látszik, hogy a felületi feszültség a tenzidek koncentrációjának növelésével csökken.

Az adszorpció jellemzéséhez a Gibbs-féle adszorpciós többletkoncentráció értékét határoztam meg. A számítást a következő egyenlet alapján végeztem:

$$\Gamma_{DTAB} = -\frac{1}{2RT} * \frac{\partial y}{\partial[\ln c_{DTAB}]} = -\frac{c_{DTAB}}{2RT} * \frac{\partial y}{\partial[c_{DTAB}]} \qquad (5.1.1)$$

ahol $c$ a koncentráció (mol/m$^3$), $T$ a hőmérséklet (K), $R$ az egyetemes gázállandó (8,314 J*K/mol), $\gamma$ a felületi feszültség (N/m). Az egy molekulára eső területet (A /Å$^2$ / molekula) a következő egyenlettel számoltam:

$$A = \frac{1}{\frac{\Gamma * N_a}{10^{20}}} \qquad (5.1.2)$$

ahol $\Gamma$a felületi koncentráció (mol/m$^2$), $N_a$ az Avogadro állandó (6,022·10$^{23}$ db).

A Gibbs egyenlet alapján számolt értékeket az 5.1.2 táblázat mutatja.

| **c /cmc** | **c/ mol m-$^3$** | **1/c / m$^3$ mol$^{-1}$** | **fel. fesz. γ / N m$^{-1}$** | **Γ / mol m$^{-2}$** | **A / Å$^2$ molekula$^{-1}$** |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0,0721 | 0 | 0 |
| 0,01 | 0,15 | 6,667 | 0,0692 | 2,44*10$^{-7}$ | 681,4 |
| 0,02 | 0,3 | 3,345 | 0,0662 | 1,011*10$^{-6}$ | 164,2 |
| 0,2 | 3 | 0,335 | 0,0525 | 2,117*10$^{-6}$ | 78,4 |
| 0,4 | 6 | 0,167 | 0,0443 | 2,156*10$^{-6}$ | 76,9 |
| 0,8 | 12 | 0,084 | 0,0374 | 2,206*10$^{-6}$ | 75,3 |

5.1.2 táblázat: A DTAB felületaktivitásának jellemzéséhez számolt adatok

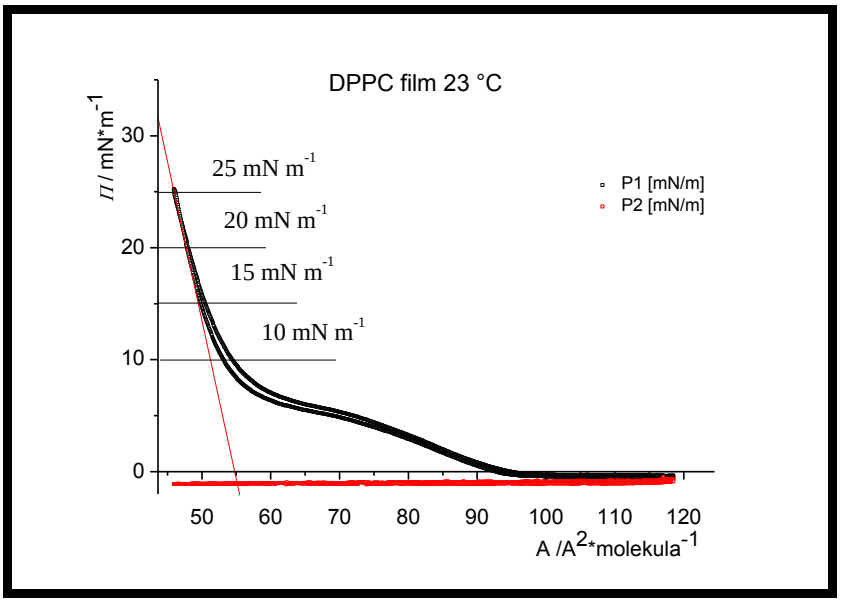
A Langmuir adszorpciós izoterma egyenlet alapján meghatározható a felületre vihető maximális koncentráció és a hozzá tartozó, egy molekulára eső terület, az 1/ $\Gamma$ vs. 1/c függvény tengelymetszetéből:

$$\Gamma_{\infty}=2{,}32*10^{-6}\text{mol/m}^2 \qquad A = 71{,}57\ \text{Å}^2\ /\ \text{molekula}, \qquad (5.1.3)$$

A számított Gibbs-féle adszorpciós többletkoncentrációk értéke pozitív, vagyis az oldott anyag felhalmozódott a határfelületi rétegben, ami összhangban van a felületi feszültség értékeknél tapasztalt csökkenéssel a koncentráció függvényében.

## 5.2 A DPPC lipid monoréteg izotermái

A lipid film oldalnyomás terület izotermák fontos információkat hordoznak az egyes felületi koncentrációk esetén a lipid film tulajdonságaira, vagyis a Langmuir-film kohezivitására, komprimálhatóságára. Az apoláris láncok közötti kölcsönhatás befolyásolhatja a penetráció hatékonyságát.[15, 19] A DPPC lipid film 25 N/m oldalnyomásig felvett izotermáját az 5.2.1 ábra mutatja.




*5.2.1 ábra: DPPC lipid film oldalnyomás-terület izotermája*

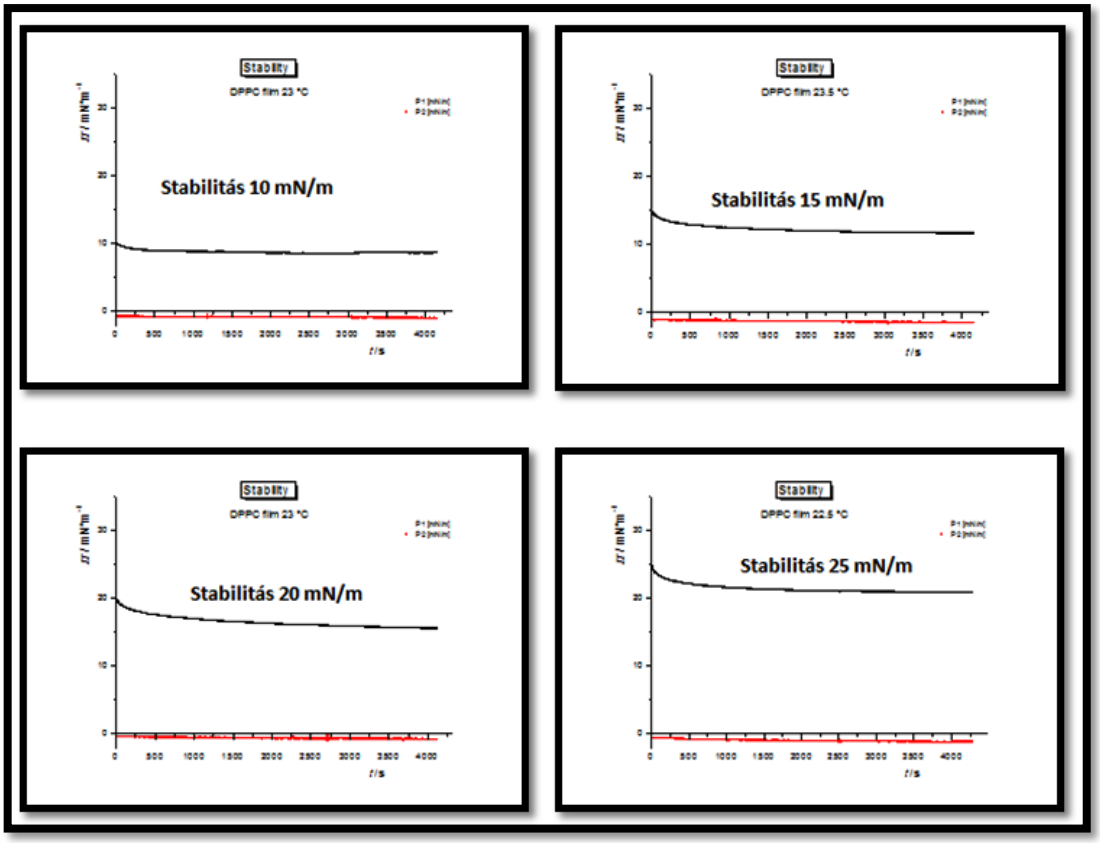
Langmuir-filmek esetében megkülönböztetünk nem-kohezív vagy gyengén kohezív és kohezív filmeket. Nem-kohezív filmekben az oldalnyomás teljes mértékben a részecskék közötti taszító kölcsönhatásoknak tulajdonítható, míg kohezív filmekben a komprimálás során többletenergiát kell biztosítani.

Az izotermák jellemző paramétere a kollapszus nyomás, amely oldalnyomásnál a film elveszti unimolekulás jellegét, a rétegek egymásra csúsznak. Vizsgálataink során, melyek a 0-25 $mNm^{-1}$-es tartományra terjedtek ki, nem értük el a DPPC kollapszus nyomását. Az izoterma legmeredekebb szakaszához illesztett egyenes terület tengellyel vett metszéspontja adja a tömör filmben egy molekulára eső terület nagyságát, vagyis a molekula területigényét. Az izotermák alakjának vizsgálatával, ill. annak irodalmi izotermákkal való összehasonlításával következtethetünk a kompresszió során bekövetkező fázisátalakulásokra.

Az általam felvett izotermák esetében az irodalmi áttekintésben bemutatott fázisátalakulások jól megfigyelhetőek. A kompresszió hatására a lipid molekulák között egyre erősödő Van der Waals kölcsönhatás révén egyre kompaktabb film jön létre. Az izotermákon látható a plató szakasz is, amely a jellegzetes LE-LC átmenetnek felel meg.

### 5.3 A DPPC lipid monoréteg stabilitása

A lipid film stabilitásának vizsgálata azt jelentette, hogy a kívánt oldalnyomás értékre komprimált lipid film oldalnyomásának időbeli változását detektáltam rögzített gát pozicionál. A stabilitás vizsgálatokat minden penetrációhoz választott oldalnyomású film esetében többször elvégeztem. Az egyes mérések ideje legalább 70 perc volt, hogy magába foglalja a penetrációt megelőző 10 perces várakozási időt és az egy órás penetrációs folyamatot is. A mérési ábrákat az 5.3.1 ábra mutatja.




*5.3.1 ábra: ADPPC lipid film stabilitási görbéi 10, 15, 20 és 25 mNm$^{-1}$ oldalnyomások mellett*

A stabilitás vizsgálatokból azt állapítottam meg, hogy a kompressziót követően, a gátat megállítva az oldalnyomás bizonyos mértékű csökkenést mutat. A DPPC lipid film relaxációjában az első 10 perc az, amely meghatározó változást mutat, ebben az időszakban az oldalnyomás nagyobb mértékben csökken. A további szakaszban a csökkenés mértéke jelentősen mérséklődik.

A stabilitás vizsgálatok és az izoterma felvételek egyik jellegzetessége, hogy a bal oldali erőmérőnek a lipiddel borított és a jobb oldali erőmérőnek a tiszta víz felületen szimultán regisztrált adatait is láthatjuk a kiértékelési görbéken. Ezen görbéken (5.3.1 ábra) jól látszik,

hogy a kompressziós és relaxációs mérések során a DPPC lipid film molekulái nem jutnak át a gát alatt, így az egyes mérések során nem kell számolnunk ezzel a hibalehetőséggel.
A stabilitás vizsgálatok során tapasztalt $\Delta\pi$ (oldalnyomás-csökkenés) értékeket az 5.3.1 táblázat mutatja. Eszerint az egy óra után mérhető oldalnyomás csökkenés összefüggést mutat a kezdeti oldalnyomással. Minél erősebben komprimált a film, annál nagyobb az oldalnyomás csökkenés, vagyis a relaxáció.

| **A lipid film kezdeti oldalnyomása $\pi$ / mNm$^{-1}$** | **Az oldalnyomás-csökkenés (60 perc) $\Delta\pi$ / mNm$^{-1}$** |
|---|---|
| 10 | 1,5 |
| 15 | 3 |
| 20 | 4,5 |
| 25 | 5 |

5.3.1 táblázat: A stabilitás vizsgálat során, 60 perc alatt bekövetkező oldalnyomás csökkenés

A stabilitásvizsgálatok egy órás eredményét a tenzid penetrációs hatékonyságának, vagyis az oldalnyomásban bekövetkezett növekedés megállapítására használtam fel. A penetráció miatti oldalnyomás-növekedés értékét, a penetrációs mérés egy órás eredménye és a stabilitás vizsgálat egy órás eredménye közötti különbségként kaptam meg.

A lipid film stabilitásának megismerése és jellemzése segítséget jelentett a penetrációs mérések elvégzéséhez. A stabilitási görbék alapján választottam a 10 perces küszöbértéket a penetráció kezdetének, és a penetrációs mérések során ezen 10 perc alatt bekövetkezett oldalnyomás csökkenést figyeltem.

## 5.4 Penetráció

A penetrációs mérések végrehajtása szempontjából az első 10 percet tekintettem meghatározó időnek. A penetrációt azon esetekben végeztem el, amely mérések során a lipid film oldalnyomás-változása összhangban volt az egyórás stabilitási vizsgálatokkal. Ez a szelekció hozzájárult a mérések reprodukálhatóságához.

A DTAB oldatokkal végzett penetrációs mérések eredményét az 5.4.1 táblázatban foglaltam össze.

| Penetráló anyag | Kationos tenzid koncentrációja | | A mérés kezdeti oldalnyomása $\pi$ / mNm$^{-1}$ | Az oldalnyomás növekedés $\Delta\pi$ / mNm$^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| | $c$ / mol/m$^3$ | $c$ / cmc | | |
| DTAB | 0,15 | 0,01 | 10 | 2,25 |
| | | | 15 | 2,0 |
| | | | 20 | 2,2 |
| | | | 25 | 2,4 |
| | 0,3 | 0,02 | 10 | 2,2 |
| | | | 15 | 2,0 |
| | | | 20 | 2,0 |
| | | | 25 | 1,3 |
| | 3 | 0,2 | 10 | 4,1 |
| | | | 15 | 3,8 |
| | | | 20 | 3,1 |
| | | | 25 | 3,3 |
| | 6 | 0,4 | 10 | 7,6 |
| | | | 15 | 6,5 |
| | | | 20 | 4,9 |
| | | | 25 | 3,8 |
| | 12 | 0,8 | 10 | 9,0 |
| | | | 15 | 7,3 |
| | | | 20 | 8,0 |
| | | | 25 | 4,4 |

5.4.1 táblázat: A DTAB oldatokkal végzett penetrációs mérések eredményének összefoglaló táblázata

### 5.4.1 A penetráció során bekövetkező oldalnyomás változás és annak értelmezése

A penetrációs mérések során az oldhatatlan unimolekuláris lipid filmbe hatolnak be a kationos tenzidek molekulái. Ez a folyamat az oldalnyomás megnövekedését eredményezi. Abban az esetben, ha ismerjük az adszorpciós izotermát, amely leírja a kationos tenzidmolekulák megoszlását a határfelület és a tömbfázis között, akkor a penetráció során bekövetkező oldalnyomás növekedést ($\Delta\pi$), a Gibbs féle adszorpciós egyenlet felhasználásával származtathatjuk. Az összefüggés bármelyik adszorpciós izoterma esetén érvényesül. A $\Delta\pi$ értelmezésére két modellt állítottak fel. [15] Az egyik a Langmuir izotermás modell, amely szerint a határfelületen lévő lipid film jelenléte csökkenti a penetráló anyag adszorpcióját, míg a másik a Frumkin izotermás modell, amely figyelembe veszi az esetlegesen fellépő kölcsönhatásokat a lipid és a tenzid, valamint a tenzid molekulák között.

A kísérleti penetrációs adatok összehasonlításához a modellekből számított értékekkel szükséges a lipid film tömörségét felületi borítottságként kifejezni.
Ez a penetrációk jellemzéséhez számolt borítottság érték:

$$x_1 = \frac{A_{1\infty}}{A_1} \qquad (5.4.1.1)$$

ahol $A_1$ az egyes film oldalnyomások mellett a DPPC egy molekulára eső terület igénye, míg $A_{1\infty}$a DPPC egy molekulára eső minimális terület igénye a legtömörebb (szilárd analóg) filmben.

Az $x_1$ értékek meghatározásához az 5.2.1 ábrán feltüntetett DPPC izotermát használtuk.

Az 5.4.1.1 táblázat ezen adatokat foglalja össze.

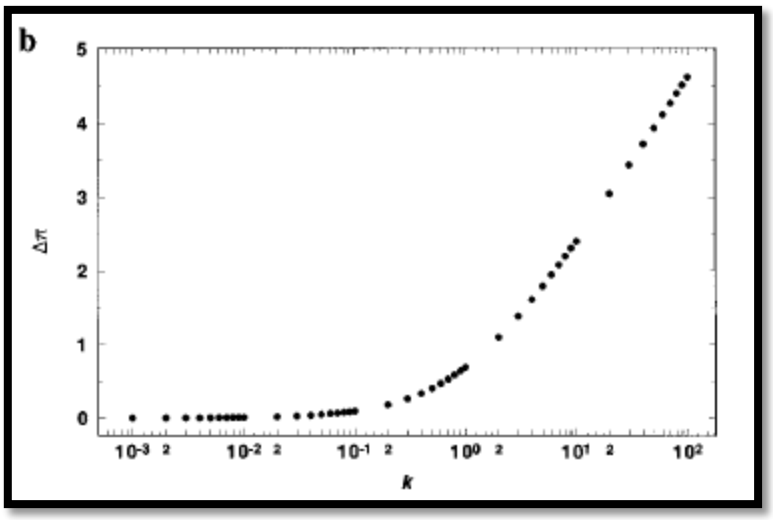
| **A DPPC film kezdeti oldalnyomása $\pi$ / mNm$^{-1}$** | **Területigény A / Å$^2$ /molekula** | $x_1$ |
|---|---|---|
| 10 | 57,76 | 0,87 |
| 15 | 54,58 | 0,92 |
| 20 | 52,29 | 0,96 |
| 25 | 50,32 | 1 |

5.4.1.1 táblázat: A penetráció kiértékeléshez számított $x_1$ értékek az egyes kezdeti oldalnyomásoknál

Az 5.4.1.1 táblázat adataiból látszik, hogy a lipid film komprimáltságával $x_1$ értéke nő.

### 5.4.1.1 Langmuir izotermás közelítés

A Langmuir izotermás modell esetében az adszorpciót, vagyis a penetráló molekulák határfelület és tömbfázis közötti megoszlását, a Langmuir adszorpciós izoterma egyenlet írja le. Amikor ezt a modellt használjuk, a lipid molekulák és a tenzid molekulák között elhanyagolunk minden lehetséges kölcsönhatást, és feltételezzük, hogy a tenzid molekulák adszorpciója a határfelületen lévő szabad helyek számától függ, amit pedig a határfelületen lévő lipid film tömörsége szab meg. Vagyis a modell szerint a lipid monoréteg csökkenti a tenzid határfelületi adszorpcióját.




*5.4.1.1.1 ábra: A penetráció hatására bekövetkező oldalnyomás változás a Langmuir izoterma modell szerint számítva* [15]

A számított összefüggést az oldalnyomásban bekövetkező változás és a penetráló anyag koncentrációja között az 5.4.1.1.1 ábra tünteti fel. $k$ a penetráló anyag koncentrációjával arányos mennyiség ($k=c_2/a$, ahol $c_2$ a penetráló anyag koncentrációja, $a$ pedig az adszorpciós szám). Az összefüggés jellemzője, hogy a penetráció mértéke csak a penetráló anyag oldatbeli

koncentrációjától függ, és erre nincs hatással a felületnek a nem oldódó kompones általi különböző mértékű borítottsága.

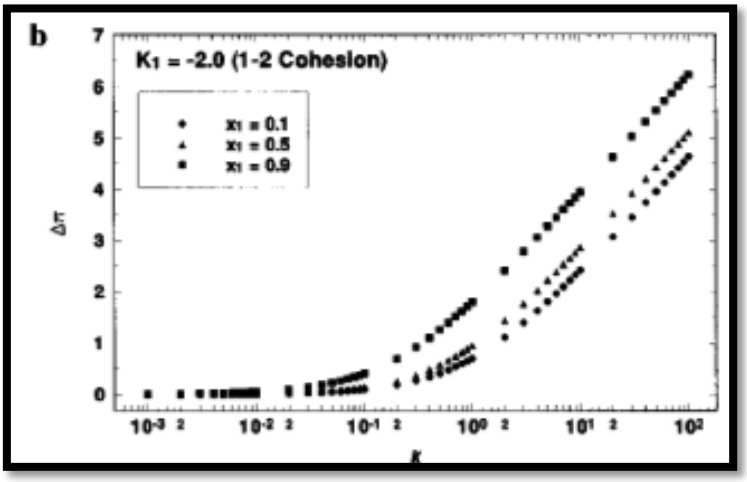
### 5.4.1.2 A Frumkin izotermás közelítés

A Frumkin izotermás közelítés esetében az adszorpciós folyamat során fellépő kölcsönhatásokat is fegyelembe vesszük. A kölcsönhatások, amelyekkel esetlegesen számolhatunk, a lipid- és tenzidmolekulák között, az elektrosztatikus vonzás ill. taszítás, és a tenzidmolekulák önmagukkal való kölcsönhatása. A határfelületen lezajló adszorpció szempontjából meghatározó tényező ezek közül a lipid-tenzid kölcsönhatás, amely az én esetemben az ikerionos szerkezetű DPPC és a kationos DTAB molekulák között alakulhat ki. Az elektrosztatikus kölcsönhatás kétféle módon nyilvánulhat meg, taszításban, ill. vonzásban. A Frumkin izotermás modell esetében adszorpciót a Frumkin adszorpciós izoterma írja le.

A) Lipid – tenzid molekulák között vonzó kölcsönhatás érvényesül (1-2)

Ha a lipid és tenzid molekulák között vonzó kölcsönhatást feltételezünk, akkor a határfelületi rétegben adszorbeálódott lipid molekulák két folyamatban vesznek részt: a lipid film komprimáltságnak mértékétől függően csökkentik a határfelületi rétegbe juttatható tenzidmolekulák mennyiségét, és a tenzidmolekulákkal kohéziós kölcsönhatásban elősegítik az adszorpciót. Az eredmény a megnövekedett penetráció a Langmuir-modellhez képest.

A kohézió esetében kapható elméleti görbét az oldalnyomásban bekövetkező változás koncentráció függésére az 5.4.1.2.1 ábra mutatja.



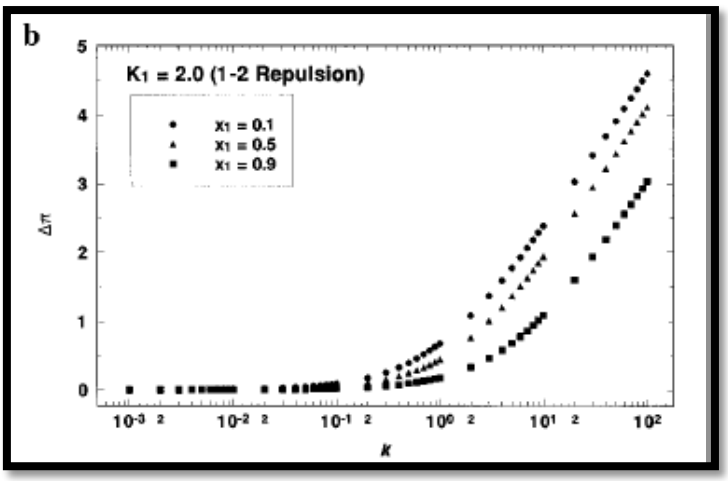

*5.4.1.2.1 ábra: A penetráció hatására bekövetkező oldalnyomás-változás számított összefüggése a penetráló anyag koncentrációjával különböző borítottságoknál 1-2 kohézió esetén* [15]

A 5.4.1.2.1 ábra megmutatja, hogy a $\Delta\pi$, az oldalnyomás-növekmény értéke a penetrációs anyag koncentrációjával ebben az esetben is monoton nő, és $\Delta\pi$ nő adott koncentráció esetén, ha a kezdeti oldalnyomás ($\pi$) nő. Eszerint kisebb lipiddel való borítottság esetén kisebb mértékű penetráció következik be azonos penetráló anyag koncentráció esetén.

B) Lipid – tenzid molekulák között taszító kölcsönhatás érvényesül

Ha a lipid- és tenzidmolekulák között taszító kölcsönhatást feltételezünk, akkor a határfelületi rétegben adszorbeálódott lipid molekulák szintén két folyamatban vesznek részt: a lipid film komprimáltságának mértékétől függően csökkentik a határfelületi rétegbe juttatható tenzidmolekulák mennyiségét a szabad határfelülethez képest, és a tenzidmolekulákkal taszító kölcsönhatásban elősegítik a deszorpciót.

A taszítás esetében kapható elméleti görbét az oldalnyomásban bekövetkező változás koncentráció függésére az 5.4.1.2.2 ábra mutatja:



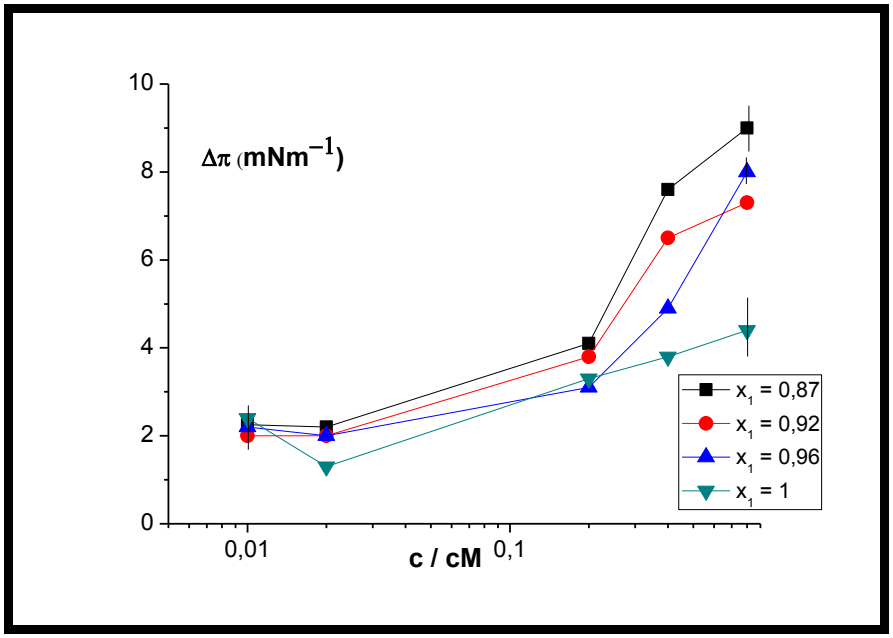

5.4.1.2.2 ábra: *A penetráció hatására bekövetkező oldalnyomás-változás számított összefüggése a penetráló anyag koncentrációjával különböző borítottságoknál 1-2 taszítás esetén* [15]

A 5.4.1.2.2 ábra megmutatja, hogy a $\Delta\pi$, az oldalnyomás-növekmény értéke a penetrációs anyag koncentrációjával ebben az esetben is monoton nő, de kisebb mértékben, mint a kohézió esetében, és $\Delta\pi$ csökken adott koncentráció esetén, ha a kezdeti oldalnyomás ($\pi$) nő. Vagyis a nem oldódó komponens nagyobb felületi koncentrációja gátolja a penetrációt.

A kísérleti eredmények, amelyekkel a fenti elméleti összefüggéseket egybevetették, inzulinnal végzett mérésekből származnak, amelynek során az inzulin különböző monorétegekbe való behatolását vizsgálták [19]. Az alkalmazott monorétegek: sztearinsav, sztearin alkohol, lecitin és koleszterin. A mérési adatok kiértékeléséből mind a négy monoréteg esetében feltételezhető volt a Frumkin izoterma modell 1-2 taszító kölcsönhatása, mely eredete a Langmuir-réteg molekulái közötti 1-1 kohézió, valamint az inzulin negatív töltése miatt a penetráló anyag molekulái közötti 2-2 taszító kölcsönhatás.

### 5.4.2 A DTAB penetrációjának jellemzése az izoterma modellek alapján

Az 5.4.2.1 ábra az egyes oldalnyomások mellett tapasztalt $\Delta\pi$ értékeket mutatja a DTAB koncentráció függvényében. Jól láthatóan a $\Delta\pi$ értéke monoton nő a koncentrációval, konstans kezdeti oldalnyomás, vagyis borítottság mellett.



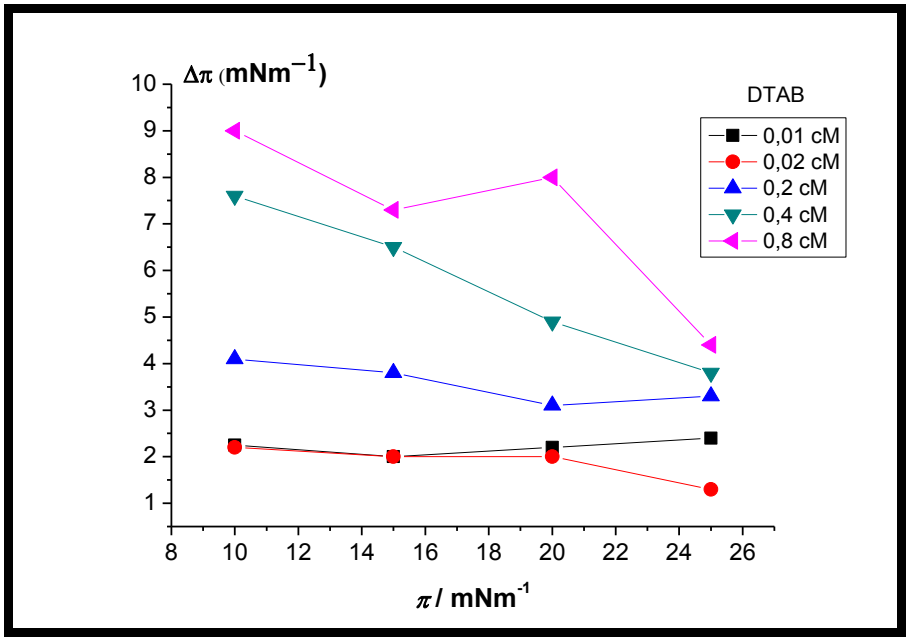

*5.4.2.1 ábra: A penetráció hatására bekövetkező oldalnyomás növekedés a DTAB koncentráció függvényében*

Az 5.4.2.1, és az 5.4.1.1.1, 5.4.1.2.1, 5.4.1.2.2 ábrák összehasonlításával jutunk el az eredményhez. Az 5.4.1.1.1 görbét vizsgálva azt tapasztaljuk, hogy a koncentráció növelése egy adott kiindulási oldalnyomás mellett monoton növekedést eredményez a $\Delta\pi$ értékében is. Lényegében ez az, amit a Langmuir izotermás modell jelent, vagyis, hogy aktuális kezdeti oldalnyomásig való kompresszióval kialakított lipid filmbe a molekulák úgy hatolnak be, hogy kitöltik a lipid molekulák közötti üres helyeket, és nem lépnek kölcsönhatásba azokkal.

Az általam elvégzett penetrációs mérések eredménye is mutatja ezt a tendenciát, mely szerint az egyes kezdeti oldalnyomások mellett a koncentrációval nő az oldalnyomás növekmény értéke. Ugyanakkor a különböző kezdeti oldalnyomások mellett, az egyre nagyobb kompresszióval, adott koncentráció esetében a DTAB kisebb mértékű penetrációja figyelhető meg. Ez arra enged következtetni, hogy a rendszerben valamilyen párkölcsönhatás nehezíti a penetrációt.

A mérési eredmények és azok ábrázolása alapján egyértelműen megállapítható, hogy a kísérleti eredményeim nem írhatóak le a Langmuir izotermás modellel, mivel szignifikáns különbség mutatkozik a penetráció mértékében a borítottság változásával. Ez arra utal, hogy az általunk vizsgált DTAB-DPPC rendszerre nem hanyagolható el a lipid-tenzid kölcsönhatás.

A lipid film kompaktságára jellemző kezdeti oldalnyomás függvényében az oldalnyomás növekedést az egyes DTAB koncentrációk esetén az 5.4.2.2 ábra mutatja. A kezdeti oldalnyomás ($\pi$) növelésével, ami egyre jobban komprimált lipid filmet jelent, egy adott DTAB koncentráció esetében a $\Delta\pi$ értéke monoton csökken, vagy nem változik. Ilyen viselkedés a tenzid és a lipid közötti kölcsönhatás esetében várható. Ez felel meg a Frumkin izotermás modell azon esetének, amikor a lipid és tenzid molekulák között taszító kölcsönhatást feltételeznek (5.4.1.2.2 ábra).

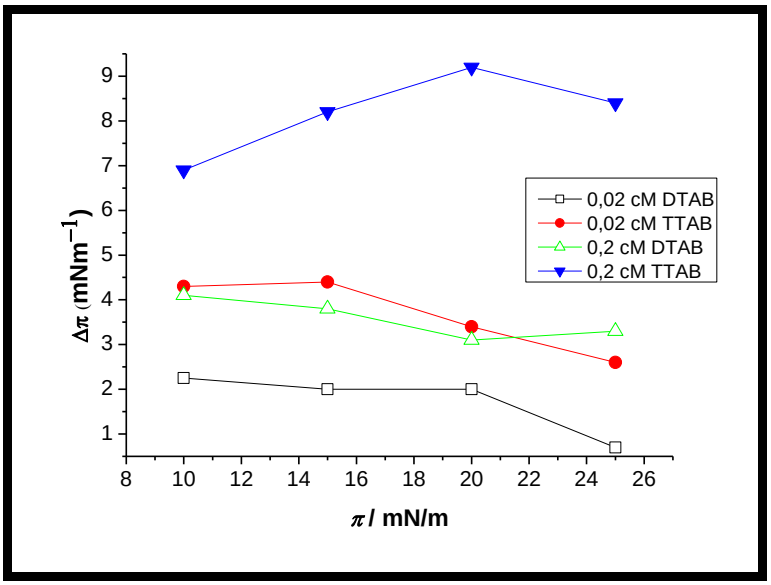



*5.4.2.2 ábra: A mért oldalnyomás-növekedés a DPPC film komprimáltságának függvényében DTAB penetrációja során*

Az egyes elméleti modellek és a kísérleti eredményeim összehasonlításából leírható a DTAB/DPPC modell rendszer viselkedése, ill. a DTAB penetrációs viselkedése. A határfelületi rétegben adszorbeált lipid molekulák között a penetrációs anyag nélkül is van kölcsönhatás, még pedig a szénláncok között ható van der Waals kölcsönhatás, amely a szénláncok közötti kohézióban nyilvánul meg. A lipid film kompressziójával ez a kölcsönhatás egyre erősödik, így alakul ki egyre kompaktabb lipid film. A DPPC molekulák ikerionos szerkezettel rendelkeznek, de a kolin fejcsoport pozitív töltést hordoz. A penetrációs anyag, DTAB pozitív töltésű fejcsoporttal rendelkezik. A két töltés jellegéből adódik, hogy a penetráció során a fejcsoportok között tasztítás léphet fel, amihez a DPPC lipid molekulák szénláncai közötti van der Waals kölcsönhatás járul, hiszen az erős van der Waals kölcsönhatás miatt nem preferált más alkillánc behatolása a lipid monorétegbe. Ez megmutatkozik a mérési eredményekben is, ugyanis ennek tulajdonítható, hogy a nagyobb kezdeti oldalnyomás (π) értékek mellett, konstans DTAB koncentrációnál egyre csökken a $\Delta\pi$ értéke (5.4.2.2 ábra). Vagyis a DTAB egyre kevésbé penetrál a DPPC lipid monorétegbe. Abban az esetben, ha a fejcsoportok közötti tasztítás meghatározó lenne az adszorpció-deszorpció szempontjából, akkor a tenzidkoncentráció növelésével konstans koncentráció mellett a $\Delta\pi$ értéke a lipid film komprimáltságával csökkenne. A mérési adatok 5.4.2.1 ábra szerinti ábrázolásából jól látható, hogy a tasztító kölcsönhatás a fejcsoportok között feltételezhető. Mivel ez a taszítás mérések alapján nem feltétlenül kimutatható, ezért az oldalnyomás növekedést inkább az 1-1 jellegű lipid molekulák alkilláncai között uralkodó van der Waals kölcsönhatás komprimáltsággal való erősödésének tulajdonítják.[10] Mindezek alapján megállapítható, hogy a DTAB penetrációja a DPPC monorétegbe nem kedvezményezett folyamat, az esetleges taszító kölcsönhatás és az erős Van der Waals kölcsönhatás miatt a határfelületen lévő szabad helyek kihasználása nem lesz maximális és a deszorpció is felgyorsul az adszorpciós folyamathoz képest.

### 5.4.3 A DTAB és TTAB penetrációjának összehasonlítása

A hidrofób alkillánchossz növekedés hatásának megfigyeléséhez két koncentráció esetében a TTAB kationos tenziddel is elvégeztem a penetrációs méréseket, azonos kísérleti körülmények között. A mérési eredményeket a 5.4.3.1 ábra szemlélteti:



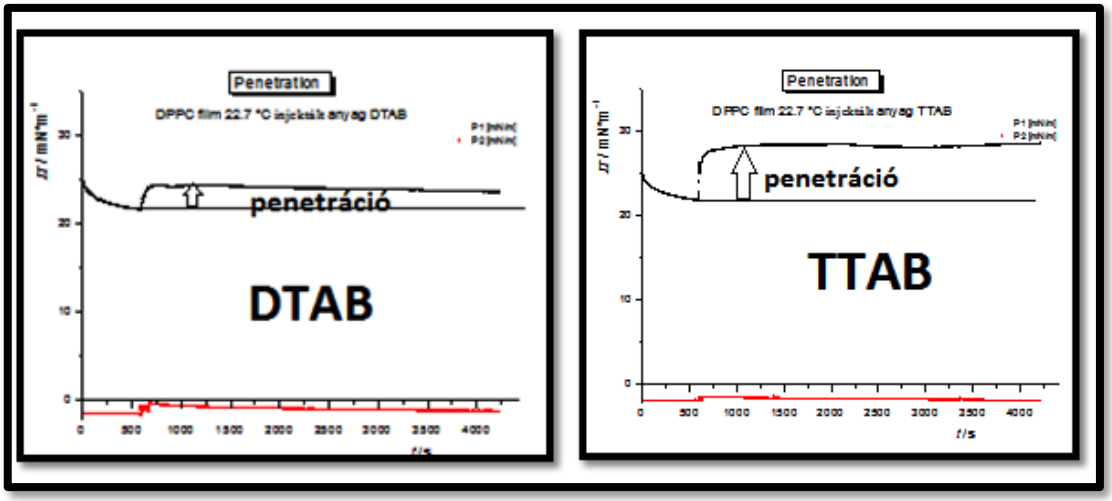

*5.4.3.1 ábra: Az oldalnyomás-változás az egyes DTAB és TTAB oldatok esetében a kezdeti oldalnyomás függvényében*

Az oldalnyomás változásának mértéke minden kezdeti lipid film tömörségnél jóval nagyobb a TTAB oldat hatására, mint a DTAB esetén. A penetrációs adatokat az 5.4 3.1 táblázat foglalja össze.

| **A mérés kezdeti oldalnyomása $\pi$ / mNm$^{-1}$** | **0,02 cmc DTAB $\Delta\pi$ / mNm$^{-1}$** | **0,2 cmc DTAB $\Delta\pi$ / mNm$^{-1}$** | **0,02 cmc TTAB $\Delta\pi$ / mNm$^{-1}$** | **0,2 cmc TTAB $\Delta\pi$ / mNm$^{-1}$** |
|---|---|---|---|---|
| 10 | 2,25 | 4,1 | 4,3 | 6,9 |
| 15 | 2 | 3,8 | 4,4 | 8,2 |
| 20 | 2 | 3,1 | 3,4 | 9,2 |
| 25 | 0,7 | 3,3 | 2,6 | 8,4 |

5.4.3.1 táblázat: DTAB és TTAB penetrációs mérési eredmények

A mérési adatokból jól látható, hogy a TTAB penetrációja sokkal hatékonyabb a lipid monorétegbe. A TTAB esetében a DTAB penetrációs modelljéhez hasonlóan, a Frumkin izotermás modellben leírtak szerint a lipid-tenzid molekulák közötti taszítás nem segíti elő a tenzid penetrációját, az egyre nagyobb kezdeti oldalnyomásoknál a $\Delta\pi$ értéke csökken. Ugyanakkor a penetráció mértéke jóval nagyobb, mint a DTAB esetében.
A mérési adatok alapján a hidrofobicitás növekedése növeli a penetrációs hatékonyságot, amely abban mutatkozik meg, hogy a TTAB esetében nagyobb változás következik be az oldalnyomásban azonos koncentrációk esetén. Az 5.4.3.2 ábra a penetrációs hatékonyságbeli különbséget szemlélteti, ugyanazon koncentrációban, 25 mNm$^{-1}$ kiindulási oldalnyomásnál.




*5.4.3.2 ábra: A DTAB és TTAB egy-egy penetrációs görbéje 25 mNm$^{-1}$ kezdeti oldalnyomásnál és azonos koncentrációnál*

Ezek a koncentrációk azonban a cmc-értékekhez viszonyított relatív koncentrációk, amit azért választottunk, hogy az asszociációs állapotok összehasonlíthatóak legyenek a két tenzidnél. Az abszolút koncentrációk értékét az 5.1.2 táblázat tartalmazza, amiből azt láthatjuk, hogy pl. a 0,65 mM-os TTAB oldat nagyobb penetráció képességet mutat, mint a 3 mM-os DTAB.

Ez az eredmény megfelel a várakozásnak, ami az alkilláncchosszal növekvő hidrofobitást illeti. A lipid filmmel való kölcsönhatásban, hasonlóan a felületaktivitáshoz, tehát meghatározó szerepet játszik az amfifil jelleg.

Ez a tapasztalat ugyanakkor ellentmondásban van a kiindulópontként használt publikációban [10] közölt, hidrofobizált polielektrolitok penetrációs képességére kapott eredménnyel. Ennek magyarázata a polimer jellegből adódik. Abban az esetben a hidrofobicitás növekedése unimolekuláris micellák képződéséhez vezetett, amelynek során a molekula poláris részei „elrejtik” az apoláris csoportokat, (hasonlóan, mint a globuláris fehérjék) a vizes környezettel kedvezőbb kölcsönhatást kialakítva. Az én esetemben ez a hatás nem tud érvényesülni, mivel a molekula meghatározó részét az apoláris láncok teszik ki, így a hidrofobicitás, vagyis az alkillánc hosszának növelése a hidrofób hajtóerőt növeli, amely a nagyobb mértékben apoláris TTAB nagyobb mértékű penetrációs hatékonyságát idézi elő a poláris vizes tömbfázisból az apoláris határfelületi rétegbe.

# Szakdolgozat összefoglaló

## Kationos tenzidek membrán affinitásának jellemzése lipid monoréteg modell segítségével

**Kelemen Orsolya**, kémia alapszakos hallgató

ELTE TTK Kémiai Intézet, Fizikai Kémiai Tanszék

Témavezető: **Dr. Kiss Éva** egyetemi tanár
Fizikai Kémiai Tanszék

A szakdolgozatom célja az volt, hogy a víz/levegő határfelületen kialakított lipid unimolekuláris filmen vizsgáljam DTAB kationos tenzid penetrációjának hatékonyságát. Ezt Langmuir filmmérleges módszerrel terveztem megvalósítani. Lipid modellanyagként dipalmitoil-foszfatidil-kolint alkalmaztam, amely a biológiai sejtmembrán egyik legfőbb alkotója. A penetrációs hatékonyság hidrofobicitással való változásának tanulmányozásához összehasonlító méréseket végeztem TTAB kationos tenziddel, szintén Langmuir filmmérleges módszerrel.

A DTAB kationos tenzid felületaktivitásának és adszorpciós viselkedésének tanulmányozására felületi feszültség méréseket végeztem lemezkiszakításos módszerrel. Az általam mért adatokat irodalmi értékékekkel vetettem össze, majd elvégeztem a mért adatokkal a kiértékelést, meghatároztam az egyes koncentrációk esetében a felületi koncentráció értékeket, és az egyes koncentrációk esetében az egy molekulára eső területigényt.

A DTAB kationos tenziddel végzett méréseimmel megállapítottam, hogy a DTAB már igen kis koncentráció tartományban is mérhető és számottevő változást eredményez a lipid film oldalnyomásában, vagyis rendelkezik penetrációs képességgel. A méréseimmel azt is igazoltam, hogy a DTAB penetrációja során kölcsönhatásba lép a lipid molekulákkal. Ez a kölcsönhatás a penetrációra negatív hatással van, csökkenti a lipid monorétegbe juttatható kationos tenzidmolekulák számát. A kölcsönhatás feltételezhetően taszításban nyilvánul meg, amit a DPPC lipidmolkeulák közötti erős van der Waals kölcsönhatás indukál. Emellett megállapítottam, hogy a penetrációs hatékonyság csökken a lipid film komprimáltságával.

A penetrációs méréseket adott koncentrációjú TTAB kationos tenzid oldatokkal is elvégeztem, amely az alkil-ammónium-bromidok között az alkillánc hossza szerinti sorrendben a DTAB után következik, 14 szénatomot tartalmazó alkillánccal. Ezzel vizsgáltam a hidrofobicitás növekedésének hatását a penetráció hatékonyságára. A Langmuir filmmérleggel végzett méréseim szerint a TTAB jóval nagyobb mértékben penetrált, mint a DTAB. A nagyobb film oldalnyomás növekedés a hidrofób hajtóerő növekedésnek volt köszönhető, amely elősegítette a TTAB penetrációját a DTAB molekulákéhoz képest.

A méréseim alapján jellemezhető volt a DTAB lipid filmbe való penetrációja, ugyanakkor érdemes további vizsgálatokat végezni annak tanulmányozására hogyan befolyásolja pl. a hőmérséklet, a hidrofobitás, a pH, az ionerősség a penetráció folyamatát.

# Summary

## Characterization of membrane affinity of cationic surfactants using lipid monolayers

**Orsolya Kelemen**, BSc student in Chemistry

Place of diploma work: Department of Physical Chemistry, Institute of Chemistry, Eötvös Loránd University, Budapest

Place of defence: Department of Physical Chemistry

Supervisor(s): **Éva Kiss**, professor
Department of Physical Chemistry

The aim of the present work was to investigate the penetrational efficiency of cationic surfactant using lipid unimolecular film created at the air/water interface.

The interaction of DTAB cationic surfactant with DPPC lipid monolayer was studied by using a Langmuir film balance technique. The efficiency of the penetration was determined with various DTAB concentrations at multiple monolayer densities. The effect of increased hidrophobicity on the membrane affinity was studied by comparing the penetration of two cationic surfactants with different alkyl chain lengths, DTAB and TTAB.

The surface activity and adsorption behaviour of DTAB surfactant were studied by equilibrium surface tension measurements using the Wilhelmy plate method. The results were compared to the data found in literature. From these measurements the surface excess concentration and the surface area per molecule were determined for DTAB in the studied concentration range.

It was found that DTAB possesses great penetrational ability since even at low concentrations, it induced significant changes in the surface pressure of lipid films. The penetration measurements also verify that DTAB interacts with the lipid molecules. Furthermore it was observed that the efficiency of penetration decreases with increased lipid monolayer density.

The interfacial behaviour of DTAB cationic surfactant was compared to that of TTAB cationic surfactant in two concentrations using penetration and surface tension measurements. The TTAB has an increased alkyl chain lenght leading to increased hydrophobicity. Based on the Langmuir balance measurements TTAB exhibited greater membrane affinity. This increased penetration is due to the increased hydrophobic interactions between the alkyl chains of the surfactants and the lipid.

The penetration of DTAB into a DPPC lipid monolayer could be characterized from these measurements, but it is well worth studying how other parameters, like the pH, temperature, and the ionic strength influence the membrane affinity of these cationic surfactants.

# 8 Irodalomjegyzék

[1] Wolfram Ervin, 1988., Kolloidika I., Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, pp. 85-125.

[2] Inzelt György, 2003., Olajat a vízre! In: Kalandozások a kémia múltjában és jelenében. Vince Kiadó Kft. Budapest, pp:146-163

[3] Kiss Éva, 2006, Langmuir-Blodgett filmek, A kémia újabb eredményei 95. kötet, Akadémiai Kiadó, Budapest

[4] Dr. Gilányi Tibor, 2005., Kolloidkémia: Nanorendszerek és Határfelületek, Egyetemi Jegyzet, ELTE

[5] K. J. Klopfer, T. K. Vanderlick 1996., Isotherms of Dipalmitoylphosphatidylcoline (DPPC) Monolayers: Features Revealed and Features Obscured; Journal of Colloid and Interface Science 182, 220-229

[6] M. Eeman, M. Deleu 2010., From biological membranes to biomimetic model membranes, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14, 719-736

[7] V. M. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta 1999. Structure and phase transitions in Langmuir monolayers, Review, Max Planck Institute of Colloids and Interface, Berlin

[8] B. Hu, L.-Z. Mi, S. Sui 1998, Study of spontaneous insertion of non-ionic surfactant Triton X-100 into phospholipid monolayers; Thin Solid Films 327-329, 69-73

[9] G. Csúcs, J. J. Ramsden 1997. Solubilization of planar bilayers with detergent; Biochimica et Biophysica Acta 1369, 304-308

[10] J. A. Castillo, A. Pinazo, J. Carilla, M. R. Infante, M. A. Alsina, I. Haro, P. Clapés, 2004., Interaction of Antimicrobial Arginine-Based Cationic Surfactants with Liposomes and Lipid Monolayers; Langmuir 20, 3379-3387

[11 ] D. Vollhardt, V.B. Fainerman 2000., Penetration of dissolved amphiphiles into two-dimensional aggregating lipid monolayers; Advances in Colloid and Interface Science 86, 103-151

[12] C. W. McConlogue, D. Malamud, T. K. Vanderlick 1998, Interaction of DPPC monolayers with soluble surfactants: electrostatic effects of membrane perturbants; Biochimica et Biophysica Acta 1372, 124-134

[13] N. O. Oliveira Jr. 1992, Langmuir-Blodgett films – Properties and Possible Applications; Brasilian Journal of Physics 22, 60-69

[14] É. Kiss, E. T. Heine, K. Hill, Y. C. He, N. Keusgen, Cs. B. Pénzes, D. Schöller, G. Gyulai, A. Mendrek, H. Keul, M. Moeller 2012. Membrane Affinity and Antibacterial Properties of Cationic Polyelectrolytes With Different Hydrophobicity; Macromolecular Bioscience 12, 1181-1189

[15] S. Sundaram, K. J. Stebe 1996., Equations for the Equilibrum Surface Pressure Increase on the Penetration of an Insoluble Monolayer by a Soluble Surfactant; Langmuir 12, 2028-2034

[16] S. Sundaram, K. J. Stebe 1997., Dynamic Penetration of an Insoluble Monolayer by a Soluble Surfactant: Theory and Experiment, Langmuir 13, 1729-1736

[17] A. di Giulio, A. Bonamore 2008., Globin Interactions with Lipid and Membranes, Methods in Enzymology 436, 239-253

[18] T. Gilányi, I. Varga, C Stubenrauch, R. Mészáros 2008.,Adsorption of alkyl trimethylammonium bromides at the air/water interface, Journal of Colloid and Interface Science 317, 395-401

[19] Birdi, K. S. 1976, Interaction of insulin with lipid monolayers, Journal of Colloid and Interface Science 57, 228-232

[20] F. M. Menger, L. Shi 2009., Electrostatic Binding Among Equilibrating 2-D and 3-D Self-Assemblies, Journal of the American Chemical Society 131, 6672-6673

[21] A. Asnacios, D. Langevin, J. F. Argillier 1998., Mixed monolayers of cationic surfactants and anionic polymers at the air-water interface: Surface tension and ellipsometry studies, The European Physical Journal B 5, 905-911

[22] T. Szekrényesi 1994., Kolloidika I.; Műegyetemi Kiadó, Budapest

[23] J. Mata, D. Varade, P. Bahadur 2005, Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants; Thermochimica Acta 428, 147-155

[24] C. Peetla, V. Labhasetwar 2009, Effect of Molecular Structure of Cationic Surfactants on Biophysical Interactions of the Surfactant-modified Nanoparticles with a Model Membrane and Cellular Uptake; Langmuir 17, 2369-2377