

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmaceutické technologie

**FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÁ CHARAKTERIZACE  
POTENCIONÁLNÍCH URYCHLOVAČŮ  
ABSORPCE**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Dr. rer. nat. Jarmila Zbytovská  
Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové 2007

Helena Vavrysová

Dovoluji si touto cestou poděkovat  
Dr. rer. nat. Jarmile Zbytovské za odborné  
vedení, cenné rady, poznatky a připomínky  
při vypracovávání této diplomové práce.

## OBSAH

1.	ÚVOD .....	4
2.	CÍL PRÁCE .....	5
3.	TEORETICKÁ ČÁST .....	6
3.1.	Stavba kůže a její bariérová funkce .....	6
3.2.	Akceleranty transdermální permeace .....	9
3.2.1.	Syntetické analogy ceramidů jako permeační urychlovače .....	10
3.3.	Základní principy použitých metod .....	12
3.3.1.	Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC).....	12
3.3.2.	Infračervená spektroskopie (IR spektroskopie) .....	12
3.4.	Charakterizace lipidů SC pomocí IR.....	17
3.5.	Další aplikace IR spektroskopie ve studiu kůže.....	20
3.6.	Využití IR spektroskopie ve studiu lipidové organizace SC.....	21
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
4.1.	Materiály .....	23
4.1.1.	Chemické názvy a vzorce syntetických ceramidů .....	23
4.2.	DSC .....	26
4.3.	ATR-FTIR spektroskopie.....	27
5.	VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	28
5.1.	12S12 .....	28
5.1.1.	DSC .....	28
5.1.2.	ATR-FTIR spektroskopie.....	28
5.2.	12GM12 .....	33
5.2.1.	DSC .....	33
5.2.2.	ATR-FTIR spektroskopie.....	33
5.3.	12GV12.....	38
5.3.1.	DSC .....	38
5.3.2.	ATR-FTIR spektroskopie.....	38
5.4.	12F12 .....	43
5.4.1.	DSC .....	43
5.4.2.	ATR-FTIR spektroskopie.....	43
5.5.	12J12 .....	48
5.5.1.	DSC .....	48
5.5.2.	ATR-FTIR spektroskopie.....	48
6.	DISKUZE.....	52
6.1.	12S12 .....	52
6.2.	12GM12 .....	53
6.3.	12GV12.....	54
6.4.	12F12 .....	55
6.5.	12J12 .....	56
6.6.	Korelace mezi metodami DSC a IR spektroskopií .....	57
7.	ZÁVĚR .....	58
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	59
9.	LITERATURA.....	60

# 1. ÚVOD

Základem této práce je studium fázového chování lipidů stratum corneum (SC) ve vztahu k urychlování transdermální absorpce a studium fyzikálně-chemických vlastností možných urychlovačů (akcelerantů, enhancerů) transdermální permeace použitím metod diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a IR (infračervené) spektroskopie. Transdermální aplikace získává stále větší pozornost zejména díky mnoha výhodám oproti podání perorálnímu. Léčivo obchází gastrointestinální trakt i játra, což vede ke zvýšení jeho biologické dostupnosti a tím snížení potřebné dávky, omezuje nežádoucí účinky a zamezuje interakcím s potravou. Transdermální aplikace léčiv významně rozšiřuje možnosti terapie nejrůznějších chorob. Většina léčiv však není schopna projít přes kůži v dostatečné míře a proto se stále hledá způsob, jak propustnost kožní bariéry snížit. To je možné chemicky, aplikací léčiva společně s látkou, která dočasně sníží funkci kožní bariéry.

Mnoho látek různých chemických struktur může být označeno jako akceleranty transdermální permeace. Předkládaná práce je konkrétně zaměřena na analogy ceramidů. Z chemického hlediska se jedná o látky strukturně podobné kožním lipidům resp. ceramidům, které tvoří základ SC, vrstvě kůže, která je zodpovědná za její bariérovou funkci. Právě interakcí těchto látek s lipidovými součástmi SC dojde k porušení integrity lipidů a tím se stává kůže propustnější pro léčivo. Podmínkou urychlovacího účinku jsou podobné strukturální a fyzikálně-chemické charakteristiky akcelerantu s kožními lipidy jako jsou lipofilita, polarita, velikost a tvar molekuly (2).

K charakterizaci lipidů SC je možno použít řadu metod jako např. DSC, IR a Ramanovu spektroskopii, rentgenovou difrakci, elektronové mikroskopické metody a další. DSC jako velmi často užívaná metoda pro charakterizaci fázového chování lipidů podává počáteční informace o teplotních změnách během fázového přechodu a v kombinaci se spektroskopickými metodami nám umožňuje popsat co se přesně děje během fázového přechodu v molekule látky (4). Pomocí IR spektroskopie lze určit uspořádání uhlovodíkových řetězců v krystalickém stavu na základě specifických vibrací methylenových skupin a na rozdíl od Ramanovy spektroskopie (vhodná pro podrobnou charakterizaci nepolárních částí molekuly) umožňuje popsat jak polární tak nepolární části molekuly. Tato fyzikální metoda má různé techniky a využití ať už ve studiu lipidů tak kůže, které budou popsány dále.

## **2. CÍL PRÁCE**

Předkládaná diplomová práce je součástí širšího výzkumu možnosti ovlivnění bariérových vlastností kůže a navazuje na předchozí studie fyzikálně-chemických vlastností urychlovačů transdermální absorpce či přirozených složek strata cornea.

Práce zavádí metodu ATR infračervené spektroskopie lipidů na pracoviště katedry farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK a jedním z cílů je studium korelace dané metody s již zavedenou metodou diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC).

Zároveň se práce zabývá charakterizací termotropního chování vybraných potenciálních modulátorů transdermální absorpce pomocí zmíněných metod.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. Stavba kůže a její bariérová funkce

Primární funkcí kůže je ochrana organismu proti mechanickému a fyzikálnímu poškození. Ovšem zjištění, že bariérová funkce je situována v nejsvrchnější vrstvě kůže SC je nedávné, první poznatky pochází od Windsora a Burche, kteří pomocí smirkového papíru postupně odstraňovali vrstvy kůže z břišní oblasti pacientů a zjišťovali průchod vody kůží. Právě po odstranění SC byl pozorován vysoký nárůst vody. Později byla důkazem přítomnost mezibuněčných lipidů, které jsou svou pravidelnou spojitou strukturou a organizací lipidových domén nezbytné pro zachování správné bariérové funkce (1).

Kůže člověka má povrch průměrně 1,8 m<sup>2</sup> a hmotnost 4,3-5 kg. Je složena ze dvou základních vrstev, dermis a epidermis. Dermis je bohatě prokrvena a inervována a představuje fyziologickou podporu pro vnější, avaskulární epidermis. Epidermis je primárně složena z keratinocytů a tvoří ji čtyři základní vrstvy (Obr. 1): stratum basale, spinosum, granulosum a SC (6). Stratum basale je nejvnitřnější vrstva tvořená cylindrickými nebo kubickými buňkami s hemidesmosomy. Další epidermální vrstva, stratum spinosum, je tvořena buňkami, které mají ostnitý vzhled a mohou se zde objevovat keratinová filamenta a také lamelární granula vyplněná stohy lipidických disků. Stratum granulosum obsahuje tři až pět vrstev polygonálních buněk s centrálně uloženým jádrem, keratohyalinová granula a lamelární granula (3).

Vnější vrstva SC tvořená 15-20 vrstvami oploštělých vzájemně do sebe zapadajících buněk bez přítomnosti jádra a organel s nepropustnou korneocytální obálkou, vyplněnými kreatinem, obklopenými lipidovou matrix. Takové uspořádání je nazýváno „cihly a malta“, soudržnost je zajištěna desmosomy. Tyto vrstvy představují různá stadia diferenciací buněk, které jsou vytvářeny z kmenových buněk v bazální vrstvě na hranici epidermis a dermis a migrují směrem ke kožnímu povrchu. V tomto směru ubývá kyslík a živiny, dochází ke změnám buněčných struktur, zplošťování buněk a akumulaci keratinu a lipidů. Tento proces zrání epidermálních buněk, jehož výsledkem je kompetentní kožní bariéra, se nazývá keratinizace. Celkově se celá epidermis obnoví za 30 dní, z toho 15 dní trvá obnova SC (6). Lipidy SC pochází z lamelárních granul, která obsahují lipidické disky a v konečných fázích diferenciací keratinocytu na rozhraní stratum granulosum a SC

tělíška migrují k vnější části buňky, kde dojde ke splynutí s plazmatickou membránou a uvolnění lipidů do mezibuněčného prostoru (1).



Obr. 1 Struktura epidermis (8).

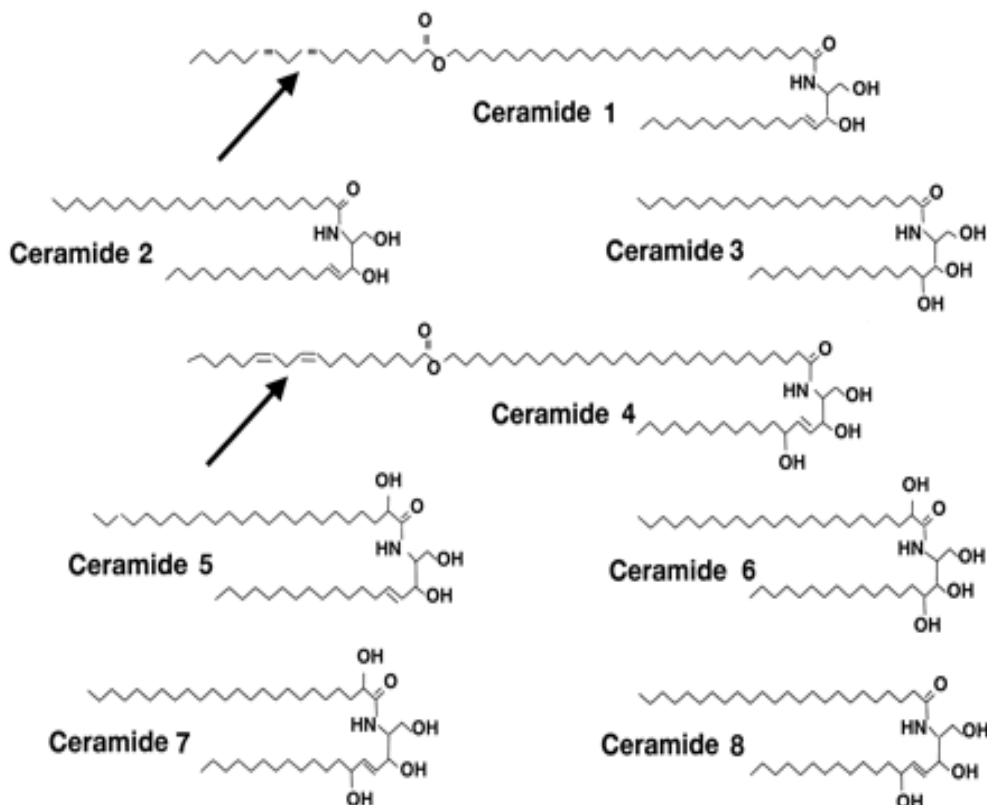
Prekurzory ceramidů ve formě acylglukosylceramidů a sfingomyelinů, které jsou skladovány v lamelárních granulech jsou při splynutí membrán metabolizovány na ceramidy. Disky postupně fúzí a vytváří multilamelární soubory, které vyplňují intercelulární prostory SC a tvoří lipidovou matrix. Lipidová matrix představuje asi 20% objemu SC (6) a z největší části (50%) je tvořena ceramidy, cholesterol tvoří 25% a volné mastné kyseliny představují okolo 10% lipidů. Také jsou přítomny v menší míře estery cholesterolu a cholesterol-sulfát. Fosfolipidy se téměř nevyskytují (1).

Cholesterol je všude se vyskytující složka biologických membrán, umožňuje smísení strukturně odlišných lipidů a přispívá k zajištění stability lamelárních struktur SC. Volné mastné kyseliny jsou téměř vždy nasycené, nevětvené a delší než 18-ti uhlíkaté. Cholesterol-sulfát je přítomen v malém množství, ale hraje důležitou roli v procesu deskvamace SC (odlupování odumřelých vrstev pokožky) (4).

Estery cholesterolu se nepodílí na tvorbě lipidické dvojvrstvy, ale jsou přítomny v nelamelárních váčcích ve SC (4).

Ceramidy jsou hlavní lipidickou součástí podílející se na bariérové funkci a jsou strukturálně heterogenní skupinou 9 typů ceramidů lišící se délkou řetězců a

stavbou polární hlavy (Obr. 2). Kožní ceramidy jsou složeny ze dvou hydrofobních řetězců a polární hlavy. Základem molekuly je bazický alkohol sfingosin, fytosfingosin nebo 6-hydroxysfingosin, na jehož aminoskupinu v poloze 2 se amidickou vazbou váže mastná kyselina o délce od 16 do 34 uhlíků která může být v poloze  $\alpha$  nebo  $\omega$  hydroxylovýma .Zvláště významné jsou tři typy ceramidů, které obsahují  $\omega$ - hydroxykyselinu, na jejíž koncový hydroxyl se estericky váže kyselina linoleová. Tyto ceramidy slouží jako spojky mezi jednotlivými lamelami (4).



**Obr. 2** Struktura ceramidů vyskytujících se v lipidové matrix, šipky znázorňují přítomnost esteru kyseliny linoleové připojeného k  $\omega$ -hydroxykyselině ceramidu 1 a 4. Toto uspořádání je také ve struktuře ceramidu 9, který byl nově objeven (5).

Intercelulární lipidy SC tvoří multilamelární struktury řazené paralelně s kožním povrchem. Pomocí elektronové mikroskopie byl zjištěn výskyt trilamelárních opakujících se jednotek, které tvoří široké-úzké-široké uspořádání. Jasně proužky získané při měření odpovídají uhlovodíkovým řetězcům, oblastem s nízkou elektronovou hustotou, zatímco tmavé představují polární skupiny. Ve srovnání s jinými biologickými membránami má SC nižší permeabilitu právě díky tvorbě multilamelárních struktur, relativně malým polárním hlavám lipidů SC, které umožní těsnější spojení a také délce jak řetězce mastné kyseliny tak acylového v ceramidu. Kůže musí zajistit určitou bariérovou kapacitu i při náhle se měnících podmínkách jako jsou např. změny teploty, pH a koncentrace látek (4).



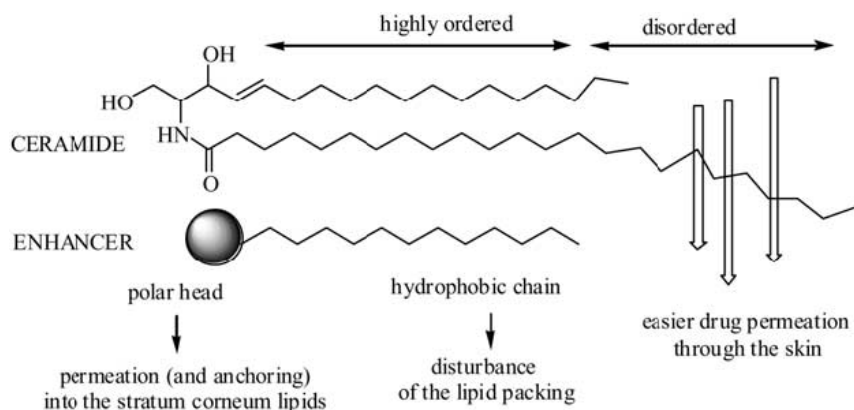
### 3.2. *Akceleranty transdermální permeace*

Akceleranty transdermální permeace jsou poměrně novou skupinou farmaceutických pomocných látek, které slouží k usnadnění permeace léčiv přes kůži do přilehlých tkání nebo k systémovému podání léčiv po jejich přechodu přes kůži do krevního oběhu. Jejich hlavním úkolem je reverzibilně snížit bariérové vlastnosti kůže a umožnit průnik léčiva přes kůži v předem odhadnutelném množství a čase (7). Akceleranty se staly bouřlivě se rozvíjející skupinou látek, které nacházejí využití při tvorbě topických a transdermálních léčivých přípravků. Stejně jako ostatní pomocné látky musí být nedráždivé, netoxické a nealergizující a nesmějí mít vlastní farmakologickou aktivitu. Nástup akceleračního účinku by měl být rychlý, po odstranění léčivého přípravku musí dojít k rychlé obnově bariérových funkcí kůže, musí být kompatibilní s ostatními složkami léčivého přípravku a levné. Všechny dosud používané akceleranty uvedeným požadavkům vyhovují pouze částečně (7).

Permeační urychlovače můžeme rozdělit do dvou skupin: 1) malé polární molekuly (ethanol, propylenglykol, dimethylsulfoxid a další), které jsou účinné ve vysokých koncentracích a některé mohou způsobit nevratné změny SC. Proto nejsou pro použití v klinické praxi příliš vhodné. 2) Amfifilní lipidové sloučeniny (mastné kyseliny a alkoholy, Azone<sup>®</sup>) obsahují v molekule polární hlavu a nepolární řetězec. Působení enhancerů probíhá ve dvou fázích, penetrace sloučeniny do místa působení a následně porušení struktury kožní bariéry, což vede ke snadnější penetraci léčiva (Obr. 3) (4). Obě fáze jsou dány kombinací sterických a hydrofobních parametrů enhanceru (9).

Přesný mechanismus působení není spolehlivě vysvětlen, předpokládá se působení prostřednictvím interakce s intercelulárními lipidy, některé z nich denaturují molekuly keratinu v korneocytech nebo proteinů v desmosomech, což způsobí nabobtnání a hydrataci. Malé polární molekuly mohou způsobit porušení vodíkových můstků, které drží molekuly ceramidů pohromadě. Některá rozpouštědla např. ethanol a dimethylsulfoxid působí extrakci kožních lipidů. Amfifilní enhancery se pravděpodobně zabudovávají mezi lamely lipidové matrix, jejichž molekula je polární hlavou orientována směrem k polární části a hydrofobními řetězci k nepolární části tvořené hydrofobními řetězci lipidů SC. Tím dojde k desorganizaci struktury lipidů, fluidizaci lamel a sníží se odolnost kožní bariéry (4). Aby mohlo dojít k rozvinutí urychlovacího účinku, musí mít molekula akceleračního účinku schopnost

proniknout až k lipidickým lamelám a díky podobným fyzikálně chemickým vlastnostem interagovat s lipidy a způsobit rozvolnění lamel a intercelulární prostor učinit hydrofilnějším (2).



**Obr. 3 Schématické znázornění interakce amfifilních urychlovačů absorpce s lipidy SC (9).**

### 3.2.1. Syntetické analogy ceramidů jako permeační urychlovače

Velké množství strukturálně odlišných látek by mohlo být označeno jako urychlovače. Tato práce se zabývá syntetickými analogy ceramidů, které byly navrženy a syntetizovány za účelem získat látky, které jsou svou strukturou a fyzikálními vlastnostmi podobné kožním ceramidům a vykazují aktivitu urychlovačů absorpce. Existuje řada ceramidových analogů, které byly získány obměnou polární hlavy a liší se délkou hydrofobního řetězce. Aktivita těchto urychlovačů je odlišná a do určité míry dána strukturou. Její velikost je vyjadřována pomocí „urychlovacího poměru“ (enhancement ratio – ER), který vyjadřuje zvýšení propustnosti kožní bariéry. ER je mimo jiné posuzován měřením fyzikálně chemických charakteristik (např. molekulární hmotnosti, velikosti van der Walsových sil aj.) (4). Strukturální podmínkou akceleračních látek je optimální délka hydrofobního řetězce okolo 10-12 uhlíků. Tato délka by mohla být vhodnou k porušení integrity lipidů SC s mnohem delšími řetězci ceramidů a také pro optimální lipofilitu k penetraci do SC. Dalším důležitým strukturálním znakem je velikost polární hlavy srovnatelná s ceramidy a omezená schopnost tvorby vodíkových vazeb. Srovnáním sloučenin se stejnou délkou hydrofobního řetězce byla zjištěna nejvyšší aktivita u sloučeniny mající polární hlavu

tvořenou glycinem, je to dáno nejnižší schopností tvorby vodíkových můstků, které mají za následek vznik rigidního uspořádání intercelulárního prostoru SC. Přítomností hydroxymetylové skupiny došlo jednoznačně ke snížení aktivity. Akceleranty této struktury zejména ty s glycinem v polární hlavě jsou vysoce účinnými i v nízkých koncentracích a jsou degradovány na netoxické metabolity působením enzymů obsažených ve stratum granulosum (9).

### 3.3. *Základní principy použitých metod*

#### 3.3.1. Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

DSC je široce využívaná termoanalytická metoda, při jejímž měření je vzorek a referenční vzorek vystaven stejnému tepelnému režimu a je měřen rozdíl v množství tepla potřebného ke zvýšení teploty jako funkce teploty. DSC měří rozdíl tepla vzorkem buď absorbovaného (endotermní reakce) nebo uvolněného (exotermní reakce) během fázového přechodu (10).

Teplota charakteristická pro fázový přechod je určena onsetem píku na DSC křivce, který vyjadřuje v případě studia struktury a fázového chování lipidů SC tání uhlovodíkových řetězců. Teplotní onset je extrapolovaný začátek píku, jedná se o průsečík extrapolované přední části základní čáry s tečnou k píku vedenou předním inflexním bodem. Odpovídající teplota je označována jako teplota extrapolovaného začátku (28). Podává nám prvotní informaci o teplotě, entalpii fázového přechodu v molekule lipidů, ostatní metody mohou být využity k popisu toho, co se přesně děje v molekule lipidu během fázového přechodu, změny v krystalové soustavě lipidu a na polární hlavě. Ke studiu fázového chování lipidů SC se proto používá DSC metoda v kombinaci např. se spektroskopickými metodami (IR spektroskopie) (4).

#### 3.3.2. Infračervená spektroskopie (IR spektroskopie)

Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Tato technika měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Infračerveným zářením je elektromagnetické záření o vlnové délce 0,8 – 500  $\mu\text{m}$ , pro použití je nejvhodnější střední oblast 2,5 -15  $\mu\text{m}$  vlnové délky, což odpovídá rozsahu vlnočtu 4000 – 670  $\text{cm}^{-1}$ . V této oblasti se organické sloučeniny projevují největším počtem absorpčních pásů. IR dává možnost odhadnout přítomnost jednotlivých funkčních skupin v molekule organické látky (Tab. 1). Oblast vlnočtů, v níž organické látky absorbují infračervené záření můžeme rozdělit do dvou částí (11):

**1. oblast vibrací valenčních  $\nu$  ( 4000 – 1500  $\text{cm}^{-1}$ )** během níž se mění vazebná vzdálenost mezi atomy, mohou být symetrické ( $\nu_s$ ) nebo asymetrické ( $\nu_{as}$ ).

**2. oblast vibrací deformačních  $\delta$  ( 1500 – 600  $\text{cm}^{-1}$ )** během níž se mění valenční úhel, ale nemění se délka vazby, mohou být nůžkové (scissoring), kroutivé (twisting), kývavé (rocking, wagging). Tyto vibrace se nacházejí při nižších vlnočtech v porovnání s valenčními vibracemi, protože na deformaci valenčních úhlů je třeba menší energie než na prodlužování a zkracování chemických vazeb (12).

Tuto oblast nelze pro danou sloučeninu přesně interpretovat, protože zde dochází ke spřáhování vibrací. Tuto část spektra lze nazvat také „oblast otisku palce“, neboť soubor absorpčních pásů zde nalezený je pro každou sloučeninu naprosto charakteristický (11).

V oblasti 4000 – 2500  $\text{cm}^{-1}$  nalezneme valenční vibrace vazeb vodíku, zejména vazby O-H, N-H, C-H. Volná vazba O-H absorbuje při nejvyšších vlnočtech okolo 3600  $\text{cm}^{-1}$ . V případě, že jde o hydroxyl vázaný vodíkovou vazbou, posunuje se vlnočtet do nižších oblastí a pás se stává intenzivnějším a širším. Signály N-H vazeb a O-H vazeb se mohou vzájemně překrývat, avšak pásy N-H vazeb nebývají tak intenzivní a jsou ostřejší, jelikož N-H vazby tvoří tak silné vodíkové vazby (11).

**Tab. 1 Přehled charakteristických vibrací funkčních skupin –  $\nu$  – valenční vibrace,  $\delta$  – deformační rovinné vibrace,  $\gamma$  – deformační mimorovinné vibrace ( podle 11, 13).**

Druh vibrace	Vlnočet ( $\text{cm}^{-1}$ )	Druh vibrace	Vlnočet ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\nu(\text{O-H})$ volná	3700-3600	$\nu(\text{C=O})$ estery	1745-1735
$\nu(\text{O-H})$ H-vazba intermol.	3550-3450	$\nu(\text{C=O})$ amidy	1680-1620
intramol.	3570-3450	$\nu(\text{C=C})$ alkeny	1660-1600
$\nu(\text{N-H})$ aminy, amidy	3550-3350	$\delta(\text{N-H})$ amidy	1600-1500
$\nu(\text{N-H})$ H-vazba	3500-3100	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ alkany	1480-1430
$\nu(\text{C-H})$ alkyny	3300-3270	$\delta(\text{O-H})$ alkoholy	1420-1340
$\nu(\text{O-H})$ H-vazba v karboxyl.kys.	3300-2500	$\nu(\text{C-O})$ alkoholy, estery	1290-1050
$\nu(\text{C-H})$ alkeny	3100-3000	$\nu(\text{C-O})$ prim.alkoholy	1075-1000
$\nu(\text{C-H})$ alkany	3000-2800	$\nu(\text{C-O})$ sekun.alkoholy	1130-1030
$\nu(\text{C=O})$ karbonyl.slouč.	1900-1600	$\gamma(\text{CH}_2)$ alkany	730-720

## Techniky IR a příprava vzorku pro IR měření

### 1. TRANSMISNÍ TECHNIKY

Podstatou této techniky je průchod infračerveného záření celým vzorkem a měření rozsahu absorpce záření vzorkem. Důsledkem toho je nutné brát v úvahu přípravu vzorku a sice koncentraci, velikost částic, homogenitu, sílu vrstvy. Tato technika je vhodná pro měření látek všech skupenství (16). K měření používáme kyvet, zhotovených z vhodného optického materiálu, který je propustný pro infračervené záření. Nejčastěji z NaCl nebo KBr, které jsou propustné v široké oblasti infračerveného spektra. Pro měření v dlouhovlnné oblasti se používá CsI nebo CsBr (15).

Plynné vzorky – vzhledem k malé hustotě molekul měříme plyny v poměrně velkých vrstvách ve speciálních plynových Yvetách (15).

Kapalné vzorky - velmi často jsou měřena spektra látek v roztocích nebo v kapalném stavu. Kromě běžných kyvet se používají také speciální kyvety, vhodné k měření velmi zředěných roztoků. Pokud je kapalný vzorek nerozpustný v běžných rozpouštědlech nebo u látek viskózních lze využít i transmittační měření ve formě kapilární vrstvy mezi dvěma KBr (NaCl) okénky. V případě měření roztoků musí být vhodně zvoleno rozpouštědlo ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CS}_2$ ) (15).

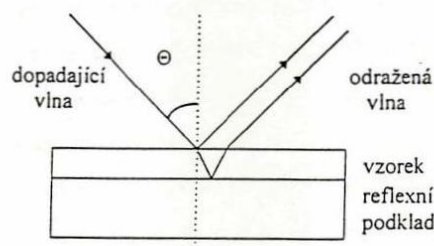
Pevné vzorky – pro měření pevných látek se používají buď přímé transmisní techniky, které vyžadují aplikaci vzorku na samonosné filmy polymerů nebo úprava vzorku dvěma způsoby. Jedná se o techniku lisování tablet nebo tvorby suspenze vzorku. Technika lisování tablet spočívá ve smísení vzorku s vhodným optickým materiálem (KBr) a úpravě do tabletové formy, která je analyzována (15).

Další možností měření je technika tvorby suspenze tzv. nujolová, při které je měřená látka suspendována v silně viskózní látce a měří se IR spektrum kapilární vrstvy získané suspenze mezi okénky z vhodného optického materiálu. Jako suspendující látky se používá parafínového oleje (Nujolu), který však sám absorbuje v oblasti pásů valenčních a deformačních vibrací C-H vazby. Pro získání úplného IR spektra je třeba měření v Nujolu kombinovat s měřením v halogenovaných suspenzích FLUOROLUBE, které neobsahují pásy C-H vibrací (15).

## 2. REFLEXNÍ ( ODRAZNÉ ) TECHNIKY

**Metoda zrcadlového odrazu ( Specular Reflectance )** – jedná se o reflexní metodu, jejíž podstatou je zrcadlový odraz na povrchu vzorku (úhel dopadu je roven úhlu odrazu) (Obr.4). Množství odraženého světla závisí na úhlu dopadu, indexu lomu vzorku, kvalitě povrchu a absorpčních vlastnostech vzorku. Z hlediska interakce záření s povrchem vzorku můžeme rozdělit na dvě techniky měření (15).

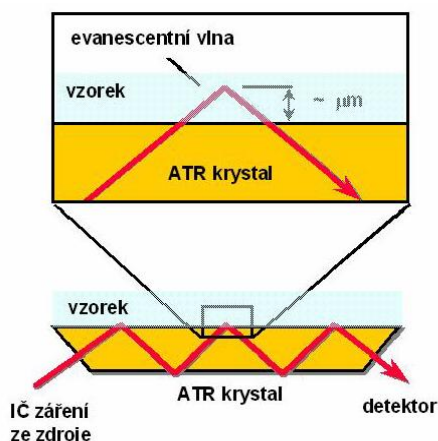
První technika je spojena se studiem tenkých filmů na zrcadlicích plochách, záření prochází povrchovým filmem, odráží se od zrcadlicí podložky, znovu prochází filmem a je detekováno. Získané reflexně-absorpční spektrum je identické s transmisním. Druhá technika je spojena se studováním reflexe na velkých površích, takto získaná spektra se mohou lišit od transmisních. Pro získání spektra podobného transmisnímu je nutné na získaný spekulárně-reflexní záznam aplikovat Krameriovu-Kronigovu transformaci (tu zajišťuje příslušný spektroskopický software) (15).



Obr. 4 Schéma metody zrcadlového odrazu (15).

**Metoda difúzní reflexe ( Difuse Reflectance )** – jde o metodu vhodnou pro pevné, práškové vzorky, umožňuje měřit spektrum vzorků bez destruktivních vlivů přípravy jako mletí a lisování tablet. Vzorky lze analyzovat buď přímo nebo v KBr matici. Při odrazu záření na povrchu pevné látky je část záření odrazena zrcadlově aniž by došlo k absorpci (spekulární reflexe) a část záření vniká do vzorku a poté z něj opět vystupuje (difúzní reflexe). Příslušná optika soustřeďuje difúzní záření na IR detektor. Hlavní výhodou této metody je schopnost analyzovat s vysokou citlivostí i slabě absorbující materiály (15).

**Metoda zeslabené totální reflexe ( ATR-Attenuated Total Reflectance )** – je vhodná zejména pro silně absorbující kapalné i práškové vzorky, především se volí tehdy pokud se zajímáme o povrch studovaného materiálu. Její podstatou je totální vnitřní reflexe infračerveného záření při průchodu krystalem o velkém indexu lomu. Podle tvaru a geometrie paprsku jím procházejícího jsou rozlišovány jednodrazové a víceodrazové ATR krystaly. Ve vzorku, který je v těsném kontaktu s měřícím ATR



**Obr. 5 Schéma ATR spektroskopie**

hloubka záření do povrchu vzorku je řádově v  $\mu\text{m}$  tzn., že charakterizujeme pouze velmi tenké povrchové vrstvy vzorku, avšak vzhledem k možnosti vícenásobného odrazu na fázovém rozhraní získáme velmi kvalitní spektrum, ekvivalentní transmisnímu. Penetrační hloubka závisí na vlnové délce záření – s rostoucí vlnovou délkou (tj. s klesajícím vlnočtem) se zvyšuje hloubka penetrace. ATR spektrum vzorku je ovlivněno vlnovou délkou infračerveného záření, poměrem indexů lomu měřeného vzorku a ATR krystalu, úhlem dopadu záření na fázové rozhraní a účinností kontaktu mezi měřeným vzorkem a krystalem. ATR je účinnou a rychlou technikou měření IR spekter, která proti transmisnímu měření v kyvetě vyžaduje minimální přípravu vzorku pro analýzu (17).

### **IČ SPEKTROMETRIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ ( FTIR )**

Původní spektrometry pracující na principu rozkladu světla (disperzní spektrometry) s mřížkovým monochromátorem neumožňovaly analýzu silně absorbujících látek, nedostatkem byla také malá citlivost, pomalost. FTIR spektrometry pracují na principu interference spektra, které na rozdíl od disperzních spektrometrů, měří interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Tyto přístroje vyžadují matematickou metodu Fourierovy transformace pro získání klasického spektrálního záznamu. Při měření dopadá na detektor vždy celý svazek záření, což umožňuje provádět i měření, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, tj. u silně absorbujících látek (14).

krystalem, vzniká při totálním odrazu na rozhraní opticky hustšího prostředí (ATR krystal) s prostředím opticky řidším (vzorek) zeslabující se absorpční vlna (evanescentní), která klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní (v  $\mu\text{m}$ ) (15). Pokud měřený vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, pak tato složka bude v totálně zeslabeném záření zeslabena. Penetrační

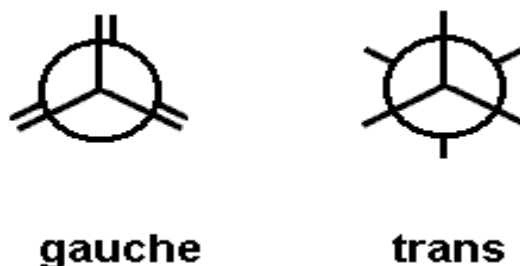


### 3.4. Charakterizace lipidů SC pomocí IR

IR spektroskopie je jednou z metod využívaných ke strukturální analýze lipidových řetězců, ke studiu jejich konformačního uspořádání a také polární hlavy molekuly lipidů. Uspořádání lipidových řetězců lze velmi dobře monitorovat z IR spektra, z konformačně sensitivních vibrací methylenových skupin uhlovodíkových řetězců lipidů (4,18). Uhlovodíkovou část molekul lipidů tvoří většinou alifatické řetězce, které mohou být uspořádány trojím způsobem: 1) pevně uspořádané alifatické řetězce se specifickými meziřetězovými interakcemi tvořící krystalovou mřížku (orthorhombická, triklinická), 2) přechodná forma mezi krystalickou a kapalnou fází s postupným vymizením meziřetězových interakcí, avšak řetězce jsou uspořádány do mřížky (hexagonální) a vyznačují se vyšší flexibilitou, 3) kapalná fáze, ve které se vyskytují  $\text{CH}_2$  skupiny víceméně volně. Přechody mezi těmito stavy jsou charakterizovány prudkými změnami entalpie měřitelné pomocí DSC a změnami pozice a intenzity absorpčních pásů v IR spektru. V případě lipidů je hlavním fázovým přechodem tání. Tání charakterizuje teplota tání, která je dána délkou uhlovodíkového řetězce, přítomností dvojných vazeb, cyklické struktury a větvením řetězce (19).

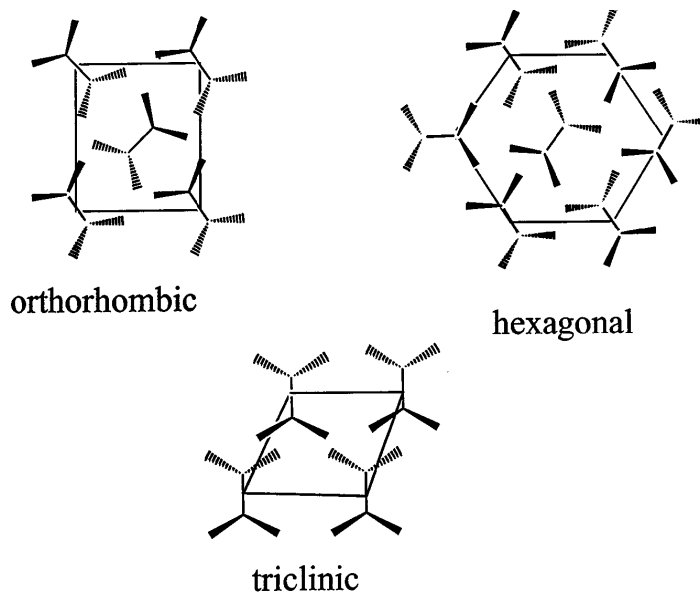
Uhlovodíkové řetězce lipidů jsou v krystalickém stavu ve vysoce uspořádané tzv. „zig-zag“ struktuře s vysokým číslem trans konformerů. Se zvyšující se teplotou se zvyšuje počet gauche konformerů (Obr. 6) a snižuje se stupeň uspořádanosti struktury lipidů a zvyšuje se flexibilita řetězce (4). Z pozice symetrických valenčních vibrací  $\text{CH}_2$  skupin ( $\nu_s$ ) pozorovatelných v rozmezí  $2848\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$  lze určit poměr trans/gauche konformerů (18). Nižší pozice  $\nu_s$  ( $\text{CH}_2$ ) určuje vyšší počet trans konformerů, např. ceramidy vykazují vysoký stupeň uspořádanosti, tedy vyšší počet trans konformerů kolem  $2848\text{ cm}^{-1}$ . S táním řetězců se zvyšuje podíl gauche konformerů v lipidovém řetězci, pozice  $\nu_s$  ( $\text{CH}_2$ ) se posunuje ke  $2853\text{ cm}^{-1}$  a výsledkem je vysoká pohyblivost řetězců. Jiná charakteristika trans konformerů je poměr intenzity mezi asymetrickou  $\nu_{as}$  (kolem  $2920\text{ cm}^{-1}$ ) a symetrickou  $\text{CH}_2$  valenční vibrací. Počet gauche konformerů v řetězci se zvyšuje se snížením tohoto poměru (4). Zatímco pozice  $\text{CH}_2$  valenčních (stretching) vibrací poskytuje kvalitativní popis konformačního uspořádání uvnitř lipidových řetězců,  $\text{CH}_2$  deformační nůžkové (scissoring) vibrace v rozmezí  $1460\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$  a  $\text{CH}_2$  deformační kývavé (rocking) vibrace o vlnočtu kolem  $720\text{ cm}^{-1}$  poskytují informace

o pravděpodobné interakci mezi jednotlivými uhlovodíkovými řetězci lipidů a jejich vzájemné uspořádání do krystalové mřížky (18).



**Obr. 6** Gauche ( zákrytová ) a trans ( střídavá ) konformace alkanových řetězců (27).

Lipidy tvořené dlouhými alkylovými řetězci jsou ve většině případů uspořádány do jedné ze tří možných struktur tvořící krystalickou mřížku se sousedními řetězci, kterou je možno určit z IR spektra (Obr. 7). Jednou z nich je orthorhombické uspořádání, ve kterém jsou nejbližší sousední řetězce navzájem kolmé a na subcelu připadají dva řetězce. V IR spektru se projevuje rozštěpením (splittingem) do dvou pásů  $\text{CH}_2$  rocking deformační vibrace okolo  $720 \text{ cm}^{-1}$  a do tří pásů  $\text{CH}_2$  scissoring deformační vibrace,  $\delta(\text{CH}_2)$  kolem  $1460 \text{ cm}^{-1}$ . Dalším typem je triklinické uspořádání, ve kterém jsou řetězce vzájemně paralelně uspořádané a na subcelu připadá jeden řetězec (20). Triklinický i hexagonální typ krystalické mřížky indikuje rozštěpení do dvou pásů deformační  $\text{CH}_2$  scissoring vibrace a singlet  $\text{CH}_2$  rocking vibrace (4). Hexagonální uspořádání lze odlišit od triklinického na základě pozice  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , indikuje ho pozice nad  $2850 \text{ cm}^{-1}$  z důvodu většího počtu gauche konformerů a tím vyšší pohyblivosti řetězců (Obr. 7).



**Obr. 7** Uspořádání lipidových uhlovodíkových řetězců (20).

IR spektroskopie je ve srovnání s Ramanovou spektroskopií vhodnou metodou pro studium struktury polární hlavy molekul lipidů (4). Polární hlavy ceramidů jsou velmi malé a obsahují několik funkčních skupin, které umožňují vytvářet laterální vodíkové vazby se sousedními molekulami ceramidů (22). Tato metoda umožňuje detekovat přítomnost a sílu intra- a interlamelárních vodíkových vazeb na základě vibrací amidové skupiny. Valenční vibrace karbonylu  $\nu(\text{C}=\text{O})$  amidové skupiny monitorují sílu vodíkových vazeb a také intermolekulární vazby. Přítomnost pevných vodíkových vazeb způsobuje charakteristický pokles frekvence této vibrace. Jejich přítomnost dokazuje také pozice vibrace  $\nu(\text{C}-\text{N})$  a  $\delta(\text{N}-\text{H})$  vazby vodíkové vazby zvyšují jejich frekvenci. Rozštěpení obou těchto vibrací vypovídá o existenci interlamelárních vazeb mezi amidovými skupinami, např. ve spektru ceramidu 2 (nehydroxylovaný ceramid). U ceramidu 5 ( $\alpha$ -hydroxyceramid), absence rozštěpení vibrací amidové skupiny nasvědčuje tomu, že pevné vodíkové vazby pocházejí z odlišných interakcí. Jedná se o interní vodíkové vazby, které jsou tvořeny mezi karbonylem amidové skupiny a  $\alpha$ -hydroxy skupinou mastné kyseliny ceramidu (21).

### ***3.5. Další aplikace IR spektroskopie ve studiu kůže***

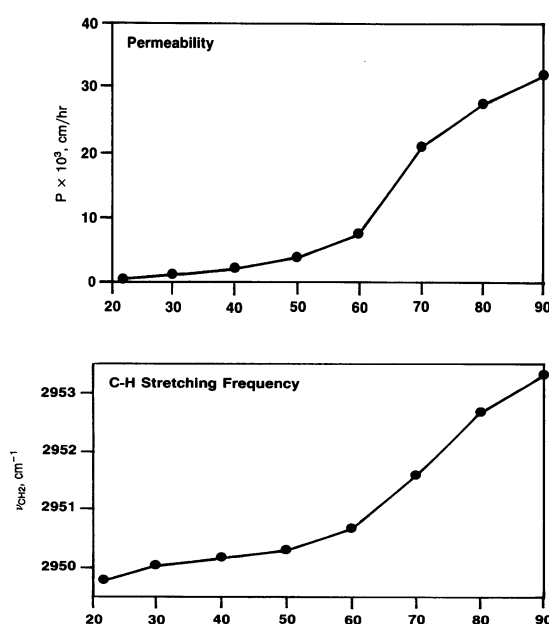
Porozumění difúzního procesu kůži je velmi důležité pro vývoj léčiv podávaných transdermální cestou. IR (ATR-FTIR) spektroskopie je vhodnou metodou pro studium kožního povrchu a difúzního chování ve SC. Získané informace týkající se chemického složení i prostorové organizace SC mohou poskytnout možné způsoby k určení cesty difúzního procesu. Heterogenní distribuci lipidových a proteinových domén lze rozlišit na základě spektrálních rozdílů každé složky. Tato spektra ukazují skutečné rozložení těchto komponent přesněji než kontakt vzorku a ATR krystalem, což je možné v případě tvrdých a hrubých povrchů. Tato metoda také umožňuje studium kožního povrchu v kontaktu s topickými preparáty ke zjišťování mechanismu transdermální permeace (24).

### 3.6. *Využití IR spektroskopie ve studiu lipidové organizace SC*

Bariérová funkce kůže spočívá v přítomnosti lipidové matrix SC. Jedinečné fyzikální nároky vystavené na SC vyžadují zvláštní strukturální organizaci lipidových složek. Model této lipidové organizace je označován jako doménový mozaikový model, ve kterém existují lipidy SC ve formě vysoce uspořádaných domén (krystalické nebo gelové fáze), obklopenými tekutou fází tvořenou kapalnými krystaly lipidů. Lipidové složení SC je neobvyklé ve srovnání s ostatními biologickými membránami, sestávající se z přibližně ekvimolární směsi ceramidů, volných mastných kyselin, cholesterolu a také cholesterol-esterů a sulfátu.

Charakterizaci ať už jednotlivých ceramidů nebo troj-komponentní směsi (ceramid-cholesterol-mastná kyselina 1:1:1) lze velmi dobře vystihnout použitím FTIR-spektroskopie (21), která umožňuje monitorovat jak strukturu a organizaci SC, tak průběh fázového přechodu a polymorfismus izolovaných kožních lipidů. K měření se využívá model lipidové bariéry SC tvořený ternární směsí ceramidu, cholesterolu a palmitové kyseliny (18). Navzdory skutečnosti, že tyto hlavní komponenty pod 40°C existují ve formě krystalických domén a mají individuální bod tání nad 70°C, sleduje se průběh fázového přechodu v teplotním rozmezí 40 až 70°C (23). Použitím deuterované palmitové kyseliny lze simultánně detekovat v IR spektru vibrace palmitové kyseliny CD<sub>2</sub> a ceramidu CH<sub>2</sub>, což umožňuje monitorovat inter- a intramolekulární interakce palmitové kyseliny a ceramidových komponent. Rozdílnou teplotou tání lze indikovat, že palmitová kyselina a ceramidy existují v oddělených konformačně uspořádaných doménách. Teplota, při které dochází k přechodu je ve směsi mnohem nižší pro každou složku než u izolovaných sloučenin. Fázové přechody jsou široké, vyskytují se v rozmezí přes 20°C a z toho lze usoudit, že model SC se neskládá pouze z nemísitelné směsi. Na základě CD<sub>2</sub> scissoring vibrací palmitové kyseliny a CH<sub>2</sub> rocking ceramidu v IR spektru lze monitorovat model SC. V případě rozštěpení pásu by se jednalo o přítomnost orthorhombické fáze, tedy přítomnost domén. Pokud by tento ternární systém existoval jako homogenní směs ceramidu, deuterované palmitové kyseliny a cholesterolu, rozštěpení by nebylo pozorovatelné. Porozumění podstaty lipidové organizace je získáno srovnáním termotropní odpovědi (závislosti vlnočtu na teplotě) proměnlivých CH<sub>2</sub> a CD<sub>2</sub> vibrací. V případě rozštěpení obou vibrací lze usoudit, že palmitová kyselina i ceramid jsou orthorhombicky uspořádány odděleně ve formě

domén a také o tom vypovídá rozdílná teplota, při které dochází k fázovému přechodu. Šířka tání palmitové kyseliny indikuje, že je palmitová kyselina ovlivněna celkovou strukturou a složením SC. Zdá se pravděpodobné, že během pozorovaného širšího fázového přechodu interaguje s cholesterolem. A tak vysoce uspořádané domény ceramidů mohou existovat v lipidové bariéře jen do teploty, při které se začnou rozrušovat domény mastné kyseliny a začnou se mísit s cholesterolem (18). Při teplotě pod 40°C vykazuje směs lipidů velmi omezenou mísitelnost. Mezi 40 až 50°C, dochází k přechodu z krystalické do kapalné, ještě uspořádané fáze, která zahrnuje ceramidy, cholesterol a palmitovou kyselinu. Pokud směs obsahuje vysoký obsah cholesterolu, tato kapalná fáze je stálá až do 75°C, cholesterol totiž indukuje utváření stálé kapalné uspořádané fáze, která zahrnuje jak ceramidy tak palmitovou kyselinu. Při nízkém obsahu cholesterolu, směs podstupuje druhé transici, která vede ke vzniku kapalné neuspořádané fáze. Utváření těchto fází je závislé na lipidovém složení, tedy je pravděpodobné, že změny poměru a složení lipidů SC ovlivňují fázové chování a tím i vlastnosti lipidové bariéry (23). Permeabilita kůže tedy závisí na stupni uspořádanosti uhlovodíkových řetězců lipidů SC. Se zvyšující se teplotou se zvyšuje podíl gauche konformerů v lipidových řetězcích a tyto teplotně indukované změny zapříčiňují zvýšení permeability kůže. Teplotní závislost permeability SC lze pozorovat na základě teplotně indukovaných posunů ve frekvenci  $\nu_s(\text{CH}_2)$  vibrací z IR spektra (Obr. 8) (25).



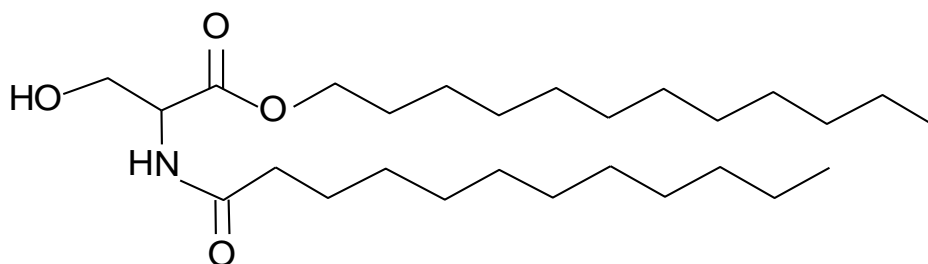
**Obr. 8** Grafické znázornění závislosti postupného zvyšování permeability SC a  $\nu_s(\text{CH}_2)$  na teplotě (25).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

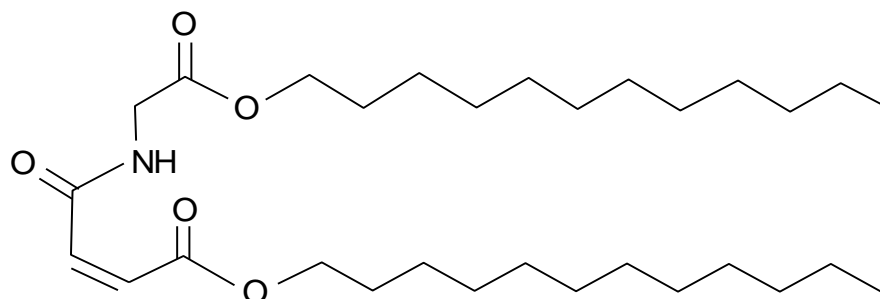
### 4.1. Materiály

Série syntetických analogů ceramidů (12S12, 12GM12, 12GV12, 12F12, 12J12), testovaná pro jejich možné použití jako kožní urychlovače absorpce, byla syntetizována na katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Jedná se o sloučeniny jejichž struktura je odvozená od aminokyselin L-serinu a glycinu (12S12, 12GM12, 12GV12) a esterů dikarboxylových kyselin (12F12, 12J12). Jednotlivé látky se liší obměnami na polární hlavě. U těchto sloučenin, zejména těch, které jsou strukturně odvozeny od aminokyselin, byl testován jejich akcelerační účinek na prasečí kůži, který je určován pomocí parametru ER, vyjadřující zvýšení propustnosti kožní bariéry. Výsledky ukázaly, že největší akcelerační aktivitu má 12GM12 s ER 6,64, 12S12 s ER 1,24 a 12GV12 s ER 1,04 (9).

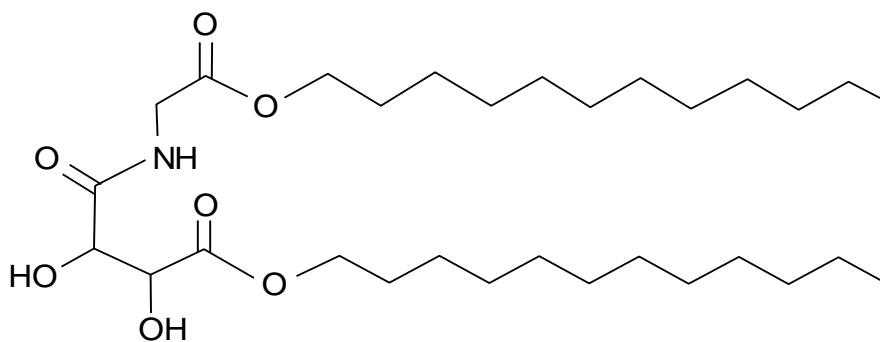
#### 4.1.1. Chemické názvy a vzorce syntetických ceramidů



Obr. 9 12S12 N-dodekanoyl-L-serin dodecylester

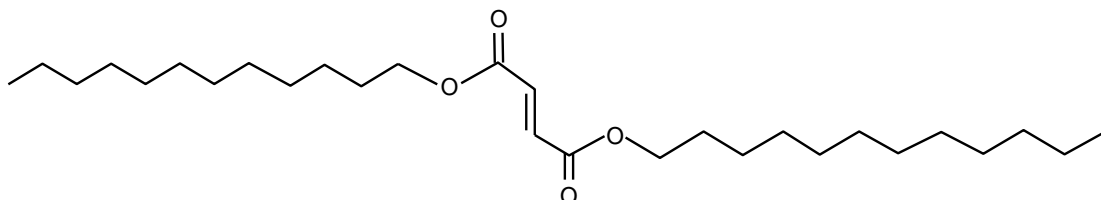


Obr. 10 **12GM12** N-(Dodecyloxykarbonylmethyl) dodecylester maleinové kyseliny

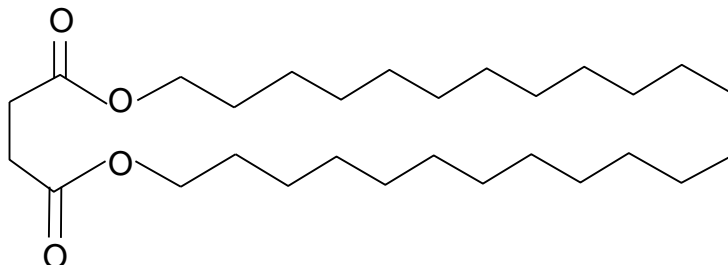


Obr. 11 **12GV12** N-(Dodecyloxykarbonylmethyl) dodecylester 2,3-dihydroxyjantarové kyseliny





Obr. 12 12F12 Didodecylester kyseliny fumarové



Obr. 13 12J12 Didodecylester kyseliny jantarové

## 4.2. DSC

Princip metody je popsán v teoretické části (viz 1.3.1). DSC měření bylo prováděno pomocí přístroje NETZSCH Phoenix DSC 200 PC, jehož součástí je software, umožňující měření a uložení měřených výsledků a komůrka, která obsahuje tepelná čidla k monitorování teploty a diferenciálního tepelného toku, připojená k termoelektrickým diskům. Vzorek i referenční vzorek v měřící pánvičce jsou umístovány na tyto disky, které umožňují přenos tepla do obou vzorků.

Na začátku měření byla provedena korekce, měření prázdných hliníkových pánviček za účelem nastavení stejných měřicích podmínek za jakých bude měřen vzorek, tzn. teplotní program (podle toho, při jaké teplotě dochází ke transici), rychlost zahřívání (5 K/min), materiál pánvičky (Al), atmosféra. Po ukončení zahřívání byl přístroj ochlazen na teplotu 20°C prostřednictvím dusíkové atmosféry. Poté mohlo nastat vlastní měření vzorku. Vzorek měřené látky byl připraven navážkou (v rozmezí 3-5 mg) na analytických vahách s přesností  $\pm 0,01$  mg do předem zvážené hliníkové pánvičky, přikryt víčkem a hermeticky uzavřen. Referenční vzorek tvořila prázdná hermeticky uzavřená pánvička taktéž předem zvážená. Vzorky byly umístěny na disky v DSC komůrkách a zahřívány v rozmezí od 0 do 120 °C rychlostí 5 K/min. Poté byly ochlazeny na teplotu 20°C rychlostí 5 K/min. Výstupem měření jsou termogramy vyjadřující závislosti teplotního rozdílu mezi vzorkem a referencí na teplotě. Data byla analyzována použitím softwaru (Thermal Data Analysis). Fázové transice jsou charakterizovány píkem, vyjadřující teplotu transice: teplota tání je vyznačena endotermním píkem a tuhnutí (krystalizace) píkem exotermním. Dále jsou charakterizovány šířkou, výškou a plochou píku. Na základě šířky píku lze usoudit, zda nedošlo během zahřívání k rozkladným změnám měřené látky. Plocha píku je úměrná změnám entalpie, vzorkem buď spotřebovaná (endotermní) nebo uvolněná (exotermní).

### 4.3. *ATR-FTIR spektroskopie*

Princip této metody je popsán v teoretické části (viz. 1.3.2). IR spektra měřených látek při různých teplotách byla získána použitím FTIR spektrometru NICOLET IMPACT 400. Součástí přístrojového vybavení je termostat zajišťující měření při určité teplotě. Pro metodu ATR (zeslabené totální reflexe) byl použit jednodrazový ATR krystal s úhlem odrazu  $45^\circ$  ze ZnSe směsi, materiálu o vysokém indexu lomu. Krystal je lichoběžníkového tvaru v horizontálním uspořádání o průměru 1,3 mm. Rezoluce měření byla  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

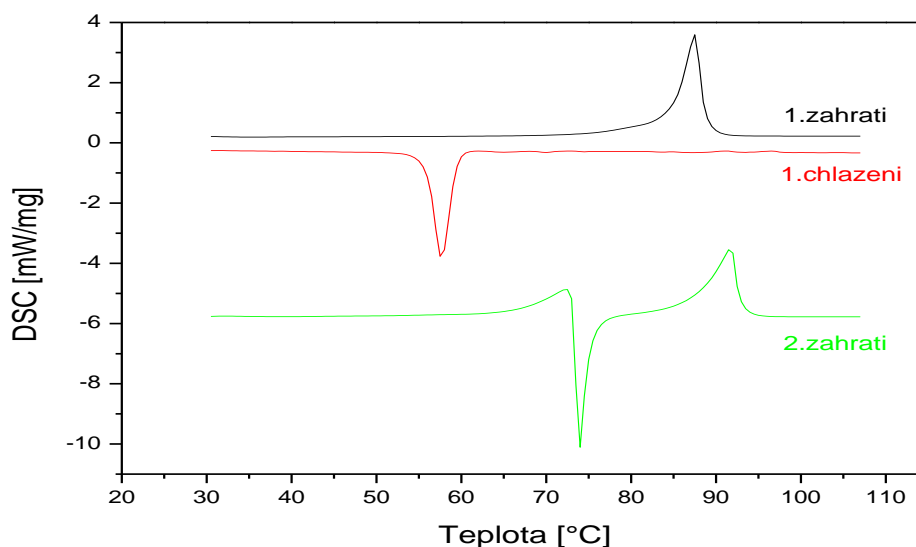
Před měřením bylo třeba proměřit pozadí (tzv.background) a při stejném nastavení přístroje pak probíhalo vlastní měření vzorků. Pro každou změnu podmínek, parametrů přístroje je nutné znovu proměřit pozadí. Před každým nanesením vzorku na měřicí krystal byl jeho povrch důkladně očištěn ethanolem a osušen. Malé množství rozetřeného vzorku bylo nanášeno na povrch krystalu tak, aby bylo dosaženo maximálního kontaktu vzorku s krystalem pomocí přítlačného zařízení. Jedno měření čítalo 128 skenů. Měření probíhalo v  $1\text{-}2 \text{ }^\circ\text{C}$  teplotním intervalu od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $50\text{-}80 \text{ }^\circ\text{C}$ , konečná teplota byla daná teplotním rozmezím, ve kterém měřená látka taje. Po každém teplotním kroku byla 10 min pauza ke stabilizaci teploty před záznamem každého dalšího měřeného spektra. Problém nastal při zjištění nedostatečné funkce termostatu, který neumožnil udržet nastavenou teplotu. Reálná teplota pak kolísala  $\pm 2 - 3 \text{ }^\circ\text{C}$  od nastavené teploty. Výstupem měření jsou IR spektra vyjadřující závislosti reflektance na vlnové délce. Zpracování, vyhodnocování a úprava jednotlivých spekter byla uskutečněna za pomoci Bruker OPUS softwaru.

## 5. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

### 5.1. 12S12

#### 5.1.1. DSC

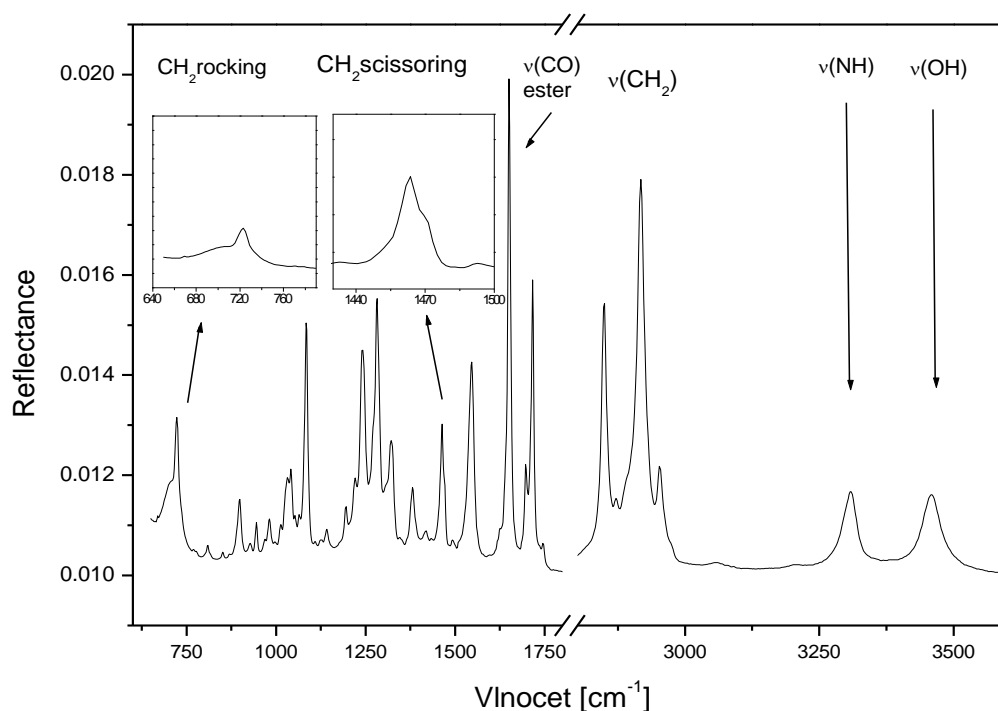
DSC termogram sloučeniny 12S12 znázorňuje fázovou transici při prvním zahřívání, kterou představuje endotermní pík, odpovídající onsetu teploty 84,9°C a změně entalpie  $\Delta H = 158$  J/g. Křivka odpovídající chlazení vzorku vykazuje fázový přechod vyznačený exotermním píkem při teplotě onsetu 51,9°C a  $\Delta H = -105,8$  J/g. DSC křivka druhého zahřátí, zaznamenaná ihned po prvním zahřívání a chlazení ukazuje dva píky, které znázorňují jak exotermní přechod při teplotě 67,7 °C a  $\Delta H = -408,2$  J/g a následně endotermní přechod při teplotě 82,4°C se změnou entalpie 141,1 J/g (Obr. 14).



Obr. 14 DSC křivky 12S12 odpovídající 1. zahřívání, 1.chlazení a 2.zahřívání

#### 5.1.2. ATR-FTIR spektroskopie

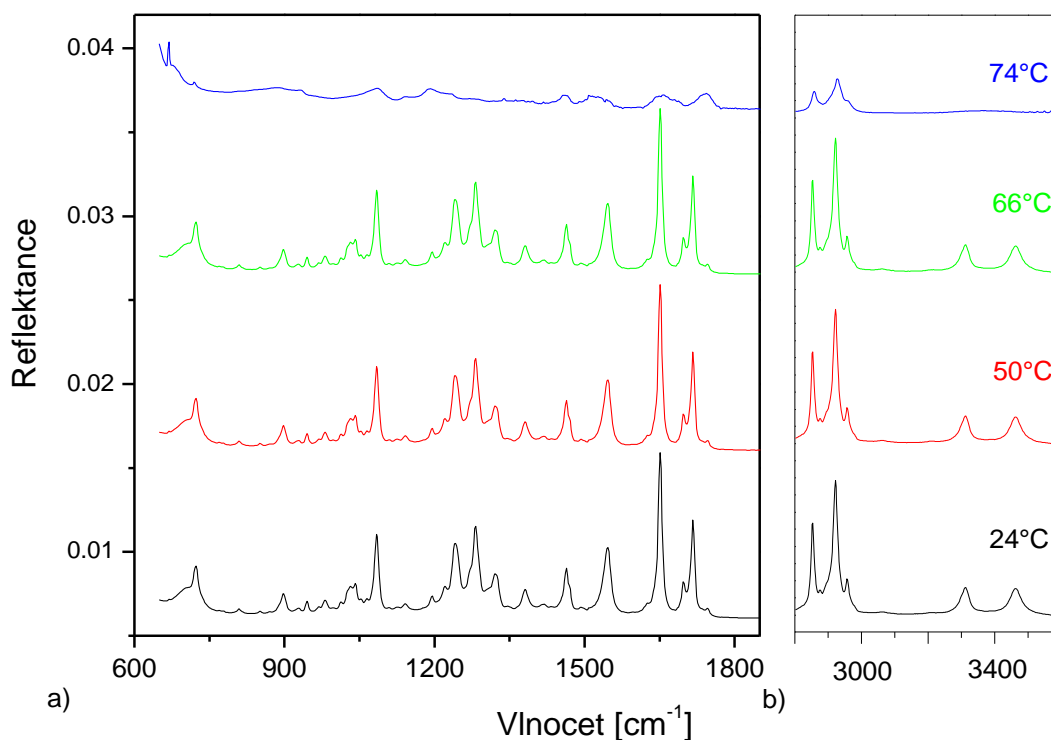
Měření probíhalo v teplotním intervalu od 25 do 98 °C po 2 °C, při blízkosti se transice po 1 °C. Fázový přechod nastal při teplotě 72 °C. IR spektrum 12S12 zaznamenané při pokojové teplotě je zobrazeno na Obr. 15, šipky označují absorpční pásy charakteristické pro analyzované funkční skupiny. Přiřazení vybraných absorpčních pásů je shrnuto v Tab. 2 (26). Na Obr.16 je zobrazena teplotní závislost spektra.



Obr. 15 IR spektrum 12S12 při pokojové teplotě. Nepřítomnost splittingu  $\text{CH}_2$  rocking a scissoring vibrace pravděpodobně vypovídá o triklinickém uspořádání lipidových řetězců. Šipky ukazují hlavní absorpční pásy charakteristické pro lipidy.

Tab. 2 Přiřazení vybraných IR pásů 12S12 při pokojové teplotě a při teplotě po fázovém přechodu (26).

IR ( $\text{cm}^{-1}$ )		Přiřazení (assignment)
24°C	74°C	
723	720	$\delta(\text{CH}_2)$ rocking
898	886	$\delta(\text{CH}_3)$ rocking
1084	1081	$\nu(\text{C-O})$ $\text{CH}_2\text{-OH}$ struktury
1241	-	$\nu(\text{C-O})$ esterové struktury
1463	1459	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring
1546	1543	$\delta(\text{NH})$
1651	1657	$\nu(\text{C=O})$ amidové struktury
1716	1743	$\nu(\text{C=O})$ esterové struktury
2849	2854	$\nu_s(\text{CH}_2)$ symetrická valenční (stretching) vibrace
2872	-	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2918	2924	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$ asymetrická valenční (stretching) vibrace
2953	-	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3308	-	$\nu(\text{NH})$
3459	-	$\nu(\text{OH})$ OH skupina tvořící intermolekulární H-můstky-dimer

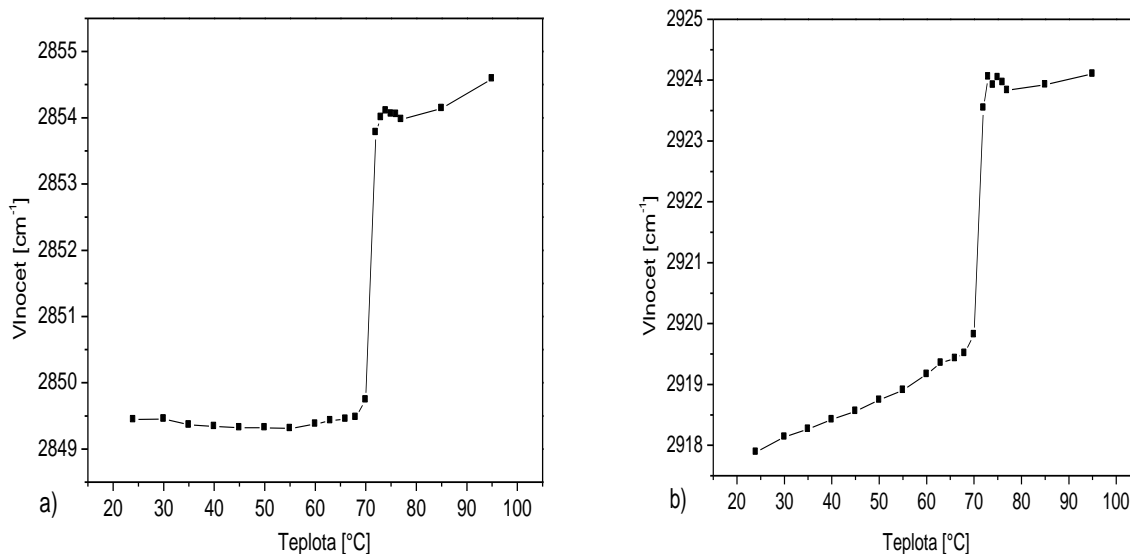


**Obr. 16** Teplotní závislost IR spektra 12S12 v rozmezí vlnové délky a) 600 - 1850  $\text{cm}^{-1}$ , b) 2800 – 3600  $\text{cm}^{-1}$  při teplotě 24, 50, 66 a 74  $^{\circ}\text{C}$ .

a) Oblast  $\text{CH}_2$  valenčních vibrací

Při pokojové teplotě jsou symetrické  $\nu_s(\text{CH}_2)$  a antisymetrické  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$   $\text{CH}_2$  stretching vibrace pozorovány při 2849 a 2918  $\text{cm}^{-1}$ . Termotropní reakce pozice  $\nu_s(\text{CH}_2)$  pásu je sledována transicí při teplotě 70  $^{\circ}\text{C}$  (Obr. 17a). Při tání dochází k posunu o 4.5  $\text{cm}^{-1}$  tohoto vibračního pásu z 2849 k 2854  $\text{cm}^{-1}$ .

Pozice  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  pásu je při zvyšující se teplotě k 68  $^{\circ}\text{C}$  posunuta o 1.5  $\text{cm}^{-1}$  z 2918 na 2919.5  $\text{cm}^{-1}$  a při teplotě 70  $^{\circ}\text{C}$  dochází k posunu z 2919 na 2924  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 17b).



**Obr. 17 a) Teplotní závislost pozice pásu symetrické stretching vibrace  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , b) asymetrické stretching vibrace  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ .**

#### b) $\text{CH}_2$ scissoring vibrace

Vibrační pás odpovídající  $\text{CH}_2$  scissoring (nůžkové) vibraci je ukazatel rozštěpení, v případě 12S12 není na IR spektru vyznačen, jak je ukázáno na Obr. 15. Za pokojové teploty je pozorován při  $1463\text{ cm}^{-1}$ , postupným zvyšováním teploty až k teplotě tání dochází k posunu k  $1461\text{ cm}^{-1}$ .

#### c) Oblast $700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$

V této spektrální oblasti jsou pozorovány methylenové rocking vibrační pásy  $\delta(\text{CH}_2)$ . Při  $24\text{ °C}$  se deformační  $\delta(\text{CH}_2)$  rocking vibrace vyskytuje při  $723\text{ cm}^{-1}$ , se zvyšující se teplotou se jeho pozice nepatrně snižuje na  $720\text{ cm}^{-1}$ . Dle Obr. 15 lze pozorovat jednotlivý pík bez náznaku rozštěpení. Při vyšším vlnočtu se vyskytuje  $\delta(\text{CH}_3)$  rocking vibrace, za pokojové teploty při  $898\text{ cm}^{-1}$  a postupným zvyšováním teploty dochází k posunu k  $886\text{ cm}^{-1}$ . Nepřítomnost štěpení  $\delta(\text{CH}_2)$  rocking a scissoring vibrací vypovídá o tom, že se nejedná o orthorhombické uspořádání řetězců v subcele.

d) Oblast C=O valenčních vibrací

Dle Tab.2 můžeme rozlišit dvě odlišné oblasti vlnových délek, ve kterých se vyskytují vibrační pásy C=O valenčních vibrací. Při pokojové teplotě a vlnové délce  $1716\text{ cm}^{-1}$  je zobrazen (viz Obr. 15) vibrační pás přiřazený C=O valenční vibraci esterové skupiny molekuly 12S12. Při teplotách do  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  zůstává nezměněn, po proběhlé fázové transici při  $74\text{ }^{\circ}\text{C}$  je jeho pozice posunuta k  $1743\text{ cm}^{-1}$  a není tak dobře pozorovatelný (Obr. 16a).

Pozice vibračního pásu při  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  a vlnové délce  $1651\text{ cm}^{-1}$  je přiřazena stretching vibraci C=O skupiny karbonylu acylového řetězce. Při teplotě po fázové transici je nepatrně posunut k  $1657\text{ cm}^{-1}$  (Obr. 16a), při vyšších teplotách již není detekovatelný.

e) NH vibrace

Pás vlnové délky  $3308\text{ cm}^{-1}$  je přiřazen NH stretching vibraci amidové skupiny (Obr.14). Se zvyšující se teplotou je pozice nepatrně zvýšena k  $3311\text{ cm}^{-1}$ . Při fázové transici dané teplotou tání dochází k posunu k  $3367\text{ cm}^{-1}$ , při vyšších teplotách již není pozorovatelný (Obr. 16b).

f) OH vibrace

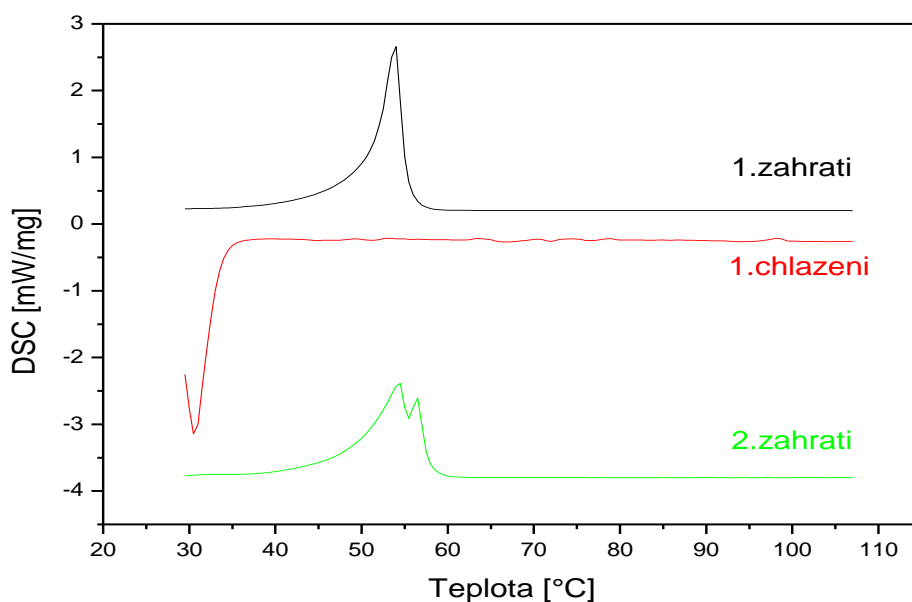
Při pokojové teplotě a vlnové délce  $3459\text{ cm}^{-1}$ , je zřetelná stretching vibrace OH skupiny v hydroxymethylové skupině molekuly 12S12 (Obr. 15). Tato nižší pozice vibrace je charakteristická pro OH skupinu tvořící dimery, prostřednictvím intermolekulárních H–můstek. Postupným zvyšováním teploty dochází k posunu k  $3469\text{ cm}^{-1}$ , po proběhlé transici není detekovatelný (Obr. 16b).



## 5.2. 12GM12

### 5.2.1. DSC

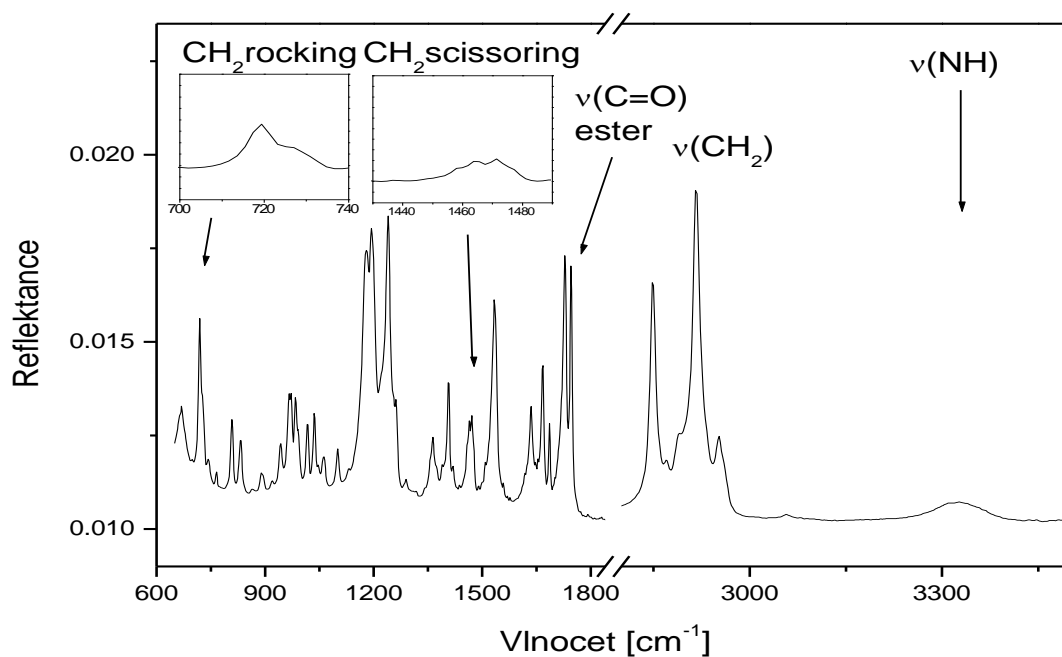
Na DSC termogramu 12GM12 lze během prvního zahřívání pozorovat fázový přechod znázorněný endotermním píkem s teplotním onsetem při 50,9 °C a změnou entalpie  $\Delta H = 129,7$  J/g. Sloučenina 12GM12 začíná tuhnout až při teplotě onsetu 24,8 °C s exotermní změnou entalpie  $\Delta H = -130,4$  J/g. Při druhém zahřívání provedeném ihned po zchlazení 12GM12, je možné pozorovat na DSC křivce rozštěpení píku, zobrazující fázový přechod při teplotě 44,3 a  $\Delta H = 119,3$  J/g (Obr. 18).



Obr. 18 DSC křivka 12GM12 zaznamenána při 1. zahřívání a chlazení a při 2. zahřátí

### 5.2.2. ATR-FTIR spektroskopie

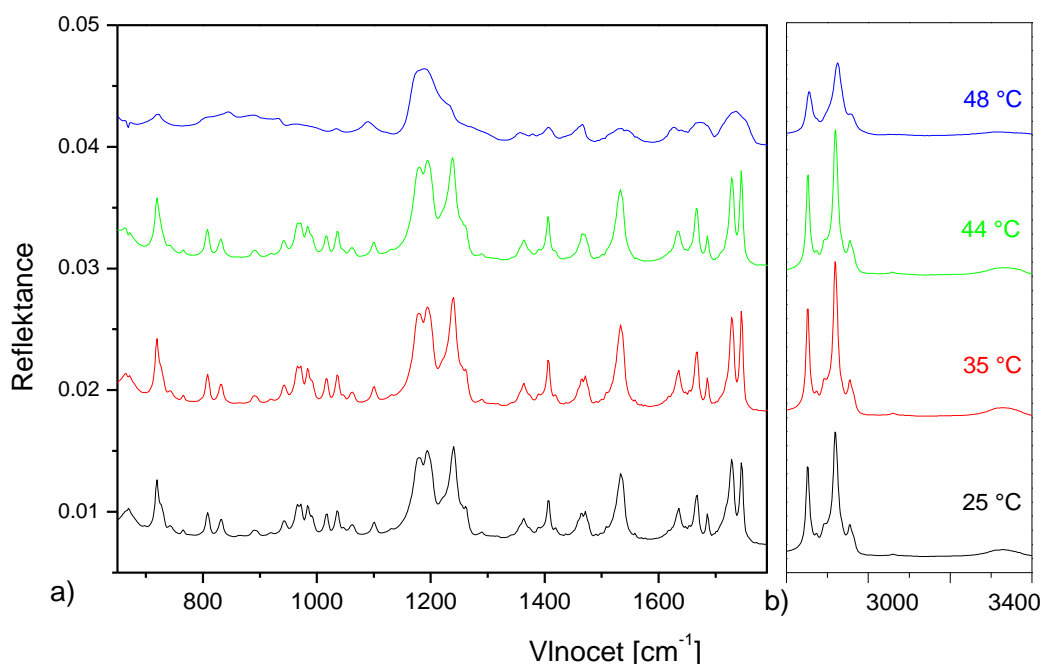
Měření bylo prováděno v teplotním intervalu od 25 do 50 °C po 1 °C. Fázový přechod byl zaznamenán při teplotě 45 °C. Infračervené spektrum 12GM12 je zaznamenáno na Obr. 19, šipky ukazují některé vibrační pásy charakteristické pro dané funkční skupiny. Přiřazení vybraných pásů IR spektra je shrnuto v Tab. 3 (26). Záznam spektra při čtyřech různých teplotách je zobrazen na Obr. 20.



Obr. 19. IR spektrum 12GM12 při pokojové teplotě. Šipky znázorňují přiřazení vybraných absorpčních pásů.

Tab. 3 Přiřazení vybraných IR pásů 12GM12 při pokojové teplotě a při teplotě po fázovém přechodu (26).

IR (cm-1)		Přiřazení (assignment)
25 °C	50 °C	
719	721	$\delta(\text{CH}_2)$ rocking
890	888	$\delta(\text{CH}_3)$ rocking
1194		$\nu(\text{C-O})$ esterové struktury
1240		
1465		
1471	1466	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring
1534	1534	$\delta(\text{NH})$
1635	1626	$\nu(\text{C=C})$
1667	1671	$\nu(\text{C=O})$ amidové struktury
1728	1735	$\nu(\text{C=O})$ esterové struktury
1746		
2849	2853	$\nu_s(\text{CH}_2)$ symetrická valenční (stretching) vibrace
2870	-	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2916	2922	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$ asymetrická valenční (stretching) vibrace
2952	2954	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3055		$\nu(=\text{CH}-)$
3326	3310	$\nu(\text{NH})$ tvořící H-můstky



**Obr. 20** Teplotní závislost spektra 12GM12 v rozmezí vlnových délek: a) 650-1790  $\text{cm}^{-1}$ , b) 2800-3400  $\text{cm}^{-1}$  při teplotách 25, 35, 44, 48  $^{\circ}\text{C}$ .

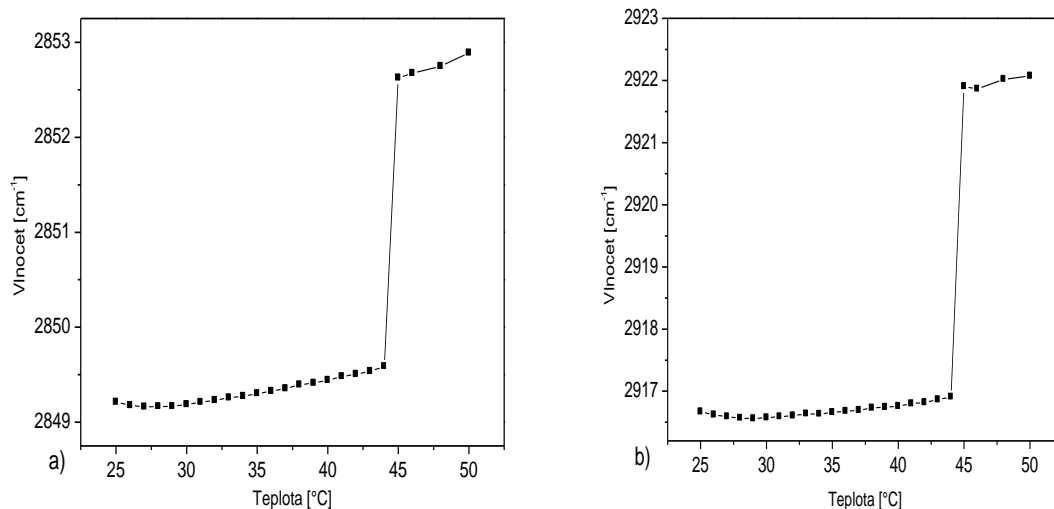
a) Oblast  $\text{CH}_2$  valenčních (stretching) vibrací

Při teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  můžeme na IR spektru pozorovat pás symetrické stretching vibrace  $\nu_s(\text{CH}_2)$  při 2849  $\text{cm}^{-1}$  a asymetrické stretching vibrace  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  při 2917  $\text{cm}^{-1}$ . Teplotní závislost  $\nu_s(\text{CH}_2)$  zobrazená na Obr. 21a, ukazuje fázový přechod při teplotě 44  $^{\circ}\text{C}$ , při kterém dochází k posunu o 4  $\text{cm}^{-1}$  na hodnotu 2853  $\text{cm}^{-1}$ .

Na Obr. 21b je zobrazená teplotní závislost  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ , při teplotě transice dochází k posunu o 5  $\text{cm}^{-1}$  na hodnotu 2922  $\text{cm}^{-1}$ .

b)  $\text{CH}_2$  scissoring vibrace

Pás  $\text{CH}_2$  nůžkové (scissoring) vibrace je za pokojové teploty možné identifikovat při vlnočtu 1465 a 1471  $\text{cm}^{-1}$ . Jak je zobrazeno na Obr. 19 a 20, je možno pozorovat rozštěpení tohoto vibračního pásu. Během fázového přechodu pak dochází k zániku štěpení a posunu k 1466  $\text{cm}^{-1}$ .



**Obr. 21 a) Teplotní závislost pásu symetrické stretching vibrace  $\nu_s$  ( $\text{CH}_2$ ), b) asymetrické stretching vibrace  $\nu_{as}$  ( $\text{CH}_2$ ).**

c) Oblast  $700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$

$\delta(\text{CH}_2)$  rocking vibrace je faktorem rozštěpení (splittingu) a podle něj lze usoudit o jaké uspořádání řetězců se jedná.

Při pokojové teplotě je zaznamenána pozice tohoto pásu při  $719\text{ cm}^{-1}$ . Při jeho dokonalejším studiu lze vyzorovat druhý pík při  $726\text{ cm}^{-1}$  (Obr. 19), který během fázového přechodu vymizí a při teplotách po tomto přechodu dochází k jeho posunu k  $721\text{ cm}^{-1}$ .

Na základě těchto dostupných informací týkajících se  $\delta(\text{CH}_2)$  rocking a scissoring vibrací, lze usoudit, že některé lipidové řetězce jsou vedle triklinického i v orthorhombickém uspořádání.

d) Oblast C=C valenčních vibrací

Přítomnost dvojné vazby v molekule 12GM12 bylo možné na IR spektru detekovat na základě vibračního pásu při  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Při nižších teplotách než byla teplota fázového přechodu, nedošlo k jeho změně, po přechodu došlo k posunu k  $1626\text{ cm}^{-1}$ .

e) Oblast C=O valenční (stretching) vibrace

Pozice C=O valenční vibrace přiřazená C=O skupině amidové struktury je zaznamenána na IR spektru při  $1667\text{ cm}^{-1}$  za pokojové teploty. Pozice tohoto pásu se nemění se zvyšující se teplotou, až při teplotě fázového přechodu dochází k posunu k  $1671\text{ cm}^{-1}$  a pás není tak dobře detekovatelný (Obr. 20).

Pozice pásu vyskytující se jako dublet při  $1728$  a  $1746\text{ cm}^{-1}$  je přiřazena valenční vibraci C=O skupin esterových struktur molekuly 12GM12 při teplotě  $25\text{ C}$ . Pozice těchto pásů zůstává nezměněna až do  $44\text{ °C}$ , při vyšší teplotě dochází k vymizení dubletu a posunu k  $1735\text{ cm}^{-1}$  (Obr. 20).

f) NH vibrace

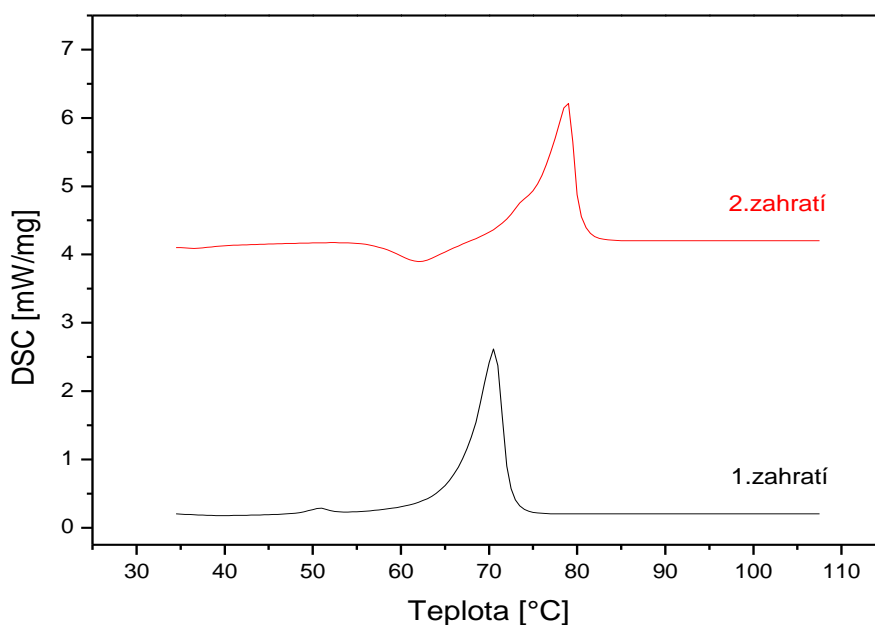
Vibrační pás zaznamenaný při  $3326\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenční vibraci  $\nu(\text{NH})$  při pokojové teplotě. Dosažením teploty fázového přechodu dochází k posunu k  $3310\text{ cm}^{-1}$  a při dalším zvyšování teploty již není pozorovatelný (Obr. 20).

Deformační vibraci NH skupiny  $\delta(\text{NH})$  je možné pozorovat při  $1534\text{ cm}^{-1}$ , ke změnám tohoto vibračního pásu dochází až při teplotách po přechodu, kdy není detekovatelný (Obr. 20).

### 5.3. 12GV12

#### 5.3.1. DSC

DSC termogram 12GV12 znázorňuje endotermní pík odpovídající fázovému přechodu s onsetem teploty 66,5 °C. Tato transice je spojena se změnou entalpie  $\Delta H = 127,8$  J/g. Křivka chlazení není zobrazena, protože látka začíná tuhnout až při 20 °C. DSC křivka druhého zahřívání zaznamenaná ihned po chlazení vykazuje onset teploty 63,8 °C a  $\Delta H = 111,3$  J/g (Obr. 22).

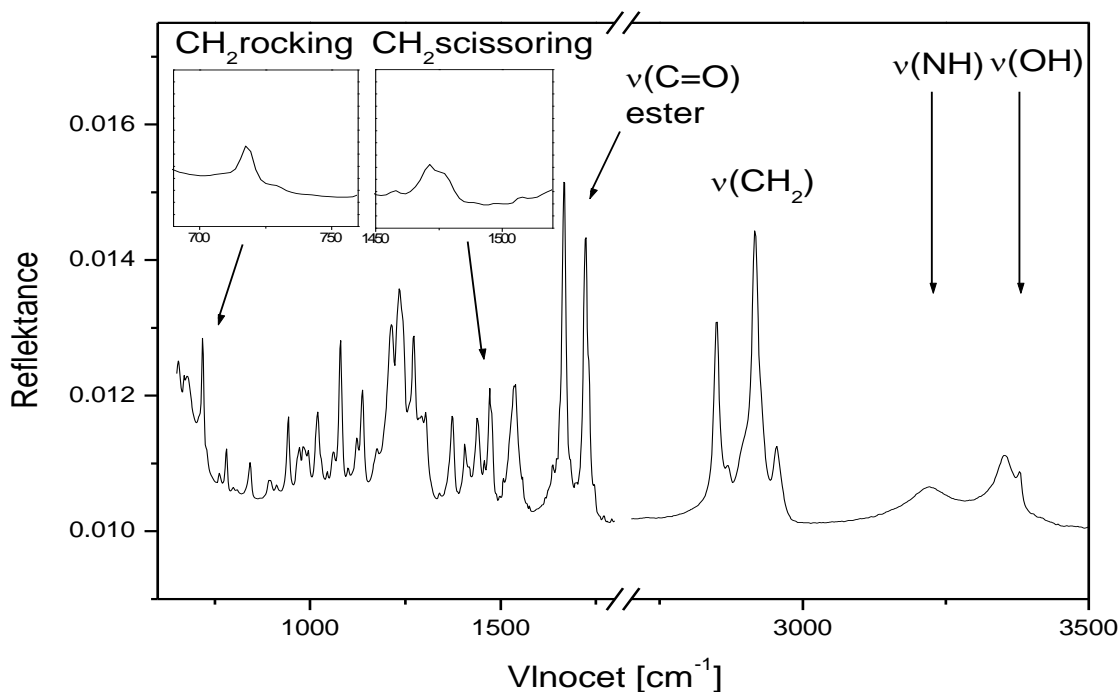


Obr. 22 DSC termogram 12GV12 odpovídající 1. a 2. zahříváním

#### 5.3.2. ATR-FTIR spektroskopie

Měření probíhalo v teplotním intervalu od 25 do 60 °C po 1 °C. Fázový přechod byl zaznamenán při teplotě 57 °C. IR spektrum 12GV12 při pokojové teplotě je zobrazeno na Obr. 23. K fázovému přechodu 12GV12 zaznamenaného na IR spektru došlo při teplotě 57 °C.

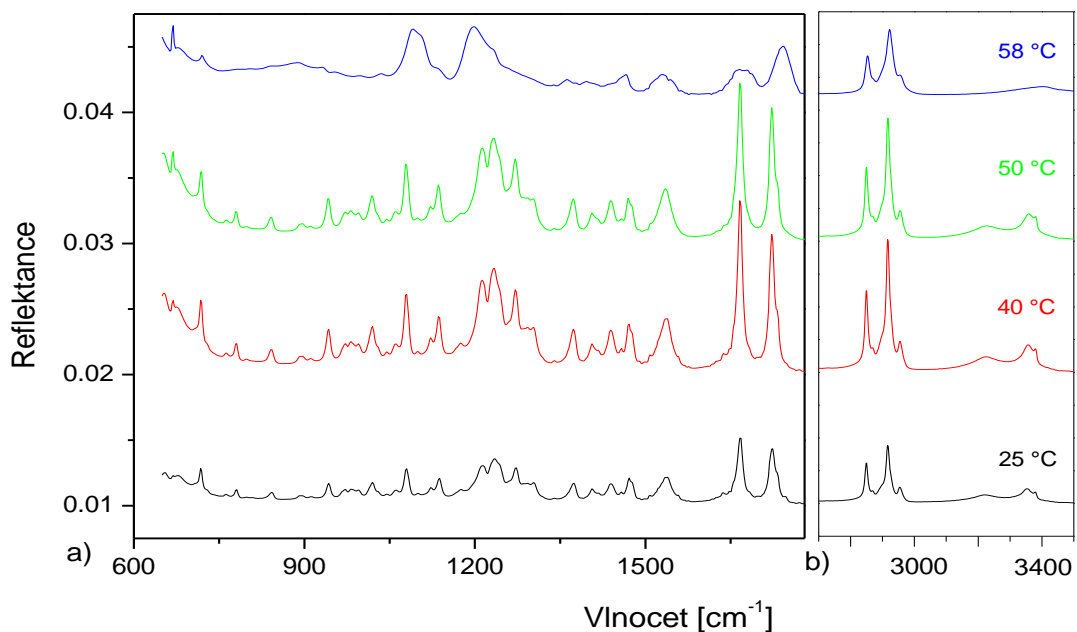
Přiřazení vibračních pásů je shrnuto v Tab. 4 (26). Teplotní závislost vybrané části IR spektra je ukázána na Obr. 24.



Obr. 23 IR spektrum 12GV12 měřeno při pokojové teplotě: výseky znázorňují zvětšené pásy  $\text{CH}_2$  rocking a scissoring vibrace a přiřazení funkčním skupinám.

Tab. 4 Přiřazení vybraných IR pásů 12GV12 při pokojové teplotě a při teplotě po fázové transici (26).

IR ( $\text{cm}^{-1}$ )		Přiřazení (assignment)
25 °C	60 °C	
718	720	$\delta(\text{CH}_2)$ rocking
1079	1091	$\nu(\text{C-O})$ OH skupiny
1213	1198	$\nu(\text{C-O})$ esterové struktury
1235		
1471	1466	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring
1538	1531	$\delta(\text{NH})$
1667	1665	$\nu(\text{C=O})$ amidové struktury
	1678	
1723	1743	$\nu(\text{C=O})$ esterové struktury
2849	2853	$\nu_s(\text{CH}_2)$ symetrická vibrace
2869	-	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2917	2922	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$ asymetrická vibrace
2954	2954	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3222	-	$\nu(\text{NH})$
3353	3407	$\nu(\text{OH})$ OH skupina tvořící intermolekulární H-můstky-dimery
3379	-	



**Obr. 24** Teplotní závislost IR spektra 12GV12 v rozmezí vlnočtu: a) 600-1800  $\text{cm}^{-1}$ , b) 2700-3500  $\text{cm}^{-1}$ .

a) Oblast  $\text{CH}_2$  valenčních vibrací

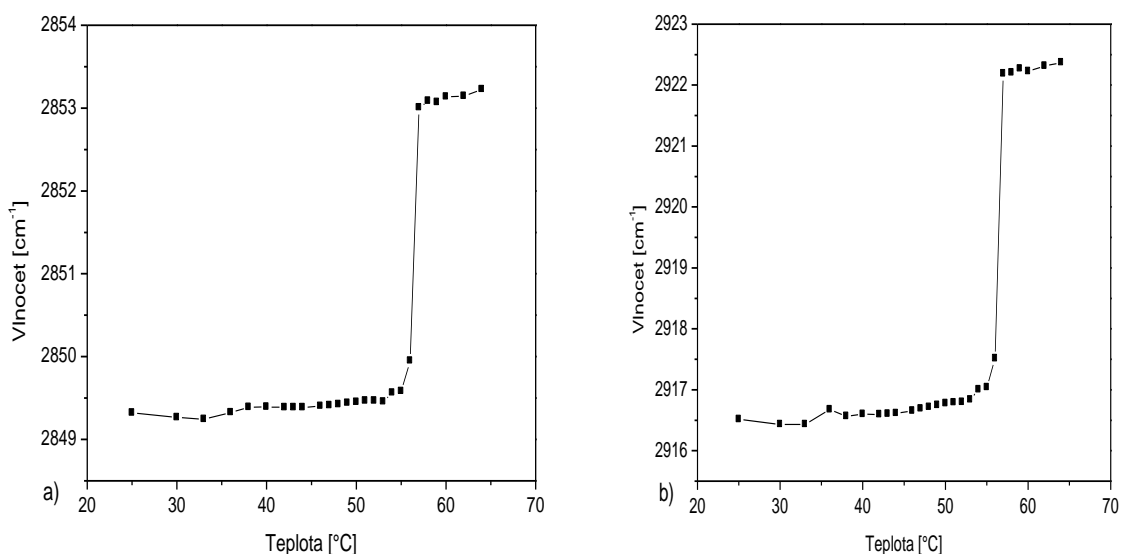
Na Obr. 25 je znázorněna pozice pásů symetrické a asymetrické valenční vibrace se zvyšující se teplotou. Symetrická vibrace  $\nu_s(\text{CH}_2)$  má pozici pásu při 25 °C při 2849  $\text{cm}^{-1}$ , dosažením teploty přechodu 56 °C dochází k posunu vibračního pásu o 4  $\text{cm}^{-1}$  na hodnotu 2853  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 25a).

Asymetrická vibrace  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  dosahuje při 25 °C hodnoty vlnočtu 2916,5  $\text{cm}^{-1}$ , se zvyšující se teplotou nedochází k větším změnám, až dosažením teploty fázového přechodu dochází k posunu k 2922  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 25b).

b)  $\text{CH}_2$  nůžková vibrace

Při dokonalejším studiu pásu přiřazeného nůžkové  $\text{CH}_2$  vibraci lze vypořadovat náznak rozštěpení při 1471 a 1476  $\text{cm}^{-1}$ , který dosažením teploty přechodu vymizí a při vyšších teplotách dochází k posunu pásu k 1466  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 23, 24).





**Obr. 25** Teplotní závislost 12GV12 pásu: a) symetrické stretching vibrace  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , b) asymetrické stretching vibrace  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ .

c) Oblast  $700\text{--}900\text{ cm}^{-1}$

$\text{CH}_2$  rocking vibrační pás má při pokojové teplotě pozici při  $718\text{ cm}^{-1}$ . Protože tato vibrace vykazuje pouze singlet (Obr. 23) můžeme vyloučit orthorhombické uspořádání řetězců. Se zvyšující se teplotou nedochází ke změně, při teplotě fázového přechodu je zaznamenán posun k  $720\text{ cm}^{-1}$ .

d) C-O vibrace

Na IR spektru 12GV12 je rozlišována dvojí pozice vibrací struktury C-O, a sice vibrační pás C-O hydroxylové skupiny a esterové struktury. Vibrace C-O je zaznamenána při  $1079\text{ cm}^{-1}$  a při teplotách po přechodu je posunuta k vlnočtu  $1091\text{ cm}^{-1}$ .

Pás přiřazený C-O esterové struktury je znázorněn na Obr. 24 jako dublet při  $1213$  a  $1235\text{ cm}^{-1}$ , dosažením teploty transice a vyšších teplot pak tvoří jednotlivý širší vibrační pás s posunem k  $1198\text{ cm}^{-1}$ .

e) C=O vibrace

Esterová C=O vibrace je přiřazena vibračnímu pásu při  $1723\text{ cm}^{-1}$  (Obr. 24), po fázovém přechodu je posunut k  $1743\text{ cm}^{-1}$  a má širší přechod, stejně jako vibrace

karbonylu amidové struktury, u které je nepatrná změna pozice vibračního pásu o  $2\text{ cm}^{-1}$ .

f) Vibrace NH skupiny

Valenční vibrace NH skupiny  $\nu(\text{NH})$  je zaznamenána při  $3222\text{ cm}^{-1}$ , vibrační pás NH skupiny při nižších vlnočtech nám může poukázat na přítomnost vodíkových můstků tvořených NH skupinou. Dosažením teploty transice se tento pás stává nepozorovatelným (Obr. 24b).

Deformační vibrace NH skupiny je pozorována při  $1538\text{ cm}^{-1}$ , při dosažení teploty fázového přechodu dochází k nepatrnému posunu.

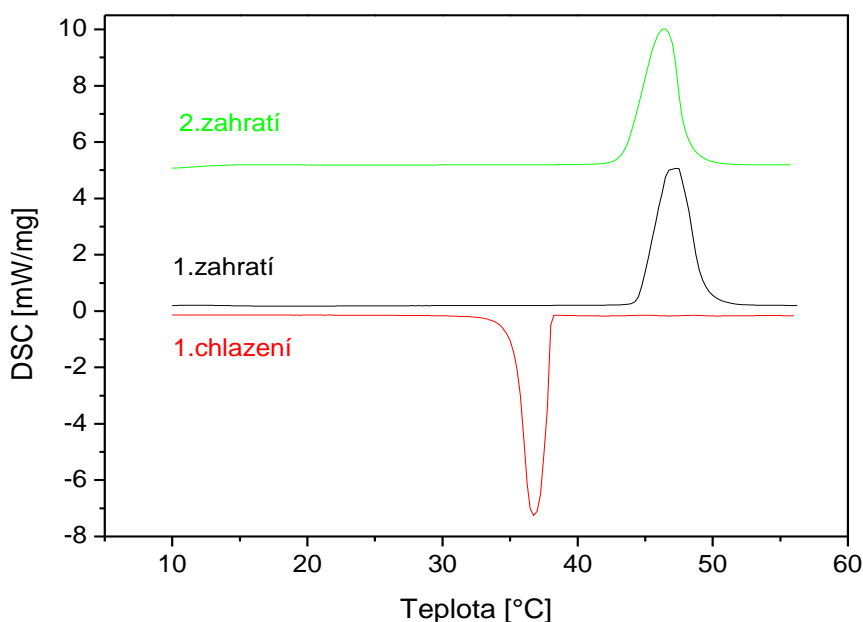
g) Vibrace OH skupiny

Vibrační pás s nejvyšší hodnotou vlnočtu je přiřazen volným hydroxylovým skupinám. Na IR spektru je možné pozorovat dublet při  $3353$  a  $3379\text{ cm}^{-1}$ . Tyto nižší hodnoty vlnočtu jsou charakteristické pro OH skupiny, které vytvářejí dimery prostřednictvím intermolekulárních H-můstků. Při transici pak dochází k posunu k  $3407\text{ cm}^{-1}$  (Obr. 24b).

## 5.4. 12F12

### 5.4.1. DSC

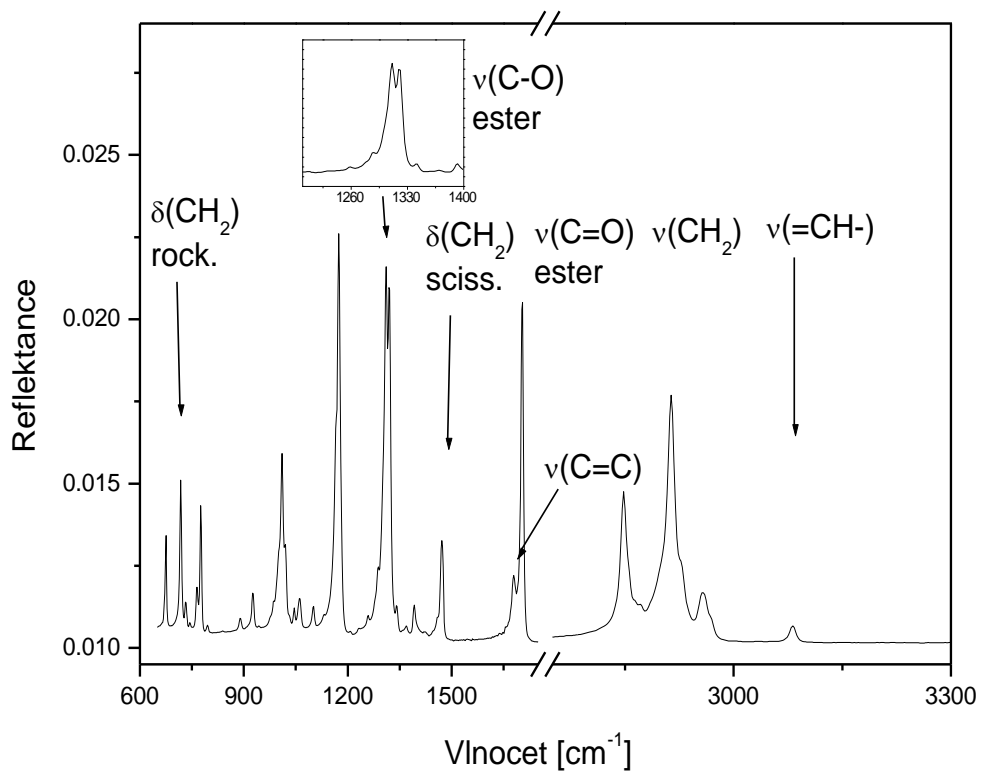
DSC termogram 12F12 znázorňuje fázový přechod při prvním zahřátí vyjádřenou teplotním onsetem při 44,5 °C a změnou entalpie  $\Delta H = 186,7$  J/g. Křivka chlazení znázorňuje krystalizaci sloučeniny při teplotě onsetu 37,9 °C a  $\Delta H = -187,2$  J/g. DSC křivka odpovídající druhému zahřátí provedenému bezprostředně po chlazení ukazuje fázovou transici vyjádřenou endotermním píkem při teplotě 44,2 °C a  $\Delta H = 185,5$  J/g (Obr. 26).



Obr. 26 DSC termogram 12F12 odpovídající 1.zahřívání a chlazení a 2.zahřátí

### 5.4.2. ATR-FTIR spektroskopie

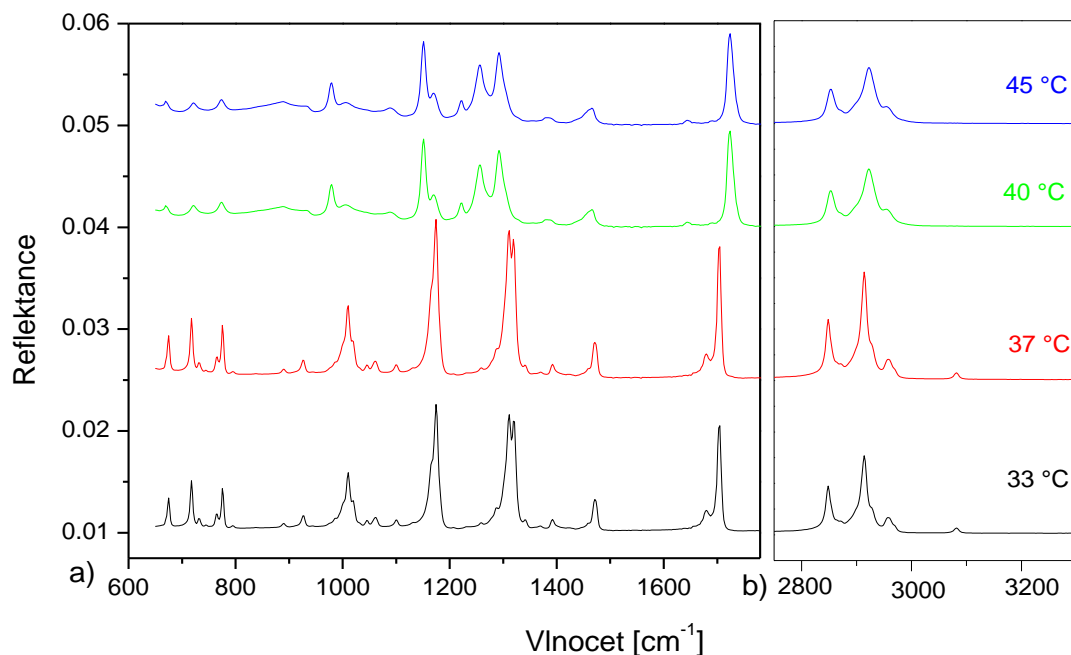
Měření probíhalo po 3 °C, v teplotním intervalu od 30 do 45 °C. Fázový přechod byl zaznamenán při teplotě 40 °C. Záznam IR spektra 12F12 je znázorněno na Obr. 27, šipky znázorňují vybrané pásy a zvětšení vibračního pásu přiřazeného vibraci C-O vazby esteru. Přiřazení hlavních pásů funkčním skupinám a strukturám v molekule zahrnuje Tab. 5. Teplotní závislost vybraných úseků IR spektra při teplotách před a po fázovém přechodu, ke kterému došlo při 40 °C znázorňuje Obr. 28.



Obr. 27 IR spektrum 12F12 při pokojové teplotě, šipky znázorňují přiřazení vibračních pásů.

Tab. 5 Přiřazení vybraných IR pásů 12F12 při pokojové teplotě a při teplotě po fázovém přechodu (26).

IR (cm-1)		Přiřazení (assignment)
30 °C	45 °C	
718	721	$\delta(\text{CH}_2)$ rocking
1010	979	$\nu(\text{C}-\text{C})$ skeletové vibrace
1174	1150	
1311	1256	$\nu(\text{C}-\text{O})$ esterové struktury
1320	1292	
1471	1466	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring
1680	-	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1704	1723	$\nu(\text{C}=\text{O})$ esterové struktury
2849	2853	$\nu_s(\text{CH}_2)$ symetrická vibrace
2871	-	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2914	2922	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$ asymetrická vibrace
2958	-	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$
3082	-	$\nu(=\text{CH}-)$



**Obr. 28** Teplotní závislost IR spektra 12F12 v rozmezí vlnočtu: a) 600-1780  $\text{cm}^{-1}$ , b) 2750-3300  $\text{cm}^{-1}$

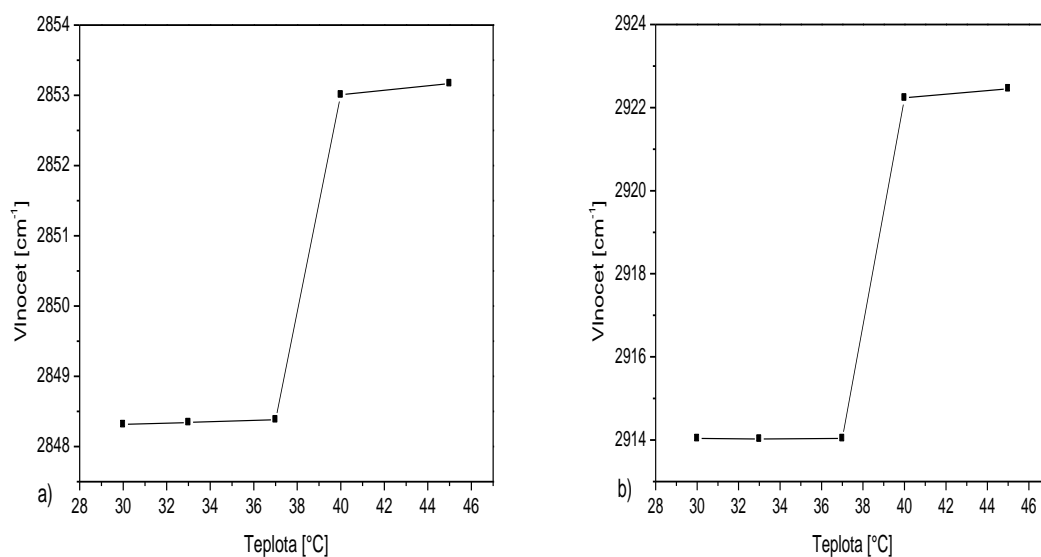
a) Oblast  $\text{CH}_2$  valenčních vibrací

Pozice vibračních pásů přiřazených symetrickým a asymetrickým valenčním vibracím  $\text{CH}_2$  skupiny v závislosti na teplotě jsou zobrazeny na Obr. 28. Při teplotě 30 °C je pozice  $\nu_s(\text{CH}_2)$  při 2848  $\text{cm}^{-1}$ . Se zvyšující se teplotou se nemění, jakmile je dosaženo teploty 37 °C až 40 °C, při které dochází k fázovému přechodu, je viditelný posun o 5  $\text{cm}^{-1}$  k hodnotě 2853  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 29a).

Asymetrická vibrace  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  má při 30 °C hodnotu vlnočtu 2914  $\text{cm}^{-1}$ , při teplotě 37 °C dochází k plynulému posunu, dosažením teploty 40 °C pak k posunu o 8  $\text{cm}^{-1}$  k hodnotě 2922  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 29b).

b)  $\text{CH}_2$  scissoring vibrace

Na Obr. 28a můžeme pozorovat singlet při 1471  $\text{cm}^{-1}$  přiřazený této vibraci. Dosažením teploty fázového přechodu dochází k posunu k 1466  $\text{cm}^{-1}$ .



**Obr. 29** Teplotní závislost 12F12 : a) symetrické stretching vibrace  $\nu_s(\text{CH}_2)$ , b) asymetrické stretching vibrace  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ .

c) Oblast CH<sub>2</sub> rocking vibrací

Při teplotě 30 °C je tento vibrační pás zaznamenán při 718 cm<sup>-1</sup>. Je znázorněn jako jednotlivý pás bez náznaků štěpení. Se zvyšující se teplotou ke 40 °C dojde k posunu k 721 cm<sup>-1</sup> a pás není tak dobře pozorovatelný.

d) Vibrace C=C vazby

Vibrační pás této vazby je vyznačen na IR spektru při 1680cm<sup>-1</sup> za pokojové teploty. Při 40 °C teplotě již přestává být pozorovatelný (Obr. 28a).

e) Valenční vibrace –CH= methinové vazby

Na IR spektru 12F12 je vyznačen vibrační pás přiřazený vibraci této vazby při nejvyšším vlnočtu 3082 cm<sup>-1</sup>. Dosažením teploty 40 °C již není pozorovatelný na spektru (Obr. 28b).

f) Valenční vibrace C-O vazby esterových struktur

Na Obr. 28a můžeme pozorovat vibrační pás C-O vazby jako dublet při 1311 a 1320  $\text{cm}^{-1}$ . Se zvýšením teploty na 40 °C dochází k posunu k 1256 a 1292  $\text{cm}^{-1}$  a tyto pásy již netvoří dublet. Na IR spektru při 40 °C můžeme dále sledovat vytvoření nového pásu při 1222  $\text{cm}^{-1}$ .

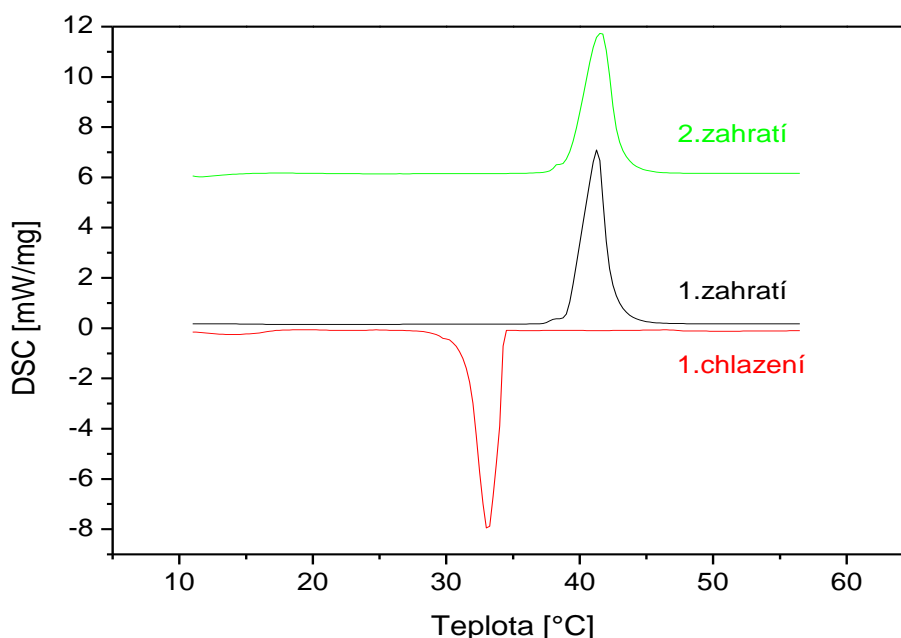
g) Valenční vibrace C=O skupiny esterových struktur

Při teplotě 30 °C je na IR spektru zaznamenán při 1704  $\text{cm}^{-1}$  vibrační pás týkající se této struktury. Se zvýšením teploty na teplotu tání, je patrný posun k 1723  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 28a).

## 5.5. 12J12

### 5.5.1. DSC

DSC termogram 12J12 zobrazený na Obr. 30, znázorňuje fázový přechod zaznamenaný při dvou zahřátí a chlazení mezi nimi. DSC křivka prvního zahřátí zaznamenává tání sloučeniny vyjádřeného endotermním píkem s onsetem při 39 °C a změnou entalpie  $\Delta H = 185,8$  J/g. Chlazení probíhající ihned po zahřátí je pak znázorněno další DSC křivkou s onsetem 32,5 °C a  $\Delta H - 180,5$  J/g. Druhé zahřátí pak následovalo bezprostředně po chlazení a fázový přechod je vyznačen endotermním píkem s onsetem 38,6 °C a  $\Delta H = 183,3$  J/g.

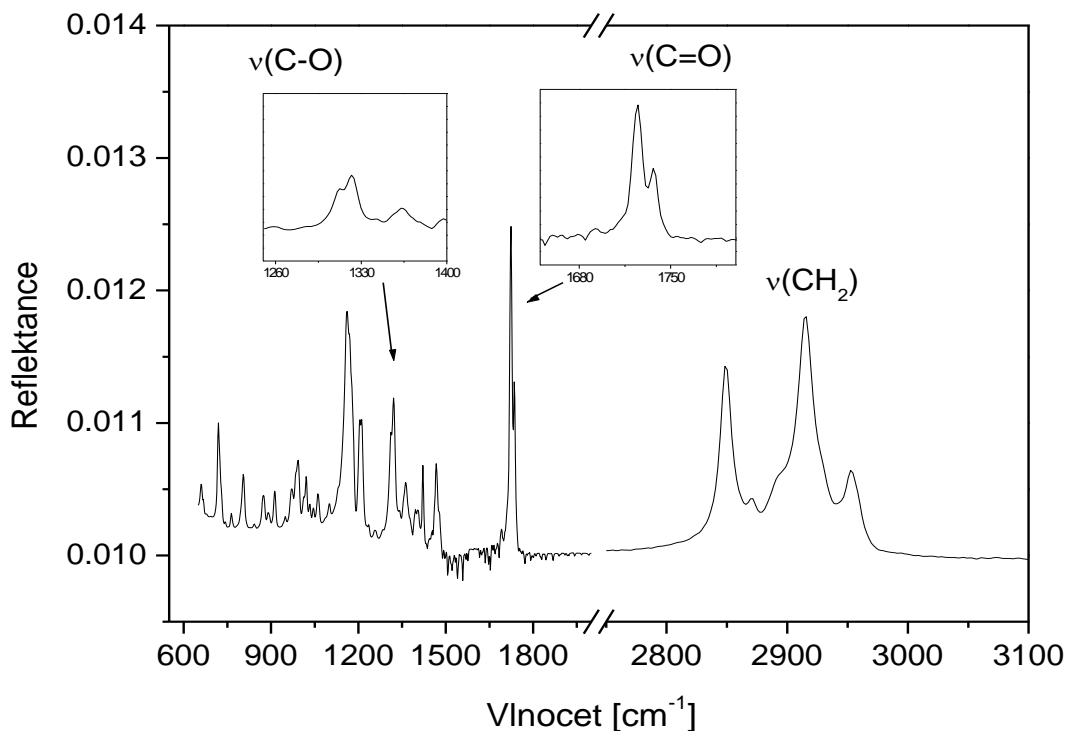


Obr. 30 DSC křivky 12J12 zaznamenané při 1. zahřívání a chlazení a 2. zahřátí

### 5.5.2. ATR-FTIR spektroskopie

Měření probíhalo po 1 °C, v teplotním intervalu od 25 °C do 41 °C. Fázový přechod byl zaznamenán při 35 °C. IR spektrum 12J12 při pokojové teplotě je ukázáno na Obr. 31. V Tab. 6 jsou shrnuta přiřazení hlavních vibračních pásů charakteristických pro určité struktury v molekule 12J12. Teplotní závislost vybraných částí IR spektra při různých teplotách je zobrazena na Obr. 32.

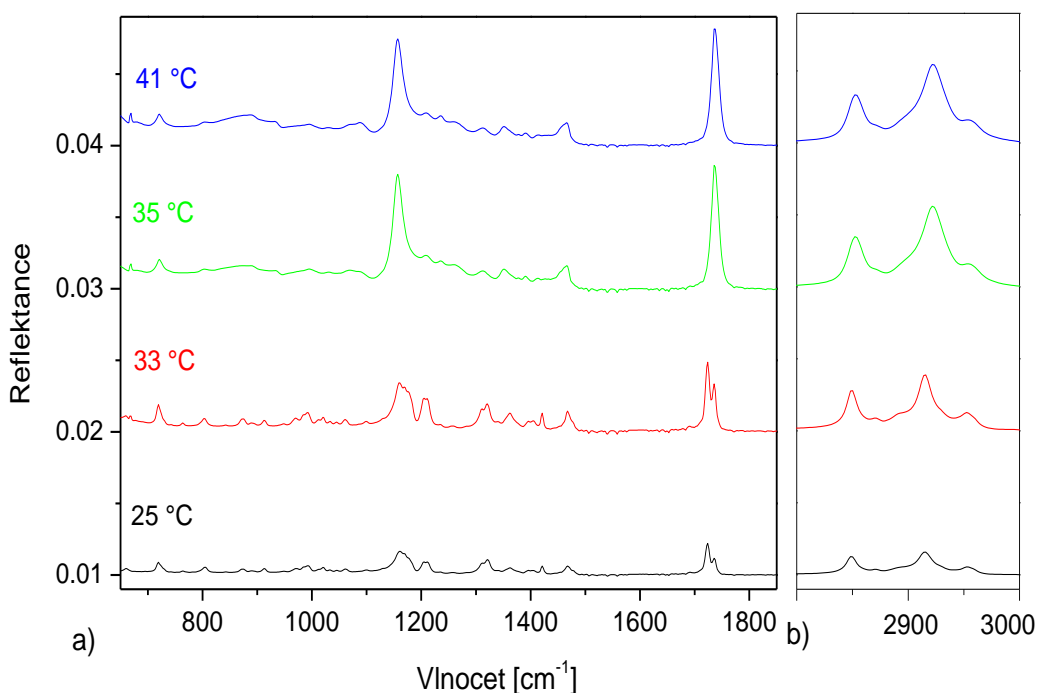




Obr. 31 IR spektrum 12J12 při pokojové teplotě. Šipky ukazují zvětšení vybraných vibračních pásů.

Tab. 6 Přiřazení vybraných IR pásů 12J12 při pokojové teplotě a při teplotě po fázovém přechodu (26).

IR (cm <sup>-1</sup> )		Přiřazení (assignment)
25 °C	41 °C	
719	721	$\delta(\text{CH}_2)$ rocking vibrace
1161	1157	$\nu(\text{C-C})$ skeletové vibrace
1321	-	$\nu(\text{C-O})$ esterové struktury
1466	1466	$\delta(\text{CH}_2)$ nůžková (scissoring) vibrace
1722		
1736	1737	$\nu(\text{C=O})$ esterové struktury
2849	2853	$\nu_s(\text{CH}_2)$ symetrická valenční (stretching) vibrace
2870	-	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2915	2922	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$ asymetrická valenční (stretching) vibrace
2953	2954	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$



Obr. 32 Teplotní závislost IR spektra 12J12 v rozmezí vlnočtu: a) od 650-1850  $\text{cm}^{-1}$ , b) 2800-3000 při teplotách 25, 33, 35, 41  $^{\circ}\text{C}$ .

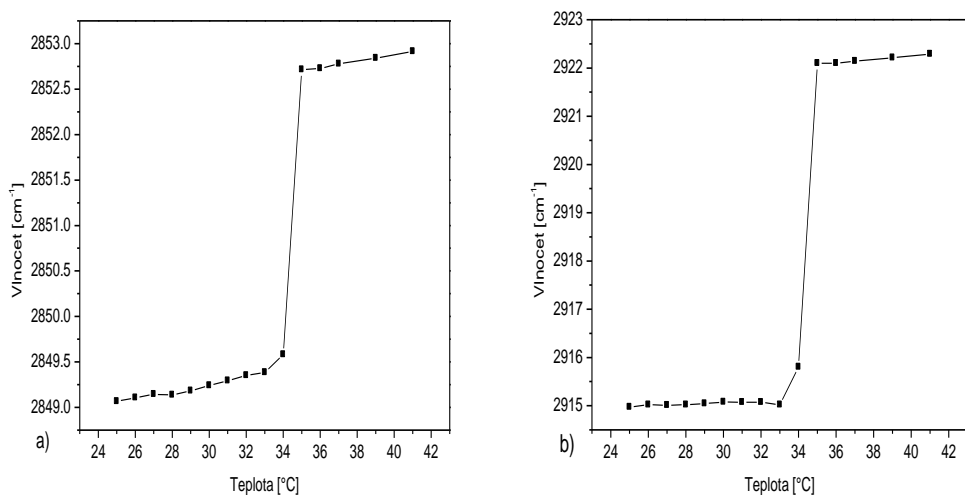
#### a) Oblast $\text{CH}_2$ valenčních vibrací

Teplotní závislosti pozic vibračních pásů přiřazených symetrickým a asymetrickým vibracím jsou zobrazeny na Obr. 32. Při pokojové teplotě je pozice  $\nu_s(\text{CH}_2)$  při 2849  $\text{cm}^{-1}$ . Se zvyšující teplotou není viditelná žádná změna. Dosažením 34  $^{\circ}\text{C}$  dochází k fázovému přechodu a při teplotě 35  $^{\circ}\text{C}$  dosahuje hodnota vlnočtu 2852,5  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 33a).

Pozice pásu  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  je za pokojové teploty 2915  $\text{cm}^{-1}$ , zvyšováním teploty pak dochází k posunu o 7  $\text{cm}^{-1}$  na hodnotu 2922  $\text{cm}^{-1}$  (Obr. 33b).

#### b) $\text{CH}_2$ scissoring vibrace

Vibrační pás přiřazený  $\text{CH}_2$  nůžkové vibraci je na IR spektru zřetelný při 1466  $\text{cm}^{-1}$  jako jednotlivý pás bez náznaku štěpení, během dalšího zahřívání se pozice nemění.



**Obr. 33** Teplotní závislost pásu 12J12: a) symetrické stretching vibrace, b) asymetrické stretching vibrace.

c) Vibrace CH<sub>2</sub> rocking

Na spektru sloučeniny 12J12 je pás této vibrace zobrazen při 719 cm<sup>-1</sup>, dosažením teploty fázového přechodu dochází k nepatrnému posunu k 721 cm<sup>-1</sup>.

d) Vibrace C-O vazby esterové struktury

Pozice pásu při 1321 cm<sup>-1</sup> je přiřazena vibracím této vazby v esterové struktuře. Při dokonalejším studiu tohoto pásu můžeme vypočítat náznak štěpení. Se zvyšující se teplotou je pozorován jako jednotlivý pás s posunem k 1314 cm<sup>-1</sup> a při teplotě po proběhlém přechodu již není pozorovatelný (Obr. 32).

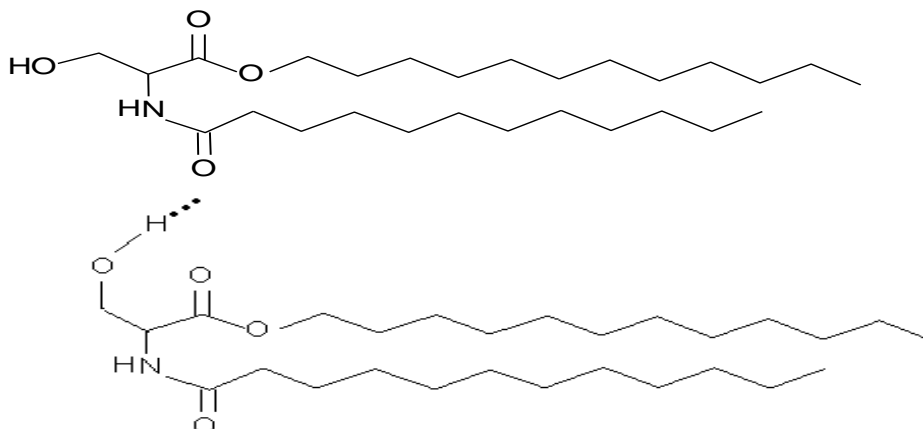
e) Vibrace C=O skupiny esterové struktury

Na Obr. 31 je znázorněn pás týkající se této vibrace jako dublet při 1722 a 1736 cm<sup>-1</sup> dosažením 35 °C teploty dublet vymizí, je zobrazen jednotlivý pás při 1736 cm<sup>-1</sup>.

## 6. DISKUZE

### 6.1. 12S12

Uhlovodíkové řetězce molekuly 12S12 vykazují za pokojové teploty vysoký stupeň konformační „zig zag“ uspořádanosti s vysokým počtem trans konformerů, o čemž vypovídá pozice symetrické valenční vibrace, která dosahuje  $2849\text{ cm}^{-1}$ . Vibrace  $\text{CH}_2$  nůžková a deformační rocking vibrace neznázorňují přítomnost rozštěpení, můžeme tedy vyloučit orthorhombické uspořádání lipidových řetězců a usoudit, že se pravděpodobně jedná o triklinické uspořádání, pro které je právě charakteristický vyšší počet trans konformerů a nepřítomnost rozštěpení pásu. Fázový přechod zaznamenaný DSC měřením při  $85\text{ }^\circ\text{C}$  neodpovídá přechodu detekovaného při  $72\text{ }^\circ\text{C}$  na IR spektru této sloučeniny, z důvodu nedostatečné funkce termostatu IR přístroje, nicméně IR měření je vhodné pro bližší studium změn, které se dějí během tání v molekule. Nejpozoruhodnější změny během zahřívání a fázového přechodu jsou zobrazeny na Obr. 15. Z nepřítomnosti rozštěpení vibračního pásu  $\delta(\text{NH})$  pozorovatelného při  $1546\text{ cm}^{-1}$ , můžeme usoudit, že NH skupina netvoří vodíkové můstky. Ty potom mohou pocházet z jiných interakcí, především z interakcí OH skupiny. Vibrační pásy přiřazené  $\text{C}=\text{O}$  skupině pozorované při  $1651\text{ cm}^{-1}$  a  $\text{C}=\text{O}$  skupiny esterové struktury při  $1716\text{ cm}^{-1}$  za pokojové teploty, nejsou dosažením teploty fázového přechodu již tak dobře pozorovatelné. Vibrační pásy NH stretching vibrace pozorovatelné za pokojové teploty při  $3308\text{ cm}^{-1}$  a OH skupiny při  $3459\text{ cm}^{-1}$  se dosažením teploty přechodu stávají nepozorovatelnými. Nižší pozice vibračního pásu při pokojové teplotě vypovídá o přítomnosti intermolekulárních vodíkových vazeb tvořících se mezi OH skupinou a  $\text{C}=\text{O}$  skupinou (Obr.34).

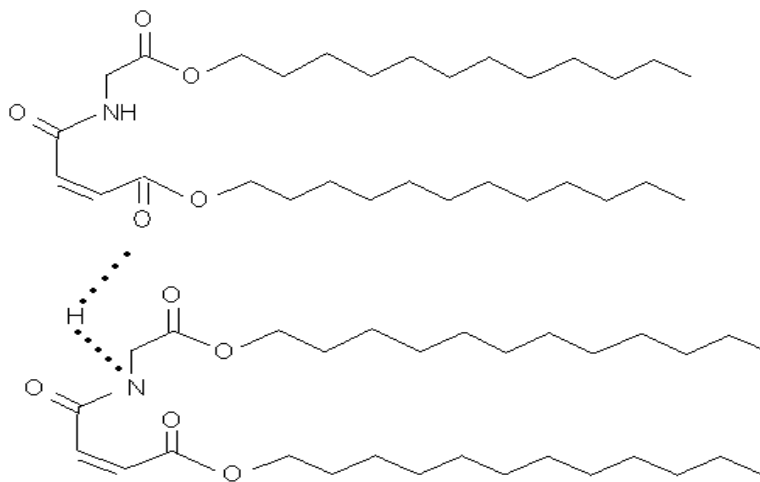


Obr. 34 Jedno z možných intermolekulárních uspořádání molekul lipidů vodíkovými můstky.

## 6.2. 12GM12

Na základě metylenových valenčních vibrací IR spektra molekuly 12GM12 můžeme usoudit o jaké uspořádání lipidových domén se jedná. Za pokojové teploty je pozice  $\text{CH}_2$  symetrické valenční vibrace při  $2849\text{ cm}^{-1}$ , vypovídá tak o relativně vyšším počtu trans konformerů a vysokém stupni uspořádanosti lipidových řetězců. Se zvyšující se teplotou dochází ke zvyšování počtu gauche konformerů a posunu k  $2853\text{ cm}^{-1}$ . Při dokonalejším studiu vibrace  $\text{CH}_2$  nůžkové a rocking můžeme pozorovat náznak rozštěpení, mohlo by se tedy jednat o orthorhombické uspořádání některého z řetězců.

Fázový přechod této sloučeniny zjištěný DSC měřením při teplotě  $51\text{ }^\circ\text{C}$  byl v IR měření zaznamenán již při teplotě  $45\text{ }^\circ\text{C}$ . Teplotní závislost vybraných částí IR spektra při různých teplotách jsou zobrazeny na Obr. 20. Vibrační pás  $\text{C}=\text{O}$  skupiny esterových struktur je pozorován jako dublet při  $1728$  a  $1746\text{ cm}^{-1}$ , dosažením teploty fázového přechodu je viditelný jeden pás se širokým přechodem. Vibrace  $\text{C}=\text{O}$  skupiny amidové struktury je na IR spektru při pokojové teplotě zaznamenána při  $1667\text{ cm}^{-1}$ , dosažením teploty přechodu se stává nepozorovatelným. Na rozdíl od velmi podobné sloučeniny 12GV12, lze v molekule 12GM12 detekovat vibraci dvojně vazby při vlnočtu  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Pozice valenční vibrace NH skupiny pozorovaná při  $3326\text{ cm}^{-1}$  je charakteristická pro NH skupinu asociovanou s vodíkovými můstky, které jsou pravděpodobně intermolekulární, tvořené mezi NH a  $\text{C}=\text{O}$  skupinou, s teplotou přechodu pak pás zaniká. Mohlo by se jednat o interakce zobrazené na Obr. 35.



**Obr. 35** Intermolekulární interakce lipidových řetězců, které by se mohly vyskytovat u sloučeniny 12GM12.

### 6.3. 12GV12

Sloučenina 12GV12, která se liší od předchozí 12GM12 přítomností dvou hydroxylových skupin místo dvojné vazby obsažené v molekule 12GM12, je za pokojové teploty ve vysoce uspořádaném stavu, o čemž vypovídá pozice  $\text{CH}_2$  symetrické valenční vibrace při  $2849 \text{ cm}^{-1}$ , tzn. že je přítomen velký počet trans konformerů. Se zvyšující teplotou narůstá počet gauche konformerů, dosažením teploty fázového přechodu pak nastává posun až k  $2853 \text{ cm}^{-1}$ , kdy dochází k tání lipidových řetězců. Na základě  $\text{CH}_2$  scissoring a rocking vibrace můžeme usoudit o jaký typ uspořádání se jedná. Z IR spektra zobrazeného na Obr. 22 můžeme vypozorovat, že není přítomen dublet ani na jedné z těchto vibrací, mohlo by se pravděpodobně jednat o triklinické uspořádání lipidových řetězců, pro které je charakteristický vyšší podíl trans konformerů za pokojové teploty, na rozdíl od hexagonálního uspořádání, pro které je typický vyšší počet gauche konformerů při nižších teplotách.

Fázový přechod této sloučeniny byl zjištěn jednak DSC a IR měřením. Na DSC křivce je zaznamenán při teplotě  $66,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a IR měřením při  $57 \text{ }^\circ\text{C}$ . Porovnáním termogramu s výsledky strukturně blízké sloučeniny 12GM12 lze pozorovat u této sloučeniny posun teploty tání o  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vyšší teplota tání může být způsobena přítomností dvou hydroxylových skupin, které se podílejí na tvorbě pevných intermolekulárních vodíkových vazeb.

Při dokonalejším studiu IR spektra 12GV12 lze na základě vibrací určitých funkčních skupin odhadnout přítomnost vodíkových můstků, které jsou tvořeny na polárních hlavách ceramidových sloučenin. Jedná se o deformační vibraci NH skupiny  $\delta(\text{NH})$  při  $1538 \text{ cm}^{-1}$  u které je patrné rozštěpení, charakteristické pro existenci intermolekulárních H-můstků na NH skupinách. O tom vypovídá také pozice valenční vibrace NH skupiny při  $3222 \text{ cm}^{-1}$ . Dosažením teploty fázového přechodu pak tento vibrační pás vymizí což vypovídá o oslabení těchto vodíkových vazeb.

Přítomnost diesteru v molekule je vyjádřena dubletem vibračního pásu C-O vazby esterové struktury při  $1213$  a  $1235 \text{ cm}^{-1}$ , teplotou přechodu dublet vymizí a zůstává jednotlivý pás se širokým přechodem (Obr. 24). Vibraci C=O skupiny amidové struktury můžeme pozorovat při  $1667 \text{ cm}^{-1}$ , zvýšením teploty na teplotu fázového přechodu, dochází k poklesu frekvence této vibrace, což je



nového vibračního pásu při  $1222\text{ cm}^{-1}$ . Přítomnost dvojné vazby v molekule 12F12 je na spektru zaznamenána vibrací při  $1680\text{ cm}^{-1}$ , při teplotě  $40\text{ °C}$  již není pozorovatelná. Porovnáním se spektrem strukturně blízké sloučeniny 12J12 není vibrace karbonylu esterové struktury pozorovaná jako dublet. Pozice tohoto vibračního pásu je při  $1704\text{ cm}^{-1}$ . Při nejvyšším vlnočtu  $3082\text{ cm}^{-1}$  je zobrazena valenční vibrace přiřazená methinové skupině  $=\text{CH}-$ , která tvoří dvojnou vazbu, teplotou fázového přechodu vymizí.

### 6.5. 12J12

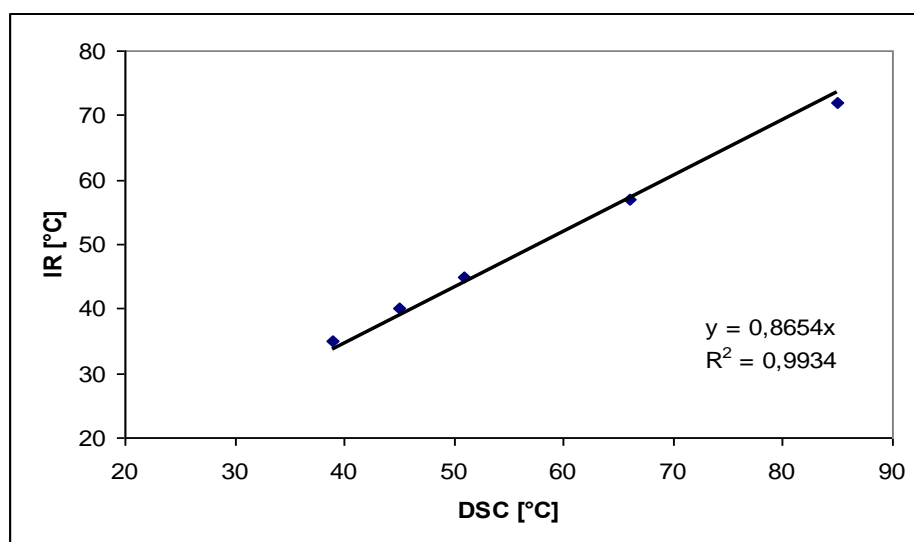
Další měřená sloučenina 12J12 má určitou strukturní podobnost s 12F12, chemicky se jedná o didodecylester kyseliny jantarové. Podle pozice metylenové valenční vibrace při  $2849\text{ cm}^{-1}$ , můžeme usoudit, že se jedná o vysoce uspořádanou strukturu s vysokým počtem trans konformerů, zvyšováním teploty až k teplotě tání dochází k posunu k  $2853\text{ cm}^{-1}$  s vysokým počtem gauche konformerů. Na základě informací zjištěných z IR spektra zejména vibrací  $\text{CH}_2$  scissoring a rocking, by se mohlo jednat pravděpodobně o triklinické uspořádání lipidových řetězců.

Fázový přechod této sloučeniny byl zaznamenán při teplotě  $39\text{ °C}$  DSC měřením a při  $35\text{ °C}$  IR měřením. Absence dvojné vazby způsobí snížení teploty tání o  $6\text{ °C}$  v porovnání s termogramem sloučeniny 12F12, což by mohlo souviset i s jistými rozdíly na IR spektrech, jedná se o nepřítomnost vibračních pásů dvojné vazby methinové skupiny  $=\text{CH}-$  a vazby  $\text{C}=\text{C}$ . Teplotní závislost vybrané části spektra je zobrazeno na Obr. 32. Fázovým přechodem dochází k zániku dubletu vibračního pásu přiřazeného  $\text{C}=\text{O}$  skupině diesteru při  $1722$  a  $1736\text{ cm}^{-1}$ . Náznak štěpení je také u vibračního pásu  $\text{C}-\text{O}$  vazby diesteru, který taktéž fázovým přechodem zaniká.



## 6.6. Korelace mezi metodami DSC a IR spektroskopii

Obr. 37 zobrazuje korelaci mezi použitými metodami DSC a ATR – FTIR spektroskopie. Je zřejmé že rozdíl ve stanovených teplotách fázových přechodů je poměrně značný. Chyba je pravděpodobně dána nedostatečnou výhřevností ATR krystalu. Na druhou stranu, z grafu je jasná lineární závislost dle rovnice  $y=0,8654x$  s regresním koeficientem  $R = 0,9934$ , kde  $x$ =teplota fázového přechodu získaná DSC měřením a  $y$ =teplota v IR měření. Se stoupající stanovovanou teplotou stoupá rovněž chyba měření. Této závislosti lze tedy využít pro další měření.



Obr. 37 Lineární regrese závislosti korelace mezi metodami DSC a IR spektroskopie. Rovnice lineární regrese je  $y=0,8654x$  s regresním koeficientem  $R^2=0,9934$ . Osa x vyjadřuje teploty fázového přechodu viděné v DSC, osa y v IR.

## 7. ZÁVĚR

Použitím kombinací dvou experimentálních metod bylo v této práci sledováno termotropní fázové chování pěti syntetických sloučenin typu ceramidů jako potencionálních permeačních urychlovačů kožní absorpce. Na základě DSC měření byly zjištěny teploty fázových přechodů jednotlivých látek a doplněním IR spektroskopií bylo možno usoudit o jaké změny se během fázových přechodů v molekulách jedná. Podle informací získaných IR měření můžeme struktury všech pěti sloučenin označit za vysoce uspořádané „zig zag“ struktury s vysokým podílem trans konformerů a uspořádáním lipidových řetězců nejčastěji do triklinické krystalové mřížky. Postupným zvyšováním teploty až k teplotě fázového přechodu se zvyšoval podíl gauche konformerů a lipidové řetězce se vyznačovaly větší pohyblivostí. Se zvyšující se teplotou došlo na polární hlavě k zániku vodíkovým můstkem, které jsou tvořeny mezi jednotlivými sousedními řetězci nebo uvnitř molekuly.

Byla provedena korelace mezi výsledky získanými DSC a IR spektroskopií. Teploty fázových přechodů jednotlivých sloučenin zjištěné DSC měření se neztotožňovaly s výsledky IR měření z důvodu nedostatečné funkce termostatu. Fázové přechody jednotlivých sloučenin získané IR měření nastaly při nižších teplotách než DSC měření. Nicméně existuje jasná lineární závislost mezi oběma měřicími metodami, která umožňuje korelaci výsledků.

Tyto látky, které jsou strukturně velmi podobné kožním ceramidům SC a jsou teprve ve stadiu výzkumu, by bylo možno použít pro urychlení kožní permeace právě interakcí s lipidovou matrix SC.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

<b>ATR-IR</b> spektroskopie	Metoda zeslabené totální reflexe (Attenuated Total Reflectance)
<b>DSC</b> kalorimetrie	Diferenciální skenování kalorimetrie
<b>ER</b>	Urychlovací poměr (Enhancement Ratio)
<b>IR</b> spektroskopie	Infračervená spektroskopie
<b>SC</b>	Stratum corneum
<b>12F12</b>	Didodecylester kyseliny fumarové
<b>12GM12</b>	N-(Dodecyloxykarbonylmethyl) dodecylester kyseliny maleinové
<b>12GV12</b>	N-(Dodecyloxykarbonylmethyl) dodecylester kyseliny 2,3-dihydroxyjantarové
<b>12J12</b>	Didodecylester kyseliny jantarové
<b>12S12</b>	N-dodekanoyl-L-serin dodecylester
<b>v</b>	Valenční vibrace
<b>v<sub>s</sub> (CH<sub>2</sub>)</b>	Valenční symetrická vibrace CH <sub>2</sub> skupin
<b>v<sub>as</sub> (CH<sub>2</sub>)</b>	Valenční asymetrická vibrace CH <sub>2</sub> skupin
<b>δ</b>	Deformační vibrace

## 9. LITERATURA

1. P. W. Wertz, B. van den Bergh: The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. University of Iowa City, USA. CPL 91 85-96, 1998.
2. K. Vávrová, A. Hrabálek: Lze překonat kožní bariéru?. Praktické lékárenství 1/2005.
3. <http://www.lf3.cuni.cz/ústavy/histologie/ppt/kůže-ho.ppt>. Staženo 12/2006.
4. K. Vávrová, J. Zbytovská, A. Hrabálek: Amphiphilic Transdermal Permeation Enhancers: Structure-Activity Relationships. Fakulty of Pharmacy, Charles University, Czech Republic, Current Medicinbal Chemistry, 12, 2273-2291, 2005.
5. <http://www.jlr.org/cgi/content/full/42/11/1759/F1>. Staženo 12/2006.
6. K. Vávrová, A. Hrabálek: Role ceramidů v kůži. Praktické lékárenství 2/2006
7. A.Hrabálek, P.Doležal, Z.Šklubalová, O.Farsa a A.Krebs: Akceleranty transdermální permeace, Farmaceutická Fakulta, Univerzita Karlova. Chem.Listy 93, 107-119, 1999.
8. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/integumentary/Integum.htm>. Staženo 11/2006.
9. K. Vávrová, A. Hrabálek, J. Zbytovská, L. Šámalová, K. Palát, T. Holas, J. Klimentová: Synthetic Ceramide Analogues as Skin Permeation Enhancers: Structure-Activity Relationships, Fakulty of Pharmacy, Charles University, Czech Republic. Bioorganic and Medicinbal Chemistry 11, 5381-5390, 2003.
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Differentialscanningcalorimetry>. Staženo 12/2006.
11. [http://www.fch.upol.cz/skripta/zfcm/ir/ir\\_teorie.htm](http://www.fch.upol.cz/skripta/zfcm/ir/ir_teorie.htm). Staženo 11/2006.

12. R. Karlíček a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Farmaceutická Fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2001.
13. K. Waisser, M. Pour: Organická chemie II., Farmaceutická Fakulta, Univerzita Karlova, Praha 2000.
14. <http://www.lms.vscht.cz/Zverze/Infrared.htm>. Staženo 01/2007.
15. <http://www.prfdec.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf>. Staženo 12/2006.
16. <http://www.mri.psu.edu/mcl/techniques/ftir>. Staženo 12/2006.
17. [http://www.vscht.cz/anl/lach1/7\\_IC.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf). Staženo 12/2006.
18. R. Mendelsohn, D. J. Moore: Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems, Rutgers University, Newark, USA. Chemistry and Physics of Lipids 96, 141-157, 1998.
19. D. M. Small: The Behaviour of Biological Lipids, Boston University, USA. Pure and Appl.Chem., Vol. 53 pp. 2095-2103, 1981.
20. M. Kobayashi, F. Kaneko: Vibrational Spectroscopic Study on Polymorphism and Order - Disorder Phase Transition In Oleic Acid, Osaka University, Osaka, Japan. J. Phys. Chem., 90, 6371 – 6378, 1986.
21. <http://www.rsc.org/delivery/ArticleLinking/DisplayArticleForFree>. Staženo 01/2007.
22. J. A. Bouwstra, P. Loan Honeywell – Nguyen, G. S. Gooris, M. Ponc: Structure of the Skin barrier and its modulation by vesicular formulations, Leden University, RA Leden, The Netherlands. Progress in Lipid Research 42 1 – 36, 2003.

23. V. Velková, M. Lafleur: Influence of the lipid composition on the organisation of lipid model mixtures: An Infrared Spectroscopy Investigation, Université de Montreal, Canada. *Chemistry and Physics of Lipids* 117 63-74, 2002.
24. S.G. Kazarian, K. L. A. Chan: Applications of ATR – FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples, Imperial College London, UK. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 858 – 867, 2006.
25. R. O. Potts and M. L. Francoeur: Lipid biophysics of water loss through the skin, Pfizer Central Research, Groton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, pp. 3871 – 3873, 1990.
26. J. Zbytovská, S. Raudenkolb, S. Wartewig, W. Hubner, W. Rettig, P. Pissis, A. Hrabálek, P. Doležal, R. H. H. Neubert: Phase behaviour of transkarbam 12, *Chemistry and Physics of Lipids* 129 97 – 109, 2004.
27. [http://www.upload.wikimedia.org/wikipedia/cs/8/81/Ethan\\_konformace.png](http://www.upload.wikimedia.org/wikipedia/cs/8/81/Ethan_konformace.png). Staženo 02/2007.
28. [http://www.fch.vutbr.cz/home/kucerik/DP\\_kovar.pdf](http://www.fch.vutbr.cz/home/kucerik/DP_kovar.pdf). Staženo 03/2007.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Dr. rer. nat. Jarmily Zbytovské. K práci jsem použila literaturu a prameny uvedené v seznamu.

V Hradci Králové dne 14.5.2007



























