



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ МЕДИЦИНСКИ
ФАКУЛТЕТ
КЛИНИЧКА МЕДИЦИНА

**МИЦЕЛАРНА СОЛУБИЛИЗАЦИЈА
ХОЛЕСТЕРОЛА ПОМОЋУ ОКСО
ДЕРИВАТА ЖУЧНИХ КИСЕЛИНА**

докторска дисертација

Ментор: Проф. Др Поша Михаљ

Кандидат: Зита Фаркаш

Нови Сад, 2014

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Zita Farkaš
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Mihalj Poša, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Micelarna solubilizacija holesterola pomoću okso derivata žučnih kiselina
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 6 / stranica 165/ slika 39/grafikona -/ tabela 102 / referenci 168/ priloga -)
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Fizička hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Holesterol; micle; okso derivati žučnih kiselina; solubilizacija; kritična micelarna koncentracija
UDK	544.6/.7:547.93
Čuva se: ČU	Biblioteka medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Doktorska disertacija razmatra solubilizaciju holesterola pomoću okso derivata žučnih kiselina, upoređuje okso derivate žučnih kiselina sa hidroksi-derivatima istih u solubilizaciji holesterola i ispituje uticaj okso derivata na vijabilnost ćelijske membrane. Takođe, ispituje pKa vrednost različitih okso-derivata žučnih kiselina sa ciljem da se odredi kiselinska konstanta ovih slabih organskih kiselina. Cilj određivanja pKa vrednosti jeste determinacija rastvorljivosti žučnih kiselina. Kada se primenjuju oralno u raznim farmaceutsko-tehnološkim formulacijama, one se primenjuju u obliku soli, koje su rastvorne u vodi. Međutim, u kiseloj sredini želuca može doći do taloženja žučne kiseline i do daljeg sprečavanja delovanja soli žučne kiseline kao solubilizatora određenih farmaceutski aktivnih supstanci. Doktorska disertacija ispituje i kritičnu micelarnu koncentraciju mešovityh micela natrijumovih soli 3 žučne kiseline (holne, deoksiholne i 7-oksodeoksiholne kiseline) i natrijum-dodecil-sulfata u različityh molskim udelima na temperaturama od 0 do 50°C pomoću spektrofluorifotometra pirenskom metodom.
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	

Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: Dr Jovan Popović, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu član: Dr Mirjana Bećarević, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu član: Dr Janoš Čanadi, redovni profesor, Prirodno matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu član: Dr Biljana Božin, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu član: Dr Ana Sebenji, docent, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

University of Novi Sad
ACIMSI
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Zita Farkaš
Mentor: MN	Dr Mihalj Poša, associate professor
Title: TI	Micellar solubilization of cholesterol by oxo-derivatives of bile acids
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters 6/ pages 165/ pictures 39/ graphs -/ tables 108/ references 168/ appendix -
Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Physical chemistry
Subject, Key words SKW	Cholesterol; micelles; oxo-derivatives of bile acids; solubilization; critical micellar concentration
UC	544.6/.7:547.93
Holding data: HD	Library of Medical faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	The PhD thesis discusses solubilization of cholesterol by using oxo derivatives of bile acids and compares it with the hydroxy-derivatives of the same in the solubilization of cholesterol, and examines the impact of the oxo derivatives to the viability of the cell membrane. Also, the pKa value of different tested oxo-derivatives of bile acids is determined. The aim of determining the pKa values is to determine the solubility of bile acids. When administered orally in various pharmaceutical-technological formulations, they are applied in the form of salts, that are soluble in water. However, the acidic medium of the stomach may cause precipitation of a bile salt and further prevent the action of bile acid salts as a solubilizers of specific pharmaceutically active substances. The PhD thesis examined the the critical micelle concentration of the mixed micelles of sodium salt of 3 bile acid (cholic, deoxycholic, and 7-oksodeoksiholne acid) and sodium dodecyl sulphate at various temperatures, the mole fractions ranging from 0 to 50 ° C using the method of spectrofluorimetry by pyrene as a probe molecule.
Accepted on Scientific Board on: AS	
Defended: DE	

<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>President: Dr Jovan Popović, full professor, Medical faculty Novi Sad</p> <p>member: Dr Mirjana Bećarević, associate professor, Medical faculty Novi Sad</p> <p>member: Dr Janoš Čanadi, full professor, Faculty of Natural Sciences Novi Sad</p> <p>member: Dr Biljana Božin, associate professor, Medical faculty Novi Sad</p> <p>member: Dr Ana Sebenji, assistant professor, Medical faculty Novi Sad</p>
------------------------------------	--

SADRŽAJ:

1 UVOD.....	1
2 CILJEVI RADA	2
3 TEORIJSKI PREGLED	3
3.1 Solubilizacija holesterola pomoću micela sa žučnim kiselinama	3
3.2 Struktura žučnih kiselina	6
3.3 Micele žučnih soli - Hidrofobnost i struktura žučnih kiselina.....	11
3.4 Samoasocijacija i struktura žučnih kiselina	17
3.5 Mešovite micelle	28
3.6 Regular Solution Theory – Termodinamika idealnih i realnih rastvora	33
3.7 Metode ispitivanja micelarnih sistema	41
3.7.1 Spektrofluorimetrija.....	41
3.7.2 Konduktometrijska titracija.....	48
3.7.3 Potenciometrijska titracija.....	49
4 EKSPERIMENTALNI DEO	53
4.1 Solubilizacija holesterola pomoću okso derivata ispitivanih žučnih kiselina i njihova osmotska otpornost	53
4.1.1 Cilj rada	53
4.1.2 Materijal	53
4.1.3 Metode.....	55
4.1.3.1 Određivanje solubilizacionog kapaciteta žučnih soli za holesterol	55
4.1.3.2 Određivanje ekvilibrijumske micelarne solubilizacije holesterola na osnovu krive solubilizacije	56
4.1.3.3 Određivanje osmotske otpornosti	56
4.1.3.4 Obrada podataka	57
4.1.4 Rezultati i diskusija	57
4.1.4.1 Micelarna solubilizacija holesterola	57
4.1.4.2 Osmotska otpornost	66
4.1.4.3 Kapacitet solubilizacije holesterola kod binarnih mešovutih micela žučnih soli i SDS-a.....	70
4.1.5 Zaključak	72
4.2 Određivanje pK_a vrednosti žučnih soli i micelarnih sistema	72
4.2.1 Materijal	72

4.2.2 Metode.....	72
4.2.2.1 Potenciometrijska titracija	72
4.2.2.2 Konduktometrijska merenja	73
4.2.2.3 Spektrofluorifotometrijska merenja.....	73
4.2.2.4 Obrada podataka	73
4.2.3 Rezultati i diskusija	74
4.2.4 Zaključak.....	78
4.3 Mešovite micelle natrijum holata i natrijum dodecilsulfata u 1:1 molskom odnosu na različitim temperaturama - eksperimentalna i teoretska razmatranja	79
4.3.1 Materijal	79
4.3.2 Metode.....	79
4.3.2.1 Spektrofluorifotometrijska merenja.....	79
4.3.2.2 Tenziometrijska merenja	79
4.3.2.3 Konduktometrijska merenja	79
4.3.2.4 Simulacije molekularne dinamike	80
4.3.3 Rezultati i diskusija	81
4.3.3.1 Eksperimentalni rezultati.....	81
4.3.3.2 Teoretski rezultati	86
4.3.4 Zaključak.....	92
4.4 Termodinamičko ispitivanje binarnih mešovutih micela natrijum-dodecil sulfata i natrijum holata u različitim molskim odnosima i uticaj temperature na molski udeo i interakcioni parametar	93
4.4.1 Materijal	93
4.4.2 Metode.....	93
4.4.2.1 Spektrofluorifotometrijska merenja.....	93
4.4.3 Rezultati i diskusija	93
4.4.4 Zaključak.....	113
4.5 Termodinamičko ispitivanje binarnih mešovutih micela natrijum-dodecil sulfata i natrijum deoksiholata u različitim molskim odnosima i uticaj temperature na molski udeo i interakcioni parametar	114
4.5.1 Materijal	114
4.5.2 Metode - Spektrofluorifotometrijska merenja.....	114
4.5.3 Rezultati i diskusija	114

4.5.4 Zaključak	134
4.6 Termodinamičko ispitivanje binarnih mešovutih micela natrijum-dodecil sulfata i natrijum 7-oksodeoksiholata u različitim molskim odnosima i uticaj temperature na molski udeo i interakcioni parametar.....	135
4.6.1 Materijal	135
4.6.2 Metode - Spektrofluorifotometrijska merenja.....	135
4.6.3 Rezultati i diskusija	135
4.6.4 Zaključak.....	145
5 ZAKLJUČAK.....	146
6 LITERATURA	148

1 UVOD

Žučne kiseline su amfifilni molekuli koji pored dobro poznatih fizioloških uloga kao što je micelarna solubilizacija lipida u toku varenja i regulacije biosinteze – homeostaze holesterola učestvuju i u velikom broju metabolitičkih puteva kao regulatori tj. u svojstvu modulatora: nuklearnih receptora (farnesoid X (FXR)); membranskih receptora (G-protein-kuplovanih receptora (GPCRs) kao što su TGR5 (poznati i kao GPBAR1, M-BAR i BG37)); jonskih kanala (Ca^{2+} -aktivirani K^+ kanali visoke provodljivosti (BK_{Ca})) itd., što u novije vreme daje sve veću primenu analoga žučnih kiselina kao terapeutika u metabolitičkim poremećajima (dijabetes tipa 2, gojaznost, hipertenzija itd.) (1-7). Stepem vezivanja žučnih kiselina za receptore, jonske kanale, kao i njihova efikasnost u solubilizaciji lipida (hidrofobnih lekova) značajno zavise od odnosa njihove hidrofobne i hidrofilne površina (8-11). Takođe, membranotoksičnost žučnih kiselina uglavnom je određen njihovom hidrofobnošću (11,12). Međutim okso derivati žučnih kiselina pokazuju smanjenu toksičnost od njihovih hidroksi analoga (11,13). Žučne kiseline sa okso grupama u steroidnom jezgru pokazuju i promotorno delovanje u transportu nekih lekova kroz lipofilne barijere u organizmu (npr. krvna moždana barijera) (14-21).

2 CILJEVI RADA

Cilj istraživanja je određivanje strukture okso derivata žučnih kiselina koja pokazuju ratsvaranje holesterola, međutim ne pokazuju membranotoksična svojstva, odnosno nalaženje odnosa žučne kiseline i natrijum dodecil sulfata (sodium dodecyl sulphate- SDS) koji najviše rastvaraju holesterol. Na osnovu kritičnih micelarnih koncentracija (CMC) okso derivata očekuje se da će 12-oksolitoholna kiselina pokazati najveću moć solubilizacije holesterola, a iz literature je poznato da ova žučna kiselina ne pokazuje membranotoksičnost. Takođe se očekuje da mešovite micide natrijum dodecil sulfata i natrijumovih soli okso derivata žučnih kiselina efikasnije rastvaraju holesterol od samih micelarnih rastvora soli žučnih kiselina.

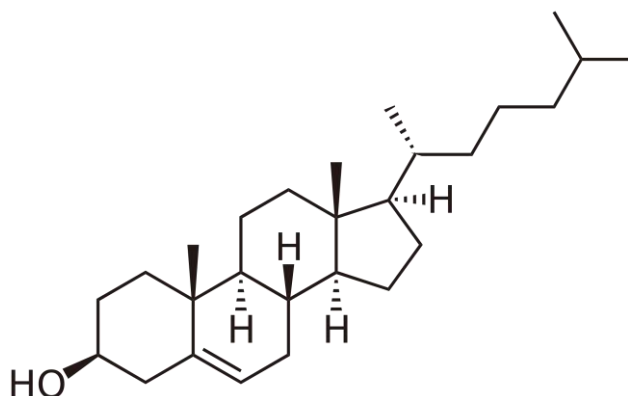
Ciljevi istraživanja su postavljeni na osnovu zadatih hipoteza:

1. Okso derivati žučnih kiselina imaju veću kritičnu micelarnu koncentraciju od hidroksi derivata;
2. Binarne smeše natrijum dodecilsulfata i natrijumove soli okso derivata žučnih kiselina pokazuju manje vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija od čistih soli okso derivata;
3. Okso derivati žučnih kiselina pokazuju manju moć micelarne solubilizacije holesterola u odnosu na ispitivane soli hidroksi derivata žučnih kiselina;
4. 12-oksolitoholna kiselina ima veću moć solubilizacije, a manju membranotoksičnost u odnosu na ostale okso derivate žučnih kiselina.

3 TEORIJSKI PREGLED

3.1 Solubilizacija holesterola pomoću micela sa žučnim kiselinama

Holesterol je hidrofoban molekul, koji poseduje ciklopentanoperhidro - fenantrensku strukturu (Slika 1) veoma sličnu žučnim kiselinama. Rastvorljivost holesterola u vodi je mala (0.095 mg/ml na 30 °C), a rastvara se dobro u organskim rastvaračima kao što su aceton, benzene, hloroform, etanol, etar, heksan, izopropil miristat i methanol.



Slika 1. Struktura holesterola

U Zapadnim zemljama, tri četvrtine žučnih kamenaca je sačinjeno od 80 do 98 težinskih % holesterola (22). Žučne kiseline fiziološki učestvuju u apsorpciji holesterola, tako što formiraju mešovite micelle sa fosfolipidima u žuči, te dovode do solubilizacije holesterola i drugih lipofilnih komponenti. Za holesterolski tip žučnog kamenca, konjugovani ursodeoksiholat, 7 β – epimer henodeoksiholata se pokazao kao ekvivalentna ili superiorna terapija u odnosu na konjugovani henodeoksiholat u oralnoj terapiji (23-28). Jedina indikacija za terapiju sa ursodeoksiholatom i njenim konjugatima jeste kada terapija sa tauroursodeoksiholatom (TUDC) nije kinetički povoljna kao što je to terapija sa TCDC micelama i inicijalna disolucija holesterola sa mešovitim TUDC: lecitin micelama nije bila signifikantna (29, 30). Eksperimenti koji određuju disoluciju holesterolskog žučnog kamenca, moraju uzeti u obzir osnovne principe termodinamike u interpretaciji eksperimentalnih rezultata (31). Takođe je dokazano, da surfaktanti koji imaju hidrofobni deo molekula hemijske strukture spojenih prstenova (ciklopentanoperhidrofenantrenska struktura i slični molekuli), kao što su natrijum holat, natrijum deoksiholat, kvilaja saponini, imaju veću moć

solubilizacije holesterola od surfaktanata sa linearnim hidrofobnim nizom, kao što su Tween 20 i Triton X-100. Mešavine surfaktanata koje su proučavane u radu Mitra-e i Dungan-a, pokazuju sinergistički efekat: formiraju micelle na nižim koncentracijama nego što su to micelle koje su sačinjene od čistih surfaktanata, i imale su veću moć solubilizacije holesterola (32). Holesterol se slabo solubilizuje pomoću žučnih soli. Potrebno je oko 30 do 100 anjona žučnih kiselina da bi se jedan molekul holesterola solubilizovao u rastvorima koji su mnogo iznad CMC. Ukoliko bi micela sadržavala jedan molekul holesterola, agregacioni broj bi trebao biti između 30 i 40. Po istraživanjima Carey-a u 0.15 M rastvoru NaCl agregacioni broj micela saturisanih holesterolom je 8 za natrijum-tauroholat na temperaturi od 20 °C i 36 °C. Ova vrednost je jedva veća od vrednosti natrijum-tauroholata bez holesterola. Ovi rezultati verovatno znače da postoje dve vrste micela: micelle sa i micelle bez holesterola. Sem ukoliko je ovo termodinamički nestabilan sistem, postojanje dve vrste micela u rastvoru je malo verovatno, pošto to zahteva postavljanje pretpostavke da neke micelle žučnih anjona imaju specifičan afinitet prema holesterolu, dok druge micelle nemaju (33). Po istraživanjima Coreta-Gomes i sar. (34) holesterol se solubilizuje u micelama glikodeoksiholne kiseline, pokazujući efikasnu solubilizaciju sa kinetikom pseudo-prvog reda vremenske konstante od 3.6 h i srednjim brojem okupacije koji iznosi više od jedan pri potpunoj saturaciji micela holesterolom. Nasuprot visokoj vrednosti broja okupacije, profil solubilizacije pokazuje da je afinitet holesterola za micelle nepromenjen do tačke saturacije.

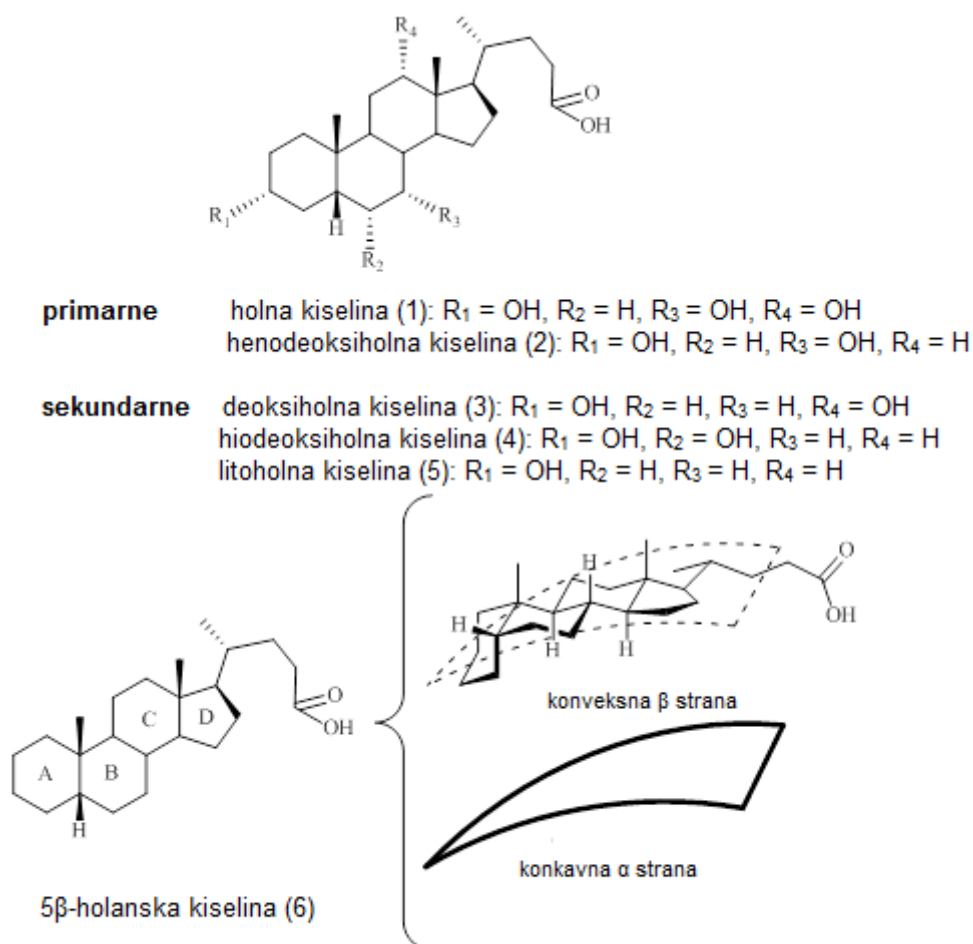
Solubilizacija, prema IUPAC-ovoj definiciji, predstavlja skraćenicu micelarne solubilizacije, izraza koji se upotrebljava u koloidnoj hemiji. Solubilizacija se dešava u sistemima koji se sastoje od solventa, asocijacionog koloida (koloid koji formira micelle), i minimum još jedne komponente, koja se zove solubilizat (komponenta koja podleže solubilizaciji). Solubilizacija je proces inkorporacije solubilizata u/na micelu. Razlikuje se od rastvaranja, zato što je rezultujuća tečnost koloidna disperzija koja uključuje asocijacioni koloid. Ova suspenzija se razlikuje od pravog rastvora po tome, što količina solubilizata u suspenziji može biti mnogo veća nego što je to rastvorljivost supstance u pravom rastvoru. Micelarna solubilizacija ima široku upotrebu u farmaceutskoj industriji za formulaciju farmaceutskih preparata sa farmakološki aktivnim supstancama koje se teško rastvaraju u odgovarajućem rastvaraču (35).

Vrednosti hidrofilno-lipofilnog balansa žučnih kiselina su iznad 18, pokazujući da su to amfifilni molekuli koji formiraju mešovite micelle sa hidrofobnim molekulima (36-39). Dok se neke žučne kiseline upotrebljavaju kao lekovi koji rastvaraju kamen u žuči holesterolskog tipa (39,40), druge pokazuju promotorni efekat na transport određenih lekova kroz razne biološke membrane (sluzokoža nosa, creva, epitel, itd.) (39-45). Žučne kiseline oštećuju ćelijske membrane tako što izvlače fosfolipide iz njih (41). U eksperimentima Bowe i sar (41) su pokazali da žučne kiseline sa većom vrednošću CMC oštećuju manje eritrocita. Poša i sar (46-49) i Roda i sar. (50) su pokazali da zamenom OH grupe žučne kiseline sa okso grupom dolazi do povećanja CMC vrednosti odgovarajućih žučnih kiselina, koje je poželjno sa aspekta sprečavanja oštećenja ćelijskih membrana. Pored ovih osobina, okso derivati pokazuju promotorni efekat na transport pojedinih lekova (51-53).

U literaturi membranotoksičnost žučnih kiselina se najčešće opisuje hemolitičkim potencijalom (eritroliza) (41, 44, 47), ali se može koristiti i manje poznat parametar, kao što je osmotska otpornost eritrocita (54). Osmotska otpornost eritrocita predstavlja sposobnost membrane eritrocita da smanji nestabilan fluks (neto fluks) molekula vode kroz membranu, koje se pojavljuje kada je ćelija u hipo- ili hiperosmolarnom rastvoru. Membrana eritrocita je otpornija na promenu osmolalnosti rastvora ukoliko ima pore manjih promera i manji broj pora, zato što to dovodi do smanjenja mogućnosti prolaza molekula vode (55).

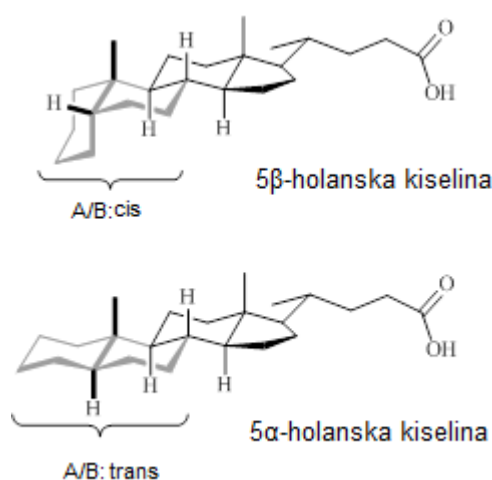
3.2 Struktura žučnih kiselina

Žučne kiseline su jedinjenja sa skeletom ciklopentanoperhidrofenantrena tj steroidna jedinjenja sa uglavnom 24 atoma ugljenika. Žučne kiseline enzimski proizvedene u jetri čoveka i drugih sisara su primarne žučne kiseline (holna (1) i henodeoksiholna kiselina (2)) iz kojih se u crevnoj flori kolona bakterijskom transformacijom dobijaju sekundarne žučne kiseline (deoksiholna kiselina (3), hiodeoksiholna kiselina (4) i litholna kiselina (5)). Kako primarne tako i sekundarne žučne kiseline su hidroksi derivati 5β -holanske kiseline (6) (Slika. 2) (38, 39,56-58).



Slika 2. Struktura žučnih kiselina

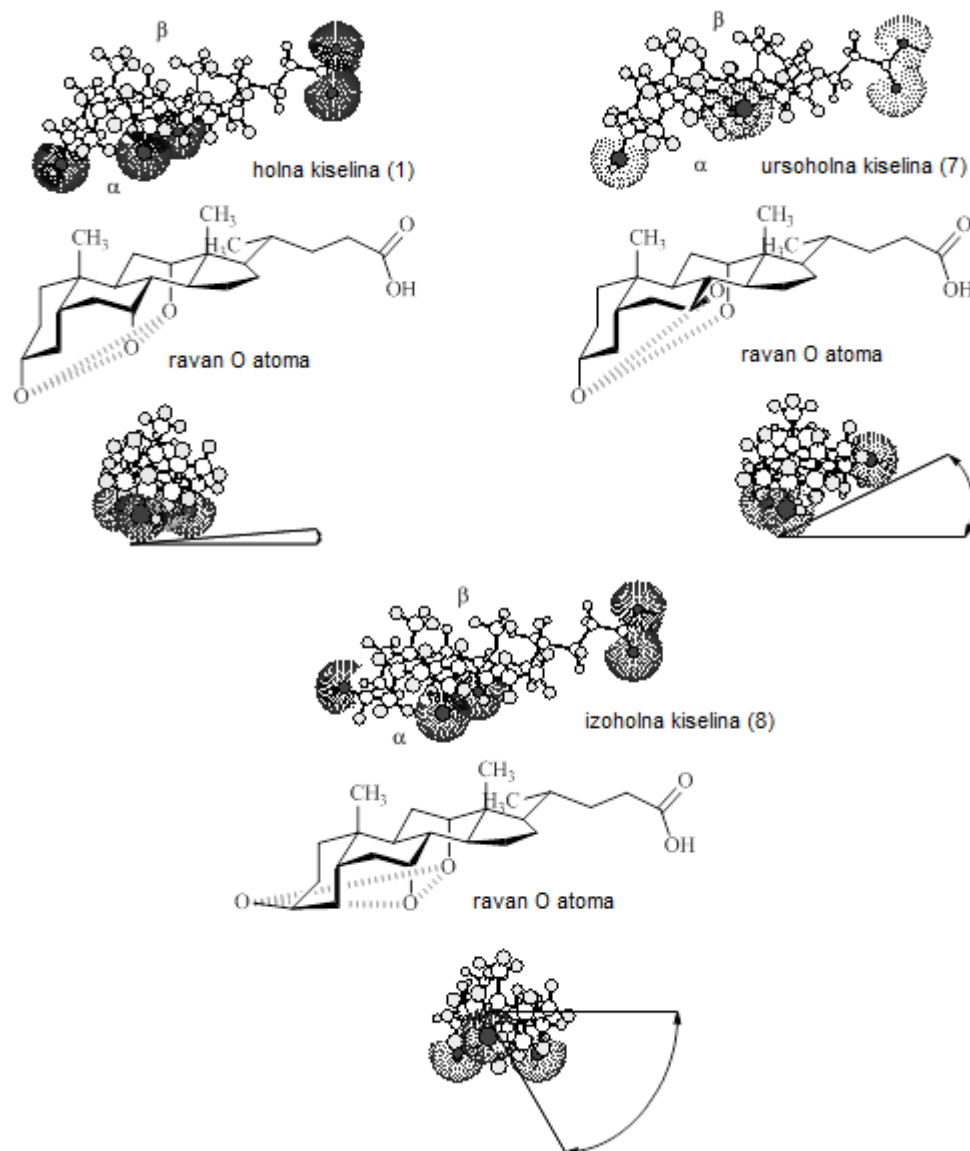
Kod nekih guštera nađene su i žučne kiseline koji su OH derivati 5α -holanske kiseline (*allo*), diastereoizomera 5β -holanske kiseline (39,56). Ove dve žučne kiseline razlikuju se u geometriji međusobnog povezivanja A i B prstena steroidnog skeleta. Kod 5β -holanske kiseline A i B prstenovi su *cis* povezani, dok kod *allo* diastereoizomera *trans* (Slika 3). Osobine žučnih kiselina velikoj meri su određeni geometrijom molekula 5β -holanske kiseline. Na steroidnom skeletu molekula 5β -holanske kiseline može se razlikovati konveksna β i konkavna α površina (8). Konveksna površina steroidnog skeleta žučnih kiselina veća je od konkavne površine istog, što može da bude od značaja pri ispitivanju uticaja orijentacije hidroksilnih i okso grupa na hidrofobnost molekula (8,59,60).



Slika 3. Diastereoizomeri holanske kiseline

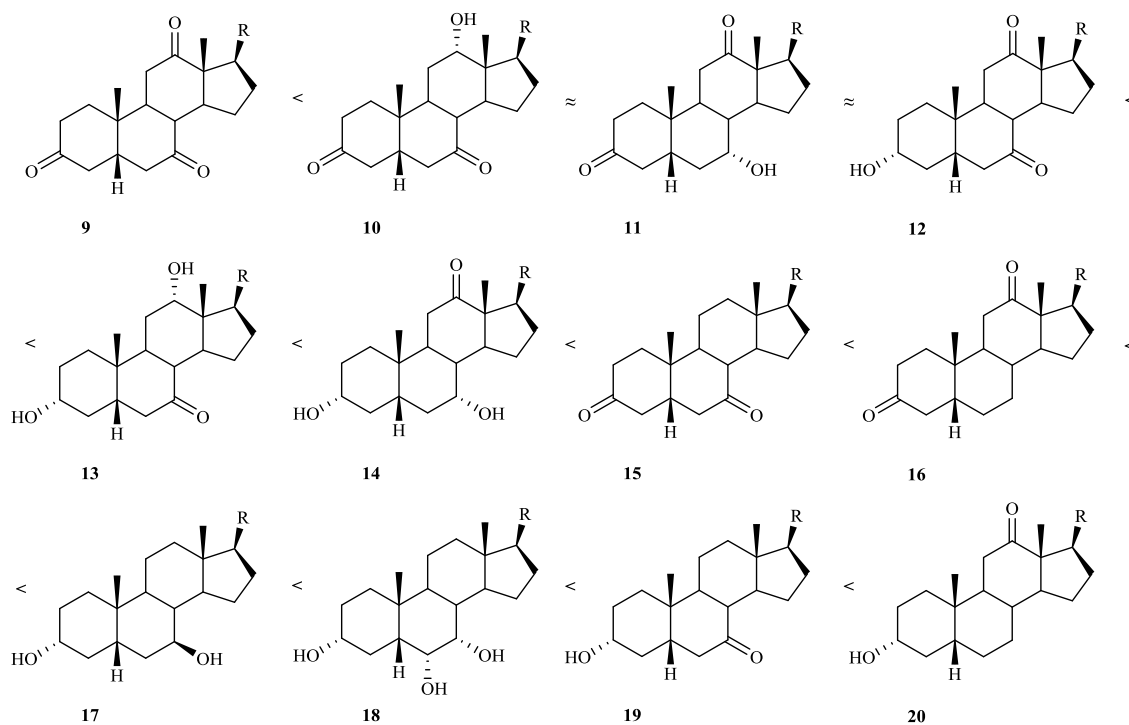
Hidroksilne grupe žučnih kiselina najčešće su orijentisane prema α strani steroidnog skeleta, dok angularne aksijalne metil grupe sa C_{10} i C_{13} imaju β orijentaciju. Istraživanja rendgenskom difrakcijom (61) dokazala su da se karboksilna grupa usled konformacione fleksibilnosti bočnog niza (sa C_{17} ugljenika) takođe može nalaziti sa α strane steroidnog sistema prstenova. Stoga konkavna površina (α) steroidnog skeleta žučnih kiselina je polarna – hidrofilna dok je konveksna površina (β) nepolarna – hidrofobna. Istovremeno prisustvo hidrofobne i hidrofilne regije u molekulu žučnih kiselina označava se kao amfifilnost. Pošto je karboksilna grupa pri fiziološkim uslovima jonizovana, žučne kiseline u biohemijskim sistemima spadaju u jonske amfifile (1,7,12,62). Holna kiselina (1) sa dve α aksijalne (*a*) OH grupe (sa C_7 i C_{12} ugljenika) i sa jednom α ekvatorijalnom (*e*) OH grupom (sa C_3 ugljenika) spada u

posebnu grupu amfifilnih jedinjenja, u grupu biplanarnih amfifila (8,11). Naime, kod ovog molekula u prostoru atomi kiseonika iz α OH grupa se nalaze u istoj ravni, u takozvanoj polarnoj ravni (hidrofilna ravan sa konkavne strane steroidnog jezgra) (Slika 4) (11). Stoga između žučnih kiselina kod holne kiseline jeste najpotpunije međusobno razdvajanje hidrofobne (β strana steroidnog skeleta) i hidrofilne površine (α strana steroidnog skeleta), što se označava kao biplanarnost. Ursoholna kiselina (7) koja je C_7 epimer holne kiseline, što znači da ova žučna kiselina na C_7 ugljeniku steroidnog skeleta ima β ekvatorijalnu (e) OH grupu. Ova promena u stereo orijentaciji C_7 OH grupe ursoholne kiseline (7) u odnosu na orijentaciju iste OH grupe holne kiseline (1), rezultuje pomeranje polarne ravni ka konveksnoj strani steroidnog sistema prstenova, što za posledicu ima promenu odnosa hidrofobne i hidrofilne površine molekula, to jest smanjuje se biplanarnost ursoholne kiseline (Slika 4). Kod C_3 epimera holne kiseline (1), to jest kod izoholne kiseline (8) C_3 OH grupa jeste β aksijalne (a) orijentacije. Što znači da kod ove žučne kiseline hipotetična ravan polarosti (koju formiraju kiseonici iz grupa: C_7 $\alpha(a)$ -OH, C_{12} $\alpha(a)$ -OH i C_3 $\beta(a)$ -OH) seče steroidni skelet, stoga kod izoholne kiseline (8) ne postoji prava biplanarnost. Kod dihidroksi žučnih kiselina kao što su npr. henodeoksiholna i deoksiholna kiselina ne može se govoriti o pravoj biplanarnosti, već se u literaturi najčešće koristi termin: molekuli sa hidrofilnom ivicom (edge) (63).



Slika 4. Polarnost holne, ursolne i izolne kiseline

Okso derivati žučnih kiselina kod čoveka se mogu naći u tragovima u fecesu i rezultati su mikrobiološke transformacije primarnih i sekundarnih žučnih kiselina u crevnoj flori. Kod nekih guštera, pernatih životinja, majmuna, pacova i morskog praseta mogu se naći i u žuči u oko 1% prema ostalim žučnim kiselinama. Kako okso derivati u prirodi nisu zastupljeni dobijaju se sintetički u laboratoriji odgovarajućim postupcima (56,58).



- (9)- triokso-5 β -holanska kiselina
 (10)-3,7-diokso-12 α -hidroksi-5 β -holanska kiselina
 (11)-3,12-diokso-7 α -hidroksi-5 β -holanska kiselina
 (12)-7,12-diokso-3 α -hidroksi-5 β -holanska kiselina
 (13)- 3 α ,12 α -dihidroksi-7-okso-5 β -holanska kiselina
 (14)- 3 α ,7 α -dihidroksi-12-okso-5 β -holanska kiselina
 (15)-3,7-diokso-5 β -holanska kiselina
 (16)- 3,12-diokso-5 β -holanska kiselina
 (17)-ursodeoksiholna kiselina
 (18)-hiholna kiselina
 (19)-7-oksolitholna kiselina
 (20)-12-okso-3 α -hidroksi-5 β -holanska kiselina

Slika 5. Struktura okso derivata 5 β -holanske kiseline poredane prema hidrofobnosti

3.3 Micele žučnih soli - Hidrofobnost i struktura žučnih kiselina

Pri rastvaranju amfifilnog objekta u vodi, uopšteno dolazi do raskidanja vodoničnih veza između molekula vode, pri čemu se formira hidrataciona ljuska (hidratacioni sloj) oko rastvorene supstance. Ukoliko se posmatra sistem (rastvor amfifila) koji je podeljen na dva podsistema: hidrofobni deo (**a**) i hidrofilni deo (**b**), onda se termodinamičke funkcije mogu posebno razmatrati za svaki podsistem. Za oba podsistema važi da pri izgradnji solvacionog kaveza (oko amfifilnog objekta), između molekula vode se približno formira isti broj vodoničnih veza koliko je i postojalo između posmatranih molekula vode u zapremini rastvora (bulk water) tj. u stanju pre rastvaranja amfifilnog objekta. Stoga promena entalpije za svaki podsistem pri formiranju hidratacione ljuske približno jeste nula: $\Delta H(\mathbf{a}) \approx \Delta H(\mathbf{b}) \approx 0$ (64-67). Takođe za oba podsistema važi da pri formiranju hidratacionog sloja molekulima vode opada entropija (translatorna i rotaciona) (68), to jest: $\Delta S(\mathbf{a}) \approx \Delta S(\mathbf{b}) < 0$. Međutim, molekuli vode sa hidrofilne strane (**b**) amfifilnog molekula formiraju dodatne vodonične veze, stoga za hidrofilni podsistem (**b**) postoji dodatna negativna entalpija ($\Delta H_e < 0$), koja se kao toplota raspoređuje u okolini (unutrašnjosti rastvora) dajući time pozitivnu promenu entropiji (okoline). Prema tome, za hidrofilni podsistem promena slobodne entalpije jeste: $\Delta G(\mathbf{b}) < 0$, te na osnovu kojeg molekuli vode sa hidrofilne strane (**b**) amfifila mogu se označavati kao stabilizovani molekuli vode (SMW), dok molekule sa hidrofobne strane (**a**) kao nestabilizovani molekuli vode (NSWM) (11,69,70).

Odnos hidrofilne i hidrofobne površine amfifilnog molekula određuje ukupnu promenu Gibbs-ove energije formiranja hidratacionog kaveza (ΔG), i kako je obično hidrofobna površina amfifilnog molekula veća, to je $\Delta G > 0$. Što je veća količina amfifila u rastvoru, to sve više molekula vode učestvuje u izgradnji hidratacionog sloja, pa je ukupna promena entropije sve negativnija. Ovo rezultuje promenu u sistemu (rastvoru) koje dovodi do prelaska nestabilizovanih molekula vode (NSMW) iz hidratacionog kaveza amfifila u unutrašnjost rastvora, pri čemu dolazi do rasta entropije sistema. Amfifilni molekuli (joni) se orijentišu tako da njene (formalno) desolvatizovane hidrofobne strane budu u što manjoj meri izložene molekulima vode. Ovo se realizuje ili u vidu samoasocijacije amfifila preko njihovih hidrofobnih površina (smanjenje entropije usled samoasocijacije amfifila je manja od povećanje entropije usled

oslobađanja NSMW iz hidratacione sfere) ili vezivanjem amfifila za hidrofobne površine sistema: hidrofobna stacionarna faza, proteini, raspodela u organski rastvarač itd. (69,71).

Uopšteno hidrofobnost neke čestice (molekula i jona) se može izraziti preko logaritma particionog koeficijenta ($\log P$) između 1-oktanola i vode (P jeste odnos ravnotežne koncentracije čestice iste elektronske strukture u 1-oktanolu i ravnotežne koncentracije istog u vodi) (9,72). Ukoliko je $\log P > 1$ onda je posmatrana čestica hidrofobna (lipofilna), dok ukoliko je $\log P < 1$ onda posmatrana čestica jeste hidrofilna (9). Pored particionog koeficijenta hidrofobnost neke čestice se može izraziti i preko hromatografskih parametara kako normalne tako i reverzne fazne (72-81). Međutim kod hromatografskih parametara se obično dobija relativni odnos hidrofobnosti unutar kongeneričnih grupa čestice (74). Uopšteno između hidrofobnosti izražene preko $\log P$ vrednosti i hidrofobnosti izražene preko hromatografskih parametara postoji dobra korelacija (9,10,73,74).

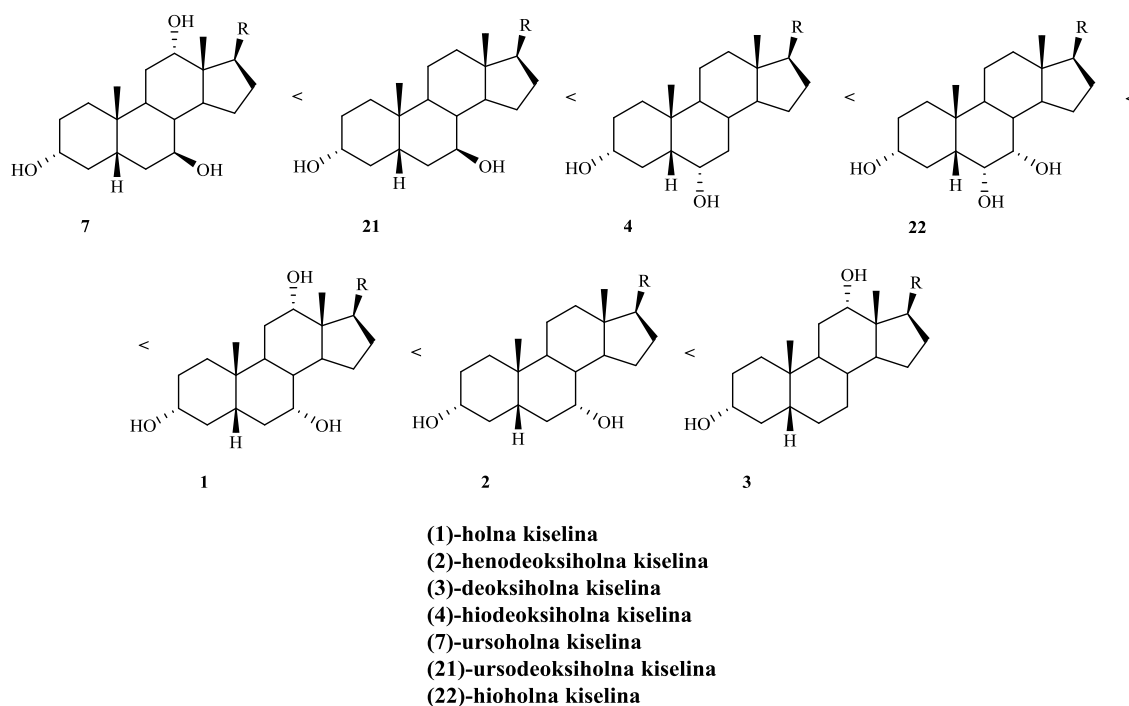
Pri ispitivanju hidrofobnosti žučnih kiselina pomoću hromatografskih tehnika najčešće se primenjuje reverzna fazna tečna hromatografija visoke rezolucije (HPLC) i reverzna fazna tankoslojna hromatografija visoke rezolucije (HPTLC).

Kod obe hromatografske metode (RPHPLC i RPTLC), pri adsorpciji žučnih kiselina na hidrofobnu stacionarnu fazu molekuli rastvarača iz solvatacionog sloja koji nisu stabilizovani vodoničnim vezama (NSWM) odlaze u hidrofilnu mobilnu fazu, dajući pozitivni entropijski dobitnos. Formalno desolvatizovane hidrofobne površine žučnih kiselina (molekula ili jona) se vezuju za površinu adsorbensa hidrofobnim interakcijama (londonove disperzione sile, idipol – indukovani dipol interakcije). Ovo predstavlja negativni entalpijski dobitnos procesu adsorpcije. Ova negativna entalpija tj. toplota rasipa se u rastvoru mobilne faze (okolina), dajući time pozitivnu promenu entropiji okoline. Tako da je ukupna promena entropije pozitivna, to jest Gibbs-ova energija se smanjuje. Smanjenje slobodne entalpije adsorpcije (ΔadG°) žučnih kiselina (molekula ili jona) na hidrofobnu stacionarnu fazu utoliko je veća ukoliko u solvatacionom sloju steroidnog skeleta postoji veći broj NSWM. Pošto je tada najveće i povećanje ukupne entropije. Pri vezivanju žučnih kiselina (molekula ili jona) za hidrofobnu stacionarnu fazu njihovi steroidni skeleti se orijentišu na taj način da

formalno desolvatizovane površine budu u što manjem stepenu izložene molekulima rastvarača iz hidrofilne mobilne faze (metanol i voda) (70, 77, 82, 83).

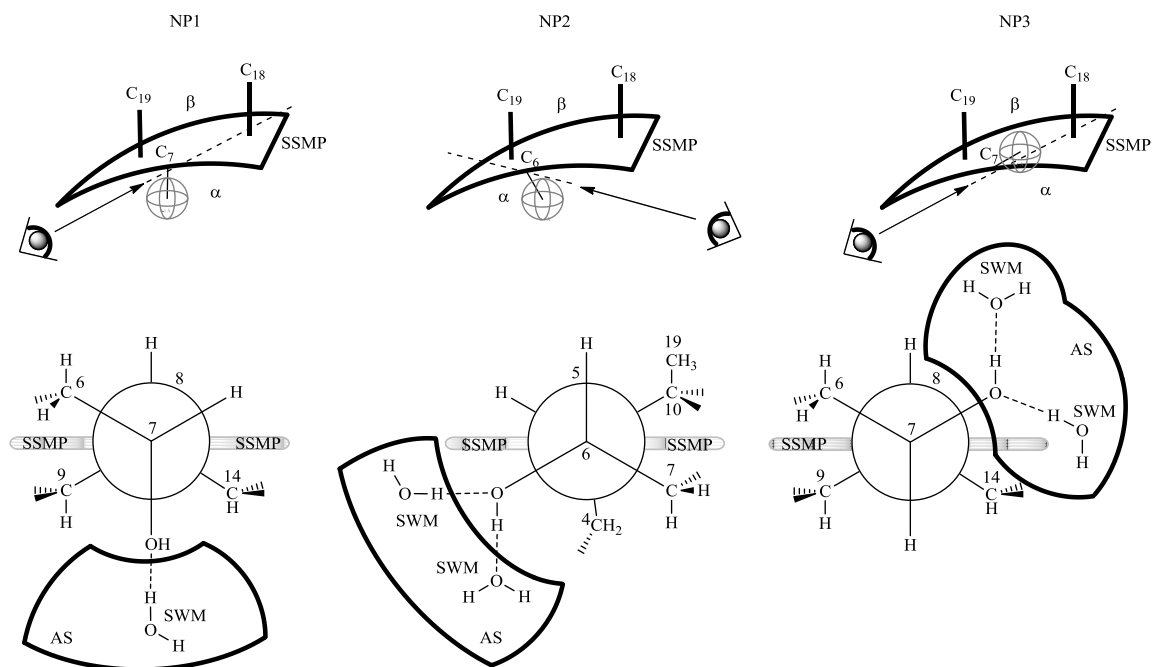
Kako su žučne kiseline biplanarna jedinjenja, za hidrofobnu ravan (stacionarnu fazu) se vezuje ona strana steroidnog skeleta koja je u najvećoj meri hidrofobna. Obično kod prirodnih žučnih kiselina i njihovih oxo derivata to je konveksna β strana steroidnog skeleta (kao izuzetak je enantiomer holne kiseline sa β konfiguracijom sva tri OH grupa, gde je α strana hidrofobnija od β strane steroidnog skeleta) (8-10,70,77, 82).

Što je β strana steroidnog skeleta hidrofobnija to je $\Delta_{ad}G^\circ$ negativniji, odnosno to je vrednost $\ln k$ veći (pozitivniji). Kod hidroksi derivata žučnih kiselina (koje su i najviše proučavani u literaturi) hidrofobnost na osnovu retencionih vremena u reverzno faznoj hromatografiji raste u sledećem nizu (Slika 6, nekonjugovane žučne kiseline: $R=CH(CH_3)CH_2CH_2COOH$): ursoholna kiselina (7) (konfiguracija OH grupa: $3\alpha,7\beta,12\alpha$) < ursodeoksiholna kiselina (21) ($3\alpha,7\beta$) < hiodeoksiholna kiselina (4) ($3\alpha,6\alpha$) < hiolna kiselina (22) ($3\alpha,6\alpha,7\alpha$) < holna kiselina (1) ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$) < henodeoksiholna kiselina (2) ($3\alpha,7\alpha$) < deoksiholna kiselina (3) ($3\alpha,12\alpha$). Gornji redosled je identičan i kod nejonizovanih i kod jonizovanih žučnih kiselina odnosno kod gliko- ($R=CH(CH_3)CH_2CH_2CONHCH_2COOH$) odnosno i kod tauro-konjugovanih ($R=CH(CH_3)CH_2CH_2CONHCH_2CH_2SO_3H$) žučnih kiselina. Ovo ukazuje na značaj steroidnog jezgra pri adsorbiciji žučnih kiselina na hidrofobnoj stacionarnoj fazi (8-10,70,73,74,77,79,80, 82).



Slika 6. Hidrofbnost hidroksi derivata 5 β -holanske kiseline

Iz gornjeg redosleda hidrofbnosti žučnih kiselina se može zaključiti da je β strana steroidnog skeleta najmanje hidrofbna kod žučnih kiselina koje u odnosu prema α aksijalnoj (α) OH grupi imaju OH grupe pomernene prema srednjoj ravni steroidnog skeleta (SSMP). (Šema 1). Naime, kao što se vidi iz Newman-ove projekcije formule (NP1, Šema 1) kod steroidnog jezgra sa α (α)-OH grupom molekuli vode iz solvacione ljuske mogu biti stabilizovani (dodatnim) vodoničnim vezama samo sa α strane steroidnog skeleta. Ukoliko steroidno jezgro ima α ekvatorijalnu (α) OH grupu (OH grupa sa C6 ugljenika hiholne (22) i hiodeoksiholne kiseline (4)) onda je stabilizovana oblast hidratacionog sloja (AS) pomena ka srednjoj ravni steroidnog skeleta (SSMP), zapravo AS obuhvata α stranu steroidnog skeleta i bočnu (lateralnu) stranu molekula (NP2, Šema 1). Dok kod steroidnog sistema prstenova sa β ekvatorijalnom (β) OH grupom oblast stabilizacije (AS) molekula vode iz hidratacionog sloja pomena je u potpunosti na β stranu molekula (NP3, Šema 1).



Šema 1. SSMP = glavna ravan steroidnog skeleta, SWM = stabilizovani molekuli vode, NSW = nestabilizovani molekuli vode, AS = prostor stabilizovanih molekula vode

Prema tome, hidrofobnost β strana steroidnih jezgara ursolne (7) i ursodeoksiholne kiseline (21) jesu identična, to što je ursodeoksiholna kiselina (21) hidrofobnija od ursolne kiseline (7) verovatno je posledica odsustva C12 $\alpha(a)$ -OH grupe. Stoga između adsorbovanih molekula ursodeoksiholne kiseline (21) mogu nastati dodatne hidrofobne interakcije preko L12 bočnih strana. (slično kao kod henodeoksiholne kiseline (2)). Veća hidrofobnost na osnovu RPHPLC retencionih koeficijenata pripada hiodeoksiholnoj (4) i hiolnoj kiselini (22) pošto u odnosu prema ursolnoj (7) i ursodeoksiholnoj kiselini (21) imaju hidrofobnije β strane steroidnog jezgra. Naime, ove žučne kiseline imaju $\alpha(e)$ -OH i $\alpha(a)$ -OH grupe. Na prvi pogled neuobičajno je da hiolna kiselina (22) sa tri OH grupe bude hidrofobnija od dihidroksi derivata hiodeoksiholne kiseline (4), ili da se veoma malo razlikuju u hidrofobnosti. Ovo se može objasniti efektom sternog ekraniranja (70,84).

Sledeća žučna kiselina po hidrofobnosti jeste holna kiselina (1) koja ima najhidrofobniju β stranu u odnosu na predhodno diskutovane žučne kiseline, pošto u položajima C7 i C12 ima α aksijalne (a) hidoksilne grupe (u položaju C3 takođe ima $\alpha(e)$ -OH grupu kao i ostale diskutovane žučne kiseline). Hidrofobnost β strane steroidnog skeleta henodeoksiholne (2) i deoksiholne kiseline (3) identična je kao kod

holne kiseline (1), međutim kod ovih molekula na hidrofobnoj stacionarnoj fazi moguće su i dodatne hidrofobne interakcije između njihovih bočnih strana steroidnih skeleta. Veća hidrofobnost deoksiholne kiseline (3) u odnosu na henodeoksiholnu kiselinu (2) verovatno je posledica sternog ekraniranja C12 α aksijalne (a) hidroksilne grupe sa C17 bočnim nizom (84).

Na Slici 5. poređani su prema povećanju hidrofobnosti (izražene preko RPHPLC i RPTLC retencionih koeficijenata) žučne kiseline čiji steroidni skelet sadrži i okso grupu (nekonjugovane žučne kiseline: $R=CH(CH_3)CH_2CH_2COOH$). Može se zaključiti da u svakoj kongeneričnoj grupi (kongenerična grupa žučnih kiselina sa dva atoma kiseonika vezanog za steroidni skelet i kongenerična grupa žučnih kiselina sa tri atoma kiseonika vezanog za steroidni skeltet) žučnih kiselina hidrofobnost β strane steroidnog skeleta opada pri supstituciji OH grupa sa okso grupama (11,70,73,77, 82). Kiseonik okso grupe koja se dobija pri oksidaciji C7 α (a)-OH grupe holne (1), odnosno henodeoksiholne kiseline (2) ima α ekvatorijalnu (e) orijentaciju, to jest atom kiseonika usled oksidacije pomerena je za 60° prema srednjem ravnu steroidnog skeleta (SSMP). Ovo za posledicu ima povećanje oblasti stabilizacije molekula vode iz hidratacione juske, odnosno vodoničnim vezama moguće je stabilisati molekule vode i sa bočne strane i delom sa β strane steroidnog sistema prstenova.

U kongeneričnoj grupi okso derivata holne kiseline (Slika 5) 12-okso derivat (14) je hidrofobniji od 7-okso derivata (13), što je verovatno posledica sternog ekraniranja C12 okso grupe sa bočnim nizom (88). Oba mono-okso derivata (13 i 14) kao i hioholna kiselina (22) imaju dva α ekvatorijalna atoma kiseonika vezanog za steroidni sistem prstenova (C3 OH grupa i odgovarajuće okso grupe kod derivata (13 i 14) odnosno dve OH grube sa C3 i C6 kod hioholne kiseline (22)) odnosno po jednu aksijalnu OH grupu. Međutim hioholna kiselina (22) jeste hidrofobnija od mono-okso derivata. Ovo takođe dokazuje sterno ekraniranje C6 hidroksilne grupe hioholne kiseline (22). U kongeneričnoj grupi sa dva atoma kiseonika (kongenerična grupa deoksiholne i henodeoksiholne kiseline) u steroidnom jezgru (Slika 5 žučne kiseline: 11, 15, 19, 20) takođe se može zapaziti da 12-mono-okso derivat (20) jeste hidrofobniji od 7-mono-okso-derivata (19) – sterno ekraniranje C12 okso grupe. Ursodeoksiholna kiselina (21) hidrofилnija je od mono-okso derivata (20 i 19) pošto njena C7

ekvatorijalna hidroksilna grupa ima β orijentaciju, dok ekvatorijalne okso grupe su α orijentacije. Stoga kod ursodeoksiholne kiseline (21) konveksna strana jeste manje hidrofobnija nego ista strana molekula okso derivata (20 i 19).

Žučne kiseline blizu kritične micelarne koncentracije (CMC) i iznad nje razaraju ćelijsku membranu, kod eritrocita izazivaju hemolizu ćelijske membrane (membranolitička aktivnost), pri čemu formiraju mešovite micelle sa fosfolipidima (86,87). Kod membranolitičke aktivnosti hidrofobnost žučnih kiselina determiniše njihovu particiju u membranu, odnosno njihova sposobnost da grade mešovite micelle sa gradivnim elementima ćelijske membrane (11,12). Između hidrofobnosti (izražena preko RPTLC retencionog paramtera) i membranolitičkog potencijala postoji dobra korelacija, pri čemu supstitucija OH grupa sa okso grupama u steroidnom jezgru dovodi do signifikantnog smanjenja membranolitičke aktivnosti okso derivata (11,13). Takođe okso derivati ne otvaraju ni tight junctions veze između ćelija (15).

3.4 Samoasocijacija i struktura žučnih kiselina

Kod amfifilnih molekula karakteristično je da u vodenim rastvorima formiraju agregate – micelle. Pri sobnim temperaturama razlog nastajanja miceli jeste entropijski. Naime, u toku povećavanja količine amfila u rastvoru sve više molekula vode (NSWM) učestvuje u hidrataciji hidrofobne površine amfifila što je entropijski nepovoljno. Pri nastajanju agregata veliki broj (ne svaki) NSWM se vraća u rastvor dajući pozitivan entropijski doprinos sistemu (formiranju micelle). Koncentracija amfifila pri kojem počinje formiranje micela se naziva kritična micelarna koncentracija (CMC). Uglavnom u literaturi postoji svatanje da se koncentracija monomera ne menja iznad CMC, dok dodatkom novih molekula amfifila raste koncentracija miceli. Postoje i pogledi prema kome formiranje agregata počinje već ispod CMC, a da CMC odgovara tački ukupne koncentracije amfifila pri kojem se naglo menjaju fizičko hemijski parametri rastvora (1,88-90).

Micelle žučnih soli razlikuju se po obliku i veličini od miceli klasičnih surfaktanata tj. amfifila sa arhitekturom hidrofilne glave i hidrofobnog repa (soli masnih kiselina, natrijum dodecil sulfat itd). Micelle žučnih kiselina blizu CMC su agregacionog broja (n_g) od 2 do 15, dok klasični surfaktanti mogu imati n_g i do 80 (91-95). Zbog male

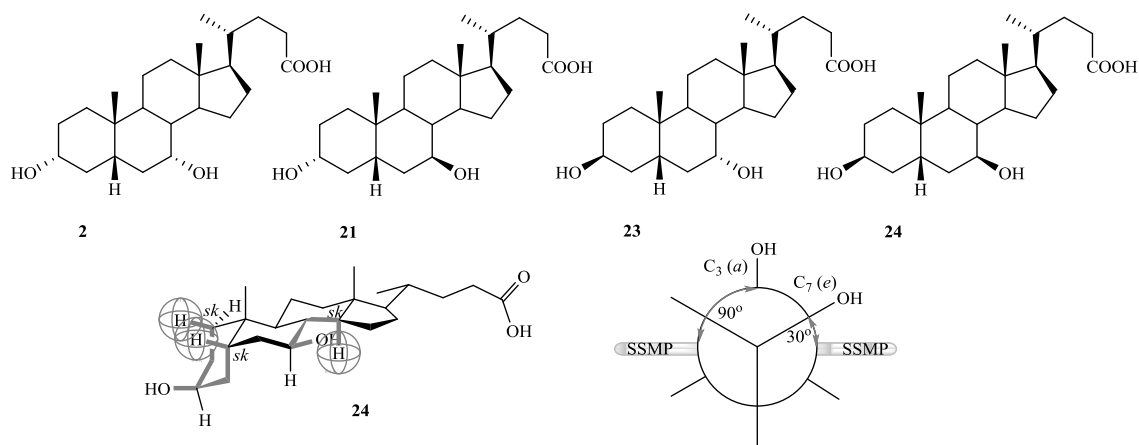
veliĉine miceli soli žučnih kiselina, fiziĉko hemijske osobine njihovih rastvora ne pokazuju tako nagle promene u okolini CMC, tj. promene su razvuĉene, kao što je sluĉaj kod micelarnih rastvora klasiĉnih surfaktanata (96,97), stoga umesto kritiĉne micelarne koncentracije predlaže se naziv noncritical multimerization concentration (98). Za odreĉivanje CMC vrednosti žučnih soli postoje mnoge eksperimentalne tehnike koje su dobro opisane u literaturi. Eksperimentalne metode se mogu podeliti u takozvane neinvazivne metode gde se prate direktne osobine micela ili fiziĉko hemijskih parametara rastvora kao celine, odnosno invazivne metode gde se koristi probni molekul (rhodamin G, azulen, piren itd) ĉije se osobine menjaju u zavisnosti od njegovog stepena inkorporacije u micelu. Meĉutim u literaturi vlada mišljenje da invazivne metode remete pravu strukturu micela, pošto nastaju mešovite micela. Stoga CMC mešovite micela je obiĉno niža od prave vrednosti (88,99,100). Pored toga osobine rastvora kao što su koncentracija elektrolita, pH, temperatura takoĉe utiĉu na vrednosti CMC. Stoga je dosta teško u literaturi uporeĉivati CMC vrednosti soli žučnih kiselina pošto od literature do literatura se menjaju metode kao i osobine rastvora (88,91).

Izmeĉu CMC vrednosti soli žučnih kiselina i vrednosti retencionih parametara (RPHPLC) postoji dobra korelacija, što upućuje na znaĉaj hidrofobnosti (naroĉito hidrofobnosti β strane steroidnog jezgra.) amfifila pri njihovoj samoasocijaciji (78,79). U NMR eksperimentima, pri formiranju micela, dolazi do porasta širine signala angularnih metil grupa žučnih soli, odnosno menjaju se njihove spin-rešetka relaksaciona vremena. Ovo takoĉe ukazuje na znaĉaj β strane steroidnog sistema prstenova u asocijaciji soli žučnih kiselina (85,101-104). Izotermalnom mikrokalorijskom titracijom može se odrediti toplotni kapacitet demicelizacije (ΔC_{pdemic}). Ukoliko je ΔC_{pdemic} pozitivan, znaĉi da pri raspadanju micela dolazi do hidratacije hidrofobne površine amfifila koja (površina) je u micelarnom stanju bila zaštićena od molekula vode (100,104). Kod soli žučnih kiselina ΔC_{pdemic} jeste pozitivna, što znaĉi da su hidrofobne površine gradivnih jedinica zaštićene od hidratacije pri formiranju micela. Na osnovu ΔC_{pdemic} vrednosti natrijum-holata i natrijum deoksiholata može se zakljuĉiti da je oko 20 do 40% upupne hidrofobne površine gradivne jedinice u miceli zaštićeno od hidratacije (105) (odnosno oko 40 do 80 procenata ako se raĉuna po β strani steroidnog jezgra). Sve ovo ukazuje da pri asocijaciji soli žučnih kiselina,

agregacija se odvija uključivanjem njihovih β strana steroidnog skeleta (tj. najviše hidrofobne strane amfifila).

Vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija (u zavisnosti od metode i jonske jačine rastvora) kod najhidrofobnije Na soli deoksiholne kiseline (3) se kreću od 2 do 8 mM, kod Na soli holne kiseline (1) od 4 do 20 mM, dok kod najmanje hidrofobne Na soli triokso-derivata (28) od 140-200 mM (11,69,70,84,88,91,106-108). Uopšteno CMC raste ako opada hidrofobnost (uglavnom β strane steroidnog skeleta) žučne kiseline, odnosno smanjuje se njihova težnja ka samoasocijaciji. Vrednost CMC raste u sledećem nizu Na soli žučnih kiselina: deoksiholna kiselina (3) (konfiguracija OH grupa: $3\alpha,12\alpha$) < henodeoksiholna kiselina (2) ($3\alpha,7\alpha$) < holna kiselina (1) ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$) < hiodeoksiholna kiselina (4) ($3\alpha,6\alpha$) < hioholna kiselina (22) ($3\alpha,6\alpha,7\alpha$) < ursodeoksiholna kiselina (21) ($3\alpha,7\beta$) < ursoholna kiselina (7) ($3\alpha,7\beta,12\alpha$). Gornji redosled je identičan i kod gliko- ($R=CH(CH_3)CH_2CH_2CONHCH_2COOH$) odnosno tauro-konjugovanih ($R=CH(CH_3)CH_2CH_2CONHCH_2CH_2SO_3H$) žučnih kiselina, sa tim što su CMC vrednosti nešto veće za nekonjugovane Na soli žučnih kiselina (11,69,70,84,88,91,106-108). Gornji redosled soli žučnih kiselina je obrnut ukoliko su žučne kiseline poređane prema povećanju hidrofobnosti njihovih β strana steroidnog skeleta (hidrofobnost na osnovu RPHPLC retencionog kapaciteta), što takođe ukazuje da u micelama anjoni žučnih kiselina su uglavnom u međusobnom kontaktu preko njihovih konveksnih strana steroidnog nukleusa, tj. β strana jednog anjona žučne kiseline ponaša se kao hidrofobna stacionarna faza drugom anjonu žučne kiseline. Međutim kako nije moguće u potpunosti međusobno pokriti dve konveksne površine, predstava o strukturnom elementu micle u kome su dva anjona žučne kiseline tj. spojene preko njihovih β strana steroidnog skeleta sasvim odgovara povećanju hidratisanih hidrofobnih površina gradivnih jedinica pri demicelizaciji (vrednosti ΔC_{pdemic}).

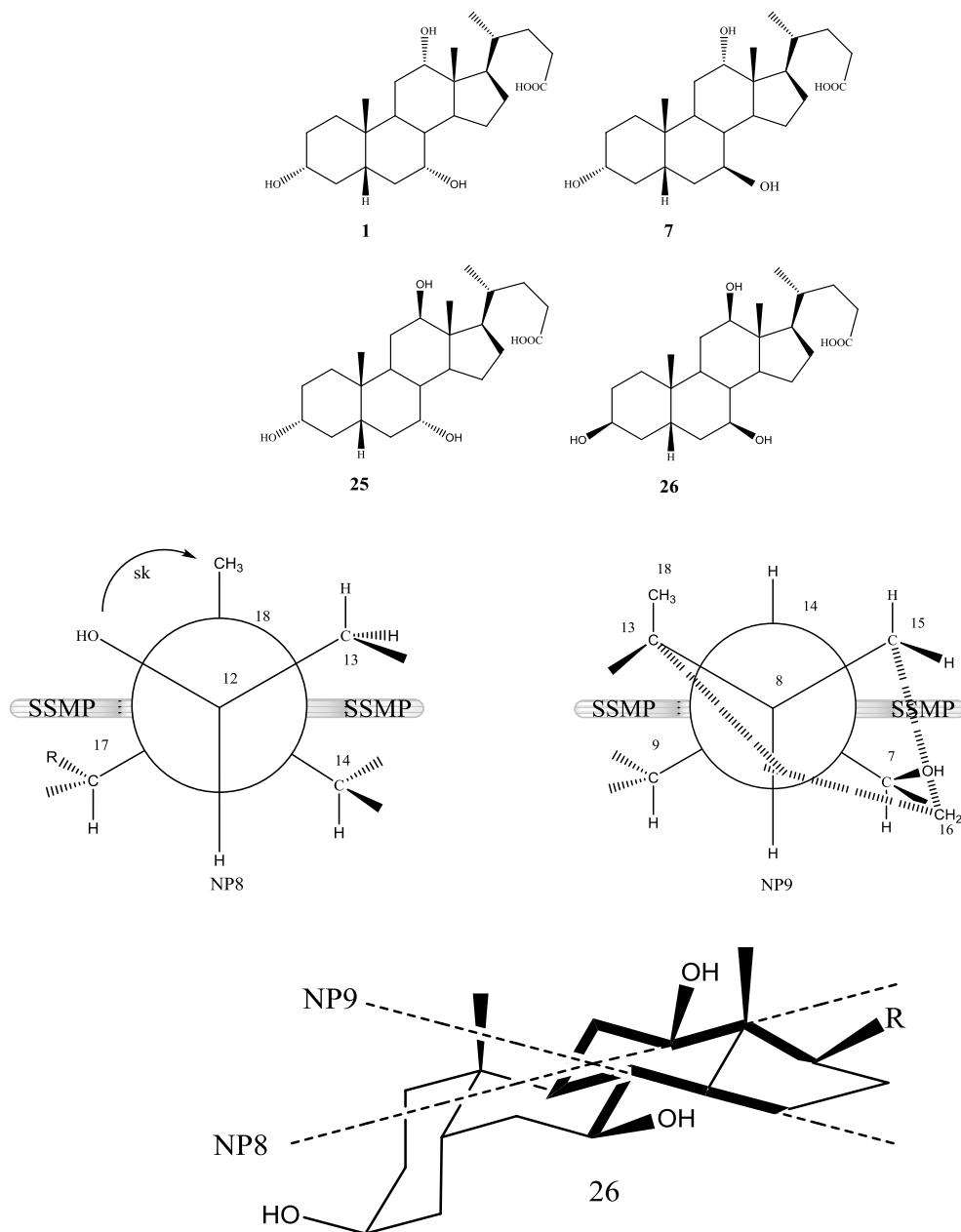
Roda i saradnici ispitivali su niz stereoizomernih žučnih kiselina. Kod stereoizomera henodeoksiholne kiseline dobili su sledeće vrednosti za CMC henodeoksiholna kiselina (2): 9 mM, ursodeoksiholna kiselina (21): 19 mM, izohenodeoksiholna kiselina (23): 28 mM i izoursodeoksiholna kiselina (24): 10.5 mM (Šema 2) (106).



Šema 2. SSMP = srednja ravan steroidnog skeleta, *sk* = sinklinalno

Kod ursodeoksiholne kiseline (21) opada hidrofobnost β strane steroidnog jezgra u odnosu na henodeoksiholnu kiselinu (2) pošto je C₇ OH grupa β ekvatorijalne orijentacije, stoga ova OH grupa jeste pomerena prema angularnim metil grupama. Kod Na soli izohenodeoksiholne kiseline (23) CMC je veća nego kod derivata (21), što znači da je kod derivata (23) β strana steroidnog jezgra manje hidrofobna nego kod ursodeoksiholne kiseline (21). Ovo je posledica aksijalne orijentacije C₃ β OH grupe derivata (23), zbog čega je onda C₃ β OH grupa u većoj meri prisutna na konveksonoj strani steroidnog jezgra nego što jeste C₇ β (*e*)-OH grupa (21). Konformacionom analizom može se zaključiti da C₃ β (*a*)-OH grupa ima dve sinklinalne (*sk*) grupe u odgovarajućim parcijalnim butanskim konformacijama (C₁ metilenska grupa i C₅ metinska grupa), dok C₇ β (*e*)-OH grupa samu jednu sinklinalnu (*sk*) grupu (C₁₄ metinska grupa). Stoga C₃ β (*a*)-OH grupa bila bi u većoj meri sterno ekranirana. Međutim, kod navedenih *sk* grupa vodonici nisu direktno usmereni ka odgovarajućim referentnim OH grupama, kao u slučaju ukoliko bi *sk* grupa bila metilna grupa. Kod derivata (24), gde su obe OH grupe β orijentacije dolazi do inverzije hidrofobnosti, tako da je α strana hidrofobnija od β strane steroidnog jezgra (106). Veća CMC vrednost Na soli stereoisomera (24) od vrednosti CMC Na soli henodeoksiholne kiseline (2) ogleda se u tome da je površina konkavne strane manja od površine konveksne strane steroidnog jezgra, pa je onda derivat (24) manje hidrofoban nego henodeoksiholna kiselina (2).

Iz aspekta konformacione analize interesantno je posmatrati CMC vrednosti kod holne kiseline i njenih stereoizomera. CMC vrednosti kod anjona sledećih žučnih kiselina su: holna kiselina (1): 13 mM, ursoholna kiselina (7): 60 mM, 3 α ,7 α ,12 β -trihidroksi-5 β -holanska kiselina (25): 37 mM i 3 β ,7 β ,12 β -5 β -holanska kiselina (26): >200 mM (106).



Šema 3. SSMP = srednja ravan steroidnog skeleta, *sk* = sinklinalno, C₂ osa simetrije drugog reda

Objašnjenje za povećanje CMC vrednosti kod anjona ursoholne kiseline (7) u odnosu na anjon holne kiseline (1) jeste identičan sa objašnjenjem povećanja CMC vrednosti C₇ epimera anjona henodeoksiholne kiseline (21) u odnosu na anjon žučne kiseline (2). Takođe, Na so C₁₂ epimera holne kiseline (25) u položaju C₁₂ steroidnog skeleta ima β ekvatorijalnu OH grupu kao i ursoholna kiselina (7) u položaju C₇, međutim anjon derivata (25) ima manju vrednost CMC od anjona (7). Prema ovome β strana steroidnog skeleta 3α,7α,12β-trihidroksi-5β-holanske kiseline (25) jeste hidrofobnija od iste strane steroidnog skeleta ursoholne kiseline (7). Naime, C₁₂ β(*e*)-OH grupa u odgovarajućoj Newman-ovoj projekcionoj formuli (Šema 3, NP8) ima u sinklinalnom (*sk*) položaju metil grupu (C₁₈ angularna) koja je onda sterno ekranira (kod anjona žučnih kiselina bočni niz je α orijentacije, stoga iako je C₁₇ metinska grupa takođe u sinklinalnom položaju, bočni niz β ekvatorijalnoj OH grupi ne stvara sterno ekraniranje). Na so trihidoksi derivata (26) kod kojeg je svaka OH grupa u β orijentaciji ima ekstremnu visoku CMC vrednost. Ako se uporede sve β (26) (Šema 3) i sve β derivati (24) (Šema 2) uočava se razlika da kod derivata (26) nije došlo do smanjivanja CMC vrednosti, tj. nije došlo do inverzije hidrofobnosti između konveksne i konkavne strane steroidnog skeleta. Ovo se može objasniti ukoliko se detaljnije analizira lokalna (regionalna) konformacija steroida u okolini C₁₂ i C₇ β hidroksilnih grupa. D prsten je u sinklinalnom (*sk*) položaju prema C₇ β hidroksilnoj grupi (Šema 3, NP9), odnosno D prsten sterno ekranira C₇ β hidroksilnu grupu sa α strane steroidnog jezgra. S druge strane C₁₂ β hidroksilna grupa u odgovarajućem molekulskom grafu ima samo C₁₈ i C₁₉ angularne metil grupe u *cis* položaju. Od kojih prema NP8 Newman-ovoj projekcionoj formuli C₁₈ metil grupa jeste u *sk* položaju (Šema 3) prema navedenoj OH grupi i sterno je ekranira sa β strane steroidnog skeleta. Prema tome, kod sve β derivata (26) C₁₂ β(*e*)-OH grupa je sterno ekranirana sa β strane dok sa α strane nije, dok C₇ β(*e*)-OH grupa jeste sterno ekranirana sa α strane (u jačoj meri), tj. otežana je stabilizacija molekula vode iz hidratacionog sloja sa α strane, dok sa β strane nije. Stoga kod sve β derivata (26) zbog C₁₂ β(*e*)-OH grupe moguća je stabilizacija molekula vode (sa vodoničnim vezama) i sa α strane steroidnog skeleta i kako je površina konkavne strane steroidnog jezgra manja od konveksne strane, to je uticaj ove OH grupe onda značajniji. Ovo znači da je kod sve β derivata (26) smanjena ukupna hidrofobnost steroidnog jezgra, to jest

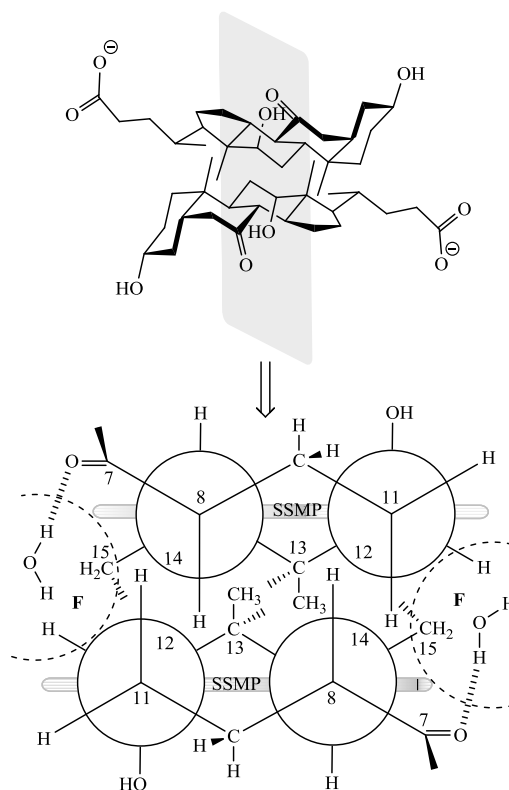
zmanjena je razlika u hidrofobnosti α i β strane steroidnog jezgra, što onda inhibiše samoasocijaciju (veoma visoka CMC).

Pri supstituciji OH grupa kod holne kiseline (1) sa okso grupama, kod dobivenih Na soli okso derivata raste vrednost CMC. Naime, sa povećanjem broja okso grupa u kongeneričnoj grupi sa tri O atoma vezanih za steroidni skelet opada biplanarna osobina u pogledu razdvojenosti hidrofobne i hidrofilne strane steroidnog nukleosida. Naime, C₇ i C₁₂ okso grupe se pomeraju ka srednjoj ravni steroidnog skeleta (SSMP), odnosno C₃ okso grupa prelazi na konveksnu stranu steroidnog skeleta. To jest sa povećanjem broja okso grupa u molekulu opada hidrofobnost β strane dok α strani raste u odnosu na holnu kiselinu (1), ipak i dalje β strana ostaje hidrofobnija. Slično je i u kongeneričnoj grupi okso derivata deoksiholne (3) i henodeoksiholne kiseline (2). Kod obe kongenerične grupe okso derivata, pri sobnoj temperaturi, entropija formiranja micela opada sa povećanjem broja okso grupe u steroidnom jezgru, pošto opada broj nestabilisanih molekula voda (NSWM) u hidratacionom sloju sa β strane steroidnog sistema prstenova (11,69,70,84,85,109,110).

Informaciju o zavisnosti strukture žučnih kiselina i njihove hidrofobnosti, odnosno njihove tendencije ka samoasocijaciji se može dobiti ukoliko se posmatra uticaj povećanja koncentracije NaCl na kritičnu micelarnu koncentraciju (70). Vrednosti CMC opadaju kod svake ispitivane Na soli žučne kiseline sa povećanjem jonske jačine rastvora (69,70,104). Kod Na soli hidroksi derivata žučnih kiselina CMC sa povećanjem koncentracije NaCl utoliko se više smanjuje ukoliko je žučna kiselina hidrofobnija (70). Prema tome, što je veća količina nestabilizovanih molekula vode (NSMV) u hidratacionom sloju anjona žučnih kiselina to je vrednost parametra $|\Delta \ln CMC / \Delta c_{NaCl}|$ veća.

Međutim, u kongeneričnoj grupi okso derivata holne kiseline $|\Delta \ln CMC / \Delta c_{NaCl}|$ raste ukoliko molekul žučne kiseline sadrži veći broj okso grupa vezanih za steroidni skelet (u kongeneričnoj grupi okso derivata sa dva O atoma u steroidnom skeletu molekuli se uglavnom ponašaju kao i OH derivati). Naime, pri supstituciji OH grupe sa okso grupom raste količina stabilizovanih molekula vode (SMV) u hidratacionom sloju molekula žučne kiseline, tj. okso derivati žučnih kiselina su manje hidrofobni od njihovih OH analoga. Ovo odstupanje okso derivata žučnih kiselina iz kongenerične

grupe okso derivata holne kiseline se može objasniti postojanjem vodoničnih veza između gradivnih jedinica micela. Naime, kod primarnih micela u fjordu („pukotina“ na površini micela na mestu „spajanja“ žučnih kiselina preko β strana steroidnog nukleosida) molekul vode (ili 2 do 3 molekula vode) može graditi vodoničnu vezu sa okso grupom jednog i sa okso grupom drugog molekula žučne kiseline (Šema 4), što onda dodatno stabilizuje micelu i to utoliko više ukoliko ima više okso grupa (69,70,110). Stabilizacija pomoću vodoničnih veza u fjordu moguća je samo ukoliko molekul žučne kiseline ima okso grupu (ili ekvatorijalnu OH grupu, međutim jači dipol keto grupe verovatno učestvuje u pravilnoj orijentaciji molekula vode u fjordu) koja je orijentisana ka β strani steroidnog jezgra, što onda rezultuje njenu sternu lokalizaciju prema fjordu (pukotini). Ukoliko je za steroidni skelet vezana α aksijalna OH grupa, onda iz sternih (prostornih) razloga ne nastaje vodonična veza (OH grupe se ne nalaze u fjordu). Postojanje fjordova i mogućnost građenja vodoničnih veza u njemu ima naročitu značajnost kod mešovite miceli okso derivata (110,111). Naime, što postoji više vodoničnih veza u fjordovima, iako je jezgro micela hidrofoban (sama micela jeste stabilnija), to onda otežava prihvatanje hidrofobnog molekula gosta (13,110). S druge strane povećanjem broja okso grupa u steroidnom skeletu soli žučnih kiselina dolazi do efikasnije solubilizacije rezveratrola. Kod mešovite micela rezveratrola i soli žučnih kiselina aromatično jezgro rezveratrola se nalazi u hidrofobnom unutrašnjem domenu micela, dok su fenolne OH grupe lokalizovane u fjordovima, gde grade vodonične veze sa okso grupama (112).



Šema 4. SSMP = srednja ravan steroidnog skeleta, F = fjord

U drugoj polovini prošloga veka u pogledu strukture miceli soli žučnih kiselina formirane su nekoliko modela. Prema najstarijem, Small-ovom modelu soli žučnih kiselina formiraju primarne micelle. Primarne micelle imaju male dimenzije, a njihov agregacioni broj kreće se od 2 (dimeri) do 10 jedinica. U primarnim micelama gradivne jedinice su spojene preko hidrofobnih β strana steroidnog skeleta tako da ne nastane šupljina u unutrašnjosti agregata, te da karboksilatne grupe budu što udaljenije jedni od drugih da bi se smanjilo elektrostatičko odbijanje. Model primarne micelle koji je sastavljena od četiri anjona holne kiseline nastaje tako što se prvo formira primarni nukleus od dva anjona žučne kiseline, u kojem su one tako povezane da se karboksilatne grupe bočnog niza nalaze sa iste strane micelle. Ovo jezgro je longitudinalnog oblika sa dve suprotne strane, od kojih je jedna sa karboksilnim grupama, a druga sa *cis* povezanim A-prstenovima steroidnog skeleta. Takva dva jezgra se zatim povezuju i formiraju micelu sa agregacionim brojem četiri. Prema Small-u pri većim koncentracijama soli žučnih kiselina primarne micelle se međusobno povezuju vodoničnim vezama preko α strane steroidnog skeleta formirajući sekundarne micelle (91).

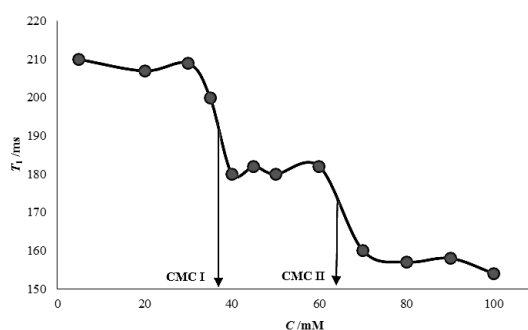
Kawamura je predložio model micela u obliku diska, na osnovu ispitivanja agregata soli žučnih kiselina pomoću spinski obeleženog probnog molekula (113). Kod ovog modela micela hidrofilne površine gradivnih jedinica orijentisane su prema rastvoru, dok su hidrofobne površine monomera okrenute ka unutrašnjosti agregata. Kod micela u obliku diska longitudinalne ose molekula žučnih kiselina su međusobno paralelne. Ovaj model micela žučnih kiselina uspešno objašnjava nisku vrednost koeficijenta vezivanja kontraiona (katjona) za površinu micela u odnosu na sferne micela natrijum dodecilsulfata (sodium-laurilsulfat). Kawamurin model dozvoljava kontinualno povećanje veličine micela sa porastom ravnotežne koncentracije soli žučnih kiselina. Ovaj model se primenjuje kod micela sa malim agregacionim brojem uobičajenim kod trihidroksi derivata žučnih kiselina odnosno kod velikih rigidnih micela dihidroksi derivata žučnih kiselina.

U evoluciji Kawamurine micela verovatno prvo nastaje dimerni agregat tipa Smalllove micela (114), koji u toku daljeg razvoja umesto aksijalno produženog agregata formira micelu u obliku diska. Značaj dimernog agregata u procesu micelizacije eksperimentalno su odredili Gouin i Zhu (NMR) (102). Naime, oni su koristili molekule žučnih kiselina koji su pomoću spejsera povezani u dimerni oblik. Primena dimernih soli žučnih kiselina u smeši sa monomernim solima žučnih kiselina rezultira opadanjem vrednosti kritične micelarne koncentracije, što upućuje na povećanu tendenciju formiranja agregata. Inače, zajednička karakteristika Small-ove i Kawamurine micela jeste hidrofilna spoljašnjost i hidrofobna unutrašnjost.

Oakenfull i Fisher (115-117) na osnovu merenja specifične provodljivosti Na holata (1) i Na deoksiholata (3) postavili su model u kome primarne micela soli žučnih kiselina nastaju građenjem vodoničnih veza između OH grupa, dok se sekundarne micela formiraju spajanjem (hidrofobne interakcije) preko β strana steroidnog skeleta soli žučnih kiselina (iz primarnih micela). Stoga je ovaj model u potpunosti suprotan od najviše prihvaćenog Small-ovog modela. Vadrere i saradnici (118) su na osnovu merenja promene molalne zapremine soli žučnih kiselina u potpunosti odbacili Oakenfull-ov i Fisher-ov model asocijacije preko vodoničnih veza, preferirajući micela soli žučnih kiselina koje nastaju hidrofobnim interakcijama.

Conte i saradnici na osnovu difrakcije X-zraka odnosno ^1H i ^{13}C NMR merenja gelastog sistema Na deoksiholata (3) došli su do helikalnog modela za agregate (119). Unutrašnjost helikalnog agregata je hidrofilna i popunjena katjonima i molekulima vode. Heliks je stabilizovan vodoničnim vezama između molekula vode i OH grupa soli žučnih kiselina koje su orijentisane ka unutrašnjosti heliksa. Joni deoksiholata su međusobno povezani vodoničnim vezama između OH grupe sa C_3 jedne i COO^- grupe sa druge gradivne jedinice. Spoljašnji deo heliksa deoksiholne kiseline je hidrofoban, što omogućuje njegovu eventualnu ugradnju u ćelijsku membranu.

Molekulsko dinamičke simulacije potvrđuju koncept primarnih i sekundarnih micela. Prema ovom metodom način agregacije zavisi od strukture gradivne jedinice. Tako na primer primarne micela izgrađene od soli deoksiholata (3) stabilizovani su hidrofobnim efektom, dok primarne micela izgrađene od Na holata stabilizovani su kako hidrofobnim efektom tako i vodoničnim vezama. Sekundarne micela prema molekulskim simulacijama su veoma dinamične i nepravilnog oblika, te se razlikuju od prethodnih modela (63,120,121).



Slika 7. Dve CMC 7-oksodeoksiholne kiseline

Kod Na soli okso derivata žučnih kiseline na osnovu NMR merenja, osobine micela najbolje odgovaraju Small-Kawamura modelu. Kod nekih Na soli okso derivata na funkciji koncentracione (C) zavisnosti spin-rešetka relaksacionog vremena (T_1) postoje dve infleksione tačke, tj dve kritične micelarne koncentracije. Prema kojem prva odgovara hidrofobnim primarnim micelama (CMC I), dok druga, sekundarnim micelama (CMC II) (Slika 7, primer 7-oksodeoksiholna kiselina (9)). Pri formiranju

sekundarnih micela iz primarnih, primarne micelle se izvlače iz ravnotežne reakcije u kojoj se formiraju, stoga je onda reakcija formiranja primarnih micela pomerenjena ka pravcu stvaranja produkta, to jest ka pravcu nastajanja primarnih micela iz gradivnih jedinica. Ovo se manifestuje snižavanjem vrednosti CMC. Prema tome, ukoliko Na so žučne kiseline formira i sekundarnu micelu, onda je prividno nešto hidrofobniji nego što bi se očekivalo na osnovu broja NSMV. Na osnovu ^1H NMR relaksacionog ispitivanja može se zaključiti da se kod Na soli mono-okso derivata holne kiseline sekundarna micela formira ukoliko je okso grupa vezana za C_7 ili C_3 atom ugljenika steroidnog skeleta, a ukoliko je okso grupa vezana za C_{12} ugljenik, onda je verovatno ekranirana sa bočnim nizom (85,101).

Istovremeno prisustvo okso i OH grupa u steroidnom jezgru žučnih kiselina favorizuje nastajanje agregata (agregati poput reverznih miceli) žučnih kiselina i nekih lekova (verapamil, lidokain) u hloroformu (model za depo efekat u ćelijskoj membrani) (122,123). U vodenom sistemu na površini nekih miceli žučnih soli (naročito kod micelle 7-okso-deoksiholata) formira se vezivno mesto za morfín (između monomernih žučnih soli i morfina nema interakcija) (124). Zahvaljujući tome da okso derivati žučnih kiselina imaju smanjenu membranolitičku aktivnost postoji mogućnost za njihovu primenu kao nosača određenih lekova.

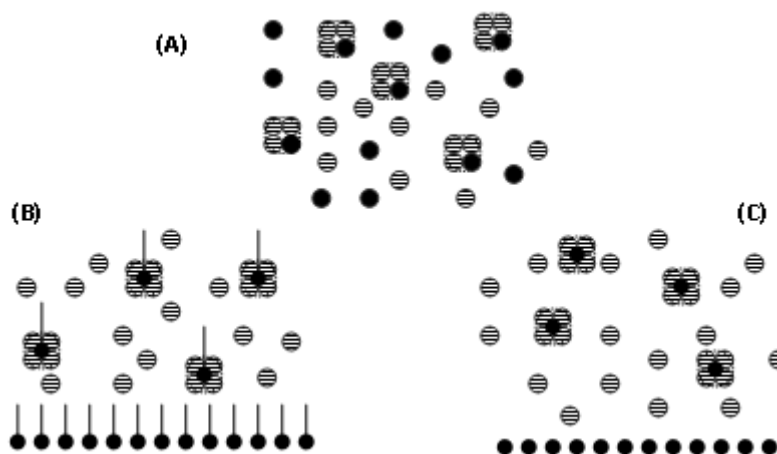
3.5 Mešovite micelle

Prema definiciji, mešovite micelle su agregati koji su izgrađeni od najmanje dva različita lipida od kojih barem jedan može i sam da gradi micelle u vodenom rastvoru (33,36,125). U literaturi se uglavnom navode tri različite grupe mešovityh micela.

Kao prvo, mešovite micelle se mogu formirati od dve različite površinske aktivne supstance – deterdženta (obe komponente mogu i same da grade micelle), pri čemu u mešovitoj miceli veći udeo ima surfaktant sa manjom CMC, tj. surfaktant koji ima veći afinitet ka miceli. U vodenom rastvoru oba surfaktanta se nalaze i kao monomeri i u micelarnom obliku (Slika 8 (A)). Kod žučnih kiselina najviše je ispitivan sistem natrijum-taurholata i kalijum-oleata te je nađeno da sa povećanjem količine kalijum-oleata raste veličina mešovite micelle. Takođe postoji mišljenje da je odnos žučne i

masne kiseline u mešovitoj miceli približno jednak odnosu istih molekula u vodenom rastvoru (33).

Kao drugo, mešovite micelle mogu biti sastavljene od površinske aktivne supstance – deterdženta i od amfifilnog molekula koji se ne rastvara u vodi (alkoholi sa dugačkim alkil nizom, monogliceridi, holesterol itd.). Nastajanje ovakvih micela obično se naziva solubilizacija (rastvaranje) uz asocijaciju. Kod ovakvih mešovitih micela vodonerastvorni amfifilni molekul inkorporira se u hidrofobno jezgro micelle sa svojim nepolarnim delom, dok je polarni deo postavljen na površinu mešovite micelle. Rastvorljivost vodonerastvorne amfifilne komponente ne menja se u nemicelarnom vodenom rastvoru (detergent se nalazi u vodenom rastvoru ispod kritične micelarne koncentracije). To znači da se u micelarnom rastvoru svi molekuli vodonerastvornog amfifila nalaze u mešovitoj miceli (Slika 8. (B)). Kritična micelarna koncentracija mešovite micelle obično je niža od CMC vrednosti deterdženta. Ovo se objašnjava povećanjem veličine mešovite micelle, to jest ugradnjom nerastvorne komponente u hidrofobni kavez micelle. Naelektrisane grupe na površini micelle bivaju udaljenije jedne od drugih što onda smanjuje repulzivne interakcije (33,36,125). U sistemu soli žučnih kiselina i monoglicerida nađeno je da se mešovita micela uglavnom sastoji od 1 do 6 molekula monoglicerida i od 10 do 14 molekula žučne kiseline. Soli žučnih kiselina slabo rastvaraju holesterol. Uglavnom, u zavisnosti od strukture žučnih kiselina, od 30 do 300 molekula žučne kiseline (soli) rastvara 1 molekul holesterola (u rastvoru gde je koncentracija žučnih kiselina iznad CMC). Prvo je postojalo mišljenje da mešovite micelle soli žučnih kiselina i holesterola imaju agregacioni broj od 30 do 40 i mislilo se da svaka micela žučne kiseline rastvara po molekul holesterola. Međutim, kasnije je nađeno da se agregacioni broj micela žučnih kiselina neznatno povećava u rastvoru koji je zasićen holesterolom u odnosu na vodeni rastvor. Ovo ukazuje na to da u vodenom rastvoru koji je zasićen holesterolom postoje micelle žučnih kiselina bez ovog molekula kao i u vodenom rastvoru (sa prosečnim agregacionim brojem 5) i veoma velike micelle sa holesterolom (sa prosečnim agregacionim brojem 30). Međutim, sa termodinamičkog aspekta ovakav sistem micela i mešovitih micela nije stabilan (33,126).



Slika 8. Mešovite micelle

I kao treće, postoje mešovite micelle između deterdženta i nepolarnog molekula (piren, naftalen, heksadekan itd.). Postoji mišljenje da se nepolarni molekul (molekul gost) u potpunosti inkorporira u hidrofobno jezgro micelle, i da nije u kontaktu sa vodenom fazom (Slika 8. (C)). Međutim, ovo može da bude prihvatljivo ukoliko micelle formiraju detergentski tipa natrijum-dodecilsulfata (velike micelle, sa fleksibilnim unutrašnjim delom, što je posledica pokretljivosti alkilnih ostataka). S druge strane, kod micela žučnih kiselina (male i rigidne micelle) hidrofobni molekul gosta samo se delom uklapa u hidrofobni kavez micelle i deo njegovog molekula je u kontaktu sa vodenom fazom, što destabilizuje ovakvu mešovitu micelu u odnosu na mešovitu micelu sa klasičnim detergentima. Vrednost kritične micelarne koncentracije i veličina mešovite micelle deterdžent – nepolarni molekul se zanemarljivo malo menja u odnosu na iste veličine micelle čistog deterdženta (33,36,125).

U biofarmaciji su važne polikomponente mešovite micelle žučnih kiselina (soli) i lecitina. Naime, ove micelle imaju relativno veliko hidrofobno i pokretljivo unutrašnje jezgro koje ima veliki afinitet ka hidrofobnim molekulima gosta. De Castro i saradnici ispitivali su prihvatanje nitrazepana (molekul gosta) od strane micelle soli holne i deoksiholne kiseline odnosno mešovite micelle holata i lecitina kao i deoksiholata i lecitina. Oni su našli da se particioni koeficijent nitrazepama signifikantno povećava kod mešovite micelle sa lecitinom u odnosu na micelle samih žučnih kiselina (127).

U fizičko-hemijskom ispitivanju mešovitih micela uglavnom se koriste parametri koji su navedeni u Tabeli 1. Jedan od najvažnijih parametara binarnih mešovitih micela žučnih kiselina jeste interakcioni parametar (β), koji se dobija iz eksperimentalno određene CMC vrednosti mešovite micelle (128). Ovaj parametar pokazuje u kojoj meri postoji sinergizam između dveju gradivnih jedinica pri formiranju mešovite micelle. Interakcioni parametar je utoliko veći ukoliko se više razlikuje eksperimentalno određena kritična micelarna koncentracija (CMC^{ex}) od kritične micelarne koncentracije mešovite micelle koja se računa prema Clintovom modelu idealnih smeša (CMC^{id}) (129-136). Ukoliko se ispituju mešovite micelle binarnih deterdženata dveju različitih žučnih kiselina, onda je odstupanje od idealnog modela utoliko veće ukoliko se žučne kiseline po hidrofilnom-lipofilnom balansu (HLB) međusobno više razlikuju.

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri mešovityh micela

Parametri		Jednačine
Idealna kritična micelarna koncentracija po Clint-u (129)	CMC_{id}	$\frac{1}{CMC^{id}} = \sum_i \frac{\alpha_i}{CMC_i}$
Molski udeo hidrofobnije žučne kiseline u relanoj mešovitoj miceli po Rubingh-u (128)	x_1	$\frac{x_1^2 \ln(CMC^{exp} \alpha / CMC_1 x_1)}{(1-x_1)^2 \ln[CMC^{ex}(1-\alpha) / CMC_2(1-x_1)]} = 1$
Molski udeo hidrofobnije žučne kiseline u idealnoj mešovitoj miceli po Motomuri (137)	x^{id}	$x^{id} = \frac{CMC_2 \alpha}{CMC_2 \alpha + CMC_1(1-\alpha)}$
Interakcioni parametar po Rubingh-u (128)	β	$\beta_{1,2} = \frac{\ln(CMC^{ex} \alpha / CMC_1 x_1)}{(1-x_1)^2}$
Koeficijent aktivnosti hidrofobnije žučne kiseline u mešovitoj miceli (138)	f_1	$f_1 = \exp \beta(1-x_1)^2 $
Koeficijent aktivnosti hidrofilnije žučne kiseline u mešovitoj miceli (138)	f_1	$f_2 = \exp \beta x_1^2 $
Slobodna energija formiranja mešovite micela	ΔG_{ex}	$\Delta G_{ex} = RT[x_1 \ln f_1 + (1-x_1) \ln f_2]$

3.6 Regular Solution Theory – Termodinamika idealnih i realnih rastvora

Za idealan rastvor entalpija mešanja je:

$$\Delta S_{\text{mix}} = -R(x_A \ln x_A + x_B \ln x_B) \quad (1)$$

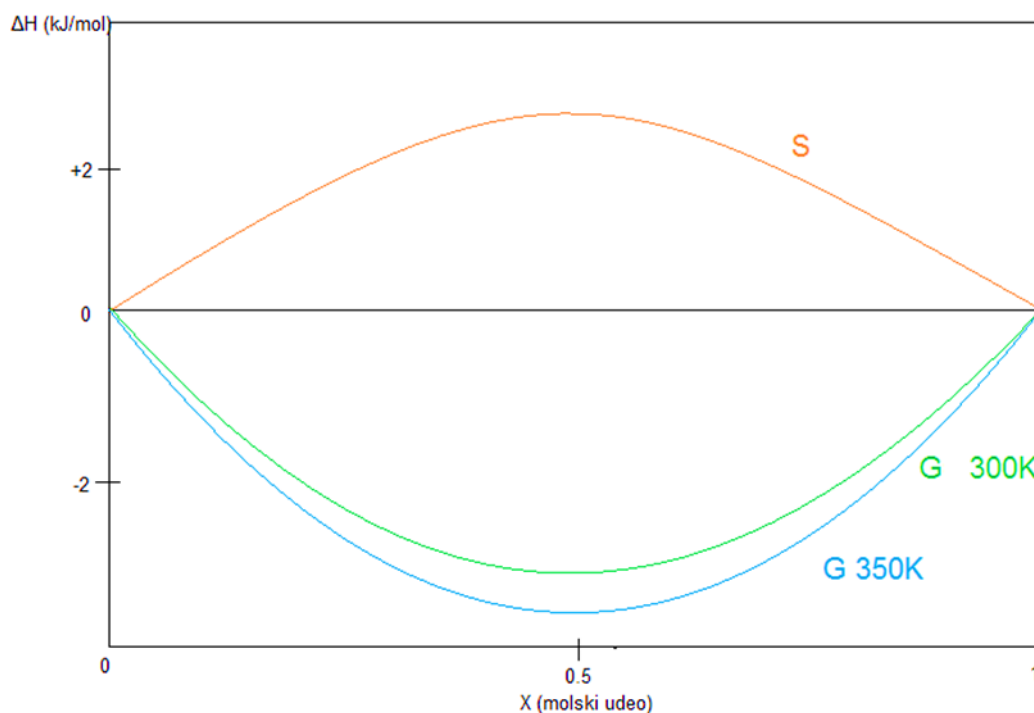
gde je x_A molски udeo komponente A, a x_B molски udeo komponente B.

Za ovakve sisteme važi da je entalpija mešanja 0:

$$\Delta H_{\text{mix}} = 0 \quad (2)$$

Gibsova slobodna energija je stoga:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = RT(x_A \ln x_A + x_B \ln x_B) \quad (3)$$



Slika 10. Zavisnost entropije od molskog udela i Gibsove slobodne energije od molskog udela i temperature

Pošto su molski udeli komponenata uvek manji od 1, $\ln x_A$ je uvek manji od 1, ΔS_{mix} je uvek veći od 0, a Gibsova energija je uvek manja od 0.

Za realan rastvor entropija mešanja je ista kao i kod idealnog rastvora, samo što sada entalpija zavisi od sastava rastvora:

$$\Delta H_{\text{mix}} = \beta x_A x_B \quad (4)$$

gde je β interakcioni parametar.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = RT(x_A \ln x_A + x_B \ln x_B) + \beta x_A x_B \quad (5)$$

Hemijski potencijal je doprinos jednog mola i -te komponente ukupnoj slobodnoj energiji sistema pri konstantnom pritisku i temperaturi. Odatle sledi da je zbir hemijskih potencijala svih komponenata sistema (μ_1, μ_2, \dots) pomnoženih brojem molova odgovarajućih komponenata (n_1, n_2, \dots) jednak slobodnoj energiji sistema G :

$$G = n_1 \mu_1 + n_2 \mu_2 + \dots = \sum n_i \mu_i \quad (6)$$

Za jednokomponentni sistem koji sadrži n molova jedne komponente slobodna energija je $G = n\mu$ tako da je hemijski potencijal te komponente $\mu = G/n$, a u slučaju da sistem čini jedan mol te komponente slobodna energija je jednaka njenom hemijskom potencijalu ($G = \mu$).

Hemijski potencijal se definiše i kao:

$$\mu_A = \left(\frac{\partial G}{\partial n_A} \right)_{T, P, n_A} \quad (7)$$

Hemijski potencijal komponente u smeši ima 2 doprinosa: jedan od čiste komponente μ^θ i jedan od mešanja.

$$\mu_{A(\text{mešanja})} = \left(\frac{\partial G}{\partial n_A} \right) = RT \frac{\partial}{\partial n_A} \left\{ n_A \ln \left(\frac{n_A}{n_A + n_B} \right) + n_B \ln \left(\frac{n_B}{n_A + n_B} \right) \right\} \quad (8)$$

koje posle matematičkih operacija možemo pojednostaviti na:

$$\mu_{A(\text{mešanja})} = RT \ln x_A \quad (9)$$

tako da je hemijski potencijal komponente A smeše:

$$\mu_A = \mu_A^\circ + RT \ln x_A \quad (10)$$

Hemijski potencijal se može dovesti u zavisnost sa temperaturom i pritiskom. U ekvilibrijumu, temperatura i pritisak smeše moraju biti jednaki u svim delovima sistema. Isto važi i za hemijski potencijal.

$$\mu_A^\alpha = \mu_A^\beta = \mu_A^\gamma \quad (11)$$

gde su α , β i γ različite faze.

Rastvor može biti ne-idealno ili zato što je $\Delta H_{\text{mix}} \neq 0$ ili zato što ΔS_{mix} nema idealnu vrednost.

$$\mu_A = \mu_A^\circ + RT \ln x_A + F_{(x)} \quad (12)$$

$F_{(x)}$ je razlika između realnog i idealnog hemijskog potencijala. Ako F ne zavisi od koncentracije, onda se može kombinovati u standardni hemijski potencijal:

$$\mu_A^* = \mu_A^\circ + F \quad (13)$$

$$\mu_A = \mu_A^\circ + RT \ln x_A + RT \ln f_A = \mu_A^\circ + RT \ln a_A \quad (14)$$

f_A – koeficijent aktivnosti

a_A – aktivitet

Raulov zakon tada postaje:

$$p_A^{\text{realan}} = f_A x_A p_A^0 \quad (15)$$

gde je koeficijent aktivnosti :

$$f_A = \frac{p_A^{\text{realan}}}{p_A^{\text{idealan}}} \quad (16)$$

entropija mešanja za idealne i realne rastvore je ista:

$$\Delta S_{\text{mix}}^i = \Delta S_{\text{mix}}^r \quad (17)$$

međutim, entalpija zavisi od koncentracije:

$$\Delta H_{\text{mix}}^i \neq \Delta H_{\text{mix}}^r \neq 0 \quad (18)$$

i ΔH_{mix}^r će biti jednaka promenama u energiji mešanja molekula B sa molekulima A.

Za molekule B to iznosi $x_A z n_B (\epsilon_{BA} - \epsilon_{BB})$, a za molekule A $x_B z n_A (\epsilon_{BA} - \epsilon_{AA})$, te stoga ukupna energija mešanja će biti:

$$E = \frac{1}{2} \frac{z n_A n_B}{(n_A + n_B)} (2\epsilon_{AB} - \epsilon_{AA} - \epsilon_{BB}) = \beta \frac{n_A n_B}{(n_A + n_B)} \quad (19)$$

$$\beta = \frac{z(2\epsilon_{AB} - \epsilon_{AA} - \epsilon_{BB})}{2} \quad (20)$$

pod pretpostavkom da je $\Delta H_{\text{mix}} = \Delta E_{\text{mix}}$

Pošto je entalpija mešanja različita od 0, to dovodi do dodatnog dela jednačine: hemijskog potencijala μ_{reg} koji se dobija diferenciranjem entalpije mešanja:

$$\mu_{\text{regA}} = \left(\frac{\partial E}{\partial n_A} \right)_{T, P, n_B} = \beta \left\{ \frac{n_B}{(n_A + n_B)} - \frac{n_A n_B}{(n_A + n_B)^2} \right\} = \beta x_B^2 \quad (21)$$

Hemijski potencijal realnog rastvora je:

$$\mu_A = \mu_A^\theta + RT \ln x_A + \beta x_B^2 = \mu_A^\theta + RT \ln x_A + RT \ln f_A \quad (22)$$

$$RT \ln f_A = \beta x_B^2 \quad (23)$$

$$f_A = e^{\frac{\beta x_B^2}{RT}} \quad (24)$$

Energija interakcije zavisi od koncentracije.

$$\Delta G_{\text{mix}} = RT(x_A \ln x_A + (1-x_A) \ln(1-x_A)) + \beta x_A(1-x_A) \quad (25)$$

diferenciranjem u odnosu na x_A :

$$\frac{d\Delta G_{\text{mix}}}{dx_A} = RT(1 + \ln x_A - 1 - \ln(1-x_A)) + \beta(1-2x_A) \quad (26)$$

ova jednačina ima dva minimuma koja se odnose na dve nemešljive faze u ekvilibrijumu koji se ne mogu odrediti analitički diferenciranjem i postoji maksimum krive na $x_A = 1/2$. Daljim diferenciranjem jednačine 26 dobija se:

$$\frac{d^2\Delta G_{\text{mix}}}{dx_A^2} = RT\left(\frac{1}{x_A} + \frac{1}{1-x_A}\right) - 2\beta \quad (27)$$

$$T_e = \frac{\beta}{2R} \quad (28)$$

Ukoliko vodeni rastvor sadrži binarnu smešu surfaktanata (**i,j**: okarakterisan molskim udeom α_i), onda se može definisati kritična micelarna koncentracija za binarnu smešu surfaktanata (cmc_{ij}). Kako binarna smeša surfaktanata gradi mešovitu micelu koja se takođe aproksimira sa pseudofazom tečne smeše, hemijski potencijal surfaktanta **i** (ili druge gradivne jedinice) u mešovitoj miceli jeste:

$$\mu_i^{mM} = \mu_i^M + RT \ln x_i^{mM} \quad f_i^{mM} = \mu_i^M + RT \ln x_i^{mM} + RT \ln f_i^{mM} \quad (29)$$

gde je $\mu_i^M + RT \ln x_i^{mM} = (\mu_i^{mM})_{id}$, a $RT \ln f_i^{mM} = \mu_i^E$, x_i^{mM} je molski udeo molekula **i** u binarnoj mešovitoj miceli, f_i^{mM} jeste koeficijent aktivnosti surfaktanta **i** u mešovitoj miceli – mera za veličinu dodatnog hemijskog potencijala surfaktanta **i** (μ_i^E).

Ako je u binarnoj mešovitoj miceli prosečna energija međumolekulskih interakcija između različitih gradivnih jedinica (tj. između **i** i **j**) različita od prosečne energije međumolekulskih interakcija iz jednodimenzionalnih (čistih) micela, onda hemijski potencijal surfaktanata **i**, **j** u binarnoj mešovitoj miceli se razlikuje od idealnog stanja tj. od idealnog hemijskog potencijala ($(\mu_i^{mM})_{id}$). Takođe, u ravnotežnom stanju hemijski potencijal surfaktanta **i** (odnosno **j**) iz vodenog rastvora jeste jednak sa hemijskim potencijalom **i** iz binarne micelarne pseudofaze ($\mu_i^{mM} = \mu_i^b, \mu_j^{mM} = \mu_j^b$), i ako ove uslove uvrstimo u prethodnu jednačinu, dobijamo:

$$RT \ln c_i + RT \ln x_i^{mM} f_i^{mM} = RT \ln c_i \quad (30)$$

Izraz (30) je zajednički u mnogim radovima koji tretiraju binarnu mešovitu micelu kao posebnu fazu tj. pseudofazu (Rubingh, 1979; Holland et al., 1983; Holland, 1986; Hoffmann et al., 1994; Rodenas et al., 1999).

Ukoliko se ravnoteža (30) odnosi na stanje kada upravo počinje formiranje binarne mešovite micelle, tada ukupna koncentracija (c_T) surfaktanata jeste: $c_T = c_i + c_j$, onda ravnotežna koncentracija surfaktanta **i** iz vodene faze se može izraziti pomoću kritične micelarne koncentracije mešovite micelle c_{ij} i njegovog molskog udela u smeši surfaktanata (α_i):

$$RT \ln c_i + RT \ln x_i^{mM} f_i^{mM} = RT \ln \alpha_i c_{ij} \quad (31).$$

Stoga molski udeo surfaktanta **i** u mešovitoj miceli jeste:

$$x_i^{mM} = \frac{\alpha_i c_{ij}}{f_i^{mM} c_i} \quad (32).$$

Kako za binarnu micelarnu fazu važi: $x_i^{mM} + x_j^{mM} = 1$, stoga uzimajući u obzir jednačinu (32) jeste:

$$1 = \frac{\alpha_i \text{cmc}_{ij}}{f_i^{mM} \text{cmc}_i} + \frac{(1-\alpha_i) \text{cmc}_{ij}}{f_j^{mM} \text{cmc}_j} \quad (33).$$

Iz gornje jednačine se dobija izraz za recipročnu vrednost kritične micelarne koncentracije binarne smeše surfaktanta:

$$\frac{1}{\text{cmc}_{ij}} = \frac{\alpha_i}{f_i^{mM} \text{cmc}_i} + \frac{(1-\alpha_i)}{f_j^{mM} \text{cmc}_j} \quad (34),$$

odnosno u slučaju da je binarna micelarna pseudofaza opisana kao idealna binarna tečna smeša, tj kada su $f_i^{mM} = f_j^{mM} = 1$, onda se dobija dobro poznata Clint-ova jednačina (1975).

$$\frac{1}{\text{cmc}_{ij}} = \frac{\alpha_i}{\text{cmc}_i} + \frac{1-\alpha_i}{\text{cmc}_j} \quad (35).$$

U slučaju realnih binarnih mešovityh micela za određivanje koeficijenata aktivnosti (iz jednačine 35) Rubingh and Holland (1983) su predložili primenu regular solution teorije (RST) koja se koristi za opisivanje realnih tečnih smeša. Za idealne tečne smeše važi da je promena entalpije mešanja nula ($\Delta_{\text{mix}} H_{ij}^{\text{id}} = 0$), što znači da je Gibbs-ova energija mešanja entropijske prirode: $\Delta_{\text{mix}} G_{ij}^{\text{id}} = -T \Delta_{\text{mix}} S_{ij}^{\text{id}}$. Prema RST odstupanje Gibbs-ove energije mešanja realne tečne smeše od Gibbs-ove energije mešanja idealne tečne smeše – dodatna slobodna entalpija (G_{ij}^E) – jeste entalpijskog porekla: $G_{ij}^E = H_{ij}^E$ dok $S_{ij}^E = 0$, tj. i u slučaju realnih tečnih smeša komponente su međusobno nasumično pomešane. U RST koeficijenti aktivnosti su povezani sa molaskim udelom komponente u binarnoj micelarnoj fazi i sa koeficijentom interakcije (β_{ij}):

$$\ln f_i = \beta_{ij} (1 - x_i^{mM})^2 \quad (36),$$

$$\ln f_j = \beta_{ij} (1 - x_j^{mM})^2 \quad (37).$$

Koeficijent interakcije predstavlja razliku između prosečne molarne energije međumolekulske interakcije dveju različitih gradivnih jedinica (E_{ij}) i zbira prosečnih molarnih energija međumolekulskih interakcija parova istih molekula (E_{ii}) odnosno (E_{jj}).

$$\beta_{ij} = (2E_{ij} - (E_{ii} + E_{jj})) / RT \quad (38).$$

Iz jednačine (32) može se izraziti koeficijent aktivnosti:

$$f_i^{mM} = \frac{\alpha_i c_m c_{ij}}{c_m c_i x_i^{mM}} \quad \text{i} \quad f_j^{mM} = \frac{\alpha_j c_m c_{ij}}{c_m c_j x_j^{mM}} \quad (39).$$

Kombinovanjem izraza (32) i RST jednačina (36 i 37)

$$\beta_{ij} (1 - x_i^{mM})^2 = \ln \frac{\alpha_i c_m c_{ij}}{c_m c_i x_i^{mM}} \rightarrow \beta_{ij} = \frac{1}{(1 - x_i^{mM})^2} \ln \frac{\alpha_i c_m c_{ij}}{c_m c_i x_i^{mM}} \quad (40)$$

$$\beta_{ij} (1 - x_j^{mM})^2 = \ln \frac{\alpha_j c_m c_{ij}}{c_m c_j x_j^{mM}} \rightarrow \beta_{ij} = \frac{1}{(1 - x_j^{mM})^2} \ln \frac{\alpha_j c_m c_{ij}}{c_m c_j x_j^{mM}} \quad (41)$$

odnosno izraza (40) i (41) može se dobiti jednačina za molnski udeo surfaktanta **i** u binarnoj micelarnoj pseudofazi:

$$1 = \frac{(1 - x_i^{mM})^2 \ln(1 - \alpha_j) c_m c_{ij} / (1 - x_i^{mM})}{(x_i^{mM})^2 \ln \alpha_i c_m c_{ij} / c_m c_i x_i^{mM}} \quad (42).$$

Ako se formiranje mešovite micelarne pseudofaze posmatra kao formiranje smeše iz čistih micelarnih faza njegovih gradivnih jedinica, onda promena molarne Gibbs-ove energije mešanja jeste (Holland, 1986):

$$\Delta_{\text{mix}} G_{ij} = RT(x_i^{mM} \ln x_i^{mM} + x_j^{mM} \ln x_j^{mM}) + RT(x_i^{mM} \ln f_i^{mM} + x_j^{mM} \ln f_j^{mM}) \quad (43)$$

gde je $RT(x_i^{mM} \ln x_i^{mM} + x_j^{mM} \ln x_j^{mM}) \Delta_{\text{mix}} G_{ij}^{\text{id}}$;

a $RT(x_i^{mM} \ln f_i^{mM} + x_j^{mM} \ln f_j^{mM}) G_{ij}^E$.

Izraz (43) je opšte važeći tj. model nezavisan. Primenom RST na dodatnu Gibbs-ovu energiju mešanja micelarnih pseudofaza (G_{ij}^E), tj. ukoliko se koeficijenti aktivnosti zamene RST jednačinama (36) i (37), onda se za G_{ij}^E dobija izraz koji jeste simetričan u odnosu na $x_i^{mM}=0.5$:

$$G_{ij}^E = RT\beta_{ij}(x_i^{mM} - (x_i^{mM})^2) \quad (44).$$

Rodenas et al. (1999) su za određivanje x_i^{mM} razvili metodu nezavisnu od RST. Oni polaze od jednačine za ravnotežu između surfaktanta u vodenom rastvoru i surfaktanta u binarnoj mešovitoj miceli kao pseudofazi

$$x_i^{mM} = -\alpha_i (1 - \alpha_i) \frac{\partial \ln c_{ij}}{\partial \alpha_i} + \alpha_i \quad (45).$$

Ukoliko razlika između molskog udela surfaktanta i u micelarnoj fazi po Rodenas-u (45) $(x_i^{mM})^R$ i molskog udela istog surfaktanta i po Rubingh-Holland-u $(x_i^{mM})^{R-H}$ jeste zanemarujuće, to onda znači da ispitivana smeša surfaktanta za G_{ij}^E ima simetričnu funkciju.

3.7 Metode ispitivanja micelarnih sistema

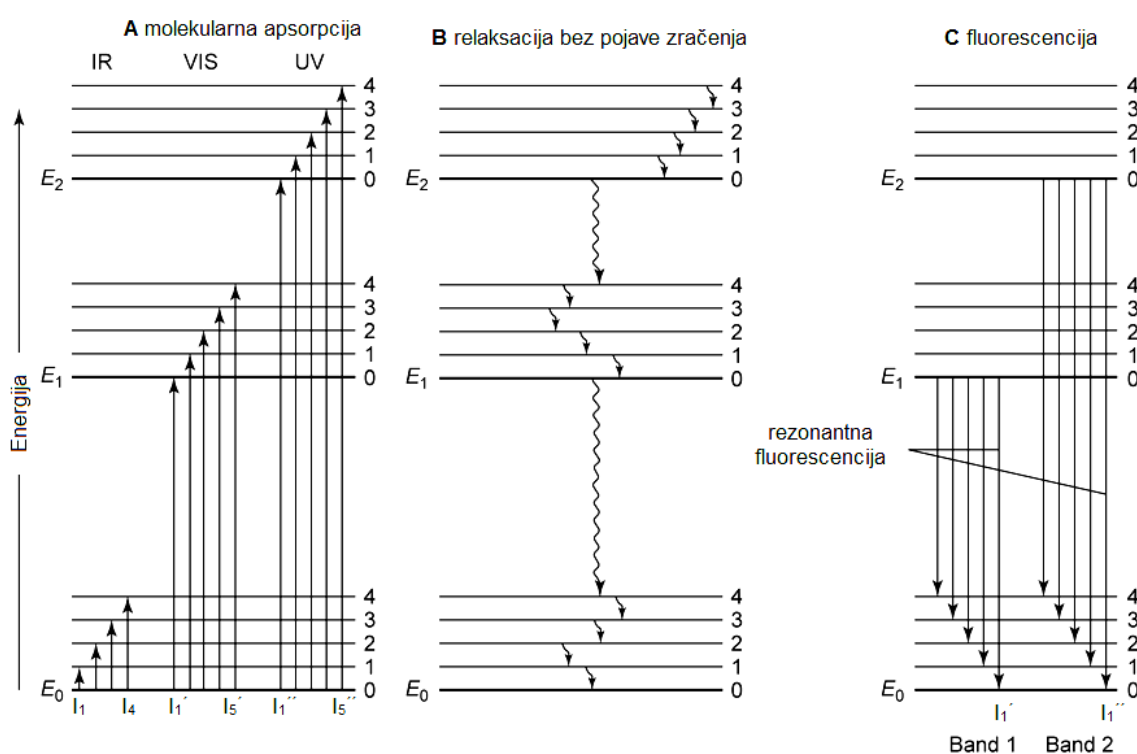
3.7.1 Spektrofluorimetrija

Fluorescentna spektroskopija (fluorimetrija, spektrofluorimetrija) predstavlja elektromagnetnu spektroskopiju koja analizira fluorescenciju uzorka. Uključuje upotrebu svetlosnog izvora, najčešće UV svetlosti, koji eksitiraju elektrone u molekulima određenih komponenti i uzrokuju emisiju svetlosti, tipično, ali ne uvek, vidljive svetlosti. Uređaji koji mere fluorescenciju se nazivaju fluorimetri.

Molekuli se nalaze na različitim energetske nivoima. Fluorescentna spektroskopija se prvenstveno bavi elektronskim i vibracionim stanjima. Uzorak koji se

ispituje ima svoje osnovno, nepobuđeno stanje niže energije i pobuđeno stanje više energije. Između ovih stanja se nalaze različita vibraciona stanja.

U fluorescentnoj spektroskopiji, uzorak se prvo ekscituje iz osnovnog stanja, apsorpcijom fotona, na neki od vibracionih ekscitiranih stanja. Kolizije ekscitiranih molekula sa drugim molekulima uzorka dovode do gubitka vibracione energije, sve dok se ne postigne najniže vibraciono stanje. Ovaj proces se najčešće prikazuje putem Jablonski dijagrama (Slika 11).



Slika 11. Dijagram energetske strukture molekula koji pokazuje neke od energetske promene što se dešavaju pri (a) apsorpciji, (b) relaksaciji bez pojave zračenja, (c) fluorescenciji molekulskih vrsta

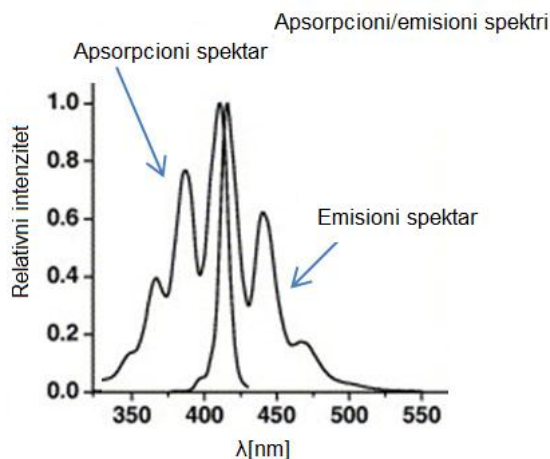
Molekul se vraća u svoje osnovno vibraciono stanje emitujući foton u procesu. Kako molekuli mogu da zauzmu bilo koji od osnovnih vibracionih stanja pri tome, emitovani fotoni će imati različite energije, i subsekventno različite frekvencije. Na ovaj način, analizom različitih frekvencija i relativnih intenziteta svetlosti emitovanih u fluorescentnoj spektroskopiji, može se definisati struktura različitih vibracionih nivoa molekula. Pri fluorescenciji molekula se pojavljuju snopovi zračenja, jer se elektronski

pobuđeni molekuli mogu relaksirati u bilo koje od nekoliko vibracionih nivoa u osnovnom elektronskom stanju. Molekulski fluorescencijski snopovi, kao i molekulski apsorpcioni snopovi, sastavljeni su od mnoštva blizu smeštenih, često teško razlučivih linija. Molekulski fluorescentni snopovi su sastavljeni uglavnom od linija većih talasnih dužina, odnosno manjih energija od onih apsorbovanog zračenja odgovornog za njihovo pobuđivanje. Taj pomak prema većim talasnim dužinama se naziva Stokes-ovim pomakom.

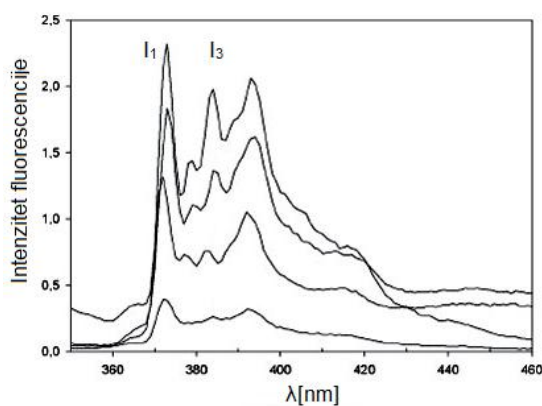
Stokes-ov pomak se objašnjava tako, što se posmatrani molekul ozrači sa fotonima talasne dužine λ_5'' . Slika 11 a prikazuje kako apsorpcija tog zračenja pomera elektron u četvrti vibracioni nivo drugog pobuđenog elektronskog stanja E_2 . Za 10^{-15} s ili manje dogodi se vibracijska relaksacija u nulti vibracioni nivo stanja E_2 (Slika 11 b). Od tog momenta relaksacija može ići dalje ili putem bez pojave zračenja, ili sa pojavom zračenja prikazanih Slikom 11 c. Pojava relaksacije uz pojavu zračenja podrazumeva da je moguća relaksacija molekula u nekoliko vibracionih nivoa osnovnog stanja, pri čemu nastaje snop 2 emitovanog zračenja. Sve te linije imaju manju energiju, ili veću talasnu energiju od ekscitacione linije λ_5'' .

Pri posmatranju molekula u pobuđenom stanju E_2 , koje podleže unutrašnjem pretvaranju u elektronsko stanje E_1 , dalja relaksacija u osnovno stanje može teći ili uz pojavu zračenja ili bez nje. Pojavi li se zračenje, nastaje fluorescentnog snop 1. Pritom postoji Stokes-ov pomak iz ultraljubičastog područja u vidljivo područje. Snop 1 može nastati i apsorpcijom vidljivog zračenja talasnih dužina λ_1' do λ_5' .

Apsorpcioni i fluorescentni spektri se često pojavljuju kao približne međusobne slike u ogledalu uz preklapanje pri rezonantnoj liniji, pošto su energetske razlike među vibracionim stanjima podjednake kako za osnovno, tako i za pobuđeno stanje.

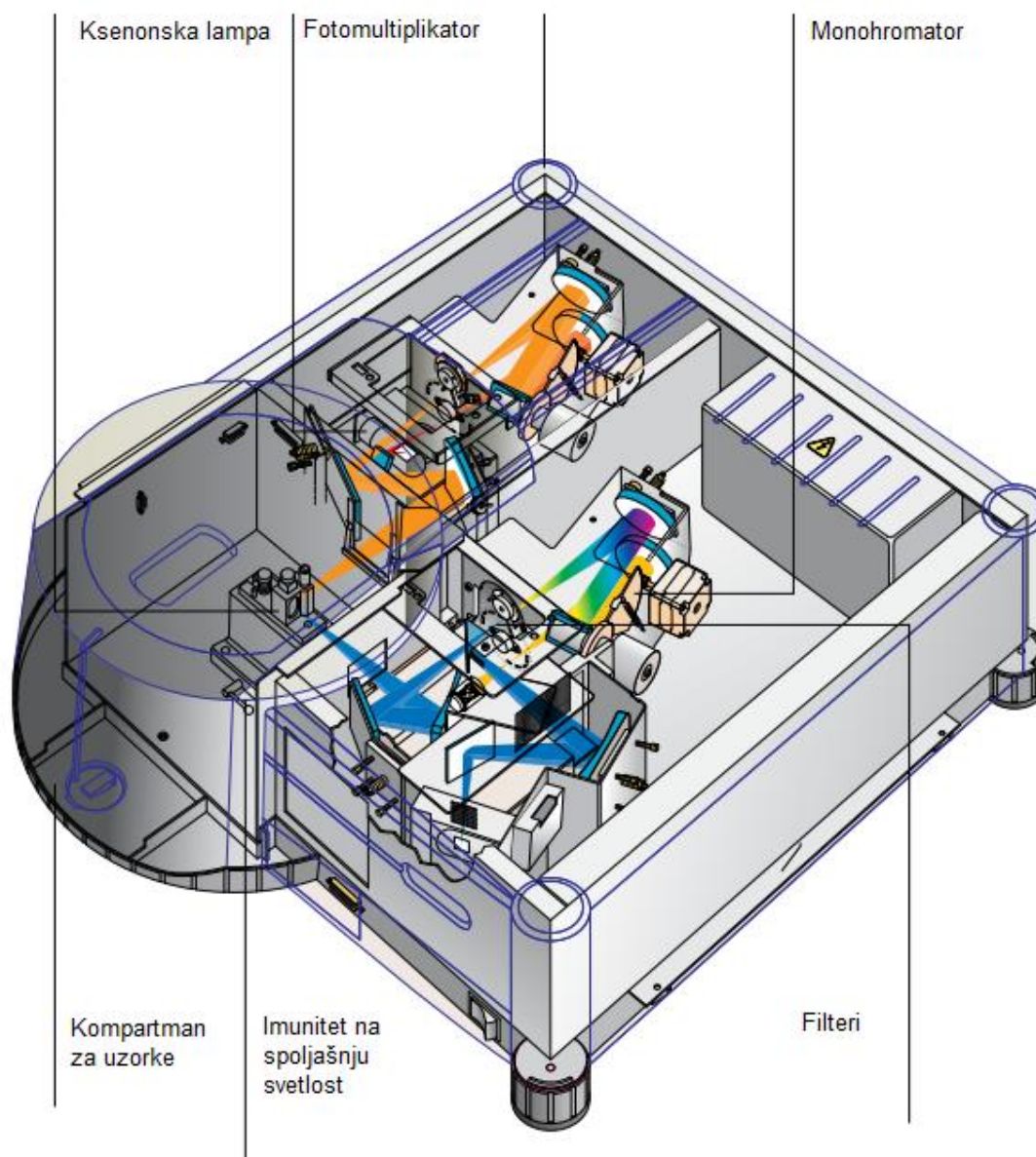


Slika 12. Apsorpcioni i emisioni spektri



Slika 13. Fluorescentni spektar pirena pri različitim koncentracijama pirena u vodenom rastvoru

Tipična fluorescentna tehnika uključuje da se različite talasne dužine emitovane svetlosti mere upotrebom monohromatora, koji uslovljavaju stalno istu talasnu dužinu ekscitirajuće svetlosti. Ovo se naziva spektar emisije. Spektar ekscitacije je suprotan, gde se emisija svetlost održava na konstantnim talasnim dužinama, a talasna dužina ekscitacione svetlosti se menja pomoću monohromatora. Emisiona mapa se meri zapisujući spektar emisije koja je rezultat niza ekscitujućih talasnih dužina i kombinujući ih zajedno. Može se iscrtati trodimenzionalna površina intenziteta kao funkcija talasnih dužina ekscitacije i emisije.



Slika 14. Tehnički nacrt Agilent Cary Eclipse Spectrofluorimeter (139)

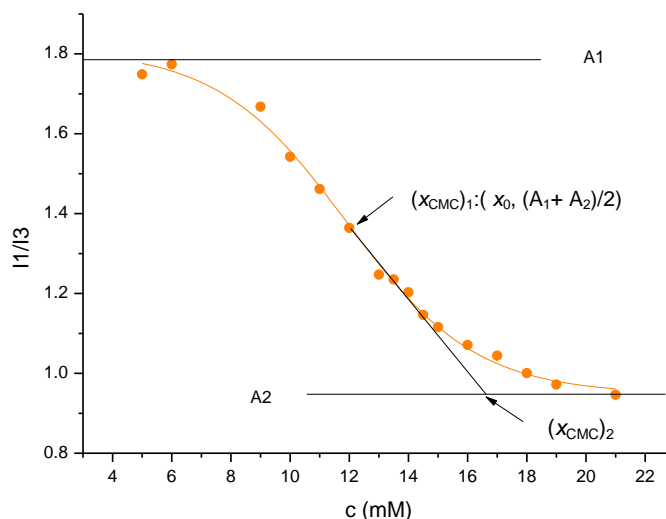
Većina spektrofluorimetara primenjuje filter za ograničavanje pobudnog zračenja i monohromatsku rešetku za disperziju fluorescencije uzorka, najčešće i za pobudno zračenje i za fluorescenciju. Snop za uzorak prvo prolazi kroz primarni monohromator, pri čemu se propušta zračenje koje uzrokuje fluorescenciju, a ograničava ili isključuje zračenje koje odgovara fluorescentnim talasnim dužinama. Fluorescentno zračenje uzorka se širi u svim smerovima, ali ga je najpogodnije posmatrati pod pravim uglom u odnosu prema pobudnom snopu. Pri drugim uglovima

raspršenje u rastvoru i na zidovima kivete može uzrokovati velike greške u merenjima intenziteta. Emitovano zračenje nakon prolaska kroz sekundarni monohromator, kojima se za merenje izoluje fluorescencijski maksimum, dolazi do fotoelektričnog detektora. Referentni snop prolazi prigušivačem, kojim se postiže smanjenje njegove snage na približno onu vrednost koju ima fluorescencijsko zračenje. Signali referentnog fotodetektora i onoga za uzorak procesiraju se diferencijalnim pojačalom čiji se izlazni signal očitava na mernoj lestvici ili pisaču.

Dokazom da se pirenski fluorescentni spektri mogu upotrebiti za određivanje kritične micelarne koncentracije rastvora surfaktanata (111), takozvani piren I_1/I_3 odnos je postao jedan od čestih metoda određivanja ovog parametra micelarnih Sistema (112). Ovaj metod se koristi ne samo u rastvorima čistih surfaktanata, već i u rastvorima mešovitim micela (113) i u studijama efekta aditiva na micelarne osobine jonskih i nejonskih surfaktanata (114).

Poznato je da kriva piren I_1/I_3 odnosa u funkciji ukupne koncentracije surfaktanata pokazuje infleksionu tačku oko kritične micelarne vrednosti. Ispod CMC-a piren I_1/I_3 odnos pokazuje polarnu sredinu; kako raste koncentracija surfaktanata, tako naglo opada I_1/I_3 odnos, ukazujući na to da piren oseti hidrofobniju sredinu. Iznad CMC piren I_1/I_3 odnos dostiže približno konstantnu vrednost zbog inkorporacije probnog molekula u hidrofobni region micidele.

Aguiar i sar. su dokazali da se funkcija zavisnosti I_1/I_3 odnosa od ukupne koncentracije surfaktanata može opisati Boltzmannovom sigmoidalnom krivom, i da se odnos $x_0/\Delta x$ može upotrebiti za odabir načina određivanja CMC (koji deo sigmoidalne krive se koristi za definiciju CMC) u rastvorima surfaktanata, kako u rastvoru jednog surfaktanta, tako i kod mešovitim micela (115).



Slika 15. Boltzmann-ova sigmoidalna kriva kao matematički opis zavisnosti odnosa I_1/I_3 od ukupne koncentracije surfaktanata

Boltzmanova sigmoidalna kriva se opisuje jednačinom:

$$y = \frac{A_1 + A_2}{1 + e^{(x-x_0)/\Delta x}} + A_2 \quad (46)$$

gde su A_1 i A_2 asimptote funkcije, x_0 predstavlja infleksionu tačku, a Δx širinu intervala preseka A_1 i A_2 sa y .

Zana i sar. su predložili da se infleksiona tačka x_0 koristi za određivanje CMC za surfaktante koji imaju vrlo niske CMC vrednosti (ispod 1 mmol/dm^3), te da se kao takva označi sa $(x_{CMC})_1$; a da se presek A_2 sa tangentom koja prolazi kroz x_0 koristi za određivanje CMC u ostalim slučajevima surfaktanata, te da se označi sa $(x_{CMC})_2$. (116). Aguirra i sar. su dalje razvili ove empirijske hipoteze i došli do zaključaka, da odnos $x_0/\Delta x$ određuje upotrebu $(x_{CMC})_1$ ili $(x_{CMC})_2$ kod surfaktanta, te ako je taj odnos manji od 10, optimalno je CMC opisati sa $(x_{CMC})_1$, a ako je veći od 10, onda sa $(x_{CMC})_2$. Takođe su dali i matematički način određivanja $(x_{CMC})_2$, naime da je to $x_0 + 2 \Delta x$ (117).

3.7.2 Konduktometrijska titracija

Konduktometrijska titracija predstavlja ispitivanje provodljivosti vodenih rastvora ispitivanih molekula u funkciji praćenja promene provodljivosti. Ekvivalentna tačka je tačka u kojoj dolazi do promene u provodljivosti rastvora. Do povećanja ili smanjenja provodljivosti dolazi usled promene koncentracija hidroksidnih ili hidronijum jona, jona koji najviše utiču na provodljivost u vodenim rastvorima.

Konduktometrijske titracije se zasnivaju na jonskim reakcijama, a tačka ekvivalencije određuje se merenjem električne provodljivosti rastvora elektrolita. Menja se električna provodljivost rastvora koji se titrira u zavisnosti od volumena dodatog titranta, odnosno rastvora koji se titrira.

Prednosti konduktometrijske titracije su moguća upotreba za analizu vrlo razređenih i obojenih rastvora, te za praćenje reakcija gde nema pogodnog indikatora, a može se upotrebiti za kiselo-bazne, redoks, taložne ili kompleksometrijske titracije.

Ova metoda se može primeniti za određivanje CMC surfaktanata ako su surfaktanti jonski. Promena električne provodljivosti vodenih rastvora surfaktanata pri postizanju CMC pojavljuje se zbog različitog stepena jonizacije ispod CMC (monomeri surfaktanata su jaki elektroliti) i iznad CMC (micele su samo delimično jonizovane). Pod pretpostavkom da se vodeni rastvori elektrolita ponašaju prema Kohlrauschovom zakonu (118), specifična provodljivost κ rastvora elektrolita se može na jednostavan način izračunati u obliku molarne jonske provodljivosti.

Ako uzmemo u obzir vodeni rastvor natrijum dodecilsulfata u dva slučaja:

1. Ispod CMC opšte je prihvaćeno da se micele ne formiraju, te stoga se specifična provodljivost vodenog rastvora SDS-a u mS/cm ($S = \Omega^{-1}$) sastoji od nezavisnih doprinosa anjona $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{-OSO}_3^-$ (SD^-) i katjona Na^+ :

$$\kappa = (\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}}) [\text{SDS}]_t = m_1 [\text{SDS}]_t \quad (47)$$

gde je m_1 nagib prave κ ispod CMC.

2. Iznad CMC, provodljivost surfaktanata opada (kao što je to slučaj i kod SDS-a). Ovo se može objasniti vezivanjem kontrajona u micele na dugolančane anjone. Procenat kontrajona u odnosu na broj dugolančanih anjona u miceli (agregacioni broj, N_{ag} (119))

se zove frakcija neutralisanog micelnog naelektrisanja, β ; te stoga je $\alpha = 1 - \beta$ stepen micelarne jonizacije. Koncentracija kontrajona (Na^+ u slučaju SDS-a) je dato sa $[\text{Na}^+]_f = \text{CMC} + \alpha[\text{SDS}]_m$ gde je $[\text{SDS}]_m = [\text{SDS}]_t - \text{CMC}$. Specifična provodljivost vodenog rastvora SDS-a pri koncentracijama iznad CMC može se podeliti na tri komponente: poreklom od anjona Na^+ i SD^- pri CMC; poreklom od micelnog anjona i od Na^+ jona u višku.

Specifična provodljivost SDS micelnog rastvora može se napisati u obliku:

$$\kappa = (\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}}) \text{CMC} + \lambda_{\text{Na}} \alpha [\text{SDS}]_m + \alpha_{\text{mic}}[\text{micele}] \quad (48)$$

Uzimajući u obzir da $[\text{micela}] = ([\text{SDS}]_t - \text{CMC})/N_{\text{ag}}$ i pretpostavljajući da je doprinos provodljivosti micidele isti kao ekvivalentan broj anjona monomera, čija je suma naelektrisanja naelektrisanje micidele, onda $\lambda_{\text{mic}} = \alpha N_{\text{ag}} \lambda_{\text{SD}}$ i jednačina 48 postaje jednačina 49:

$$\kappa = (\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}}) \text{CMC}(1 - \alpha) + (\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}})\alpha [\text{SDS}]_t = \kappa_0 + m_2[\text{SDS}]_t \quad (49)$$

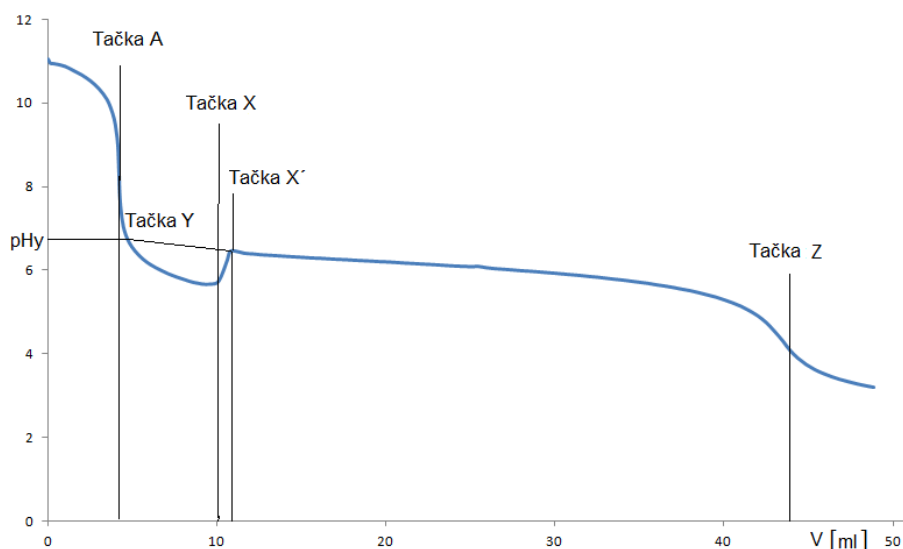
gde $m_2 = m_1 \alpha$ a α predstavlja nagib prave funkcije zavisnosti κ od $[\text{SDS}]_t$ iznad CMC, a κ_0 presek.

CMC vrednost se može odrediti bilo kao presek dve prave definisane jednačinama 47. i 49., ili iz preseka prave iznad CMC (jednačina 49.) zajedno sa nagibima m_1 i frakcione micelarne jonizacije α , koja se može odrediti kao odnos nagiba funkcije provodljivosti iznad i ispod CMC, to jest $\alpha = m_2/m_1$ (120).

3.7.3 Potencijometrijska titracija

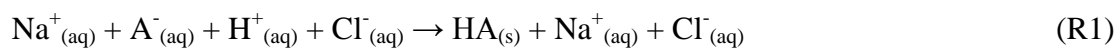
Dok su natrijumove i kalijumove soli (A^-) slobodnih di- i trihidroksi žučnih kiselina rastvorne u vodi, protonovani oblici slobodnih žučnih kiselina (HA) su relativno nerastvorni u vodi. Pri koncentracijama iznad kritične micelarne koncentracije (CMC) žučne kiseline su solubilizovane u micelama, stoga im se povećava rastvorljivost pri ovim koncentracijama. Uticaj pH vrednosti na žučne kiseline se

najbolje može objasniti analizom titracione krive tipične žučne soli koji se dobija titracijom baznog rastvora soli žučne kiseline sa hlorovodoničnom kiselinom.



Slika 16. Titraciona kriva žučne soli sa hlorovodoničnom kiselinom

Na početku titracije neophodne su visoke pH vrednosti rastvora (veće od 10) poreklom od viška natrijum-hidroksida koji se dodaje u rastvor soli žučnih kiselina. Žučna kiselina je pri ovim pH vrednostima potpuno jonizovana. Titracija sa hlorovodoničnom kiselinom se sprovodi dok se cela količina žučne kiseline ne prevede u protonovan oblik. Hemijska reakcija u uprošćenom obliku za precipitaciju je sledeća:



gde je $\text{Na}^+_{(\text{aq})} + \text{A}^-_{(\text{aq})}$ potpuno jonizovana so žučne kiseline, a $\text{HA}_{(\text{s})}$ predstavlja nerastvornu kiselinu. Nerastvoran oblik žučne kiseline se pri precipitaciji u nekoj meri ugrađuje u micide koje formiraju anjoni žučnih kiselina pri određenoj koncentraciji. Iz titracione krive se mogu izračunati solubilizacija i pK_a vrednosti kiseline.

Titraciona kriva anjona žučne kiseline iznad CMC je data na Slici 16. Inicijalni deo titracione krive predstavlja titraciju male dodate količine natrijum hidroksida. Na infleksionoj tački W, konveksni deo krive postaje naglo konkavan, ukazujući na prvu ekvivalentnu tačku (deo na kojoj reakcija opisana jednačinom (R1) počinje da se odvija). Posle ove tačke se pH vrednost sporije menja, sve do tačke X, gde naglo dolazi

do precipitacije, pH se naglo poveća do X' zbog adsorpcije H^+ jona od strane precipitata, bez daljeg dodatka kiseline. Ovoj promeni često prethodi Tindalov efekat.

Sa svakim sukcesivnim dodatkom HCl-a, ekvivalentna količina žučne kiseline se istaloži, koja se ponaša kao pufer produkujući plato na titracionoj krivi bez nagle promene pH vrednosti. Pri kraju titracije, dolazi do promene krive u konveksan oblik, i kada dođe do završetka reakcije prikazane jednačinom (R1), dolazi do pojave još jedne infleksione tačke Z, koja je krajnja infleksiona tačka. Ekstrapolacija puferskog dela krive horizontalno od tačke X' do tačke Y pokazuje tačku na kojoj bi počela precipitacija kristala žučne kiseline, da nije došlo do superstauracije. Između tačaka X i Y, pojavljuje se superstauracija, te se takav rastvor ne nalazi u ekvilibrijumu.

Od početka pa do kraja titracije, prisutne su dve faze (tečna i kristalna), i pošto rastvor između tačaka X i Y nije stabilan, XY je jedini deo krive koji prikazuje termodinamički ekvilibrijum za tečnu fazu. Tačka Y predstavlja maksimalnu rastvorljivost žučne kiseline (HA) u rastvoru anjona žučne kiseline (A^-) pre supersaturacije.

Iz ovakvih titracionih kriva moguće je izračunati sledeće karakteristike sistema:

1. ukupnu količinu hlorovodonične kiseline (TOT) koja je neophodna da se istitriše određena količina soli žučnih kiselina (od tačke W do tačke Z);
2. pH vrednost na kojoj dolazi do precipitacije žučne kiseline iz rastvora koji pokazuje supersaturaciju (pH u tački X), i pH na kojoj bi se prvi molekuli istaložili da nije bilo supersaturacije (pH na X'), drugim rečima ekvilibrijumski pH u tački precipitacije;
3. maksimalnu rastvorljivost kiseline u rastvoru soli žučne kiseline. Iznad CMC broj anjona žučne kiseline neophodne da solubilizuje jedan molekul žučne kiseline u micelarnom rastvoru. A^-/HA se može dobiti iz sledećih podataka:

$$\frac{A^-}{HA} = \frac{\text{količina kiseline od Y do Z}}{\text{količina kiseline od W do Y}} \quad (50)$$

4. pojednostavljena formula Beck-a i Steenberg-a koja se može koristiti za izračunavanje pK_a vrednosti žučnih kiselina iz dela WY krive pomoću sledeće formule:

$$pK_a = pH_y + \log \frac{HA}{TOT-HA} + \frac{0,5\sqrt{\mu}}{1+\sqrt{\mu}} \quad (51)$$

gde je pH_y tačka pH vrednost u tački Y, TOT je ukupna količina hlorovodonične kiseline neophodna za završetak reakcije (51), a HA je količina kiseline dodata od prve ekvivalentne tačke (W) do tačke Y. μ je ukupna jonska jačina u tački Y.

Ekwall i sar. su detaljno ispitivali natrijum holat i natrijum deoksiholat, i došli do zaključka da je pK_a vrednost promenjiva sve do formiranja micela. U nekom intervalu koncentracije dok su prisutni monomeri žučne kiseline i micela, dolazi do povećanja pK_a vrednosti. Kada se cela količina žučnih kiselina prevede u micela, dolazi do uspostavljanja relativno konstantne, više pK_a vrednosti (121).



Slika 17. Radiometer Analytical TIM870 Titration Manager (140)

4 EKSPERIMENTALNI DEO

4.1 Solubilizacija holesterola pomoću okso derivata ispitivanih žučnih kiselina i njihova osmotska otpornost

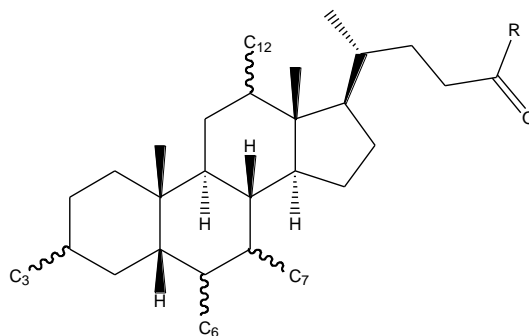
4.1.1 Cilj rada

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi odnos između strukture (stereochemija) ispitivanih žučnih kiselina i njihove sposobnosti solubilizacije holesterola (C_{Chm}) i ravnotežne micelarne solubilizacije holesterola (x_{Chm}). Drugi cilj je bio da se pronađe struktura žučne kiseline, koja rastvara holesterol, ali ne pokazuje membranotoksičnost. Ova studija solubilizacije holesterola se primarno fokusira na okso derivate holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline (Slika 17), što dosad nije ispitivano.

4.1.2 Materijal

Holna, deoksiholna i henodeoksiholna kiselina (Sigma, 98%) su korišćene kao polazne supstance za sintezu njihovih okso derivate (Slika 17).

3α -hidroksi-12-okso- 5β -holanska kiselina (12-oksolitoholna kiselina) i $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-okso- 5β -holanska kiselina (12-oksohenodeoksiholna kiselina) su sintetisane po procedurama Miljković i sar. (126), dok su $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-okso- 5β -holanska kiselina (7-oksodeoksiholna kiselina) i 3α -hidroksi-7-okso- 5β -holanska kiselina (7-oksolitoholna kiselina) su sintetisane po Tullaru (127). 3α -hidroksi-7,12-diokso- 5β -holanska kiselina (7,12-dioksolitoholna kiselina) je sintetisana selektivnom oksidacijom 7α -hidroksi grupe $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-okso- 5β -holanoata prema procedurama Tullar-a (127). Polazna supstanca za sintezu 12-hidroksi-3,7-diokso- 5β -holanske kiselina (12-hidroksi-3,7-dioksoholanska kiselina), je bila metil holat, koji je selektivno oksidovan prema reakcijama Kuwada i sar. (128). 3,7,12-triokso- 5β -holanska kiselina (3,7,12-trioksoholanska kiselina), 3,12-diokso- 5β -holanska kiselina (3,12-dioksoholanska kiselina) i 3,7-diokso- 5β -holanska kiselina (3,7-dioksoholanska kiselina) su sintetisani postupcima Fieser-a i Rajagopalan-a (129). Hiodeoksiholna kiselina (Sigma, Novi Zeland 98%). Sve žučne kiseline su transformisane u odgovarajuće soli poznatom procedurom (130).



	Naziv strukture (skraćena)	Supstituenti			
		C ₃	C ₆	C ₇	C ₁₂
(1)	3 α ,12 α -dihidroksi-5 β -holanska kiselina; Deoksiholna kiselina (D)	α -OH			α -OH
(2)	3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -holanska kiselina; Henodeoksiholna kiselina (CD)	α -OH		α -OH	
(3)	3 α ,6 α -dihidroksi-5 β -holanska kiselina; Hiodeoksiholna kiselina (HD)	α -OH	α -OH		
(4)	3 α -hidroksi-12-okso-5 β -holanska kiselina; 12-oksolitoholna kiselina (12-oxoLC)	α -OH			=O
(5)	3 α -hidroksi-7-okso-5 β -holanska kiselina; 7-oksolitoholna kiselina; (7-oxoLC)	α -OH		=O	
(6)	3,7-diokso-5 β -holanska kiselina; 3,7-dioksoholanska kiselina; (3,7-dioxoC)	=O		=O	
(7)	3,12-diokso-5 β -holanska kiselina; 3,12-dioksoholanska kiselina; (3,12-dioxoC)	=O			=O
(8)	3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β -holanska kiselina; Holna kiselina (C)	α -OH		α -OH	α -OH
(9)	3 α ,12 α -dihidroksi-7-okso-5 β -holanska kiselina; 7-oksodeoksiholna kiselina; (7-oxoD)	α -OH		=O	α -OH
(10)	3 α ,7 α -dihidroksi-12-okso-5 β -holanska kiselina; 12-oksohenodeoksiholna kiselina; (12-oxoCD)	α -OH		α -OH	=O
(11)	12 α -hidroksi-3,7-diokso-5 β -holanska kiselina; 12 α -hidroksi-3,7-dioksoholanska kiselina; (12-OH-3,7-dioxoC)	=O		=O	α -OH
(12)	3 α -hidroksi-7,12-diokso-5 β -holanska kiselina; 7,12-dioksolitoholna kiselina; (7,12-dioxoLC)	α -OH		=O	=O
(13)	3,7,12-triokso-5 β -holanska kiselina; 3,7,12-trioksoholanska kiselina (dehidroholna k.) (3,7,12-trioxoC)	=O		=O	=O

Slika 18. Strukture ispitivanih žučnih kiselina

Holesterol (Aldrich, 95%) je rekristalizovan tri puta iz 95% vrućeg etanola, zatim se kristalizovao kao holesterol monohidrat (131).

4.1.3 Metode

4.1.3.1 Određivanje solubilizacionog kapaciteta žučnih soli za holesterol

Solubilizaciona moć žučnih kiselina je određena metodama Armstrong-a i Carey-a (131). Fino usitnjen holesterol monohidrat 100mg (0.2580 mmol) je stavljen u erlenmajer i dodato mu je 10ml vodene suspenzije natrijumove soli žučne kiseline (150 mM, 0.15 M NaCl, pH 7.4 $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^-$).

U slučajevima natrijumovih soli 12-hidroksi-3,7-dioksoholanske, 3-hidroksi-7,12-dioksoholanske i 3,7,12-trioksoholanske kiseline, zbog limita detekcije, zapremina suspenzije je bila 20ml. Sadržaj erlenmajera je termostatiran 7 dana na 37 °C uz mešanje na magnetnoj mešalici (300 rpm). Posle toga suspenzija se filtrirala pomoću prethodno zagrejanog filtera (37 °C, 0.22 µm). U slučaju deoksiholne, 12-oksolitholne, henodeoksiholne i holne kiseline uzorci su uzimani direktno iz filtrata (100 µl), dok u slučaju ostalih žučnih kiselina filtrat je evaporisan do suvog praška. Ako su ispitivane soli hiodeoksiholne i 7-oksolitholne kiseline, filtrat je ispran sa 5ml destilovane vode, dok u slučaju 12-oksohenodeoksiholne, 7-oksodeoksiholne, 3,12-dioksoholanske, 3,7-dioksoholanske, 7-hidroksi-3,12-dioksoholanske, 12-hidroksi-3,7-dioksoholanske i 3,7,12-trioksoholanske kiseline suvi ostatak je rastvoren u destilovanoj vodi (1.00 ml) i uzet je alikvot od 100 µl za analizu holesterola.

Holesterol je određen enzimskim metodama holesterol oksidaze (Reanal, Budapest) putem merenja apsorbance na 500 nm na Agilent 8453 spektrofotometru, upotrebom destilovane vode kao slepa proba.

Sposobnost solubilizacije holesterola (C_{Chm}) je izražen kao broj molova rastvorenog holesterol monohidrata po molu žučne kiseline (molarna frakcija rastvorenog holesterola) (131).

4.1.3.2 Određivanje ekvilibrijumske micelarne solubilizacije holesterola na osnovu krive solubilizacije

Ekvilibrijumska micelarna solubilizacija holesterola pomoću žučnih kiselina je određena prema modifikovanoj verziji eksperimenta za određivanje solubilizacije lecitina (132).

Suspenzije holesterol monohidrata 10mg (0.0258 mmol) i natrijumovih soli žučnih kiselina (20 ml, 0.15 mM NaCl, pH 7.4 $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^-$) su pripremljene tako da su koncentracije žučnih soli bile od 2 mM do 10 mM. Ako se nije postigla solubilizacija holesterola, nove serije rastvora su pripremane od 10 mM do 20 mM, i tako dalje. Suspenzija holesterol monohidrata i žučnih kiselina je termostatiran na 37 °C u vodenom kupatilu tokom 48 h uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici (300 rpm). Koncentracija holesterola se određuje direktno iz filtrata enzimatskom metodom (Reanal, Budapest). Ukoliko kod neke žučne kiseline nije došlo do solubilizacije holesterola do 250 mM (koncentracija soli žučne kiseline) onda se eksperiment za tu žučnu so ponavlja tako da je količina holesterol monohidrata u suspenziji 1mg (0.0025 mmol). Ravnotežna koncentracija x_{Chm} (molarna frakcija rastvorenog holesterola) se određuje na osnovu funkcije zavisnosti solubilizacije holesterola od koncentracije soli žučne kiseline.

4.1.3.3 Određivanje osmotske otpornosti

Osmotska otpornost se određuje na osnovu krvi pacova (Wistar) prema Jakovljeviću (133).

U eksperimentu je formirano 14 grupa pacova (po jedna grupa za svaku ispitivanu žučnu kiselinu i jedna kontrolna grupa). Svaka grupa je sačinjena od 7 jedinki eksperimentalne životinje. Pri određivanju osmotske rezistencije eritrocita narkotisanom životinji (etarska narkoza) u repnu venu se ubrizgava rastvor (3mM pH 7.4 $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^-$) ispitivane Na-soli žučne kiseline u dozi od 0.01 mmolkg⁻¹ (kod kontrolne grupe fiziološki rastvor). Nakon faze raspodele žučnih kiselina, posle 45 minuta, vadi se krv iz leve komore srca eksperimentalne životinje u epruvetu sa antikoagulansom (citratna krv). Uzorak citratne krvi (100µl) se stavlja u seriju hipotoničnih rastvora NaCl (0.00; 0.05; 0.10; 0.15; 0.20; 0.25; 0.30; 0.35; 0.40; 0.45; 0.50; 0.55; 0.60; 0.65; 0.70; 0.75 %NaCl) i u izotonični rastvor (0.90%NaCl). Rastvori se centrifugiraju

(3 min, 1500 obrtaja u minuti). Koncentracija hemoglobina se određuje spektrofotometrijski (134) iz supernatanta. Smatra se da je došlo do hemolize u nekom od hiptotoničnih rastvora ukoliko je relativno povećanje koncentracije hemoglobina δ_{HB} u datom hipotoničnom rastvoru c_{HB-h} u odnosu na koncentraciju hemoglobina c_{HB-i} u izotoničnom rastvoru (0.90%NaCl) veći od 0.1 (10%): $\delta_{HB} = (c_{HB-h} - c_{HB-i}) / c_{HB-i} > 0.1$

Molekul smanjuje osmotsku rezistenciju eritrocita ukoliko se hemoliza javlja u hiptoničnom rastvoru čija je koncentracija veća od 0.45% NaCl.

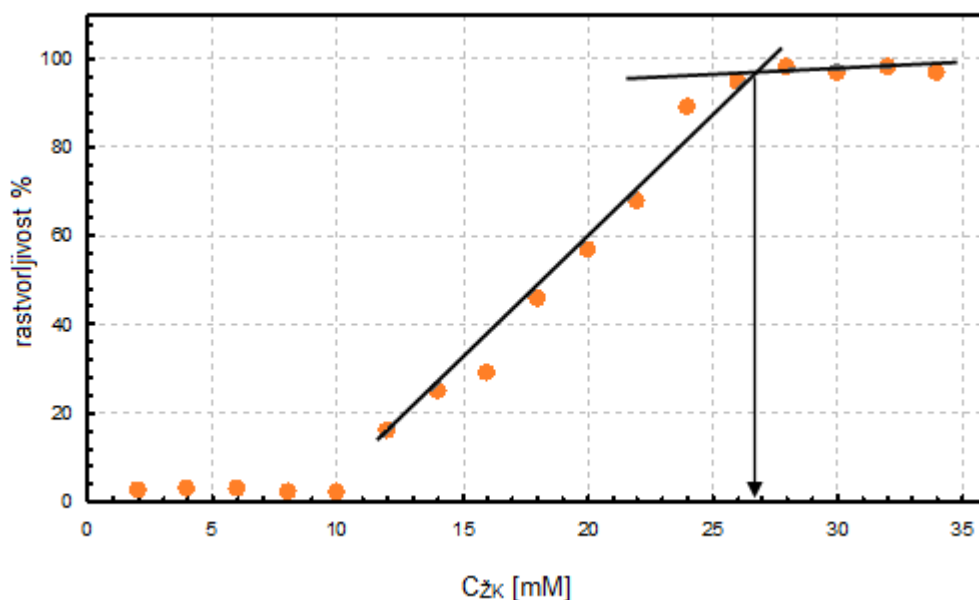
4.1.3.4 Obrada podataka

Hijerarhijska klasifikacija, korelacija i glavna analiza komponenata (Principal Component Analysis, PCA) su dobijeni upotrebom programskog paketa Statistica 8.0. 3D modeli (energestki najpovoljniji) žučnih kiselina su generisani upotrebom MOPAC protokola (ChemBio3D Ultra 11.0).

4.1.4 Rezultati i diskusija

4.1.4.1 Micelarna solubilizacija holesterola

Kapacitet solubilizacije holesterola (C_{Chm}) soli žučnih kiselina je određena metodom Armstrong and Carey-a (131) (Tabela 2) prema kome ispitivane soli žučnih kiselina se primenjuju u ekvimolarnim količinama u rastvorima gde je njihova koncentracija iznad CMC. Takođe je određena i ravnotežna micelarna solubilizacija holesterola (x_{Chm}) na osnovu krive solubilizacije (Slika 19).



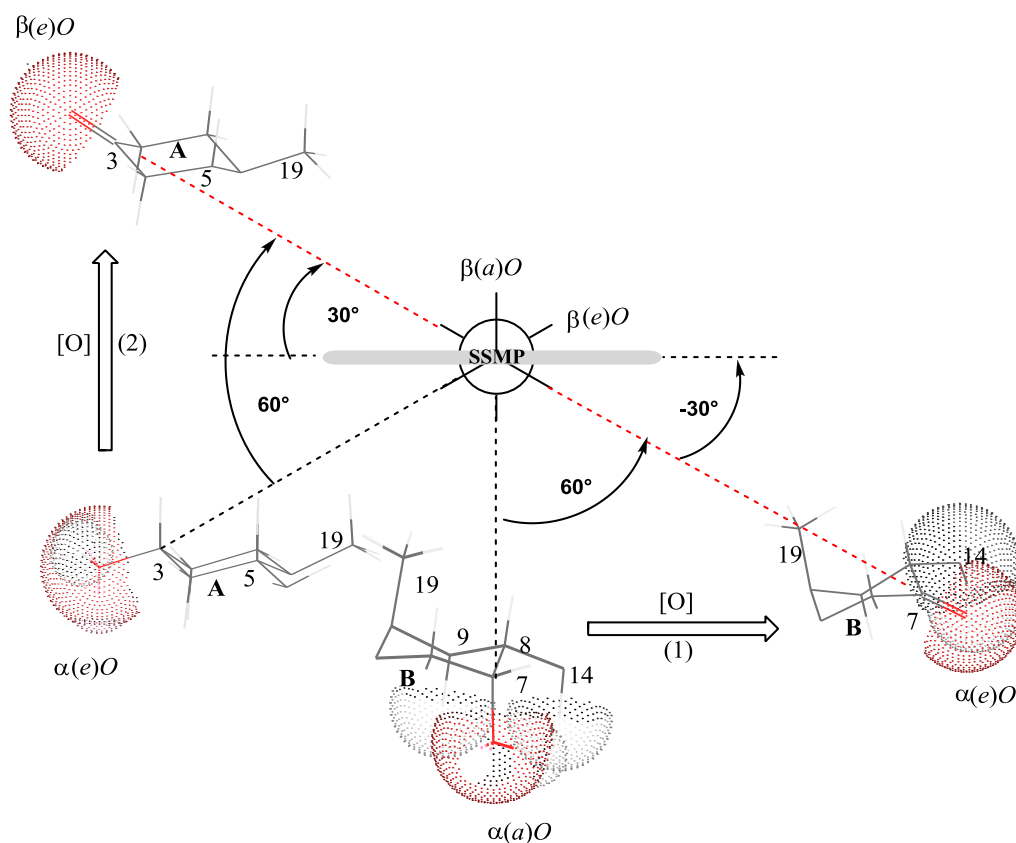
Slika 19. Primer krive solubilizacije holesterol monohidrata (1mg) kod 7-oksolitoholne kiseline, strela na slici pokazuje koncentraciju žučne kiseline pri kojoj je 100% solubilizacija, te na osnovu ove koncentracije se računa x_{Chm}

Vrednosti kapaciteta solubilizacije holesterola i vrednosti ravnotežne micelarne solubilizacije holesterola se međusobno statistički značajno razlikuju kod sledećih žučnih kiselina: deoksiholna kiselina, henodeoksiholna kiselina, holna kiselina, hioholna kiselina i 7-oxolitoholna kiselina (Tabela 2). Ove različite vrednosti solubilizacije holesterola kod gore navedenih žučnih kiselina je moguće objasniti na osnovu vrste miceli koje one formiraju. Naime, na osnovu Partai-jeve simulacije molekularne dinamike (135) je poznato da holna kiselina ispod 30 mM gradi dimere sa vodoničnim vezama pored uobičajenih Small-ovih miceli sa hidrofobnim jezgrom, što onda smanjuje moć solubilizacije holesterola, pošto se smanjuje broj micela sa hidrofobnim kavezom. Drugo objašnjenje može da bude u vrednostima ravnotežnih konstanti (K) građenja mešovutih miceli soli žučnih kiselina i holesterola. Vrednosti K su veoma male za žučne kiseline sa dve i tri okso grupe, stoga njihova promena koncentracije (iznad CMC) malo utiče na moć solubilizacije holesterola. Eksperimentalni podaci za kapacitet solubilizacije holesterola ne razlikuju se statistički od literaturnih podataka (131) (Tabela 2).

Tabela 2 Eksperimentalne vrednosti i literaturni podaci

Žučne kiseline	CMC	C_{Chm}	x_{Chm}	C_{Chm}
	[mM]	[mol/mol ŽK]		
	lit. ^{136,137}	exp. Srednje±SD (n=7)		lit. ¹³¹
(1) Deoksiholna kiselina	5.50	0.072±0.003	0.057±0.004	0.069±0.01
(2) Henodeoksiholna kiselina	5.75	0.061±0.002	0.048±0.003	0.056±0.003
(3) Hiodeoksiholna kiselina	17.00	0.0065±0.0005	0.0051±0.0005	
(4) 12-oksolitoholna kiselina	18.50	0.016±0.005	0.013±0.005	
(5) 7-oksolitoholna kiselina	22.50	0.0058±0.0003	0.0047±0.0004	
(6) 3,7-dioksoholanska kiselina	75.00	0.0012±0.0004	0.0010±0.0005	
(7) 3,12-dioksoholanska kiselina	72.00	0.0010±0.0004	0.0010±0.0005	
(8) Holna kiselina	8.00	0.032±0.002	0.026±0.002	0.032±0.002
(9) 7-oksodeoksiholna kiselina	60.00	0.0017±0.0004	0.0016±0.0003	
(10) 12-oksohenodeoksiholna kiselina	65.00	0.0022±0.0005	0.0024±0.0003	
(11) 12 α -hidroksi-3,7-dioksoholanska kiselina	102.00	0.00053±0.00020	0.00053±0.00020	
(12) 7,12-dioksolitoholna kiselina	100.00	0.00075±0.00025	0.00070±0.0003	
(13) 3,7,12-trioksoholanska k. (dehidroholna k.)	140.00	0.00±0.00015	0.00±0.00010	

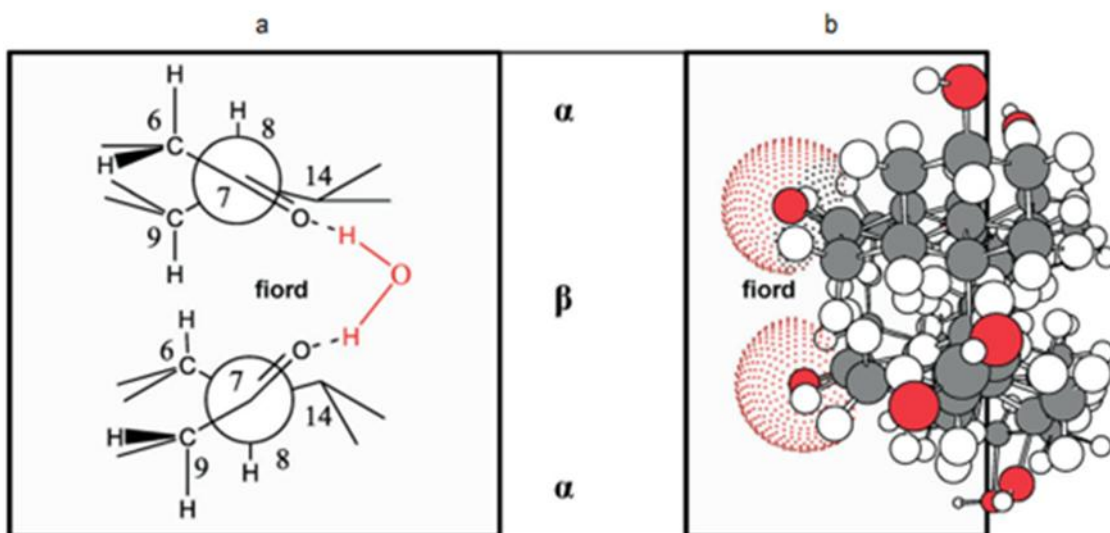
Sa povećanjem broja OH grupa kao i sa supstitucijom OH grupa sa okso grupama smanjuje se moć solubilizacije holesterola (pad vrednosti C_{Chm} i x_{Chm}) kao i tendencija ka samoagregaciji (povećavaju se vrednosti CMC, Tabela 2). Efekat okso grupa na moć solubilizacije holesterola žučnih kiselina se može se objasniti orijentacijom okso grupe prema srednjoj ravni steroidnog skeleta i na osnovu stabilnosti mešoviti micela koje se formiraju od žučnih kiselina i holesterola.



Slika 20. Pomeranje kiseonikovog atoma prema srednjoj ravni steroidnog skeleta (SSMP) putem oksidacije α aksijalne (1) i α ekvatorijalne (2) OH grupe u okso grupe. (Presek u odnosu na A i B prsten steroidnog skeleta)

Oksidacijom α aksijalnih (a) OH grupa holne kiseline (OH grupe sa C7 i C12 metilenskih grupa steroidnog skeleta) odnosno $\alpha(a)$ OH grupa deoksiholne kiseline i henodeoksiholne kiseline nastaju okso grupe čiji atomi kiseonika imaju α ekvatorijalne (e) položaje (Slika 20). Prema tome atomi kiseonika C7 i C12 okso grupa su pomereni za 60° u odnosu na položaje $\alpha(a)$ OH grupa (Newman-ova projekciona formula), to jest sa srednjom ravni steroidnog sistema prstenova (SSMP) zaklapaju ugao od -30° . Oksidacijom α ekvatorijalne (e) OH grupe (C3 OH grupa holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline) nastaje okso grupe čiji atomi kiseonika imaju $\beta(e)$ orijentaciju, to jest zaklapaju ugao od 30° sa SSMP (Slika 20). Pri supstituciji OH grupa okso grupama nastaju derivati kod kojih je atom kiseonika pomeren ka β strani steroidnog skeleta. Prisustvo okso grupa smanjuje stabilnost mešovityh micela žučnih kiselina i holesterola zbog ulaska molekula vode u pukotine – fjordove

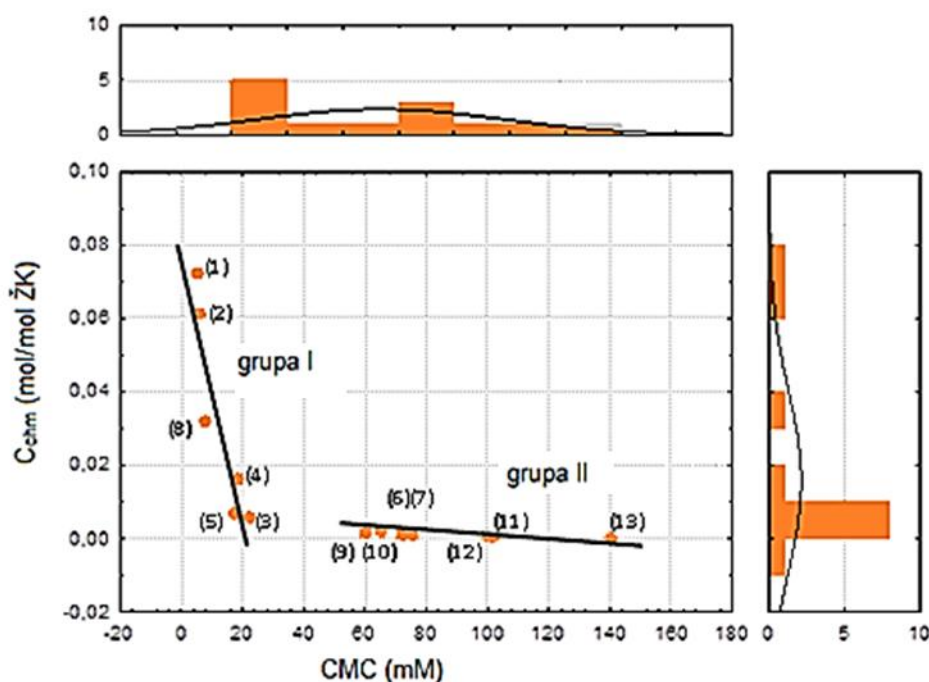
(137,138,139,140) koji se nalaze na površini micela gde se dva monomera sudaraju (Small-ov model primarnih micela). Molekuli vode se vodoničnim vezama vezuju za okso grupe i stvaraju vodonične mostove koji stabilizuju micela bez holesterola (ovaj način stabilizacije nije moguć ako monomer žučne kiseline ima α aksijalnu OH grupu) (137,138,139). Ovo snižava hidrofobnost unutrašnjeg kaveza micela smanjujući mogućnost prihvatanja hidrofobnog molekula gosta (holesterol) i smanjuje solubilizaciju holesterola pomoću okso derivata žučnih kiselina (Slika 21). Kawamura et al. (141) je na sličan način objasnio smanjenu moć solubilizacije holesterola kod tauroursodeoksiholne kiseline. Naime, ova žučna kiselina ima C7 β ekvatorijalnu OH grupu koja je pomerena prema angularnim metil grupama, stoga u Small-ovoj miceli C7 OH grupe susednih žučnih kiselina grade međusobno vodonične veze, pa je micela kompaktnija, to jest teže prihvata holesterol u hidrofobni kavez.



Slika 21. Efekat fjorda (a) isečen iz strukture micela 7-monoketoholne kiseline u Newman-ovoj projekciji (b) presek micela

Odnos hidrofobne i hidrofilne površine molekula žučnih kiselina determiniše njihovu samoasocijaciju (građenje micela) kao i formiranje mešovitih micela sa holesterolom. Pored toga, za veliki broj žučnih soli su poznate vrednosti kritičnih micelarnih koncentracija (CMC), stoga ukoliko postoji funkcionalna zavisnost između C_{Chm} odnosno x_{Chm} i CMC na osnovu postojećih vrednosti CMC moglo bi se proceniti

(predvideti) x_{Chm} odnosno C_{Chm} i za one žučne kiseline koje nisu obučene eksperimentima u ovom radu. U ravni koju definišu CMC i kapacitet solubilizacije holesterola C_{Chm} , mogu se identifikovati dve linearne grupe (Slika 22). Prvu grupu formiraju deoksiholna kiselina (D), henodeoksiholna kiselina (CD), holna kiselina (C), 12-oksolitoholna (12-oxoLC), hiodeoksiholna (HD) i 7-oksolitoholna kiselina (7-oxoLC), a drugu grupu formiraju mono – i diokso derivati holne kiseline (7-oxoD, 12-oxoCD, 12-OH-3,7-dioxoC, 7,12-dioxoLC), 3,7,12-trioksoholanska kiselina (3,7,12-trioxoC), 3,12-dioksoholanska kiselina (3,12-dioxoC) and 3,7-dioksoholanska kiselina (3,7-dioxoC).



(1): D; (2): CD; (3): HD; (4): 12-oxoLC; (5): 7-oxoLC; (6): 3,7-dioxoC; (7): 3,12-dioxoC; (8): C; (9): 7-oxoD; (10): 12-oxoCD; (11): 12-OH-3,7-dioxoC; (12): 7,12-dioxoLC; (13): 3,7,12-trioxoC

Slika 22. Korrelacija između kapaciteta solubilizacije holesterola C_{Chm} i kritične micelarne koncentracije (CMC) žučnih kiselina

Mala vrednost koeficijenta korelacije između CMC žučnih kiselina i x_{Chm} ($r = -0.677$) je rezultat formiranja linearnih grupa I i II. Poznato je u literaturi da žučne kiseline formiraju linearne kongenerne grupe, na primer holna kiseline i njeni okso derivati, dihidroksi derivati žučnih kiselina i njihovi okso derivati, itd.(142). U ovom

slučaju linearne kongenerne grupe nisu "čiste" homologne grupe zato što se grupa II formira blizu okso derivata holne, deoksiholne i henodeoksiholne kiseline. Stereohemijskom analizom je utvrđeno da žučne kiseline iz grupe I zadovoljavaju sledeći izraz:

$$\max 2\alpha(e)O \wedge 0\alpha(a)O \vee \max 2\alpha(a)O \vee \max 1\alpha(e)O \quad (52)$$

gde O označava atom (jezgro) kiseonika (OH ili okso grupa), $\alpha(e)$ predstavlja α ekvatorijalnu orijentaciju dok $\alpha(a)$ odgovara α aksijalnoj orijentaciji. Prema gornjem izrazu u prvu grupu ulaze žučne kiseline koje maksimalno imaju dva atoma (jezgra) kiseonika (OH ili okso grupa) u α ekvatorijalnom položaju bez α aksijalne OH grupe u steroidnom skeletu, kao što su hiodeoksiholna kiselina ($C3-\alpha(e)OH$ i $C6-\alpha(e)OH$), 7-oksolitoholna kiselina ($C3-\alpha(e)OH$ i $C12-\alpha(e)okso$ grupe), odnosno žučne kiseline koje maksimalno imaju dve OH grupe u α aksijalnoj orijentaciji i jedan O atom (OH ili okso grupa) u α ekvatorijalnoj orijentaciji (holna kiselina: $C3-\alpha(e)OH$, $C7-(a)OH$ i $C12(a)OH$). Isto tako u grupu I ulaze i one žučne kiseline koji imaju manji broj O atoma u odgovarajućim orijentacijama od maksimalnog broja prema izrazu (52), kao što su deoksiholna kiselina ($C3-\alpha(e)OH$ i $C12-\alpha(a)OH$) i henodeoksiholna kiselina ($C3-\alpha(e)OH$ i $C7-\alpha(a)OH$).

Ako se stereohemijski uslov (52) ispuni – atomi kiseonika mogu biti na različitim C atomima kao OH grupe ili okso grupe – u ravni CMC - C_{Chm} žučne kiseline formiraju grupu koja se određuje sa linearnom funkcijom:

$$x_{Chm} = 0.0613 - 0.0027CMC \quad (53)$$

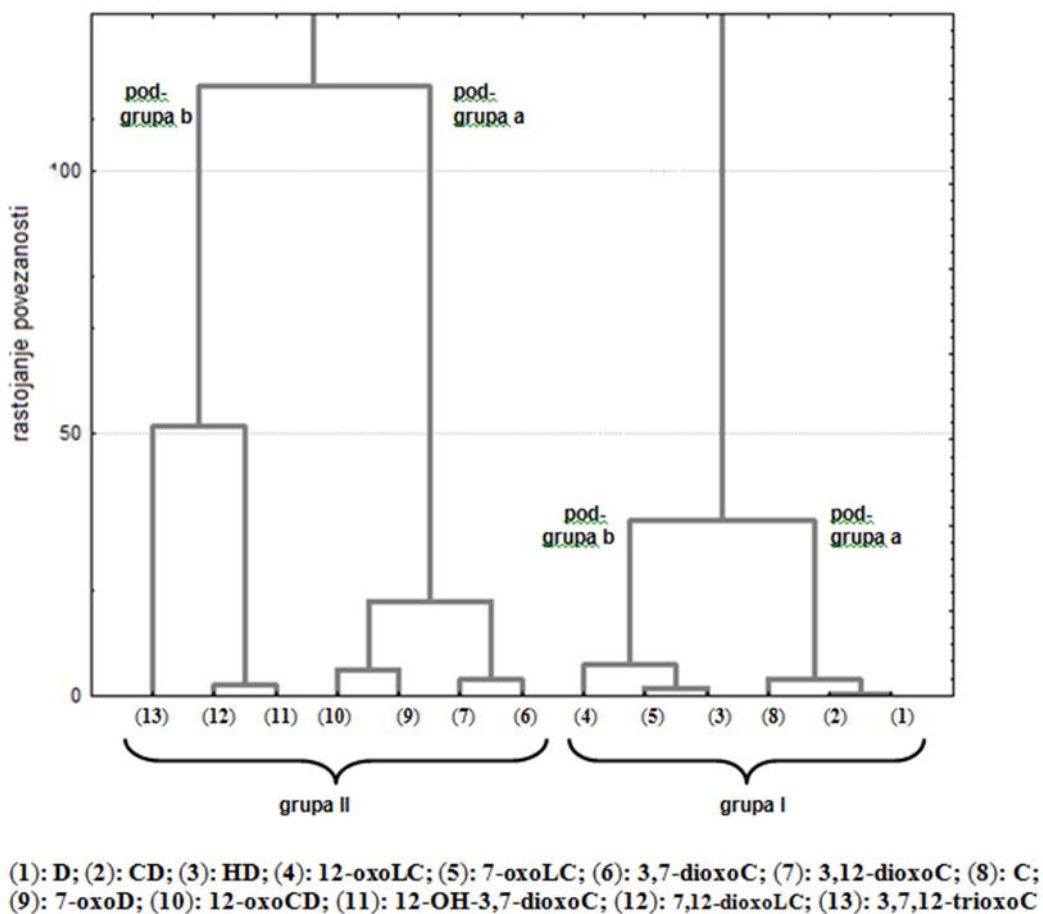
$$r = -0.91149$$

Žučne kiseline koje ne odgovaraju jednačini 2 formiraju grupu II. Linearna regresiona jednačina grupe II je:

$$x_{Chm} = 0.0030 - 2.35 \cdot 10^{-5} CMC \quad (54)$$

$$r = -0.84413$$

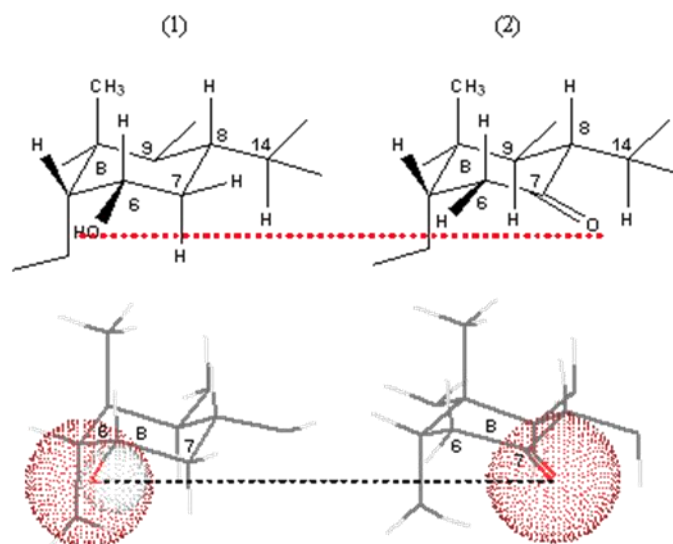
Između parametara solubilizacije holesterola C_{Chm} i x_{Chm} postoji velika korelacija (Pearson-ova korelacija: 0.99989) što pokazuje da kapaciteti solubilizacije holesterola verno opisuju redosled žučnih kiselina u solubilizaciji holesterola.



Slika 23. Hijerarhijsko grupisanje ispitivanih žučnih kiselina u odnosu na CMC i C_{Chm}

Grupisanje žučnih kiselina u ravni CMC i C_{Chm} (CMC - x_{Chm}) takođe je potvrđeno i hijerarhijskom metodom grupisanja na osnovu vrednosti CMC i C_{Chm} (centroidno pravilo povezivanja). Naime, u dobivenom dendrogramu takođe se formiraju dve grupe (Slika 23). U grupi I mogu se identifikovati dve podgrupe (**a** i **b**). Za podgrupu **Ia** je karakteristično da molekuli žučnih kiselina imaju C3 $\alpha(e)$ OH grupu i maksimum dve $\alpha(\alpha)$ OH grupe. Za podgrupu **Ib** karakteristično je to, što su prisutne $\alpha(e)$ orijentisani kiseonikovi atomi bez $\alpha(a)O$. U grupi II takođe postoje dve podgrupe.

IIa grupa ima $\beta(e)O$ (C3 okso grupu), dok žučne kiseline iz grupe IIb nemaju $\beta(e)O$. Dendrogram pokazuje veliku sličnost između hiodeoksiholne kiseline i 7-oksolitoholne kiseline, naime, njihove vrednosti x_{Chm} se statistički ne razlikuju značajno ($p < 0.05$) (Tabela 2.). Ova njihova sličnost u sloubilizaciji holesterola verovatno potiče od toga da kod obe žučne kiseline atomi kiseonika vezanih za steroidni skelet imaju istu orijentaciju prema srednjoj ravni steroidnog sistema prstenova (Slika 24). Iako gornji stereochemijski zaključak važi i za 12-oksolitoholnu kiselinu, međutim ova žučna kiselina za x_{Chm} ima znatnu veću vrednost nego predhodne dve. Ova razlika je posledica ekraniranja C12 okso grupe sa bočnim nizom (138) (stvaranje vodoničnih veza između C12 okso i OH grupa COOH funkcionalne grupe, ili kada je COOH jonizovana, postoje vodonične veze između C12 okso grupe i karboksilnih grupa, Bertolesi et al. (143) su našli vodoničnu vezu između bočnog niza i C12 okso grupe dehidroholne kiseline) i sa ovim 12-oksolitoholna kiselina je hidrofobnija od 7-oksolitoholne kiseline i hiodeoksiholne kiseline (R_{M0} retencioni index u reverzno faznoj tankoslojnoj hromatografiji – molekularna lipofilnost za 12-oxoLC je 4.68 dok za 7-oxoLC je 4.49) (132).



Slika 24. Prostorni raspored kiseonikovih atoma: (1) u B prstenu hiodeoksiholne kiseline, (2) u B prstenu 7-oksolitoholne kiseline

4.1.4.2 Osmotska otpornost

U ovom eksperimentu se određuje osmotska rezistencija eritrocita u hipotoničnom rastvoru. Postoji neto fluks molekula vode J_{voda} iz rastvora u intracelularni prostor eritrocita koji se opisuje sledećom jednačinom (125):

$$J_{voda} = p_{voda} \Delta\pi \approx p_{voda} RT \Delta c_{NaCl} \quad (55)$$

U gornjoj jednačini p_{voda} predstavlja permeabilnost membrane za molekule vode, dok je $\Delta\pi$ razlika osmotskog pritiska na površini membrane (u unutrašnjosti ćelije osmotski pritisak je visok, dok je u hipotoničnom rastvoru nizak, tako da se molekuli vode kreću prema unutrašnjosti ćelije) dok Δc_{NaCl} predstavlja razliku koncentracije soli između intracelularne tečnosti eritrocita i hipotoničnog rastvora. Kako se koncentracija NaCl rastvora smanjuje, tako $\Delta\pi$ vrednosti postaju veće (takođe Δc_{NaCl} raste), pa bi se fluks molekula vode morao povećavati. Ali, ako se permeabilnost membrane prema molekulima vode ne menja, pored visokih vrednosti $\Delta\pi$ nema transporta molekula vode u unutrašnjost ćelija, te ne dolazi do hemolize. Ako ksenobiotik ne oštećuje ćelijsku membranu (permeabilnost membrane se ne menja) smatra se da 0.45% rastvor NaCl-a nema dovoljnu $\Delta\pi$ da bi stvorilo neto fluks vode kroz membranu, tj. da izazove hemolizu (125,133).

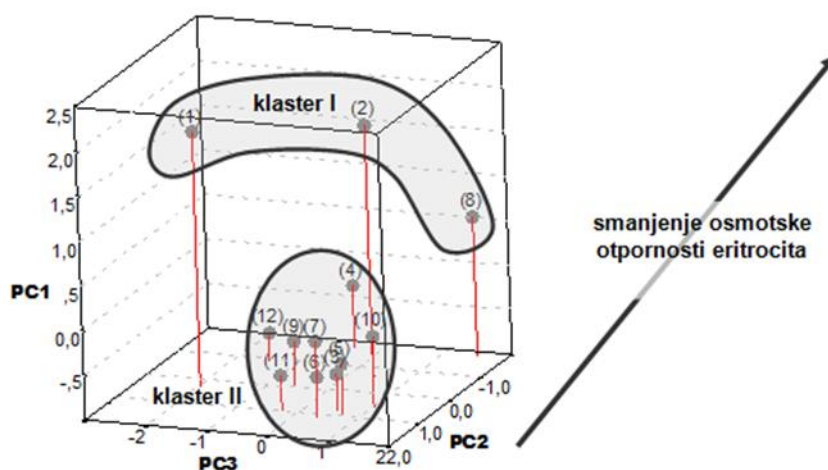
Ukoliko žučna kiselina uništava membranu, to dovodi do veće propustljivosti membrane za molekule vode p_{voda} . Ukoliko se hemoliza javlja u hipotoničnom rastvoru čija je koncentracija veća od 0.45% NaCl onda se smatra da ispitivani molekul smanjuje osmotsku rezistenciju (otpornost) eritrocita u tom opsegu koncentracija.

Tabela 3. Osmotska otpornost, siva boja označava hemolizu $\delta_{HB} \geq 0.1$, sa tamno sivom bojom je označena koncentracija NaCl posle koje dolazi do hemolize, tj ispitivani molekuli smanjuju osmotsku otpornost

ŽK	koncentracija NaCl 10 ⁻¹ [%]															
	7.50	7.00	6.50	6.0	5.50	5.0	4.50	4.0	3.50	3.0	2.50	2.0	1.50	1.0	0.5	0.0
kont.	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.06±0.02	0.08±0.02	0.11±0.03	0.10±0.03	0.12±0.03
-1	0.06±0.01	0.09±0.01	0.12±0.01	0.14±0.02	0.13±0.02	0.17±0.03	0.24±0.04	0.24±0.04	0.27±0.05	0.25±0.04	0.29±0.04	0.26±0.04	0.28±0.05	0.31±0.05	0.30±0.04	0.39±0.05
-2	0.07±0.01	0.09±0.01	0.09±0.02	0.12±0.02	0.16±0.04	0.19±0.03	0.25±0.05	0.26±0.05	0.26±0.04	0.27±0.05	0.31±0.05	0.29±0.04	0.30±0.05	0.34±0.06	0.36±0.05	0.42±0.07
-3	0.06±0.01	0.05±0.00	0.04±0.00	0.06±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.09±0.02	0.11±0.01	0.12±0.02	0.15±0.02	0.18±0.02	0.20±0.03	0.23±0.02	0.25±0.05
-4	0.04±0.00	0.05±0.00	0.05±0.01	0.07±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.09±0.02	0.08±0.01	0.12±0.02	0.13±0.02	0.14±0.02	0.17±0.02	0.20±0.02	0.24±0.03	0.28±0.04	0.29±0.06
-5	0.06±0.01	0.07±0.01	0.04±0.00	0.06±0.01	0.06±0.02	0.05±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02	0.11±0.01	0.12±0.02	0.13±0.02	0.15±0.02	0.19±0.02	0.22±0.02	0.24±0.05	0.24±0.05
-6	0.06±0.00	0.06±0.01	0.04±0.00	0.05±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.09±0.01	0.08±0.02	0.08±0.02	0.11±0.01	0.11±0.01	0.14±0.02	0.17±0.02	0.21±0.04	0.23±0.05	0.26±0.04
-7	0.05±0.00	0.06±0.01	0.04±0.00	0.06±0.01	0.06±0.01	0.08±0.02	0.06±0.02	0.09±0.02	0.10±0.01	0.11±0.02	0.13±0.02	0.15±0.02	0.18±0.02	0.22±0.03	0.25±0.05	0.24±0.04
-8	0.05±0.00	0.06±0.01	0.06±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02	0.06±0.02	0.10±0.01	0.13±0.02	0.16±0.02	0.20±0.03	0.23±0.04	0.25±0.04	0.28±0.05	0.28±0.05	0.30±0.06	0.36±0.05
-9	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.00	0.06±0.01	0.07±0.02	0.06±0.02	0.08±0.02	0.08±0.01	0.10±0.02	0.11±0.02	0.12±0.02	0.14±0.01	0.18±0.02	0.22±0.03	0.23±0.04	0.27±0.05
-10	0.05±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.06±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01	0.07±0.02	0.07±0.02	0.09±0.01	0.12±0.02	0.14±0.02	0.18±0.03	0.19±0.02	0.22±0.03	0.24±0.04	0.25±0.03
-11	0.06±0.01	0.05±0.00	0.06±0.00	0.06±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02	0.08±0.02	0.10±0.02	0.12±0.01	0.15±0.02	0.17±0.03	0.20±0.03	0.22±0.03	0.23±0.03
-12	0.04±0.00	0.05±0.00	0.05±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02	0.06±0.01	0.07±0.01	0.07±0.02	0.08±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.14±0.02	0.18±0.02	0.20±0.02	0.23±0.04	0.23±0.04
-13	0.05±0.00	0.04±0.00	0.04±0.00	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02	0.08±0.01	0.08±0.01	0.10±0.01	0.12±0.01	0.15±0.02	0.18±0.02	0.20±0.03

$n = 7$; kont. – kontrolna grupa

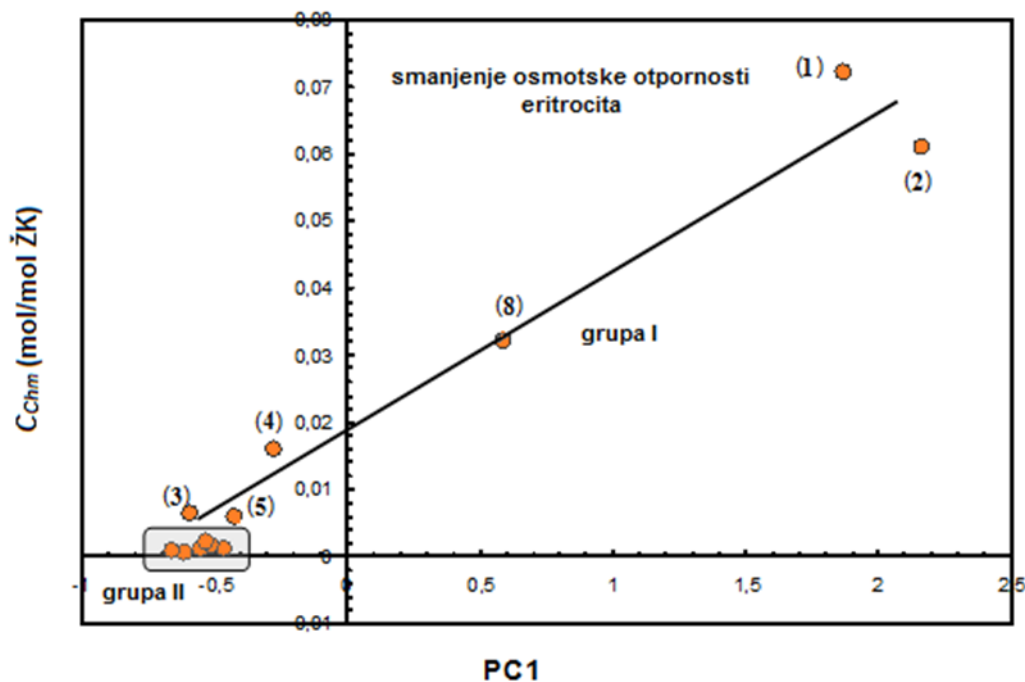
U Tabeli 3 predstavljeni su vrednosti δ_{HB} za ispitivane žučne kiseline. U hipotoničnim rastvorima NaCl čija je koncentracija veća od 0.45% hemoliza se javlja kod deoksiholne i henodeoksiholne kiseline, dok se kod holne kiseline hemoliza javlja pri 0.45%. Stoga ove žučne kiseline smanjuju osmotsku rezistenciju eritrocita. Primenom principial component analysis (PCA) u Tabeli 3 prikazane su glavne komponente PC1, PC2, PC3 koje objašnjavaju 98.99% ukupne varijanse u tabeli vrednosti δ_{HB} . U prostoru vrednosti glavnih komponenti (Slika 25) ispitivane žučne kiseline formiraju dva klastera. U klaster I ulaze žučne kiseline: deoksiholna (1), henodeoksiholna (2) i holna (8) kiselina, dok u klaster II okso derivati žučnih kiselina i hiodeoksiholna kiselina (3). Grupisanje žučnih kiselina u prostoru vednosti glavnih komponenti potvrđuju zaključak na osnovu kriterijuma $\delta_{HB} > 0.1$ da žučne kiseline (1) i (2) odnosno (3) smanjuju osmotsku rezistenciju eritrocita. Naime, ove žučne kiseline formiraju odvojeni klaster (Slika 25).



(1): D; (2): CD; (3): HD; (4): 12-oxoLC; (5): 7-oxoLC; (6): 3,7-dioxoC; (7): 3,12-dioxoC; (8): C; (9): 7-oxoD; (10): 12-oxoCD; (11): 12-OH-3,7-dioxoC; (12): 7,12-dioxoLC; (13): 3,7,12-trioxoC

Slika 25. Formiranje klastera ispitivanih žučnih kiselina u prostoru vrednosti glavnih komponenti (PC1, PC2, i PC3 objašnjavaju 98,99% ukupne varijanse u Tabeli 3) dobijeni na osnovu podataka δ_{HB} (Tabela 3)

Ulazak hiodeoksiholne kiseline (3) u grupu sa žučnim kislelinama sa okso grupom u steroidnom skeletu potvrđuje značaj ekvivalentne stereoheмиjske orijentacije α C6 OH grupe kod hiodeoksiholne kiseline i C7 oxo grupe 7-oksolitoholne kiseline (Slika 24). Da bi se povezala moć solubilizacije holesterola ispitivanih žučnih kiselina i njihova osmotska rezistencija izračunate su Pearsonove korelacije između C_{Chm} i vrednosti glavnih komponenti (PC1, PC2 and PC3). Signifikantna korelacija ($r = 0.981$; $p = 0.001$) postoji između C_{Chm} i PC1 (PC1 objašnjava 81.54% ukupne varijanse u Tabeli 3). Što znači da iz vrednosti (podataka) δ_{HB} soli žučnih kiselina (Tabela 3) glavna komponenta PC1 je „ekstrahovala“ informaciju o hidrofobnosti, s obzirom da hidrofobnost određuje kako solubilizaciju probnog molekula tako i membranolitičku aktivnost žučnih kiselina (131,132). Ispitivane žučne kiseline u ravni C_{Chm} - PC1 takođe formiraju dve grupe kao i u ravni C_{Chm} - CMC sa identičnim elementima (Slika 26). Hidrofobne žučne kiseline koje smanjuju osmotsku rezistenciju eritrocita (deoksiholna (1), henodeoksiholna (2) i holna (8) kiselina) se nalaze u desnom pozitivnom kvadrantu ravni C_{Chm} - PC1. Prisustvo okso grupa ili $\alpha(e)$ OH grupe umesto $\alpha(a)$ OH grupe smanjuje hidrofobnost β strane steroidnog skeleta što dovodi do smanjenja moći solubilizacije holesterola kao i do smanjenja membranolitičke aktivnosti. Žučne kiseline iz grupe II (Slika 26) ne pokazuju membranolitičku aktivnost međutim praktično i ne solubilišu holesterol. Sledeće žučne kiseline iz grupe I 12-oksolitoholna (4) > 7-oksolitoholna kiselina (5) hiodeoksiholna kiselina (3) u izvesnoj meri imaju moć solubilizacije holesterola a da pri tome *in vivo* ne smanjuju osmotsku rezistenciju eritrocita (Slika 26).



Slika 26. Grupisanje žučnih kiselina u ravni C_{Chm} – PC1 (glavna komponenta PC1 objašnjava 81.54% ukupne varijanse iz Tabele 3)

Smanjenje osmotske rezistencije eritrocita od strane deoksiholne (1), henodeoksiholne (2) i holne kiseline (8) posledica je njihove velike moći solubilizacije lecitina (132), te ove žučne kiseline gradeći mešovite micelle sa fosfolipidima ćelijskih membrana, menjaju integritet membrana to jest permeabilnost.

4.1.4.3 Kapacitet solubilizacije holesterola kod binarnih mešovutih micela žučnih soli i SDS-a

Binarne mešovite micelle žučnih soli i sodijum dodecil sulfata kod svake ispitivane žučne kiseline povećava solubilizacioni kapacitet holesterola. Pošto C12 ugljovodonični niz SDS-a teži ka radijalnoj raspodeli u agregatima, stoga su mešovite micelle sfernog ili elipsoidnog oblika. Povećava se hidrofobni domen mešovite micelle u odnosu na micelu same žučne soli, što pogoduje prihvatanju molekula holesterola. Za solubilizaciju holesterola u navedenim mešovitim micelama, ključnu ulogu ima α C3 ekvatorijalna OH grupa steroidnog skeleta. Naime, ova OH grupa je usmerena prema unutrašnjosti micelle, te stoga gradi vodoničnu vezu sa OH grupom holesterola. Ovo dokazuje da kod sistema gde su gradivne jedinice anjoni 7α OH i 12α OH derivati 5β

holanske kiseline i SDS-a, opada moć solubilizacije holesterola u odnosu na sisteme gde na steroidnom skeletu postoji ekvatorijalna C3 OH grupa. Ukoliko su gradivni elementi mešovitih micela hioholna, hiodeoksiholna, ursoholna ili ursodeoksiholna kiselina, onda mešovite micelle imaju veći kapacitet solubilizacije holesterola, dok kod čistih micela navedenih žučnih soli upravo je obrnuto. Naime, njihovi micelarni rastvori imaju manju moć solubilizacije nego micelarni rastvori natrijum holata, deoksiholata i henodeoksiholata. Objašnjenje je takođe u geometriji steroidnog skeleta. Kod hioholne, hiodeoksiholne, ursoholne i ursodeoksiholne kiseline postoji jedna OH grupa koja je pomerena za 60° u odnosu na α aksijalni položaj, prema β strani steroidnog skeleta, stoga kada steroidni skelet tangencijalno naleže na površinu micelle, onda su ove OH grupe orijentisane prema hidrofobnom kavezu agregata, te je omogućeno vodonično vezivanje holesterola.

Tabela 4. Solubilizacija holesterola pomoću mešovitih micela žučnih kiselina i natrijum dodecil sulfata

Mešovite micelle	$C_{chm}/\text{mol/mol MM}$		
	$\alpha\text{-(SDS)} = 0.25$	$\alpha\text{-(SDS)} = 0.5$	$\alpha\text{-(SDS)} = 0.75$
Na-deoksiholat + SDS	0.187	0.284	0.311
Na-henodeoksiholat + SDS	0.180	0.275	0.303
Na-holat + SDS	0.162	0.268	0.295
Na-7 α ,12 α -dihidroksi-5 β -holanat + SDS	0.106	0.241	0.262
Na-hioholat + SDS	0.214	0.289	0.328
Na-hiodeoksiholat + SDS	0.201	0.280	0.304
Na-ursoholat + SDS	0.237	0.315	0.329
Na-ursodeoksiholat + SDS	0.245	0.327	0.334
Na-7-okso-deoksiholat + SDS	0.224	0.279	0.309
Na-12-okso-henodeoksiholat + SDS	0.22	0.281	0.318

n=5

4.1.5 Zaključak

Kapacitet solubilizacije holesterola (C_{Chm}) i ravnotežna micelarna solubilizacija holesterola (x_{Chm}) međusobno pokazuju veliku korelaciju. Pri supstituciji α aksijalne OH grupe sa okso grupom ili sa α ekvatorijalnom OH grupom pomera se jezgro kiseonika ka srednjoj ravni steroidnog skeleta žučnih kiselina što onda smanjuje hidrofobnost β strane steroidnog jezgra, samim tim se smanjuje i njihova moć solubilizacije holesterola, to jest membranolitička aktivnost. Na osnovu moći solubilizacije holesterol monohidrata (C_{Chm} and x_{Chm}) i osmotske otpornosti optimalna žučna kiselina je 12-monoketodeoksiholna kiselina, koja ima 26% kapaciteta solubilizacije u odnosu na henodeoksiholnu kiselinu, ali ne pokazuje membranolitičku aktivnost.

4.2 Određivanje pK_a vrednosti žučnih soli i micelarnih sistema

4.2.1 Materijal

Natrijum-holat i natrijum-deoksiholat su poreklom Calbiochem p.a. 3α - hidroksi-12-okso- 5β -holanoična (12-oksolitoholna kiselina) kiselina i $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-okso- 5β -holanoična (12-oksohenodeoksiholna) kiselina su pripremljene prema procedurama Miljković i sar. (126). $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-okso- 5β -holanoična (7-okso-deoksiholna) kiselina je sintetisana po metodi Tullar-a (127). 3α -hidroksi-7,12-dioks- 5β -holanoična (7,12-dioksolitoholna) kiselina je sintetisana selektivnom oksidacijom 7α -hidroksilne grupe $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi-12-okso- 5β -holanoične kiseline prema procedurama Tullar-a (127). Svi okso-derivati su transformisani u natrijumove soli poznatom procedurom (130).

4.2.2 Metode

4.2.2.1 Potencimetrijska titracija

Titracija je rađena sa Radiometer Analytical TIM870 Titration Manager i upotrebom Titra Master 85 softvera. Koncentrati svakog anjona žučne kiseline su spremljeni iznad CMC, i razblaživanjem rastvora, dobijeni su radni rastvori. Titracije su

rađene u inertoj atmosferi. U rastvorima anjona holne i deoksiholne kiseline $10\mu\text{l}$ natrijum-hidroksida koncentracije $2,5\text{ mol/dm}^3$ je dodato da bi se pH vrednost rastvora podigla iznad 10. Mali višak natrijum hidroksida je dodat tokom neutralizacije okso-derivata, tako da su dobijeni rastvori imali pH vrednost veću od 10. Hlorovodonična kiselina je pripremljena u koncentraciji $0,01\text{ mol/dm}^3$ za holnu i deoksiholnu i $0,03\text{ mol/dm}^3$ za okso-derivate (standardizovana na četiri decimale). Kao alikvot je upotrebljeno 20 ml rastvora soli žučnih kiselina. Dynamic inflexion point titration metoda je korišćena, sa PHC 2001 elektrodom (kombinovani pH), brzina birete 10ml/min , 10s prihvatanje rezultata, i kriterijum stabilnosti 50mpH/min . Titracije su ponovljene tri puta i srednja pK_a vrednost je dobijena.

4.2.2.2 Konduktometrijska merenja

Konduktometrijska merenja su rađena sa vodenim rastvorima čistih natrijumovih soli žučnih kiselina. Provodljivost je merena putem postepenog razblaživanja rastvora surfaktanata sa dejonizovanom vodom. Podaci su dobijeni upotrebom Consort C 860 konduktometra. Čelija sa rastvorima je uronjena u vodeno kupatilo, kontrolišući varijaciju temperature $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$. Temperatura je držana konstantnom na $25\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.2.3 Spektrofluorifotometrijska merenja

Spektrofluorifotometrijska merenja su rađena sa Agilent Cary Eclipse fluorescence spektrofotometrom. Rastvori soli žučnih kiselina su pripremljeni upotrebom zasićenog vodenog rastvora pirena. Piren je ekscitovan na 334 nm . Praćena je promena intenziteta prvog (I_1 , 373 nm) i trećeg (I_3 , 384 nm) vibracionog snopa emisionog spektra pirena u funkciji koncentracije surfaktanata na $25\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.2.4 Obrada podataka

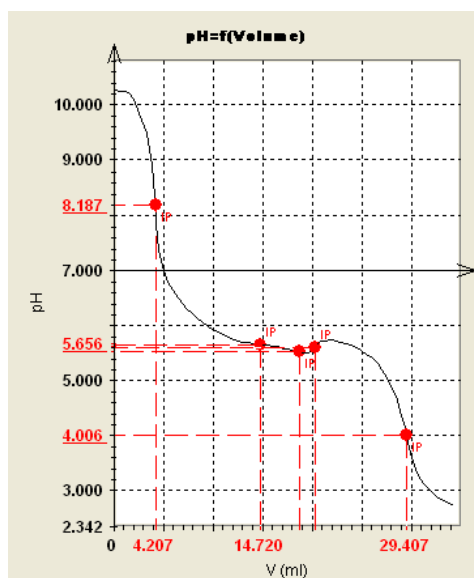
Titra Master 85 softver crta titracione krive i nalazi prevojne tačke na krivama. Za određivanje tačke ekvilibrijuma precipitacije se koristio programski paket Origin 6.1.

4.2.3 Rezultati i diskusija

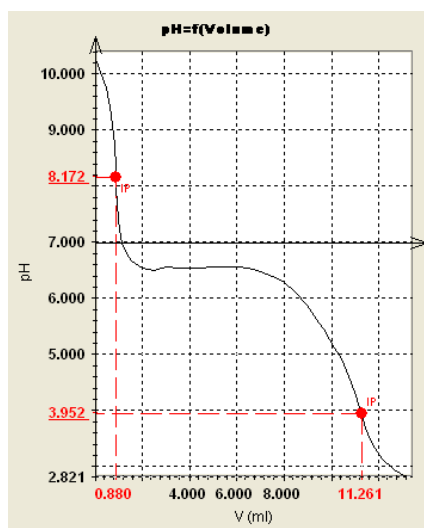
CMC vrednosti određene putem neinvazivnih tenziometrijskih i potenciometrijskih metoda su vrlo slične. Spektrofluorifotometrijske vrednosti su niže od vrednosti dobijenih putem gore pomenuta dva metoda, zbog toga što je ovo invazivna metoda, u kojoj se koristi piren kao probni molekul, koji ulazi u hidrofobni domen micle i smanjuje CMC vrednosti (Tabela 5).

CMC vrednosti ispitivanih žučnih soli se povećavaju kako se OH grupe supstituišu sa okso grupama u natrijumovim solima holne i deoksiholne kiseline. Konformaciona analiza pokazuje da tokom oksidacije α ekvatorijalne i α aksijalne OH grupe u okso grupe, atom kiseonika se pomera za 60° u odnosu na glavnu ravan steroidnog skeleta, prema konveksnoj β strani steroidnog skeleta (13,84). Ova promena u sternom položaju atoma kiseonika smanjuje hidrofobnu β stranu steroidnog skeleta. Merenja metodom reverzno-fazne tečne hromatografije visokog pritiska su pokazala da se CMC vrednosti žučnih soli određuju pomoću vrednosti hidrofobne (β) strane steroidnog skeleta (79). Prema ovome, uvođenjem okso grupa u steroidni skelet, tendencija za samoasocijacijom je smanjena, i ovo se manifestuje putem povećanja CMC vrednosti.

Potenciometrijske titracije (Slike 27 i 28) su pokazale da natrijum-holat i natrijum 12-oxo-3,7-dihidroksi-5 β -holanoat pokazuju supersaturaciju, dok deoksiholat i ostali derivati ne pokazuju.



Slika 27. Titraciona kriva natrijum-holata



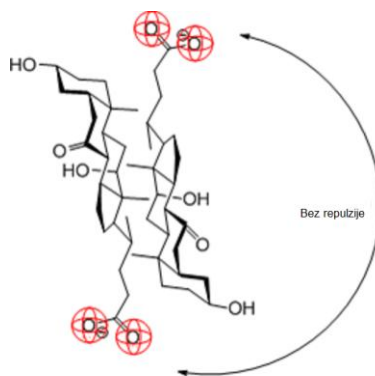
Slika 28. Titraciona kriva natrijum 12-okso-3,7-dihidroksi-5 β -holanoata

Kiselinske konstante ispitivanih soli žučnih kiselina bi trebale da budu iste ako su rastvori ispod CMC. Zbog udaljenosti OH i okso grupa od glavne ravni steroidnog skeleta, uticaj njihovog induktivnog efekta na karboksilnu grupu bočnog niza se ne uzima u obzir. Različite pK_a vrednosti (ispod CMC) su verovatno rezultat razlika hidratacije anjona/kiseline, koja je rezultat promene broja OH i okso grupa u steroidnom skeletu. Povećanje pK_a vrednosti micelnog anjona žučnih kiselina u odnosu na pK_a monomera je veće kako dolazi do povećanja hidrofobnosti soli žučne kiselina.

Tabela 5. Kritične micelarne koncentracije i pK_a vrednosti

Žučne soli	CMC/ mM			pK_a			ΔpK_a
	Tenzio metrija	Spektrofluorifotometrija	Potencijometrija	0.5 CMC	CMC	iznad CMC	
D	13	10	13	5.15	5.70	5.89	0.74
C	8	7.5	8	4.98	5.32	5.48	0.5
12-OL	20	17	20	5.66	5.71	5.74	0.08
12-OCD	65	60	65	5.4	5.48	5.52	0.12
7-OD	50	45	50	5.48	5.60	5.66	0.18
3,12-DOC	50	48	50	5.42	5.71	5.74	0.32

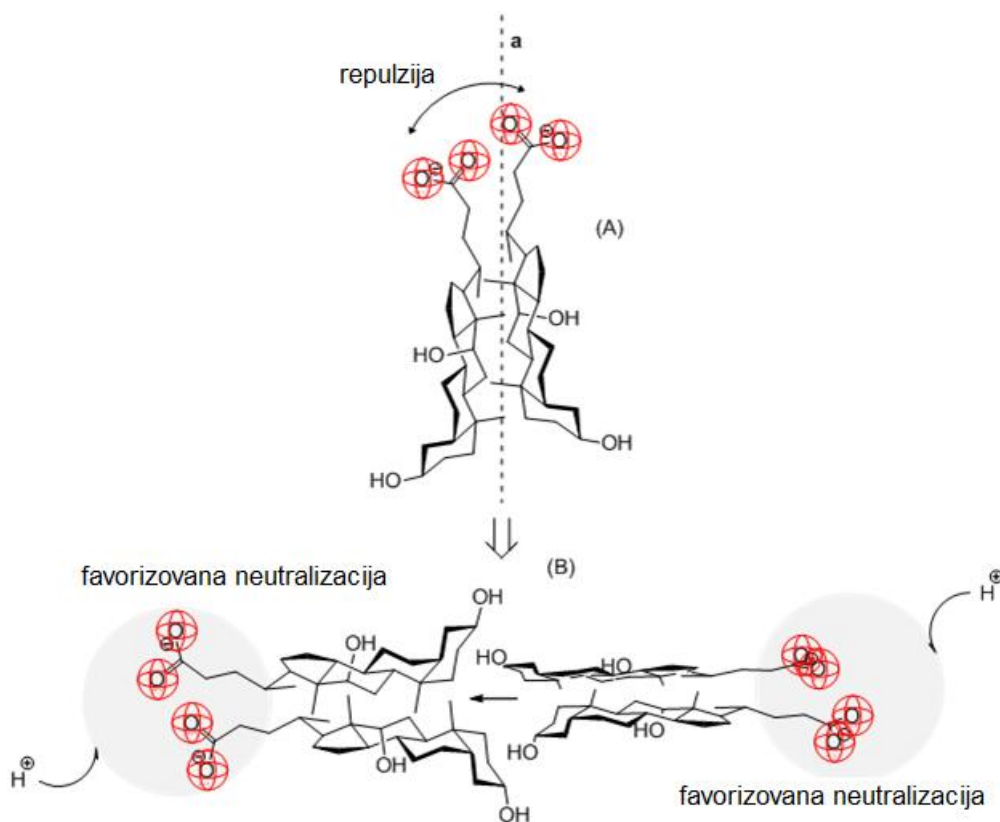
Kako idemo ka hidrofobnijim surfaktantima, micide imaju veće agregacione brojeve. Kod okso-derivata žučnih soli hidrofobna površina konveksne β strane je smanjena i imajući u vidu Small-ove modele primarnih micela žučnih kiselina, gde su konstitutivne jedinice međusobno vezane putem β strane steroidnog skeleta (144) možemo reći da okso derivati žučnih soli imaju manje agregacione brojeve od micela žučnih soli sa α aksijalnim OH grupama. NMR studije su pokazale da blizu CMC vrednosti, micide najverovatnije imaju agregacioni broj 2 (145) (postoji dimerna micela, Slika 29).



Slika 29. Dimerna micela okso-derivata anjona žučne kiseline

U primarnim dimernim micelama, karboksilne grupe su razdvojene, te nema repulzivne interakcije između njih. Ovo implicira da se polielektrolitni efekat može zanemariti. Za hidrofobne žučne soli, kao što je to natrijum deoksiholat, prema Small-ovim primarnim micelama dozvoljeni su agregacioni brojevi koji se kreću do 16. Stoga, primarna micela ima strukturni element gde su karboksilne grupe na istoj strani micide (Slika 30).

Prvo dolazi do agregacije strukturnog elementa sa karboksilnim grupama na istim stranama agregata (A). Micela $n = 4$ se formira iz dva dimerna strukturna elementa koji su povezani sa A prstenovima steroidnog skeleta, dok se jedan element rotira u odnosu na osu **a** za 40° do 60° . Zbog ovih pretpostavki, elektrostatičke repulzivne interakcije su prisutne sa obe strane micide (B). Protonovanje karboksilatnog anjona smanjuje repulzivne interakcije, što dovodi do stabilizacije micide. Zbog ovoga, pK_a vrednosti su mnogo veće u micelarnoj fazi kod hidrofobnih žučnih anjona, upoređujući sa micelarnom fazom žučnih soli dimernih micela.



Slika 30. Primer micelle natrijum deoksiholata sa agregacionim brojem $n = 4$.

Što je steroidni skelet žučne soli hidrofobniji (β strana steroidnog skeleta), kapacitet solubilizacije nejonizovane žučne kiseline je veći, tako da je manja količina anjona žučne kiseline neophodna za solubilizaciju monomera (Tabela 6).

Tabela 6. Vrednosti maksimalne solubilizacije (MS) žučne kiseline pri različitim CMC

BA/MS	CMC	1,1CMC	1,2CMC	1,3CMC	Average MS
D	4.15	5.87	6.04	7.49	5.89
C	8.56	8.89	9.72	12.17	9.83
12-OL	6.7	8.18	8.78	10.3	8.49
12-OCD	9.57	11.28	14.02	15.43	12.57
7-OD	11.23	11.78	12.64	13.13	12.19
3,12-DOC	7.43	8.5	16.71	18.33	12.74

Kod okso derivata, zajedno sa smanjenjem hidrofobnosti, struktura micelle određuje i kapacitet solubilizacije. Agregati okso-derivata pokazuju “pukotine”, takozvane fjordove na površini micelle, putem koje je hidrofobni domen micelle parcijalno izložen hidrataciji.

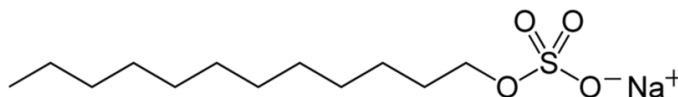
4.2.4 Zaključak

Ispitivanjem holne i deoksiholne kiseline i njihovih okso derivata, pokazalo se da hidrofobnije soli žučnih kiselina imaju veće vrednosti pK_a iznad CMC (micelarna faza). Žučne soli imaju niže vrednosti kapaciteta solubilizacije kako im se povećava hidrofobnost. CMC vrednosti koje su dobijene potenciometrijskom titracijom u ovom radu, odgovaraju vrednostima dobijenih spektrofluorifotometrijskim i tenziometrijskim metodama.

4.3 Mešovite micelle natrijum holata i natrijum dodecilsulfata u 1:1 molskom odnosu na različitim temperaturama - eksperimentalna i teoretska razmatranja

4.3.1 Materijal

U ovom radu su upotrebljeni natrijum holat i natrijum dodecil sulfat (Sigma, 99.98%).



Slika 31. Hemijska struktura natrijum dodecilsulfata

4.3.2 Metode

4.3.2.1 Spektrofluorifotometrijska merenja

Spektrofluorifotometrijska merenja su rađena sa Agilent Cary Eclipse fluorescence spektrofotometrom. Rastvori natrijum holata i natrijum dodecilsulfata su pripremljeni upotrebom zasićenog vodenog rastvora pirena. Piren je ekscitovan na 334 nm. Praćena je promena intenziteta prvog (I_1 , 373 nm) i trećeg (I_3 , 384 nm) vibracionog snopa emisionog spektra pirena u funkciji koncentracije surfaktanata na temperaturama 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, i 50 °C. Greške u određivanju CMC se procenjuju da su manje od 3% ($n = 5$).

4.3.2.2 Tenziometrijska merenja

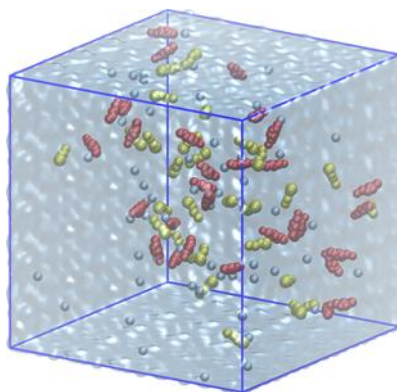
Tenziometrijska merenja su rađena sa vodenim rastvorima natrijum holata i natrijum dodecilsulfata, postepenim razblaživanjem, pomoću Krüss tenziometra (Nemačka) koristeći se *du Nouy ring* metodom. Sva merenja su ponovljena sedam puta. U svim merenjima temperatura je bila konstantna.

4.3.2.3 Konduktometrijska merenja

Konduktometrijska merenja su rađena sa vodenim rastvorima natrijum holata i natrijum dodecilsulfata. Provodljivost je merena putem postepenog razblaživanja rastvora surfaktanata dejonizovanom vodom. Podaci su dobijeni upotrebom Consort C 860 konduktometra. Čelija sa rastvorima je uronjena u vodeno kupatilo, kontrolišući varijaciju temperature ± 0.1 °C. Temperatura je držana konstantnom na 25 °C.

4.3.2.4 Simulacije molekularne dinamike

Stvaranje mešovitih micela holatnog anjona (CA) i SDS-a je ispitivano krupnozrnastom metodom molekularne dinamike (146). Najvažnije interakcije CA i SDS su opisane zrnima 4 i 8 (mesta interakcije). U ćeliju simulacije je smešteno 60 molekula surfaktanata upotrebom Packmol programskog paketa (147, 148) u 1:1 molском odnosu. Da bi se oponašali eksperimentalni uslovi, odgovarajući broj molekula vode (62.000) i 60 katjona natrijuma je dodato u prostor oblika kocke ($195 \times 195 \times 195 \text{ \AA}^3$), koji rezultuje efektivnoj koncentraciji surfaktanata od 12.3 mM (Slika 32).



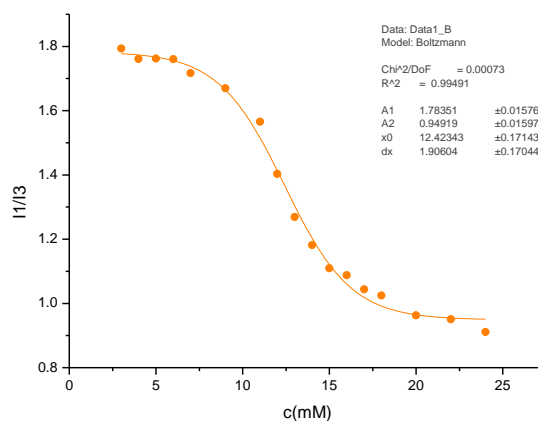
Slika 32. Inicijalna struktura molekularne simulacije krupno-zrnaste metode: CA, anjon dodecilsulfata i Na^+ su prikazani redom crveno, žuto i plavo van der Waals-ovom reprezentacijom

Računanja su vršena sa Gromacs 4.5.4 programskim paketom (149). Posle 2500 silaznih minimizirajućih koraka, sistem je podvrgnut NPT pre-ekvilibraciji. U ovom delu simulacije, veličina koraka je namešten na 4 fs a računanje je trajalo 20 ps. Posle pre-ekvilibracije, vreme je podešeno na 20 fs, i 4.2 μs duga NPT simulacija je izvršena. Tokom računanja molekularne-dinamike, primenjena je Berendsenova temperatura i šema kuplovanja pritiska 150. Temperatura je podešena na 27 °C, pritisak na 1 bar, τ_T na 1.0 ps a τ_p na 3.0 ps u pre-ekvilibraciji i 1.0 u ostalom delu simulacije. Primenjeni su periodični granični uslovi za sve 3 dimenzije i granična vrednost od 12 Å je pripisana za interakcije dugog dometa. Funkcija promene je upotrebljena za van der Waals-ove i elektrostatičke interakcije od 9 Å do 0 Å, respektivno.

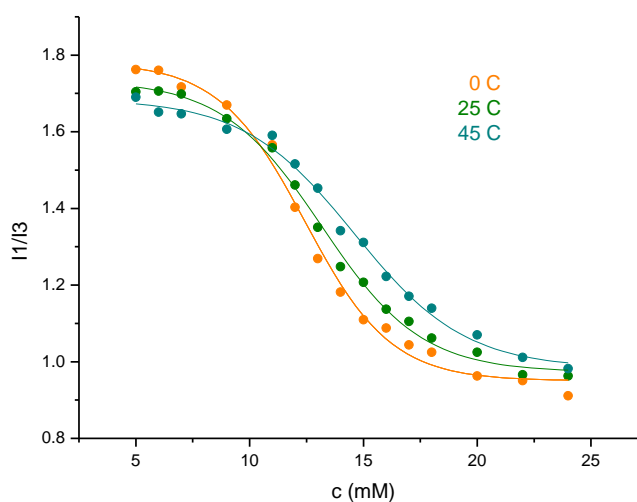
4.3.3 Rezultati i diskusija

4.3.3.1 Eksperimentalni rezultati

Na slici 33. može se videti da se odnos I_1/I_3 naglo smanjuje sa povećanjem koncentracije surfaktanata. Prema procedurama Kim i sar., ova nagla promena odnosa intenziteta prvog i trećeg emisionog snopa pirena ukazuje na početak micelizacije, uzrokujući smanjenje polarnosti mikrosredine pirena (151). Piren detektuje hidrofobniju, tj manje polarnu sredinu, pošto prelazi iz vodene faze u mešovite micelle.



Slika 33. Boltzmann-ova kriva zavisnosti I_1/I_3 od koncentracije surfaktanata



Slika 31. Promena odnosa intenziteta I_1/I_3 pirena u funkciji ukupne koncentracije surfaktanata na različitim temperaturama, CMC je određena Boltzmann-ovim fitovanjem (rezultati jednog merenja)

Zbog toga, promena u odnosu I_1/I_3 kao funkcija koncentracije surfaktanata se koristila kao metod da se utvrdi kritična micelarna koncentracija. Spektrofluorimetrijska merenja CMC vrednosti su potvrđene merenjem površinskog napona (γ) kao funkcije totalne koncentracije (c) binarnih smeša površinski aktivnih materija (presek dve prave) (152). Međusobne devijacije kritične micelarne koncentracije utvrđene ovim metodama su manje od 2% ($n = 5$) u temperaturnom intervalu od 20 °C do 50 °C (Slika 34).

Tabela 7. Agregacioni parametri za binarnu mešavinu natrijum holata i natrijum dodecil sulfata (1:1)

$t / ^\circ\text{C}$	$\text{cmc}_1(f)/\text{mM}$	$\text{cmc}_2(f)/\text{mM}$	$\text{cmc}_{\text{ex}}(f)/\text{mM}$	$\text{cmc}_{\text{ex}}(t)/\text{mM}$	x_1	x_{id}	$\beta_{1,2}$
0	9.00±0.16	10.00±0.12	4.09±0.12	4.19±0.05	0.508±0.015	0.52632	-3.32
5	9.50±0.13	10.23±0.14	4.01±0.12	4.09±0.06	0.505±0.015	0.52632	-3.56
10	10.00±0.18	10.47±0.17	4.01±0.12	4.12±0.06	0.503±0.015	0.52632	-3.72
15	10.50±0.17	10.82±0.13	4.17±0.13	4.22±0.07	0.502±0.016	0.52632	-3.74
20	11.00±0.21	11.31±0.18	4.12±0.12	4.23±0.08	0.502±0.015	0.52632	-3.97
25	11.50±0.23	11.98±0.21	4.07±0.12	4.2±0.06	0.503±0.015	0.52632	-4.23
30	12.00±0.25	12.4±0.22	4.21±0.13	4.33±0.07	0.502±0.015	0.52632	-4.24
35	12.50±0.26	13.11±0.26	4.4±0.13	4.54±0.08	0.503±0.015	0.52632	-4.25
40	13.00±0.29	13.58±0.31	4.54±0.14	4.7±0.09	0.503±0.015	0.52632	-4.28
45	13.50±0.28	14.03±0.31	4.76±0.14	4.9±0.11	0.502±0.015	0.52632	-4.22
50	14.00±0.35	14.78±0.35	6.78±0.2	7.02±0.16	0.504±0.015	0.52632	-2.98

f - spektrofluorimetrija

t - tenziometrija

cmc_1 -cmc natrijum holata

cmc_2 -cmc natrijum dodecilsulfata

Drugi termodinamički parametri su izračunati na osnovu spektrofluorimetrijskih merenja.

Eksperimentalno utvrđene kritične micelarne koncentracije (cmc^{ex} , Tabela 7) binarne smeše surfaktanata ne menja se značajno od 0 °C do 15 °C. Na nižim temperaturama, formiranje micle je određeno entropijskim efektom, to jest hidrofobnom dehidratacijom nepolarnih regiona monomer micelle. Između 15 °C i 50 °C cmc^{ex} raste, a objašnjenje ovoga je sledeće: sa daljim povećanjem temperature pokretljivost monomera u mešovitoj miceli je veća, i to destabilizuje mešovite micle u

odnosu na niže temperature. Porast temperature dovodi do poremećaja hidrofobne interakcije koja dovodi do formiranja micelle i do termalne preturbacije (152).

Prema Clint-u (153) poznavajući kritične micelarne vrednosti čistih gradivnih jedinica binarnih micela (cmc_i), može se izračunati idealna kritična micelarna koncentracija (cmc^{id}) za svaku ispitivanu temperaturu (Tabela 6):

$$\frac{1}{cmc^{id}} = \sum_i \frac{\alpha_i}{cmc_i} \quad (56)$$

gde je α_i molska frakcija komponente i u rastvoru. Kao što se vidi iz Tabele 7, cmc^{ex} vrednost je niža od cmc^{id} vrednosti na svim ispitivanim temperaturama. Ovo ukazuje na to, da realna mešovita micela CA i SDS-a ima egzotermniju entalpiju formacije ako se uporedi sa idealnom mešovitom micelom (za idealnu mešovitu micelu, formiranje micelle je isključivo vođeno entropijom, bez promene u entalpiji). Iz tog razloga, formiranje realne mešovite micelle je favorizovanije od idealne mešovite micelle zbog viška negativne slobodne energije ($\Delta_{excess}G < 0$). Po Rubingh-ovoj jednačini, molski udeo (x_1) hidrofobnijeg monomera (CA) u mešovitoj miceli se računa prema sledećoj jednačini:

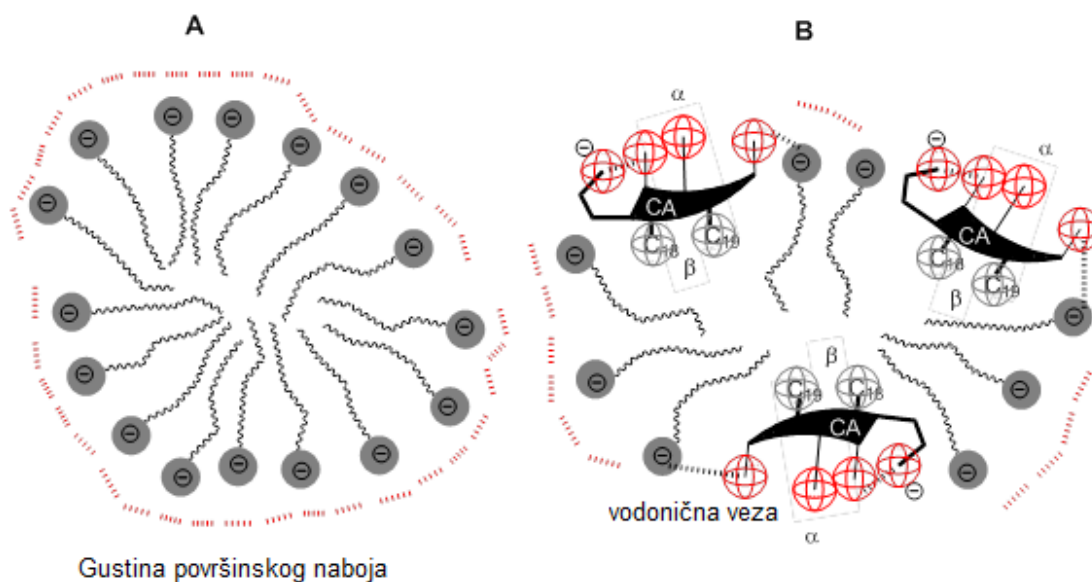
$$1 = \frac{x_1^2 \ln(cmc^{ex} \alpha / cmc_1 x_1)}{(1-x_1)^2 \ln[cmc^{ex}(1-\alpha) / cmc_2(1-x_1)]} \quad (57),$$

gde je cmc_1 kritična micelarna koncentracija (na odgovarajućim temperaturama) hidrofobnije komponente (CA), dok je cmc_2 kritična micelarna koncentracija (na odgovarajućim temperaturama) SDS-a. Poznavajući parametre koji se spominju, može se izračunati interakcioni parameter za monomer micela ($\beta_{1,2}$), po formuli:

$$\beta_{1,2} = \frac{\ln(cmc^{ex} \alpha / cmc_1 x_1)}{(1-x_1)^2} \quad (58).$$

Interakcioni parametar je negativan u celokupnom ispitivanom opsegu temperature. Postoji sinergizam (atraktivna interakcija) između različitih monomera. Pošto su obe gradivne jedinice micela anjonske, očekivalo bi se da postoje repulzivne interakcije između njih (pozitivne vrednosti interakcionog parametra ukazuju na antagonizam između gradivnih jedinica ($\Delta_{excess}G > 0$)). Negativne vrednosti interakcionog parametra se mogu objasniti strukturom mešovitih micela. Kao što se može videti iz detaljne analize simulacije molekularne dinamike, oblik ovih micela bi bio blizu sfernog, i anjoni žučne kiseline se mogu smestiti između polarnih glava SDS-a na njihovu površinu, tako da se konkavni deo steroidnog skeleta (sa OH grupama) orijentiše prema vodenom rastvoru, dok se konveksni deo sa angularnim metil grupama orijentiše prema hidrofobnom domenu alifatičnog niza SDS-a.

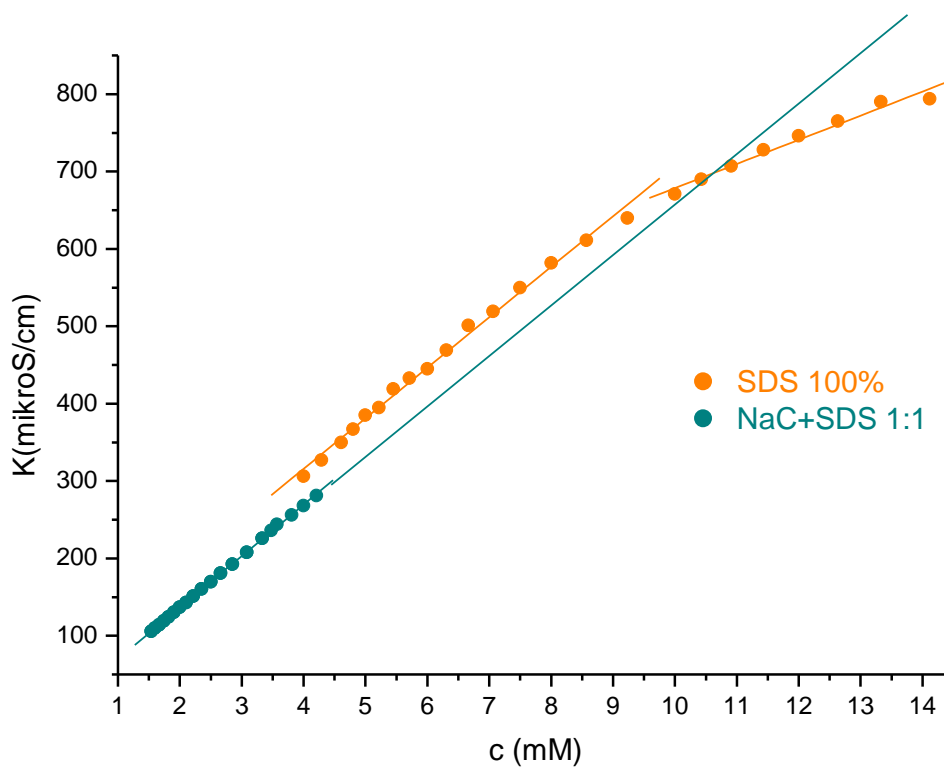
Prisustvo relativno velike površine steroidnog skeleta na interfejsu mešovitih micela popunjava prostor između sulfatnih grupa SDS-a. Dva anjona holata mogu isto tako da formiraju vodonične veze između karboksilne grupe (153), te je zbog toga karboksilna grupa maskirana od repulzivnih interakcija. Visoke negativne vrednosti interakcionog parametra pokazuju moguće vodonične veze između monomera. Ove veze su moguće između aksijalnih (u odnosu na steroidni skelet) OH grupa steroidnog skeleta i manje-više aksijalnih (u odnosu na celu micelu) sulfatnih grupa SDS-a (Slika 35).



Slika 35. Micela natrijum dodecilsulfata (A), i mešovita micela natrijum dodecilsulfata i natrijum holata, steroidni skelet anjona holne kiseline narušava kontinualnu gustinu površinskog naboja (B)

Sniženje interakcionog parametra na 50 °C (Tabela 7) može se objasniti sa povećanim intenzitetom unutrašnjeg kretanja gradivnih jedinica (157) – micela postaje manje rigidna i ovo dovodi do delimičnog raskidanja vodoničnih veza.

Slika 36. prikazuje specifičnu provodljivost (κ) u funkciji ukupne koncentracije surfaktanata (c): $\kappa = f(c)$. Na funkciji $\kappa = f(c)$ za čist natrijum dodecilsulfat, postoji izražena tačka prekida koja pokazuje formiranje micela. Ovo se objašnjava time, što se na površini micela natrijum dodecilsulfata formira negativni površinski naboj, koji privlači natrijumove jone suprotnog naelektrisanja. Tako vezani joni delimično neutralizuju električni naboj micela, i tako smanjuju njenu pokretljivost kada uporedimo sa stanjem kada su svi monomeri jonizovani. Na funkciji $\kappa = f(c)$ za binarnu mešovitu micelu natrijum holata i natrijum dodecilsulfata (1:1) ne postoji tačka prekida, što znači da posle formiranja micela celokupno negativno naelektrisanje je slobodno, nije neutralisano putem suprotno naelektrisanih jona. Ovo potvrđuje pretpostavku da je steroidni skelet zbog njegove veličine i kapaciteta formiranja vodoničnih veza sprečava formiranje kompaktnog površinskog naboja na mešovitoj miceli (Slika 35).

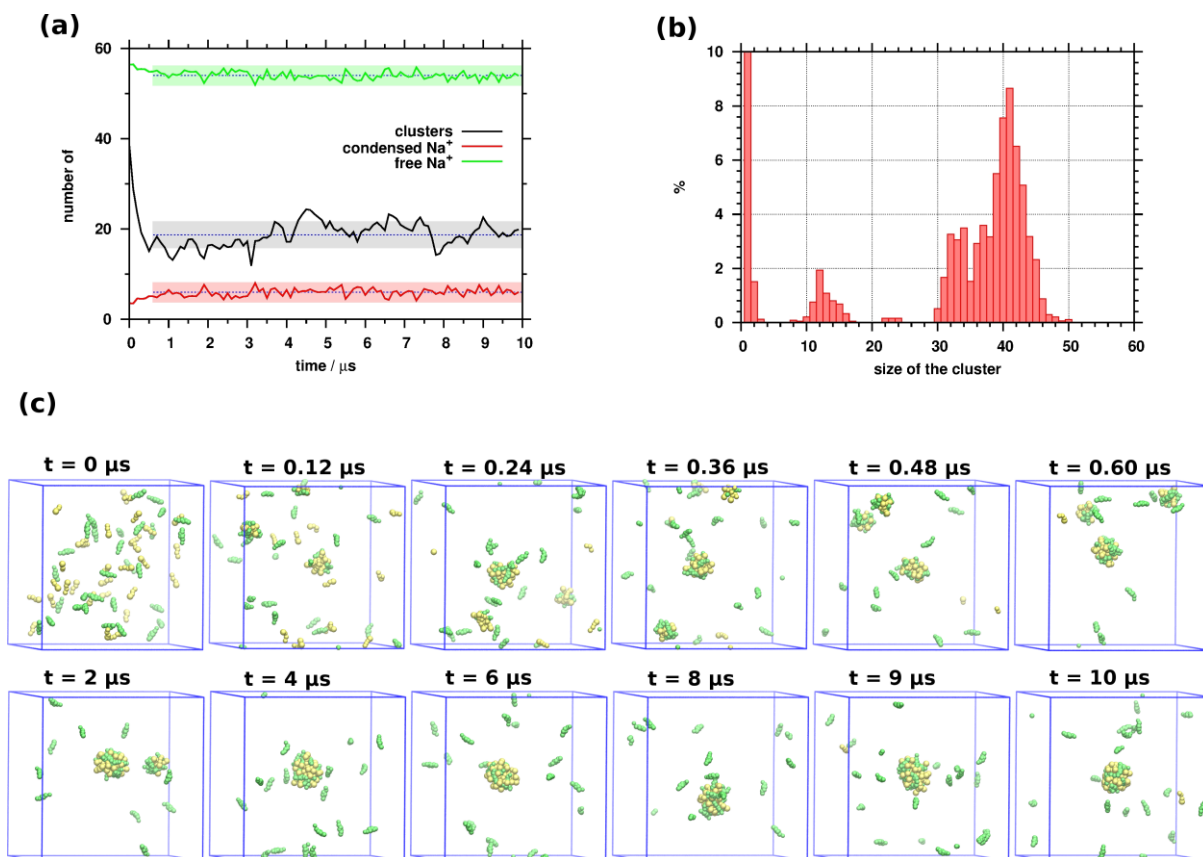


Slika 36. Promena specifične provodljivosti u funkciji koncentracije surfaktanata

4.3.3.2 Teoretski rezultati

Veličina ćelije za simulaciju je brzo uravnotežena ($V_{eq} = 8114.11 \text{ nm}^3$), koja je dovela do efektivne koncentracije surfaktanata od $12.28 \text{ mmol}/\text{dm}^3$, koja je veća od cmc^{ex} (Slika 32).

Samoasocijacija molekula surfaktanata je praćena određivanjem broja formiranih agregata (number of clusters, NOC) (Slika 37a).



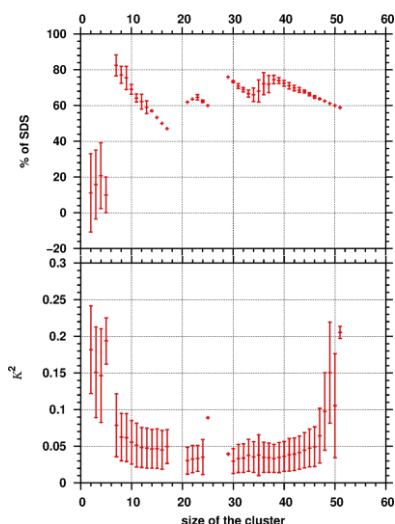
Slika 37. (a) Vremenska evolucija broja agregata (NOC), slobodni i kondenzovani Na⁺ katjoni u toku simulacije molekularne dinamike primenjujući blok proseke upotrebljavajući interval od 100ns. Isprekidane linije predstavljaju srednju, a providne trake standardnu devijaciju (vrednosti su računane od 0.6 μs do 10 μs). (b) Distribucija veličine agregata. (c) Odabrani okviri iz putanje molekularne dinamike u različitim vremenskim intervalima.

Smatramo da dva molekula predstavljaju agregate, ako je razdaljina između dva posmatrana dela molekula manji od 7 Å. Na početku simulacije, NOC je iznosio 60, zbog činjenice da je sistem postavljen slučajno i nije bilo interakcija između molekula surfaktanata. Posle prvih nekoliko stupnjeva, uočeno je brzo smanjenje NOC-a, sve do 0.60 μs, koji jasno ukazuje na samoasocijaciju monomera. Posle ovog perioda, postignut je ekvilibrijum, gde se vrednost NOC-a menjao između 9 i 27, sa prosečnim brojem od 18.7 (±2.8). Broj pokazuje da se 18.7 različitih agregata može naći u svakom okviru posmatranja i da je broj molekula surfaktanata drugačiji u svakom agregatu. Da bi se ovo razjasnilo, određena je procentualna distribucija veličine agregata (Slika

37(b)) i prikazani su snimci putanje (Slika 37(c)). Histogram raspodele agregata pokazuje da postoji veliki broj monomera tokom simulacije (realna vrednost je 28.7%). Ovi monomeri predstavljaju molekule CA u ~98% i ovo se može videti, takođe na slici 37(c). Posle 4 μ s postoji jedna velika micela opkoljena pretežno molekulima CA; tek se oko 9 i 10 μ s može naći molekul SDS kao slobodan monomer. Do ~ 2 μ s formirani su manji agregati koji su se dalje asociirali u jednu veću micelu posle 4 μ s. Ova najveća micela ima dinamičnu strukturu zbog činjenice da CA molekuli ulaze i izlaze iz te strukture. Na osnovu histograma, možemo zaključiti, da je najdominantniji agregat sastavljen od 41 molekula surfaktanata (> 8%) u toku simulacije. Prosečan sadržaj SDS-a u formiranim micelama je 66.6 ± 7.8 tokom 9.4 μ s ekvibracije putanje (ovaj broj uključuje sve agregate, dimere, trimere, itd.). Sadržaj SDS-a je određen kao funkcija veličine agregata (Slika 38, gornji panel). Možemo zaključiti da za male agregate (sastavljeni od 2, 3, 4 i 5 surfaktanata) prosečni sadržaj SDS-a je nizak i jako varira. Za agregate sastavljene od 7-17 monomera javlja se interesantno ponašanje. Inicijalnih 80% sadržaja SDS-a se smanjuje linearno sa povećanjem veličine agregata i posle 13 monomera, standardna devijacija u potpunosti nestaje. Za agregate sastavljene od 11-13 molekula, smanjuje se sadržaj SDS-a na 50%, što je u skladu sa eksperimentalnim podacima. Veća vrednost devijacije SDS-a za manje agregate (7-10) ukazuje na to da su molekuli CA statistički preferirani. Sa druge strane, oba molekula ulaze i izlaze iz agregata. Za agregate veličine 14-17 nestanak standardne devijacije ukazuje na stabilno jezgro sastavljeno od molekula SDS-a, a povećanje veličine agregata je usled ulaska molekula CA (Slika 35). Isto ponašanje je nađeno i za agregate veličine oko 40: maksimalan sadržaj SDS-a 75% je detektovan sa gregacionim brojem 36. Dalje povećanje broja monomer smanjuje sadržaj SDS-a zbog ulaska molekula CA i konsekventno linearno opada prosečni sadržaj SDS-a u agregatima. Ovi podaci razjašnjavaju formiranje micela: prvo se formira stabilno jezgro micela od molekula SDS-a sa promenljivim brojem surfaktanata, i posle ovog procesa ostatak molekula CA se vezuje na površinu micela. Na osnovu linearnog opadanja sadržaja SDS-a u micelama, možemo zaključiti da se mešovita micela stabilizuje sa 50% sadržaja CA na površini micelle. Predložili smo da se tokom 10 μ s simulacije ne može doći do statističkog sastava velike micela. Termodinamički ekvilibrijum eksperimenta je evidentan, međutim najverovatnije dolazi do uspostavljanja ekvilibrijuma koji se donosi

na manje micelle. Podaci dobijeni eksperimentalno i *in silico* studijama koreliraju međusobno, ali simulacija predviđa veći sadržaj SDS-a u micelama. Ako se uzmu u obzir metastabilna stanja, pogotovo za veće micelle, tačni podaci se mogu dobiti samo ako se produži vreme simulacije. Tačnost parametra polja sila takođe može uticati na kompoziciju i strukturu micela. Parametri upotrebljeni ovoj studiji su uspešno primenjeni u drugim istraživanjima (154, 155). Drugi mogući razlog jeste period uzorkovanja: dužina putanje nije dovoljna da se dobije makroskopski sadržaj SDS-a. Pretpostavljamo da je ova poslednja tvrdnja tačna, mada ako posmatramo prethodne pretpostavke, naime da se prvo formira stabilno jezgro SDS-a, pa se zatim micela popunjava sa molekulima CA, koje povećava veličinu agregata, posle 4 μ s formira se veća micela od skoro svih molekula SDS-a i nevezani molekuli CA ulaze i izlaze iz takve micelle (variranje veličine agregata u funkciji vremena). Struktura jezgra micelle ne može da primi više CA i zbog toga mora da dođe do promene strukture jezgra da bi se sve više molekula holata vezalo. Znamo da se ovakva promena ne može dogoditi tokom dužine simulacije od 10 μ s, i zbog toga planiramo da proširimo simulaciju na duži vremenski period posmatranja da bismo proverili validnost prethodno spomenutih tvrdnji, ali su prvi koraci formiranja micelle dobijeni i može se dobiti kvalitetna slika o procesu samoasocijacije SDS-a i CA.

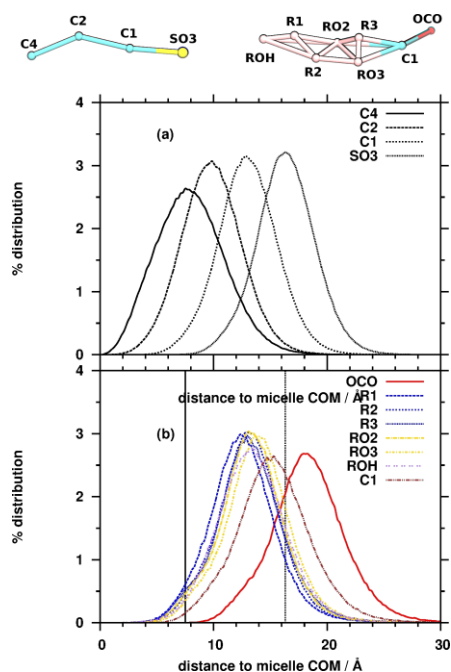
Da bismo odredili oblik micelle izračunata je anizotropija relativnog oblika (K^2) (Slika 38, donji panel). Ako je $K^2 = 0$ onda je oblik micelle sferno simetričan, a ako je $K^2 = 1$, sve upućuje na to da svi elementi strukture leže na jednoj liniji. Na osnovu slike, možemo zaključiti, da za male micelle (veličina agregata < 6) i za velike agregate (veličina agregata > 49) visoko anizotropne strukture su formirane, a ako je veličina agregata između, formiraju se agregati približno sfernog oblika. Za manje agregate je jasno da ne mogu formirati sferne agregate zbog malog broja molekula surfaktanata. Za velike agregate uzrok velike anizotropije jeste fuzija dve manje micelle u jednu veću.



Slika 38. Prosečni sadržaj SDS-a (gornji panel) i relativna anizotropija oblika (donji panel, K^2) i promena anizotropije u funkciji veličine agregata.

Katjoni natrijuma su isto tako uključeni u simulaciju, i kako SDS tako i holna kiselina, poseduje mesta interakcije (SO₃ and OCO) sa negativnim naelektrisanjem, izučavana je i interakcija između jona Na⁺ i interakcionih mesta. Koristili smo 7 Å razdaljine za određivanje interakcije između Na⁺, SO₃ i OCO. Kao što se vidi sa Slike 39 (a) 10% Na⁺ je kondenzovano (prosečni broj kondenzovanih katjona je 5.9 ± 2.1 , i slobodnih 54.0 ± 2.1). Prošlo je dvadeset godina, otkad je Manning razvio Teoriju standardne kondenzacije kontraiona (155, 156) na sistemima različitih oblika kao što su sfere, cilindri i ravni (157, 158). Prema teoriji, ako je koncentracija kontraiona mala, ali je veća od 0, postoje joni, koji se nalaze u blizini naelektrisane sfere (ili su kondenzovani na površini) i postoje joni u rastvoru (156). Ne možemo uraditi direktnu komparaciju između naših rezultata i rezultata Manning i sar., zbog oblika micela koji je blizu sferičnog, ali za ovaj oblik micela su dobijeni kvalitativno slični rezultati. Merjenja provodljivosti su pokazale isto ponašanje natrijumovih jona, zato što je specifična provodljivost bila linearna sa povećanjem koncentracije surfaktanata.

Da bi se dobila konzistentna slika o strukturi micela, fokusirali smo analizu na radialnu distribuciju različitih interakcionih mesta unutar formiranih micela (Slika39).



Slika 39. Radijalna distribucija različitih mesta interakcije SDS-a (gornji panel) i CA (donji panel). Na donjem panelu, prva i druga vertikalna linija ukazuje na položaj maksimuma pika C4 i SO3 mesta interakcije.

Uzimajući u obzir da C4 mesto interakcije ima pik između 6-8 Å, C1 između 12-14 Å i SO3 oko 16 Å, možemo zaključiti da se SDS unutar micelle orijentiše tako, da je hidrofobni deo okrenut prema jezgru micelle. Visoko hidrofilni deo (SO3) se okreće prema vodenom rastvoru, gde su moguće povoljne interakcije između SDS-a i molekula vode. Za C4 SDS-a kriva distribucije je šira ako uporedimo sa C2, C1 i SO3. Ovo je zbog veće fleksibilnosti unutar jezgra micelle i nisu svi molekuli SDS-a upereni prema jezgru micelle.

Slika 39(b) prikazuje distribuciju mesta interakcije molekula CA. Distribucija hidrofobnih i slabo hidrofilnih delova molekula CA se podudaraju i postavljeni su u intermedijernom sloju micelle (između C2 i SO3 mesta interakcije). Nasuprot ovome, distribucija C1 je malo pomerena prema visoko hidrofobnom jezgru micelle. Ovo ukazuje na to da su molekuli CA na hidrofobnoj površini, umesto da su okrenuti ka centru micelle i ova interakcija dovodi do zaključka da postoji hidrofilna interakcija sa polarnim rastvaračem. Hidrofobna mesta interakcije (R1, R2 i R3) su locirana dublje, ako uporedimo sa hidrofilnim mestima interakcije (RO2, RO3 i ROH) te dolazi do interakcije između hidrofobnih mesta interakcije CA sa hidrofobnim jezgrom SDS-a,

dok su hidrofilna jezgra orijentisana prema vodenoj fazi. Strukturne karakteristike se dobro slažu sa eksperimentalnim podacima za strukturu micela (Slika 35).

4.3.4 Zaključak

Mešovite micela natrijum holata i natrijum dodecilsulfata (1:1) su termodinamički stabilnije od idealnih mešovitih micela. Postoji sinergistički efekat ($\beta_{1,2} < 0$) u mešovitim micelama u temperaturnom intervalu od 0 °C do 50 °C. Mešovite micela su praktično u potpunosti jonizovane, vezivanje suprotno naelektrisanih jona je zanemarljivo. Molekulsko–dinamički modeli za ispitivane binarne smeše surfaktanata na 25 °C pokazuju da je molski udeo mešovitih micela konzistentan sa vrednostima dobijenim određivanjem kritične micelarne koncentracije i postoji vezivanje suprotno naelektrisanih jona za mešovite micela, koje se razlikuje od konduktometrijskih merenja. Upotrebom teoretskih izračunavanja, potvrdili smo oblik micela i distribuciju različitih komponenata unutar formiranih micela.

4.4 Termodinamičko ispitivanje binarnih mešovitih micela natrijum-dodecil sulfata i natrijum holata u različitim molskim odnosima i uticaj temperature na molski udeo i interakcioni parametar

4.4.1 Materijal

Sve hemikalije koje su upotrebljene u eksperimentima su poreklom iz Sigme, čistoće 99.98%.

4.4.2 Metode

4.4.2.1 Spektrofluorifotometrijska merenja

Spektrofluorifotometrijska merenja su rađena sa Agilent Cary Eclipse fluorescence spektrofotometrom. Rastvori natrijum holata i natrijum dodecilsulfata su pripremljeni upotrebom zasićenog vodenog rastvora pirena. Pripremljeni su rastvori sa molskim udelom natrijum holata (natrijum holat + natrijum dodecilsulfat 100%) 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%. Piren je eksitovan na 334 nm. Praćena je promena intenziteta prvog (I_1 , 373 nm) i trećeg (I_3 , 384 nm) vibracionog snopa emisionog spektra pirena u funkciji koncentracije surfaktanata na temperaturama 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, i 50 °C. Greške u određivanju CMC se procenjuje da su manje od 3% ($n = 5$).

4.4.3 Rezultati i diskusija

Iz **Tabela 8-26.** se može videti da eksperimentalno određene vrednosti kritične micelarne koncentracije (cmc^{ex}) imaju niže vrednosti od idealne (cmc^{id}) pri svakoj ispitivanoj temperaturi. Pri određivanju cmc^{ex} upotrebljena je metoda određivanja za $(x_{CMC})_1$.

Tabela 8. Vrednosti moluskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molški udeo natrijum holata 5%, natrijum dodecilsulfata 95%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,6	9,94	0,356	-6,942
5	3,6	10,19	0,357	-7,101
10	3,65	10,44	0,358	-7,221
15	3,66	10,80	0,358	-7,333
20	3,63	11,29	0,361	-7,556
25	3,69	11,95	0,364	-7,718
30	3,6	12,38	0,367	-7,979
35	3,95	13,01	0,365	-7,787
40	4,41	13,55	0,361	-7,489
45	4,75	14,00	0,358	-7,310
50	4,82	14,74	0,361	-7,453

Tabela 9. Vrednosti moluskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molški udeo natrijum holata 10%, natrijum dodecilsulfata 90%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,3	9,89	0,372	-5,204
5	4,35	10,15	0,372	-5,312
10	4,42	10,42	0,371	-5,377
15	4,42	10,79	0,373	-5,549
20	4,35	11,28	0,376	-5,784
25	4,42	11,93	0,379	-5,934
30	4,4	12,36	0,381	-6,109
35	4,64	13,05	0,382	-6,104
40	5,16	13,52	0,378	-5,825
45	5,3	13,97	0,378	-5,854
50	5,9	14,70	0,375	-5,596

Tabela 10. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 15%, natrijum dodecilsulfata 85%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,12	9,84	0,383	-3,944
5	5,02	10,11	0,384	-4,158
10	4,95	10,39	0,385	-4,351
15	4,87	10,77	0,388	-4,589
20	4,88	11,26	0,390	-4,752
25	4,95	11,91	0,393	-4,902
30	4,99	12,34	0,395	-5,043
35	5,13	13,01	0,397	-5,126
40	5,22	13,49	0,397	-5,186
45	5,45	13,95	0,397	-5,171
50	5,54	14,66	0,399	-5,275

Tabela 11. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 20%, natrijum dodecilsulfata 80%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,01	9,78	0,427	-5,646
5	3,04	10,07	0,427	-5,780
10	2,95	10,37	0,427	-6,028
15	3,05	10,75	0,426	-6,047
20	3,17	11,25	0,427	-6,099
25	3,35	11,88	0,427	-6,067
30	3,41	12,32	0,427	-6,142
35	3,87	12,98	0,426	-5,853
40	4,21	13,46	0,424	-5,663
45	4,65	13,92	0,421	-5,400
50	4,86	14,62	0,422	-5,402

Tabela 12. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 25%, natrijum dodecilsulfata 75%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,42	9,73	0,429	-3,837
5	4,41	10,04	0,429	-4,010
10	4,36	10,35	0,429	-4,202
15	4,33	10,74	0,429	-4,373
20	4,24	11,23	0,432	-4,650
25	4,13	11,86	0,435	-4,943
30	4,12	12,30	0,436	-5,109
35	4,11	12,95	0,438	-5,297
40	4,39	13,43	0,437	-5,187
45	4,52	13,89	0,437	-5,214
50	4,69	14,58	0,438	-5,238

Tabela 13. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 30%, natrijum dodecilsulfata 70%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,45	9,68	0,453	-4,582
5	3,64	9,99	0,450	-4,512
10	3,72	10,32	0,449	-4,585
15	3,62	10,72	0,450	-4,861
20	3,55	11,21	0,451	-5,105
25	3,63	11,83	0,452	-5,205
30	3,65	12,28	0,453	-5,358
35	3,70	12,92	0,454	-5,473
40	3,87	13,40	0,454	-5,454
45	4,23	13,87	0,453	-5,256
50	4,87	14,54	0,456	-5,760

Tabela 14. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 35%, natrijum dodecilsulfata 65%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,64	9,62	0,466	-4,178
5	3,52	9,96	0,465	-4,461
10	3,75	10,30	0,464	-4,395
15	3,88	10,70	0,463	-4,422
20	3,97	11,20	0,462	-4,480
25	3,81	11,81	0,465	-4,852
30	3,99	12,26	0,464	-4,814
35	3,99	12,89	0,466	-5,008
40	4,71	13,37	0,463	-4,491
45	5,52	13,84	0,460	-4,004
50	5,64	14,50	0,462	-4,100

Tabela 15. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 40%, natrijum dodecilsulfata 60%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,06	9,57	0,481	-4,690
5	3,5	9,92	0,479	-4,343
10	3,21	10,28	0,478	-4,824
15	3,2	10,69	0,478	-5,014
20	3,21	11,18	0,478	-5,174
25	3,19	11,78	0,479	-5,388
30	3,16	12,24	0,479	-5,579
35	3,66	12,86	0,479	-5,189
40	3,77	13,34	0,479	-5,224
45	4,39	13,81	0,477	-4,750
50	4,33	14,46	0,479	-4,987

Tabela 16. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 45%, natrijum dodecilsulfata 55%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,75	9,52	0,493	-3,761
5	3,88	9,89	0,491	-3,793
10	3,83	10,25	0,490	-4,017
15	3,82	10,67	0,489	-4,190
20	4,14	11,17	0,488	-4,037
25	3,68	11,76	0,490	-4,708
30	4,19	12,22	0,489	-4,348
35	4,05	12,83	0,491	-4,686
40	4,85	13,31	0,490	-4,118
45	5,68	13,79	0,488	-3,612
50	5,63	14,42	0,490	-3,830

Tabela 17. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 50%, natrijum dodecilsulfata 50%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,09	9,47	0,508	-3,324
5	4,01	9,85	0,505	-3,561
10	4,01	10,23	0,503	-3,723
15	4,17	10,66	0,502	-3,740
20	4,12	11,15	0,502	-3,976
25	4,07	11,73	0,503	-4,230
30	4,21	12,20	0,502	-4,239
35	4,4	12,80	0,506	-4,327
40	4,54	13,28	0,503	-4,283
45	4,76	13,76	0,502	-4,219
50	6,78	14,38	0,504	-2,980

Tabela 18. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 55%, natrijum dodecilsulfata 45%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,45	9,42	0,523	-2,874
5	3,99	9,81	0,519	-3,500
10	4,47	10,21	0,518	-3,208
15	4,46	10,64	0,516	-3,383
20	4,52	11,14	0,516	-3,524
25	4,44	11,71	0,516	-3,790
30	5,56	12,18	0,517	-3,032
35	5,57	12,77	0,518	-3,221
40	6,14	13,25	0,518	-2,971
45	6,86	13,73	0,519	-2,675
50	7,28	14,34	0,520	-2,595

Tabela 19. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 60%, natrijum dodecilsulfata 40%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,55	9,37	0,539	-2,705
5	4,46	9,78	0,535	-2,967
10	4,56	10,18	0,533	-3,058
15	4,52	10,63	0,531	-3,276
20	4,72	11,12	0,531	-3,291
25	4,84	11,69	0,531	-3,379
30	4,95	12,16	0,530	-3,447
35	5,48	12,74	0,532	-3,216
40	5,64	13,22	0,532	-3,263
45	5,90	13,71	0,532	-3,230
50	6,38	14,30	0,534	-3,082

Tabela 20. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 65%, natrijum dodecilsulfata 35%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,65	9,33	0,556	-2,557
5	4,82	9,74	0,553	-2,587
10	4,76	10,16	0,549	-2,819
15	4,80	10,61	0,547	2,974
20	5,26	11,11	0,548	-2,776
25	4,93	11,66	0,546	-3,263
30	5,46	12,14	0,547	-2,997
35	5,49	12,71	0,547	-3,169
40	6,62	13,20	0,551	-2,528
45	7,93	13,68	0,556	-1,906
50	7,72	14,26	0,555	-2,208

Tabela 21. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 70%, natrijum dodecilsulfata 30%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,02	9,28	0,576	-2,163
5	5,26	9,71	0,574	-2,164
10	5,25	10,14	0,569	-2,353
15	5,31	10,59	0,567	-2,512
20	5,35	11,09	0,565	-2,677
25	5,43	11,64	0,565	-2,833
30	6,45	12,12	0,570	-2,246
35	6,52	12,68	0,569	-2,388
40	7,27	13,17	0,572	-2,070
45	7,09	13,65	0,569	-2,351
50	7,51	14,22	0,571	-2,277

Tabela 22. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 75%, natrijum dodecilsulfata 25%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,28	9,23	0,585	-2,873
5	4,33	9,67	0,581	-3,021
10	4,57	10,11	0,580	-2,982
15	4,66	10,58	0,578	-3,099
20	5,32	11,08	0,582	-2,706
25	5,06	11,62	0,578	-3,147
30	5,35	12,10	0,578	-3,073
35	5,78	12,65	0,581	-2,939
40	6,68	13,14	0,586	-2,445
45	7,02	13,63	0,586	-2,376
50	7,26	14,19	0,587	-2,413

Tabela 23. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 80%, natrijum dodecilsulfata 20%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	7,93	9,18	0,662	0,549
5	6,10	9,64	0,622	-1,339
10	5,79	10,09	0,613	-1,871
15	5,77	10,56	0,608	-2,110
20	6,53	11,06	0,614	-1,724
25	6,52	11,59	0,611	-1,969
30	6,73	12,08	0,610	-2,019
35	7,49	12,62	0,615	-1,681
40	7,91	13,11	0,616	-1,597
45	7,93	13,60	0,613	-1,775
50	9,94	14,15	0,631	-0,772

Tabela 24. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 85%, natrijum dodecilsulfata 15%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,62	9,14	0,644	-1,526
5	5,76	9,60	0,639	-1,650
10	5,67	10,07	0,632	-2,001
15	5,92	10,55	0,631	-2,020
20	6,06	11,04	0,629	-2,144
25	6,26	11,57	0,628	-2,207
30	6,85	12,06	0,632	-1,951
35	7,62	12,59	0,639	-1,608
40	8,33	13,08	0,643	-1,302
45	8,33	13,57	0,639	-1,515
50	8,94	14,11	0,644	-1,349

Tabela 25. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 90%, natrijum dodecilsulfata 10%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	6,31	9,09	0,683	-0,788
5	6,85	9,57	0,686	-0,563
10	6,82	10,04	0,677	-0,939
15	6,83	10,53	0,670	-1,239
20	7,09	11,03	0,669	-1,301
25	7,29	11,55	0,668	-1,431
30	7,60	12,04	0,667	-1,417
35	8,65	12,56	0,679	-0,838
40	9,57	13,06	0,688	-0,387
45	8,92	13,55	0,673	-1,157
50	9,02	14,07	0,670	-1,327

Tabela 26. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 95%, natrijum dodecilsulfata 5%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	8,72	9,04	0,796	3,490
5	9,06	9,53	0,788	3,105
10	8,73	10,02	0,759	1,526
15	8,95	10,52	0,753	1,191
20	9,36	11,01	0,752	1,175
25	9,52	11,52	0,746	0,818
30	9,86	12,02	0,744	0,732
35	10,34	12,53	0,746	0,806
40	10,63	13,03	0,743	0,673
45	11,20	13,53	0,746	0,852
50	12,20	14,04	0,759	1,495

Iz **Tabela 27-45.** se može videti da eksperimentalno određene vrednosti kritične micelarne koncentracije (cmc^{ex}) imaju niže vrednosti od idealne (cmc^{id}) pri svakoj ispitivanoj temperaturi. Pri određivanju cmc^{ex} upotrebljena je metoda određivanja za $(x_{CMC})_2$.

Tabela 27. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 5%, natrijum dodecilsulfata 95%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,58	10,57	0,344	-6,136
5	4,64	10,83	0,343	-6,251
10	4,49	11,16	0,347	-6,544
15	4,46	11,72	0,353	-6,698
20	5,06	12,13	0,347	-6,336
25	5,07	12,86	0,352	-6,542
30	5,31	13,31	0,350	-6,492
35	6,06	14,20	0,345	-6,197
40	6,12	14,65	0,346	-6,358
45	6,58	15,00	0,341	-6,197
50	6,68	15,75	0,343	-6,334

Tabela 28. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 10%, natrijum dodecilsulfata 90%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,87	10,49	0,353	-4,122
5	5,56	10,79	0,358	-4,530
10	5,54	11,13	0,360	-4,697
15	5,62	11,65	0,365	-4,744
20	5,43	12,06	0,370	-5,045
25	5,59	12,76	0,373	-5,123
30	6,00	13,22	0,370	-4,996
35	6,41	14,10	0,370	-4,987
40	6,75	14,58	0,367	-4,960
45	6,89	14,96	0,366	-5,032
50	7,71	15,71	0,361	-4,772

Tabela 29. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 15%, natrijum dodecilsulfata 85%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,899	19,33	0,307	-4,88
5	2,590	17,27	0,322	-5,39
10	2,508	16,72	0,331	-5,82
15	5,543	36,95	0,2088	-2,33
20	5,064	33,76	0,238	-2,88
25	5,588	37,25	0,453	-7,35
30	5,911	39,40	0,211	-2,27
35	6,234	41,56	0,237	-2,57
40	6,428	42,85	0,222	-2,26
45	6,740	44,93	0,209	-2,03
50	7,020	46,80	0,198	-1,91

Tabela 30. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 20%, natrijum dodecilsulfata 80%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,00	10,35	0,420	-4,726
5	4,00	10,70	0,419	-4,920
10	3,81	11,06	0,421	-5,255
15	4,01	11,50	0,424	-5,146
20	4,09	11,91	0,424	-5,211
25	5,07	12,57	0,419	-4,547
30	5,57	13,04	0,416	-4,343
35	5,74	13,91	0,417	-4,461
40	5,91	14,44	0,416	-4,552
45	6,53	14,87	0,410	-4,300
50	6,36	15,62	0,413	-4,593

Tabela 31. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 25%, natrijum dodecilsulfata 75%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,40	10,28	0,424	-3,244
5	5,48	10,66	0,422	-3,382
10	5,42	11,03	0,423	-3,577
15	5,35	11,42	0,429	-3,704
20	5,31	11,84	0,430	-3,874
25	4,93	12,48	0,437	-4,359
30	4,73	12,95	0,439	-4,688
35	4,65	13,81	0,441	-4,991
40	5,07	14,37	0,438	-4,857
45	5,21	14,83	0,436	-4,907
50	5,40	15,58	0,436	-4,958

Tabela 32. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 30%, natrijum dodecilsulfata 70%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,73	10,21	0,447	-3,529
5	4,63	10,62	0,446	-3,817
10	5,17	10,99	0,442	-3,532
15	4,91	11,35	0,449	-3,810
20	4,90	11,77	0,449	-3,952
25	4,73	12,39	0,453	-4,267
30	4,99	12,87	0,452	-4,225
35	5,00	13,72	0,454	-4,474
40	5,50	14,30	0,450	-4,289
45	5,65	14,79	0,448	-4,347
50	5,50	15,54	0,450	-4,655

Tabela 33. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 35%, natrijum dodecilsulfata 65%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,08	10,15	0,462	-3,063
5	4,99	10,57	0,459	-3,318
10	5,07	10,96	0,458	-3,407
15	5,03	11,28	0,464	-3,520
20	5,09	11,70	0,464	-3,622
25	5,29	12,30	0,466	-3,644
30	5,56	12,78	0,465	-3,616
35	6,45	13,63	0,463	-3,276
40	6,54	14,24	0,461	-3,422
45	8,51	14,75	0,452	-2,564
50	7,77	15,50	0,456	-3,114

Tabela 34. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 40%, natrijum dodecilsulfata 60%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,64	10,08	0,479	-3,241
5	4,78	10,53	0,476	-3,340
10	4,88	10,93	0,475	-3,417
15	5,03	11,21	0,479	-3,351
20	4,72	11,63	0,480	-3,759
25	5,08	12,21	0,481	-3,629
30	6,15	12,70	0,479	-3,058
35	6,85	13,54	0,478	-2,873
40	7,31	14,17	0,475	-2,827
45	8,67	14,71	0,469	-2,322
50	8,78	15,46	0,470	-2,478

Tabela 35. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 45%, natrijum dodecilsulfata 55%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,49	10,01	0,494	-2,439
5	5,61	10,49	0,490	-2,569
10	5,46	10,89	0,490	-2,856
15	5,55	11,14	0,494	-2,828
20	5,61	11,57	0,493	-2,928
25	6,26	12,12	0,495	-2,665
30	6,14	12,62	0,494	-2,909
35	7,69	13,45	0,494	-2,274
40	8,53	14,10	0,490	-2,070
45	9,52	14,67	0,486	-1,813
50	9,58	15,42	0,486	-1,986

Tabela 36. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 50%, natrijum dodecilsulfata 50%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,95	9,95	0,512	-1,993
5	5,41	10,45	0,506	-2,587
10	5,26	10,86	0,505	-2,877
15	5,16	11,07	0,509	-2,993
20	4,91	11,50	0,508	-3,349
25	5,00	12,03	0,510	-3,452
30	5,21	12,54	0,509	-3,458
35	5,46	13,36	0,509	-3,523
40	5,31	14,04	0,506	-3,848
45	5,36	14,63	0,504	-4,001
50	9,81	15,38	0,505	-1,771

Tabela 37. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 55%, natrijum dodecilsulfata 45%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	6,79	9,88	0,532	-1,304
5	6,63	10,41	0,526	-1,653
10	5,62	10,83	0,521	-2,505
15	5,87	11,00	0,526	-2,360
20	5,81	11,43	0,525	-2,570
25	7,09	11,95	0,530	-1,914
30	8,74	12,46	0,533	-1,225
35	8,78	13,27	0,532	-1,475
40	9,23	13,97	0,528	-1,497
45	9,26	14,58	0,524	-1,682
50	9,78	15,34	0,523	-1,656

Tabela 38. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 60%, natrijum dodecilsulfata 40%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	5,39	9,82	0,544	-2,173
5	5,55	10,37	0,540	-2,308
10	5,94	10,80	0,539	-2,194
15	5,48	10,94	0,541	-2,563
20	6,17	11,34	0,543	-2,234
25	7,04	11,86	0,548	-1,842
30	7,46	12,38	0,547	-1,775
35	7,81	13,19	0,547	-1,857
40	7,95	13,91	0,542	-2,011
45	8,21	14,54	0,539	-2,083
50	8,62	15,30	0,539	-2,099

Tabela 39. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 65%, natrijum dodecilsulfata 35%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	7,05	10,85	0,575	-0,878
5	6,46	9,94	0,563	-1,562
10	6,49	9,98	0,59	-1,718
15	6,66	10,25	0,565	-1,630
20	7,28	11,20	0,567	-1,409
25	5,47	8,41	0,556	-2,856
30	7,74	11,91	0,567	-1,511
35	7,89	12,14	0,565	-1,708
40	10,31	15,86	0,573	-0,754
45	11,43	17,58	0,573	-0,510
50	10,14	15,60	0,563	-1,294

Tabela 40. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 70%, natrijum dodecilsulfata 30%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	6,09	9,69	0,586	-1,458
5	6,86	10,28	0,586	-1,191
10	7,43	10,73	0,587	-1,018
15	7,19	10,81	0,589	-1,180
20	6,91	11,24	0,584	-1,571
25	8,01	11,70	0,593	-1,038
30	7,82	12,22	0,587	-1,370
35	8,99	13,02	0,593	-1,008
40	9,39	13,78	0,588	-1,077
45	9,68	14,46	0,584	-1,179
50	9,84	15,22	0,581	-1,336

Tabela 41. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 75%, natrijum dodecilsulfata 25%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	6,22	9,63	0,607	-1,262
5	6,21	10,24	0,599	-1,596
10	6,07	10,70	0,593	-1,913
15	7,17	10,74	0,610	-1,106
20	7,34	11,18	0,608	-1,189
25	6,98	11,62	0,603	-1,633
30	8,35	12,15	0,613	-0,951
35	8,30	12,94	0,607	-1,302
40	9,07	13,72	0,606	-1,150
45	9,87	14,42	0,606	-0,983
50	10,63	15,18	0,608	-0,871

Tabela 42. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 80%, natrijum dodecilsulfata 20%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	11,06	9,57	0,743	3,678
5	7,13	10,21	0,632	-0,794
10	7,55	10,67	0,632	-0,723
15	6,79	10,68	0,626	-1,315
20	8,16	11,11	0,641	-0,506
25	8,73	11,54	0,646	-0,303
30	8,72	12,07	0,640	-0,599
35	10,88	12,86	0,661	0,425
40	10,37	13,66	0,643	-0,309
45	10,19	14,38	0,632	-0,725
50	14,96	15,14	0,683	1,553

Tabela 43. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 85%, natrijum dodecilsulfata 15%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	7,5	9.51	0,676	0,092
5	7,56	10.17	0,664	-0,334
10	7,62	10.63	0,658	-0,584
15	7,82	10.61	0,666	-0,395
20	8,17	11.05	0,666	-0,373
25	8,49	11.46	0,668	-0,351
30	9,19	12.00	0,672	-0,124
35	10,19	12.78	0,678	0,179
40	10,62	13.60	0,672	0,009
45	9,76	14.35	0,651	-0,906
50	10,95	15.10	0,659	-0,512

Tabela 44. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 90%, natrijum dodecilsulfata 10%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	8,33	9,45	0,728	1,320
5	8,53	10,13	0,715	0,814
10	8,73	10,60	0,709	0,592
15	8,82	10,55	0,716	0,757
20	9,26	10,99	0,717	0,837
25	9,73	11,38	0,722	0,996
30	10,29	11,92	0,723	1,091
35	11,26	12,70	0,730	1,395
40	13,59	13,54	0,765	3,171
45	13,97	14,31	0,752	2,621
50	14,58	15,07	0,749	2,475

Tabela 45. Vrednosti molskog udela natrijum holata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum holata 95%, natrijum dodecilsulfata 5%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	10,76	9,45	0,6599	4,374
5	12,14	10,13	0,6414	4,524
10	11,77	10,60	0,6659	4,172
15	11,98	10,55	0,6605	4,355
20	12,29	10,99	0,6654	4,277
25	11,81	11,39	0,6780	3,739
30	12,33	11,92	0,6875	3,779
35	14,01	12,70	0,6708	4,234
40	13,97	13,54	0,6972	3,812
45	14,05	14,31	0,7189	3,366
50	16,46	15,07	0,6714	4,084

4.4.4 Zaključak

Prema Regular Solution Theory (RST) koeficijent molekularne interakcije u binarnim mešovitim micelama surfaktanata ne zavisi od temperature, već isključivo od razlike energije međumolekulskih interakcija u binarnom stanju i u monokomponentnom stanju. Stoga, konstantnost $\beta_{1,2}$ u toku promene temperature označava da se može prihvatiti primena RST. U tabelama 8-45 može se uzeti konstantnost koeficijenta $\beta_{1,2}$ u funkciji temperature, odnosno da standardna devijacija $\beta_{1,2}$ za ispitivani temperaturni opseg je u granici SD određivanja $\beta_{1,2}$ polazeći od CMC. Sa povećanjem molskog udela natrijum holata u binarnoj smeši surfaktanata opada koeficijent interakcije. Ovo znači da je binarna mešovita micela natrijum holata i natrijum dodecilsulfata u odnosu na idealnu mešovitu micelu najstabilnija pri $\alpha = 0.05$ natrijum holata. Naime, što je manja količina natrijum holata, to se konformaciono kruti steroidni skelet lakše uklapa u konformaciono fleksibilan i uopšteno pokretljivi hidrofobni domen natrijum dodecil sulfata. Sa povećanjem molskog udela natrijum holata sve više dolazi do problema pakovanja, te dolazi do opadanja koeficijenta interakcije.

4.5 Termodinamičko ispitivanje binarnih mešoviti micela natrijum-dodecil sulfata i natrijum deoksiholata u različitim molskim odnosima i uticaj temperature na molski udeo i interakcioni parametar

4.5.1 Materijal

Sve hemikalije koje su upotrebljene u eksperimentima su poreklom iz Sigme, čistoće 99.98%.

4.5.2 Metode - Spektrofluorifotometrijska merenja

Spektrofluorifotometrijska merenja su rađena sa Agilent Cary Eclipse fluorescence spektrofotometrom. Rastvori natrijum deoksiholata i natrijum dodecilsulfata su pripremljeni upotrebom zasićenog vodenog rastvora pirena. Pripremljeni su rastvori sa molskim udelom natrijum deoksiholata (natrijum deoksiholat + natrijum dodecilsulfat 100%) 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%. Piren je ekscitovan na 334 nm. Praćena je promena intenziteta prvog (I_1 , 373 nm) i trećeg (I_3 , 384 nm) vibracionog snopa emisionog spektra pirena u funkciji koncentracije surfaktanata na temperaturama 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, i 50 °C. Greške u određivanju CMC se procenjuje da je manje od 3% ($n = 5$).

4.5.3 Rezultati i diskusija

Iz **Tabela 46-64** se može videti da eksperimentalno određene vrednosti kritične micelarne koncentracije (cmc^{ex}) imaju niže vrednosti od idealne (cmc^{id}) pri svakoj ispitivanoj temperaturi. Pri određivanju cmc^{ex} upotrebljena je metoda određivanja za $(x_{CMC})_1$.

Tabela 46. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 5%, natrijum dodecilsulfata 95%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,19	9,50	0,382	-6,448
5	2,94	9,67	0,389	-6,775
10	3,05	9,85	0,390	-6,642
15	3,28	10,14	0,389	-6,425
20	3,18	10,59	0,393	-6,708
25	3,45	11,19	0,393	-6,581
30	3,26	11,57	0,397	-5,698
35	3,48	12,20	0,397	-5,698
40	3,38	12,70	0,399	-5,750
45	3,54	13,15	0,397	-5,698
50	4,26	13,95	0,389	-5,495

Tabela 47. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 10%, natrijum dodecilsulfata 90%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,87	9,06	0,416	-5,748
5	2,89	9,17	0,419	-5,710
10	3,06	9,30	0,420	-5,497
15	3,04	9,55	0,423	-5,602
20	3,08	9,96	0,424	-5,685
25	3,05	10,50	0,428	-5,930
30	3,05	10,85	0,429	-6,049
35	3,02	11,40	0,432	-6,250
40	3,21	11,93	0,429	-6,228
45	3,67	12,38	0,426	-5,901
50	3,95	13,21	0,422	-5,914

Tabela 48. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 15%, natrijum dodecilsulfata 85%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,69	8,65	0,440	-5,344
5	2,30	8,72	0,448	-5,964
10	3,01	8,80	0,443	-4,878
15	2,81	9,02	0,448	-5,237
20	2,78	9,39	0,450	-5,430
25	3,19	9,88	0,449	-5,065
30	3,14	10,21	0,450	-5,242
35	3,54	10,71	0,450	-4,934
40	3,68	11,25	0,448	-5,027
45	4,44	11,70	0,442	-4,448
50	4,43	12,54	0,441	-4,799

Tabela 49. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 20%, natrijum dodecilsulfata 80%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,35	8,28	0,461	-5,404
5	2,42	8,30	0,464	-5,269
10	2,53	8,36	0,466	-5,086
15	2,52	8,54	0,468	-5,161
20	2,39	8,89	0,470	-5,517
25	2,05	9,34	0,474	-6,312
30	2,29	9,65	0,473	-5,989
35	2,84	10,09	0,473	-5,312
40	3,73	10,64	0,467	-4,478
45	3,97	11,08	0,465	-4,402
50	4,35	11,94	0,461	-4,387

Tabela 50. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 25%, natrijum dodecilsulfata 75%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,24	7,93	0,482	-7,568
5	1,40	7,93	0,484	-7,061
10	1,37	7,96	0,487	-7,161
15	1,36	8,12	0,488	-7,233
20	1,47	8,44	0,489	-7,093
25	1,44	8,85	0,490	-7,342
30	1,59	9,14	0,490	-7,076
35	1,63	9,54	0,491	-7,119
40	1,71	10,09	0,489	-7,180
45	1,65	10,53	0,488	-7,489
50	1,91	11,39	0,485	-7,258

Tabela 51. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 30%, natrijum dodecilsulfata 70%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,50	7,62	0,492	-4,525
5	2,42	7,59	0,495	-4,600
10	2,38	7,60	0,498	-4,652
15	2,45	7,73	0,500	-4,598
20	2,48	8,03	0,501	-4,703
25	2,67	8,41	0,502	-4,573
30	2,75	8,68	0,502	-4,574
35	2,99	9,05	0,504	-4,397
40	3,25	9,60	0,501	-4,316
45	3,33	10,03	0,500	-4,412
50	3,78	10,89	0,496	-4,262

Tabela 52. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 35%, natrijum dodecilsulfata 65%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,65	7,33	0,506	-4,029
5	2,62	7,28	0,510	-4,037
10	2,62	7,26	0,513	-4,013
15	2,59	7,38	0,515	-4,121
20	2,68	7,66	0,515	-4,111
25	2,75	8,01	0,517	-4,200
30	3,00	8,27	0,517	-3,955
35	3,17	8,60	0,519	-3,883
40	3,33	9,15	0,516	-3,951
45	3,58	9,57	0,515	-3,851
50	3,93	10,43	0,511	-3,845

Tabela 53. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 40%, natrijum dodecilsulfata 60%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,96	7,06	0,522	-3,371
5	2,97	6,99	0,526	-3,299
10	3,04	6,96	0,530	-3,178
15	3,11	7,06	0,532	-3,129
20	3,18	7,32	0,533	-3,194
25	3,31	7,65	0,534	-3,193
30	3,39	7,89	0,534	-3,220
35	3,48	8,20	0,536	-3,269
40	3,63	8,74	0,532	-3,362
45	3,86	9,16	0,531	-3,308
50	4,03	10,01	0,526	-3,514

Tabela 54. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 45%, natrijum dodecilsulfata 55%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,89	6,81	0,529	-5,023
5	1,96	6,72	0,533	-4,825
10	1,9	6,68	0,535	-4,919
15	1,95	6,76	0,537	-4,868
20	1,89	7,01	0,537	-5,163
25	2,32	7,32	0,541	-4,481
30	2,33	7,55	0,541	-4,602
35	1,83	7,83	0,537	-5,741
40	2,21	8,37	0,537	-5,244
45	2,14	8,77	0,534	-5,551
50	1,97	9,63	0,529	-6,280

Tabela 55. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 50%, natrijum dodecilsulfata 50%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,18	6,58	0,533	-6,821
5	1,74	6,48	0,543	-5,193
10	1,75	6,42	0,545	-5,115
15	1,57	6,50	0,545	-5,651
20	1,24	6,73	0,540	-6,750
25	1,01	7,01	0,538	-7,799
30	1,21	7,24	0,540	-7,172
35	1,02	7,50	0,538	-8,019
40	1,18	8,03	0,538	-7,722
45	1,14	8,43	0,536	-8,052
50	2,43	9,27	0,543	-5,287

Tabela 56. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 55%, natrijum dodecilsulfata 45%)

t [°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,98	6,36	0,554	-4,592
5	1,96	6,25	0,557	-4,564
10	1,89	6,18	0,559	-4,690
15	1,92	6,24	0,560	-4,650
20	1,97	6,47	0,561	-4,713
25	2,08	6,74	0,562	-4,642
30	2,22	6,95	0,564	-4,518
35	2,35	7,19	0,566	-4,420
40	2,52	7,71	0,563	-4,396
45	2,75	8,10	0,563	-4,225
50	3,36	8,93	0,563	-3,775

Tabela 57. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 60%, natrijum dodecilsulfata 40%)

t [°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,60	6,15	0,575	-3,273
5	2,53	6,04	0,578	-3,316
10	2,62	5,96	0,583	-3,109
15	2,65	6,01	0,585	-3,105
20	2,67	6,22	0,585	-3,246
25	2,69	6,48	0,585	-3,406
30	2,71	6,68	0,584	-3,509
35	2,89	6,91	0,587	-3,371
40	2,86	7,42	0,581	-3,745
45	2,85	7,80	0,577	-3,961
50	3,05	8,62	0,573	-4,104

Tabela 58. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 65%, natrijum dodecilsulfata 35%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,14	5,96	0,561	-6,802
5	1,06	5,84	0,563	-7,090
10	1,57	5,75	0,576	-5,343
15	1,94	5,80	0,585	-4,451
20	1,62	6,00	0,577	-5,393
25	1,69	6,24	0,578	-5,387
30	1,66	6,43	0,577	-5,618
35	1,65	6,64	0,577	-5,803
40	1,74	7,15	0,574	-5,853
45	1,65	7,52	0,570	-6,289
50	1,51	8,33	0,563	-7,089

Tabela 59. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 70%, natrijum dodecilsulfata 30%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,47	5,78	0,579	-3,911
5	1,48	5,65	0,582	-5,605
10	1,47	5,56	0,585	-5,619
15	1,5	5,60	0,586	-5,551
20	1,55	5,79	0,587	-5,583
25	1,59	6,02	0,587	-5,638
30	1,69	6,20	0,589	-5,528
35	1,78	6,40	0,591	-5,454
40	1,94	6,90	0,589	-5,358
45	2,24	7,26	0,592	-4,932
50	2,54	8,06	0,590	-4,797

Tabela 60. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 75%, natrijum dodecilsulfata 25%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,29	5,62	0,611	-3,672
5	2,32	5,47	0,616	-3,510
10	2,31	5,38	0,619	-3,467
15	2,04	5,41	0,613	-4,140
20	2,31	5,60	0,618	-3,671
25	2,73	5,81	0,678	-3,032
30	2,97	5,99	0,632	-2,743
35	3,48	6,17	0,645	-2,066
40	4,02	6,68	0,649	-1,660
45	4,03	7,02	0,643	-1,941
50	3,90	7,81	0,628	-2,681

Tabela 61. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 80%, natrijum dodecilsulfata 20%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,51	3,04	0,632	-3,199
5	2,51	3,20	0,637	-3,096
10	2,51	3,14	0,640	-3,002
15	2,66	3,26	0,646	-2,734
20	2,88	3,41	0,651	-2,485
25	3,01	3,48	0,652	-2,435
30	3,11	3,68	0,653	-2,437
35	5,11	3,99	0,720	0,999
40	5,57	4,27	0,719	1,060
45	5,91	5,70	0,719	1,118
50	8,13	5,29	0,786	4,447

Tabela 62. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 85%, natrijum dodecilsulfata 15%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,25	5,31	0,641	-3,849
5	2,29	5,15	0,646	-3,615
10	2,45	5,05	0,655	-3,158
15	3,22	5,07	0,684	-1,483
20	3,43	5,24	0,689	-1,282
25	3,74	5,44	0,697	-0,913
30	4,23	5,60	0,712	-0,143
35	5,95	5,77	0,805	4,722
40	6,45	6,24	0,802	4,636
45	6,92	6,58	0,810	5,195
50	6,88	7,35	0,756	2,289

Tabela 63. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 90%, natrijum dodecilsulfata 10%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,43	5,16	0,666	-3,588
5	2,47	5,01	0,672	-3,343
10	2,5	4,90	0,676	-3,144
15	2,59	4,92	0,681	-2,989
20	2,64	5,08	0,680	-3,080
25	2,78	5,27	0,682	-2,982
30	2,97	5,43	0,686	-2,750
35	3,44	5,58	0,701	-1,934
40	3,52	6,05	0,692	-2,311
45	3,91	6,38	0,698	-1,945
50	4,23	7,14	0,691	-2,127

Tabela 64. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 95%, natrijum dodecilsulfata 5%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,78	5,03	0,704	-3,048
5	2,96	4,87	0,717	-2,366
10	2,91	4,76	0,719	-2,353
15	3,03	4,78	0,725	-2,061
20	3,18	4,93	0,728	-1,939
25	3,24	5,11	0,726	-2,090
30	3,44	5,26	0,730	-1,815
35	3,76	5,41	0,741	-1,272
40	4,02	5,87	0,737	-1,378
45	5,63	6,20	0,801	2,617
50	5,72	6,94	0,771	0,824

Iz **Tabela 65-83** se može videti da eksperimentalno određene vrednosti kritične micelarne koncentracije (cmc^{ex}) imaju niže vrednosti od idealne (cmc^{id}) pri svakoj ispitivanoj temperaturi. Pri određivanju cmc^{ex} upotrebljena je metoda određivanja za $(x_{CMC})_2$.

Tabela 65. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 5%, natrijum dodecilsulfata 95%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,46	10,60	0,313	-5,578
5	4,47	10,83	0,315	-5,626
10	4,58	11,10	0,318	-5,562
15	4,52	11,73	0,323	-5,924
20	4,53	12,08	0,329	-5,974
25	4,58	12,83	0,333	-6,176
30	4,99	13,30	0,327	-6,016
35	5,06	14,17	0,332	-6,205
40	5,12	14,41	0,340	-6,005
45	5,94	14,69	0,329	-5,370
50	5,59	15,34	0,341	-5,753

Tabela 66. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 10%, natrijum dodecilsulfata 90%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,63	9,06	0,361	-5,603
5	3,68	9,17	0,363	-5,626
10	3,67	9,30	0,367	-5,637
15	3,78	9,55	0,367	-5,811
20	3,48	9,95	0,378	-6,201
25	3,61	10,50	0,379	-6,280
30	3,75	10,85	0,377	-6,337
35	3,61	11,40	0,384	-6,744
40	3,87	11,93	0,389	-6,261
45	6,17	12,38	0,358	-4,297
50	5,39	13,21	0,376	-4,981

Tabela 67. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 15%, natrijum dodecilsulfata 85%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,27	8,65	0,371	-4,417
5	4,26	8,71	0,374	-4,493
10	4,49	8,80	0,375	-4,283
15	4,44	9,02	0,378	-4,631
20	4,54	9,39	0,383	-4,573
25	5,00	9,88	0,380	-4,405
30	4,95	10,21	0,381	-4,664
35	5,84	10,71	0,374	-4,201
40	6,75	11,25	0,373	-3,392
45	6,49	11,70	0,381	-3,595
50	7,49	12,54	0,376	-3,095

Tabela 68. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 20%, natrijum dodecilsulfata 80%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,22	8,28	0,410	-5,291
5	3,14	8,31	0,413	-5,449
10	3,22	8,36	0,417	-5,366
15	3,31	8,54	0,416	-5,551
20	3,76	8,89	0,415	-5,032
25	4,02	9,34	0,415	-5,002
30	4,65	9,65	0,406	-4,607
35	5,29	10,09	0,403	-4,299
40	6,01	10,64	0,408	-3,571
45	5,73	11,08	0,415	-3,798
50	5,79	11,94	0,421	-3,841

Tabela 69. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 25%, natrijum dodecilsulfata 75%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,69	7,93	0,447	-7,684
5	1,72	7,93	0,448	-7,672
10	1,80	7,96	0,450	-7,466
15	1,82	8,12	0,449	-7,723
20	1,88	8,44	0,452	-7,584
25	2,03	8,85	0,452	-7,516
30	2,09	9,14	0,450	-7,620
35	2,23	9,54	0,451	-7,582
40	2,77	10,09	0,456	-6,469
45	3,57	10,53	0,453	-5,472
50	3,97	11,39	0,455	-5,116

Tabela 70. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 30%, natrijum dodecilsulfata 70%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,16	7,62	0,444	-4,965
5	3,01	7,59	0,448	-5,237
10	3,11	7,60	0,451	-5,082
15	3,32	7,73	0,448	-5,117
20	3,51	8,03	0,452	-4,897
25	3,77	8,41	0,452	-4,848
30	3,96	8,68	0,448	-4,855
35	4,27	9,05	0,449	-4,772
40	5,24	9,60	0,457	-3,720
45	5,38	10,03	0,460	-3,636
50	5,94	10,89	0,463	-3,301

Tabela 71. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 35%, natrijum dodecilsulfata 65%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,19	7,33	0,460	-4,824
5	3,19	7,28	0,461	-4,860
10	3,28	7,26	0,466	-4,759
15	3,42	7,38	0,463	-4,883
20	3,68	7,66	0,467	-4,583
25	3,84	8,01	0,468	-4,657
30	4,00	8,27	0,464	-4,699
35	4,23	8,60	0,466	-4,704
40	4,70	9,15	0,478	-4,023
45	5,32	9,57	0,480	-3,550
50	5,72	10,43	0,485	-3,325

Tabela 72. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 40%, natrijum dodecilsulfata 60%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,44	7,06	0,474	-4,438
5	3,48	6,99	0,475	-4,431
10	3,61	6,96	0,480	-4,280
15	3,62	7,06	0,477	-4,561
20	3,73	7,32	0,483	-4,447
25	3,81	7,65	0,483	-4,579
30	3,92	7,90	0,480	-4,699
35	3,99	8,20	0,482	-4,845
40	4,63	8,74	0,496	-3,995
45	5,26	9,16	0,499	-3,492
50	5,36	10,01	0,505	-3,484

Tabela 73. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 45%, natrijum dodecilsulfata 55%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,97	6,81	0,492	-6,605
5	2,2	6,72	0,493	-6,222
10	2,31	6,68	0,497	-6,010
15	2,31	6,76	0,494	-6,304
20	2,42	7,01	0,499	-6,120
25	2,5	7,32	0,499	-6,215
30	2,57	7,55	0,496	-6,330
35	2,66	7,83	0,498	-6,430
40	2,91	8,37	0,510	-5,786
45	2,88	8,77	0,512	-5,823
50	3,02	9,63	0,517	-5,714

Tabela 74. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 50%, natrijum dodecilsulfata 50%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,67	6,58	0,504	-7,271
5	1,9	6,48	0,505	-6,794
10	1,92	6,42	0,509	-6,737
15	1,91	6,49	0,506	-7,060
20	1,84	6,73	0,510	-7,191
25	1,64	7,01	0,509	-7,865
30	1,79	7,24	0,507	-7,760
35	1,78	7,50	0,508	-8,000
40	2,08	8,03	0,520	-7,114
45	2,23	8,42	0,522	-6,812
50	2,48	9,27	0,527	-6,454

Tabela 75. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 55%, natrijum dodecilsulfata 45%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,86	6,36	0,515	-6,833
5	2,53	6,25	0,519	-5,664
10	2,55	6,18	0,523	-5,591
15	2,62	6,24	0,522	-5,876
20	2,70	6,47	0,529	-5,789
25	2,84	6,74	0,527	-5,750
30	3,06	6,95	0,522	-5,619
35	3,49	7,19	0,525	-5,323
40	3,57	7,71	0,540	-4,921
45	3,55	8,10	0,543	-4,959
50	6,42	8,93	0,571	-2,595

Tabela 76. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 60%, natrijum dodecilsulfata 40%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,16	6,15	0,535	-4,756
5	2,97	6,03	0,535	-5,056
10	3,19	5,96	0,542	-4,753
15	3,4	6,01	0,538	-4,803
20	3,31	6,22	0,543	-4,882
25	3,69	6,48	0,544	-4,662
30	3,38	6,68	0,537	-5,251
35	3,62	6,91	0,539	-5,193
40	3,72	7,42	0,556	-4,780
45	3,47	7,80	0,557	-5,080
50	3,92	8,62	0,565	-4,615

Tabela 77. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 65%, natrijum dodecilsulfata 35%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,17	5,96	0,532	-8,840
5	1,10	5,84	0,532	-9,136
10	1,87	5,75	0,543	-6,956
15	1,98	5,80	0,540	-7,039
20	1,93	6,00	0,544	-7,122
25	1,99	6,24	0,544	-7,247
30	2,00	6,43	0,540	-7,447
35	2,07	6,64	0,541	-7,529
40	2,18	7,15	0,554	-7,003
45	2,45	7,52	0,559	-6,523
50	3,17	8,33	0,571	-5,522

Tabela 78. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 70%, natrijum dodecilsulfata 30%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,85	5,78	0,550	-7,097
5	1,85	5,65	0,551	-7,153
10	1,84	5,56	0,555	-7,154
15	1,87	5,60	0,551	-7,404
20	1,97	5,79	0,556	-7,143
25	2,05	6,02	0,556	-7,228
30	2,22	6,20	0,554	-7,154
35	2,44	6,40	0,556	-6,975
40	2,77	6,90	0,574	-6,143
45	3,39	7,26	0,585	-5,314
50	3,80	8,06	0,595	-4,890

Tabela 79. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 75%, natrijum dodecilsulfata 25%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,62	5,62	0,574	-5,857
5	2,93	5,47	0,579	-5,432
10	2,73	5,38	0,582	-5,727
15	2,69	5,41	0,574	-6,067
20	3,70	5,60	0,595	-4,735
25	3,43	5,81	0,588	-5,285
30	4,35	5,99	0,594	-4,556
35	4,92	6,17	0,600	-4,255
40	5,12	6,67	0,626	-3,705
45	4,22	7,02	0,614	-4,534
50	4,34	7,81	0,620	-4,441

Tabela 80. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 80%, natrijum dodecilsulfata 20%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,54	3,04	0,588	-6,206
5	2,53	3,20	0,589	-6,288
10	2,55	3,14	0,594	-6,217
15	2,66	3,26	0,589	-6,355
20	3,25	3,41	0,604	-5,464
25	3,43	3,48	0,604	-5,480
30	3,31	3,68	0,596	-5,901
35	7,01	3,99	0,655	-2,941
40	7,03	4,27	0,691	-2,466
45	6,4	5,70	0,679	-2,865
50	14,39	5,90	0,524	3,487

Tabela 81. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 85%, natrijum dodecilsulfata 15%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,27	10,01	0,600	-7,034
5	2,45	10,07	0,604	-6,752
10	2,9	9,78	0,618	-5,997
15	4,85	10,74	0,649	-4,133
20	5,39	10,40	0,669	-3,582
25	5,88	11,01	0,673	-3,441
30	6,18	11,87	0,667	-3,523
35	9,49	12,43	0,548	0,939
40	9,51	10,79	0,700	1,271
45	8,85	10,65	0,642	1,136
50	9,68	10,55	0,756	1,473

Tabela 82. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 90%, natrijum dodecilsulfata 10%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,68	9,98	0,651	-5,474
5	3,77	10,03	0,653	-5,387
10	3,79	9,71	0,659	-5,285
15	4,06	10,68	0,655	-5,369
20	4,09	10,31	0,662	-5,259
25	4,53	10,92	0,667	-5,074
30	4,97	11,79	0,666	-4,929
35	4,56	12,33	0,655	-5,564
40	5,26	10,62	0,695	-4,445
45	5,94	10,47	0,399	0,744
50	5,49	10,35	0,709	-4,229

Tabela 83. Vrednosti molskog udela natrijum deoksiholata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum deoksiholata 95%, natrijum dodecilsulfata 5%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,99	9,94	0,714	-4,897
5	4,91	9,98	0,712	-5,026
10	4,89	9,64	0,679	-3,257
15	4,98	10,62	0,706	-5,273
20	5,13	10,23	0,673	-3,148
25	5,58	10,82	0,687	-3,366
30	5,69	11,72	0,683	-3,839
35	6,28	12,24	0,684	-3,319
40	7,79	10,46	0,705	0,218
45	11,28	10,30	0,689	4,433
50	6,85	10,16	0,524	0,969

4.5.4 Zaključak

Prema Regular Solution Theory (RST) koeficijent molekularne interakcije u binarnim mešovitim micelama surfaktanata ne zavisi od temperature, već isključivo od razlike energije međumolekulskih interakcija u binarnom stanju i u monokomponentnom stanju. Stoga, konstantnost $\beta_{1,2}$ u toku promene temperature označava da se može prihvatiti primena RST. U tabelama 46-82 može se uzeti konstantnost koeficijenta $\beta_{1,2}$ u funkciji temperature, odnosno da standardna devijacija $\beta_{1,2}$ za ispitivani temperaturni opseg je u granici SD određivanja $\beta_{1,2}$ polazeći od CMC. Sa povećanjem molskog udela natrijum deoksiholata u binarnoj smeši surfaktanata opada koeficijent interakcije. Ovo znači da je binarna mešovita micela natrijum deoksiholata i natrijum dodecilsulfata u odnosu na idealnu mešovitu micelu najstabilnija pri $\alpha = 0.05$ natrijum deoksiholata. Naime, što je manja količina natrijum deoksiholata, to se konformaciono kruti steroidni skelet lakše uklapa u konformaciono fleksibilan i uopšteno pokretljivi hidrofobni domen natrijum dodecil sulfata. Sa povećanjem molskog udela natrijum deoksiholata sve više dolazi do problema pakovanja, te dolazi do opadanja koeficijenta interakcije.

4.6 Termodinamičko ispitivanje binarnih mešoviti micela natrijum-dodecil sulfata i natrijum 7-okso-deoksiholata u različitim molskim odnosima i uticaj temperature na molski udeo i interakcioni parametar

4.6.1 Materijal

Piren i natrijum dodecilsulfat su poreklom iz Sige, čistoće 99.98%. $3\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-7-okso- 5β -holanoična (7-okso-deoksiholna) kiselina je sintetisana po metodi Tullar-a (159).

4.6.2 Metode - Spektrofluorimetrijska merenja

Spektrofluorimetrijska merenja su rađena sa Agilent Cary Eclipse fluorescence spektrofotometrom. Rastvori natrijum 7-okso-deoksiholata i natrijum dodecilsulfata su pripremljeni upotrebom zasićenog vodenog rastvora pirena. Pripremljeni su rastvori sa molskim udelom natrijum 7-okso-deoksiholata (natrijum 7-okso-deoksiholat + natrijum dodecilsulfat 100%) 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%. Piren je ekscitovan na 334 nm. Praćena je promena intenziteta prvog (I_1 , 373 nm) i trećeg (I_3 , 384 nm) vibracionog snopa emisionog spektra pirena u funkciji koncentracije surfaktanata na temperaturama 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, i 50 °C. Greške u određivanju CMC se procenjuje da je manje od 3% ($n = 5$).

4.6.3 Rezultati i diskusija

Iz **Tabela 84-102** se može videti da eksperimentalno određene vrednosti kritične micelarne koncentracije (cmc^{ex}) imaju niže vrednosti od idealne (cmc^{id}) pri svakoj ispitivanoj temperaturi. Pri određivanju cmc^{ex} upotrebljena je metoda određivanja za $(x_{CMC})_1$.

Tabela 84. Vrednosti moluskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molški udeo natrijum dodecilsulfata 5%, natrijum 7-oksodeoksiholata 95%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	0,74	10,33	0,6178	-14,850
5	1,52	10,60	0,646	-12,137
10	1,46	10,81	0,639	-12,074
15	2,33	11,17	0,660	-10,169
20	1,99	11,66	0,648	-10,936
25	2,56	12,35	0,659	-10,148
30	2,59	12,86	0,664	-10,699
35	3,53	13,62	0,682	-9,172
40	3,26	14,12	0,676	-10,374
45	2,49	14,61	0,662	-11,972
50	3,87	15,39	0,684	-10,129

Tabela 85. Vrednosti moluskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molški udeo natrijum dodecilsulfata 10%, natrijum 7-oksodeoksiholata 90%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,84	10,69	0,634	-10,008
5	2,05	11,00	0,642	-9,907
10	2,23	11,17	0,640	-9,302
15	2,77	11,54	0,651	-8,527
20	2,753	12,03	0,645	-8,568
25	3,59	12,74	0,659	-7,683
30	3,52	13,36	0,664	-8,460
35	3,8	14,16	0,668	-8,530
40	3,25	14,71	0,657	-9,479
45	3,16	15,25	0,657	-9,995
50	3,84	16,04	0,665	-9,313

Tabela 86. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 15%, natrijum 7-oksodeoksiholata 85%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	0,799	11,07	0,592	-13,007
5	1,33	11,43	0,610	-11,232
10	1,79	11,55	0,615	-9,733
15	2,07	11,94	0,620	-9,268
20	2,33	12,42	0,621	-8,813
25	3,1	13,17	0,634	-7,903
30	2,97	13,90	0,639	-8,777
35	2,79	14,75	0,635	-9,425
40	3,25	15,34	0,643	-9,030
45	3,67	15,94	0,652	-8,883
50	3,92	16,76	0,652	-8,769

Tabela 87. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 20%, natrijum 7-oksodeoksiholata 80%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,92	11,47	0,630	-7,247
5	3,40	11,90	0,643	-6,929
10	3,92	11,97	0,645	-6,086
15	4,42	12,37	0,652	-5,703
20	4,47	12,84	0,647	-5,746
25	4,37	13,62	0,641	-6,105
30	4,78	14,48	0,656	-6,378
35	4,92	15,40	0,657	-6,657
40	4,96	16,04	0,658	-6,940
45	5,08	16,70	0,661	-7,179
50	7,48	17,55	0,691	-5,598

Tabela 88. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 25%, natrijum 7-oksodeoksiholata 75%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,30	11,91	0,643	-5,414
5	4,55	12,40	0,652	-5,534
10	4,22	12,41	0,636	-5,614
15	4,01	12,83	0,630	-5,977
20	4,26	13,29	0,628	-5,773
25	4,46	14,10	0,628	-5,857
30	4,73	15,11	0,642	-6,306
35	4,64	16,10	0,639	-6,741
40	5,00	16,79	0,645	-6,731
45	3,81	17,53	0,631	-8,305
50	4,49	18,41	0,636	-7,748

Tabela 89. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 30%, natrijum 7-oksodeoksiholata 70%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,06	12,39	0,624	-5,563
5	3,84	12,94	0,625	-6,162
10	4,42	12,89	0,624	-5,287
15	4,26	13,33	0,620	-5,615
20	4,33	13,77	0,615	-5,604
25	4,45	14,61	0,613	-5,726
30	4,34	15,80	0,623	-6,566
35	3,99	16,87	0,618	-7,298
40	3,88	17,63	0,618	-7,731
45	4,48	18,46	0,629	-7,517
50	5,54	19,36	0,637	-6,731

Tabela 90. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 35%, natrijum 7-oksodeoksiholata 65%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,36	12,90	0,599	-6,274
5	3,68	13,54	0,609	-6,261
10	3,26	13,41	0,594	-6,532
15	3,65	13,86	0,598	-6,208
20	3,65	14,29	0,592	-6,232
25	3,77	15,17	0,591	-6,343
30	3,96	16,56	0,606	-6,901
35	3,99	17,72	0,607	-7,259
40	4,49	18,55	0,614	-7,047
45	4,65	19,48	0,619	-7,271
50	5,46	20,42	0,624	-6,755

Tabela 91. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 40%, natrijum 7-oksodeoksiholata 60%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,47	13,46	0,601	-5,068
5	4,83	14,20	0,612	-5,117
10	4,74	13,97	0,600	-4,953
15	5,18	14,44	0,603	-4,705
20	4,95	14,85	0,594	-4,952
25	5,05	15,77	0,592	-5,109
30	5,1	17,40	0,606	-5,787
35	5,28	18,65	0,609	-6,046
40	5,52	19,58	0,613	-6,154
45	5,89	20,63	0,621	-6,282
50	6,11	21,59	0,618	-6,256

Tabela 92. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 45%, natrijum 7-oksodeoksiholata 55%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,02	12,33	0,581	-5,503
5	4,00	13,02	0,588	-5,926
10	4,16	12,79	0,579	-5,497
15	4,04	13,23	0,576	-5,737
20	4,34	13,60	0,574	-5,513
25	4,46	14,44	0,573	-5,644
30	4,66	15,96	0,589	-6,199
35	4,24	17,12	0,587	-6,999
40	5,56	17,98	0,601	-6,166
45	6,51	18,95	0,614	-5,892
50	3,68	19,84	0,584	-8,381

Tabela 93. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 50%, natrijum 7-oksodeoksiholata 50%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,19	14,74	0,569	-5,379
5	4,28	15,73	0,578	-5,707
10	4,31	15,24	0,566	-5,370
15	4,51	15,76	0,567	-5,338
20	4,62	16,11	0,562	-5,276
25	4,65	17,12	0,561	-5,508
30	5,02	19,35	0,579	-5,929
35	5,39	20,86	0,584	-6,033
40	5,37	22,01	0,586	-6,339
45	5,91	23,37	0,596	-6,373
50	5,84	24,41	0,591	-6,550

Tabela 94. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 55%, natrijum 7-oksodeoksiholata 45%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,05	15,47	0,559	-5,763
5	4,27	16,62	0,569	-5,966
10	4,44	15,97	0,558	-5,492
15	4,77	16,52	0,560	-5,360
20	4,49	16,83	0,552	-5,621
25	4,63	17,89	0,552	-5,755
30	4,86	20,49	0,569	-6,305
35	4,76	22,17	0,571	-6,799
40	5,01	23,46	0,583	-7,223
45	5,48	25,04	0,584	-6,939
50	6,59	26,11	0,587	-6,294

Tabela 95. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 60%, natrijum 7-oksodeoksiholata 40%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,84	16,28	0,534	-7,13
5	2,41	17,62	0,539	-8,21
10	1,84	16,77	0,526	-8,96
15	1,60	17,34	0,525	-9,68
20	1,56	17,61	0,521	-9,79
25	0,68	18,73	0,517	-13,40
30	0,89	21,79	0,528	-13,07
35	0,87	23,65	0,530	-13,55
40	2,22	25,12	0,543	-10,13
45	2,45	26,97	0,549	-10,14
50	2,68	28,06	0,548	-9,90

Tabela 96. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 65%, natrijum 7-oksodeoksiholata 35%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,52	17,18	0,528	-5,410
5	5,03	18,75	0,539	-5,265
10	5,3	17,65	0,526	-4,740
15	5,45	18,26	0,527	-4,894
20	5,88	18,46	0,522	-4,612
25	6,02	19,65	0,522	-4,761
30	5,32	23,26	0,540	-6,048
35	5,93	25,35	0,546	-6,006
40	5,58	27,04	0,548	-6,548
45	6,67	29,21	0,560	-6,268
50	7,35	30,33	0,558	-5,963

Tabela 97. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 70%, natrijum 7-oksodeoksiholata 30%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	2,83	18,18	0,510	-7,467
5	3,21	20,03	0,519	-7,379
10	3,92	18,64	0,508	-6,234
15	4,25	19,28	0,509	-6,069
20	4,48	19,41	0,504	-5,873
25	4,70	20,67	0,504	-5,912
30	5,00	24,94	0,525	-6,506
35	5,28	27,31	0,529	-6,656
40	5,67	29,27	0,534	-6,677
45	6,45	31,86	0,544	-6,599
50	7,34	33,01	0,543	-6,192

Tabela 98. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 75%, natrijum 7-oksodeoksiholata 25%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	6,15	19,31	0,495	-4,585
5	5,41	21,51	0,507	-5,530
10	5,90	19,74	0,491	-4,819
15	5,66	20,42	0,492	-5,134
20	6,04	20,45	0,486	-4,890
25	6,07	21,80	0,487	-5,117
30	5,81	26,88	0,510	-6,127
35	7,27	29,61	0,517	-5,642
40	7,26	31,91	0,522	-5,963
45	8,76	35,05	0,533	-5,631
50	10,19	36,19	0,532	-5,146

Tabela 99. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 80%, natrijum 7-oksodeoksiholata 20%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	4,39	20,59	0,478	-6,219
5	4,95	23,21	0,489	-6,204
10	5,28	20,97	0,473	-5,564
15	5,66	21,71	0,473	-5,432
20	5,67	21,62	0,468	-5,443
25	5,70	23,06	0,469	-5,657
30	5,75	29,14	0,493	-6,499
35	6,19	32,32	0,498	-6,598
40	6,46	35,06	0,504	-6,777
45	6,99	38,93	0,512	-6,873
50	7,91	40,06	0,510	-6,502

Tabela 100. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 85%, natrijum 7-oksodeoksiholata 15%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	6,88	22,05	0,454	-4,969
5	7,53	25,21	0,461	-4,919
10	7,53	22,38	0,448	-4,673
15	7,52	23,16	0,444	-4,611
20	8,06	22,92	0,435	-4,396
25	8,65	24,48	0,436	-4,378
30	8,55	31,83	0,468	-5,333
35	9,27	35,58	0,475	-5,439
40	10,56	38,91	0,480	-5,232
45	12,93	43,79	0,491	-4,892
50	15,17	44,86	0,486	-4,351

Tabela 101. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 90%, natrijum 7-oksodeoksiholata 10%)

$t[^\circ\text{C}]$	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	3,71	22,05	0,441	-7,922
5	4,19	25,21	0,449	-7,887
10	4,13	22,38	0,437	-7,587
15	4,73	23,16	0,434	-7,165
20	5,31	22,92	0,426	-6,693
25	5,69	24,48	0,426	-6,658
30	6,59	31,83	0,448	-6,996
35	6,87	35,58	0,455	-7,277
40	6,86	38,91	0,461	-7,611
45	7,87	43,79	0,469	-7,531
50	9,73	44,86	0,463	-6,764

Tabela 102. Vrednosti molskog udela natrijum natrijum dodecilsulfata (x_1) i interakcionog parametra između gradivnih jedinica (β) (molski udeo natrijum dodecilsulfata 95%, natrijum 7-oksodeoksiholata 5%)

t[°C]	cmc^{ex}	cmc^{id}	x_1	$\beta_{1,2}$
0	1,84	25,69	0,431	-11,882
5	2,05	30,46	0,437	-11,911
10	2,23	25,84	0,426	-11,196
15	2,77	26,75	0,421	-10,420
20	2,82	26,08	0,418	-10,369
25	3,59	27,90	0,413	-9,625
30	3,52	39,03	0,434	-10,676
35	3,79	44,56	0,438	-10,800
40	3,25	49,85	0,446	-11,789
45	3,16	58,36	0,453	-12,347
50	3,84	58,98	0,449	-11,669

4.6.4 Zaključak

Prema Regular Solution Theory (RST) koeficijent molekularne interakcije u binarnim mešovitim micelama surfaktanata ne zavisi od temperature, već isključivo od razlike energije međumolekulskih interakcija u binarnom stanju i u monokomponentnom stanju. Stoga, konstantnost $\beta_{1,2}$ u toku promene temperature označava da se može prihvatiti primena RST. U tabelama 83-102. može se uzeti konstantnost koeficijenta $\beta_{1,2}$ u funkciji temperature, odnosno da standardna devijacija $\beta_{1,2}$ za ispitivani temperaturni opseg je u granici SD određivanja $\beta_{1,2}$ polazeći od CMC. Sa povećanjem molskog udela natrijum 7-oksodeoksiholata u binarnoj smeši surfaktanata opada koeficijent interakcije. Što je manja količina natrijum 7-oksodeoksiholata, to se konformaciono kruti steroidni skelet lakše uklapa u konformaciono fleksibilan i uopšteno pokretljivi hidrofobni domen natrijum dodecil sulfata. Sa povećanjem molskog udela natrijum 7-oksodeoksiholata sve više dolazi do problema pakovanja, te dolazi do opadanja koeficijenta interakcije.

5 ZAKLJUČAK

Kapacitet solubilizacije holesterola (C_{Chm}) i ravnotežna micelarna solubilizacija holesterola (x_{Chm}) međusobno pokazuju veliku korelaciju. Pri supstituciji α aksijalne OH grupe sa okso grupom ili sa α ekvatorijalnom OH grupom pomera se jezgro kiseonika ka srednjoj ravni steroidnog skeleta žučnih kiselina što onda smanjuje hidrofobnost β strane steroidnog jezgra, samim tim se smanjuje i njihova moć solubilizacije holesterola, to jest membranolitička aktivnost. Na osnovu moći solubilizacije holesterol monohidrata (C_{Chm} and x_{Chm}) i osmotske otpornosti optimalna žučna kiselina je 12-monoketodeoksiholna kiselina, koja ima 26% kapaciteta solubilizacije u odnosu na henodeoksiholnu kiselinu, ali ne pokazuje membranolitičku aktivnost.

Ispitivanjem holne i deoksiholne kiseline i njihovih okso derivata, pokazalo se da hidrofobnije soli žučnih kiselina imaju veće vrednosti pK_a iznad CMC (micelarna faza). Žučne soli imaju niže vrednosti kapaciteta solubilizacije kako im se povećava hidrofobnost. CMC vrednosti koje su dobijene potenciometrijskom titracijom u ovom radu, odgovaraju vrednostima dobijenih spektrofluorifotometrijskim i tenziometrijskim metodama.

Mešovite micelle natrijum holata i natrijum dodecilsulfata (1:1) su termodinamički stabilnije od idealnih mešovutih micela. Postoji sinergistički efekat ($\beta_{1,2} < 0$) u mešovitim micelama u temperaturnom intervalu od 0 °C do 50 °C. Mešovite micelle su praktično u potpunosti jonizovane, vezivanje suprotno naelektrisanih jona je zanemarljivo. Molekulsko–dinamički modeli za ispitivane binarne smeše surfaktanata na 25 °C pokazuju da je molski udeo mešovutih micela konzistentan sa vrednostima dobijenim određivanjem kritične micelarne koncentracije i postoji vezivanje suprotno naelektrisanih jona za mešovite micelle, koje se razlikuje od konduktometrijskih merenja. Upotrebom teoretskih izračunavanja, potvrdili smo oblik micelle i distribuciju različitih komponenata unutar formiranih micela.

Prema Regular Solution Theory (RST) koeficijent molekularne interakcije u binarnim mešovitim micelama surfaktanata ne zavisi od temperature, već isključivo od razlike energije međumolekulskih interakcija u binarnom stanju i u monokomponentnom stanju. Stoga, konstantnost $\beta_{1,2}$ u toku promene temperature označava da se može prihvatiti primena RST. U tabelama 8-45 može se uzeti

konstatnost koeficijenta $\beta_{1,2}$ u funkciji temperature, odnosno da standardna devijacija $\beta_{1,2}$ za ispitivani temperaturni opseg je u granici SD određivanja $\beta_{1,2}$ polazeći od CMC. Sa povećanjem molskog udela natrijum holata u binarnoj smeši surfaktanata opada koeficijent interakcije. Ovo znači da je binarna mešovita micela natrijum holata i natrijum dodecilsulfata u odnosu na idealnu mešovitu micelu najstabilnija pri $\alpha = 0.05$ natrijum holata. Naime, što je manja količina natrijum holata, to se konformaciono kruti steroidni skelet lakše uklapa u konformaciono fleksibilan i uopšteno pokretljivi hidrofobni domen natrijum dodecil sulfata. Sa povećanjem molskog udela natrijum holata sve više dolazi do problema pakovanja, te dolazi do opadanja koeficijenta interakcije.

Prema Regular Solution Theory (RST) koeficijent molekularne interakcije u binarnim mešovitim micelama surfaktanata ne zavisi od temperature, već isključivo od razlike energije međumolekulskih interakcija u binarnom stanju i u monokomponentnom stanju. Stoga, konstantnost $\beta_{1,2}$ u toku promene temperature označava da se može prihvatiti primena RST. U tabelama 46-82 može se uzeti konstatnost koeficijenta $\beta_{1,2}$ u funkciji temperature, odnosno da standardna devijacija $\beta_{1,2}$ za ispitivani temperaturni opseg je u granici SD određivanja $\beta_{1,2}$ polazeći od CMC. Sa povećanjem molskog udela natrijum deoksiholata u binarnoj smeši surfaktanata opada koeficijent interakcije. Ovo znači da je binarna mešovita micela natrijum deoksiholata i natrijum dodecilsulfata u odnosu na idealnu mešovitu micelu najstabilnija pri $\alpha = 0.05$ natrijum deoksiholata. Naime, što je manja količina natrijum deoksiholata, to se konformaciono kruti steroidni skelet lakše uklapa u konformaciono fleksibilan i uopšteno pokretljivi hidrofobni domen natrijum dodecil sulfata. Sa povećanjem molskog udela natrijum deoksiholata sve više dolazi do problema pakovanja, te dolazi do opadanja koeficijenta interakcije, kao što isto važi i za sistem 7-oksodeoksiholata.

6 LITERATURA

- 1) Calabresi, M.; Andreozzi, P.; La Mesa, C. Supra-molecular association and polymorphic behaviour in systems containing bile acid salts. *Molecules*, 2007, 12(8), 1731-1754.
- 2) Dopico, M.A.; Walsh, V.J.; Singer, J. Natural bile acids and synthetic analogues modulate large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) channel activity in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.*, 2002, 119, 251-273.
- 3) Chiang, J.Y. Bile acid regulation of hepatic physiology III. Bile acids and nuclear receptors. *Am. J. Physiol.*, 2003, 284, G349-G356.
- 4) Rao, P.Y.; Stravitz, T.R.; Vlahcevic, R.Z.; Curley, C.E.; Sando, J.J.; Hylemon, B.P. Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acids structure and diacylglycerol formation. *J. Lipid Res.*, 1997, 38, 2446-2454.
- 5) Thomas, C.; Pellicciari, R.; Pruzanski, M.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Rev. Drug Discov.*, 2008, 7, 678–693.
- 6) Mikov, M.; Fawcett, J.P. *Bile Acids*, 1rd ed.; Medishet Publisher: Geneva, 2007.
- 7) Hoffmann, F.A.; Roda, A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J. Lipid Res.*, 1984, 25, 1477-1489.
- 8) Armstrong, J.M.; Carey, C.M. The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *J. Lipid Res.*, 1982, 23, 70-80.
- 9) Roda, A.; Minutello, A.; Angellotti, M.A.; Fini, A. Bile acid structure-activity relationships: evaluation of bile acids lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *J. Lipid Res.*, 1990, 31, 1433-1443.
- 10) Heuman, M.D. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *J. Lipid Res.*, 1989, 30, 719-730.

- 11) Poša, M.; Kuhajda, K. Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids. *Steroids*, 2010, 75(6), 424-431.
- 12) Garidel, P.; Hildebrand, A.; Knauf, K.; Blume, A. Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition. *Molecules*, 2007, 12(10), 2292-2326.
- 13) Poša, M.; Farkaš, Z. Cholesterol solubilization by oxo derivatives of selected bile acids and their osmotic resistance. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2010, 75(8), 767-784.
- 14) Mikov, M.; Kevresan, S.; Kuhajda, K.; Jakovljević, V.; Vasović, V. 3 α ,7 α -dihydroxy-12-oxo-5 β -cholanate as blood-brain barrier permeator. *Pol. J. Pharmacol.*, 2004, 56, 367-371.
- 15) Yang, L.; Zhang, H.; Mikov, M.; Tucker, I.G. Physicochemical and biological characterization of monoketocholic acid, a novel permeability enhancer. *Molecular Pharmaceutics*, 2009, 6(2), 448-456.
- 16) Al-Salami, H.; Butt, G.; Tucker, I.G.; Mikov, M. Influence of the semisynthetic bile acid MKC on the ileal permeation of gliclazide in vitro in healthy and diabetic rats treated with probiotics. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 2008, 30(2), 107-113.
- 17) Poša, M.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Ćirin-Novta, V.; Kuhajda, K. Effect of cholic acid and its keto derivatives on the analgesic action of lidocaine and associated biochemical parameters in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2007, 32, 109-117.
- 18) Kuhajda, I.; Poša, M.; Jakovljević, V.; Ivetić, V.; Mikov, M. Effect of 12-monoketocholic acid on modulation of the analgesic action of morphine and tramadol. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2009, 34, 73-78.
- 19) Vasović, V.; Vukmirović, S.; Poša, M.; Mikov, M.; Rašković, A.; Jakovljević, V. Effect of rat pretreatment with aqueous solution of stevioside and bile acids on the action of certain cardioactive drugs. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 311-314.
- 20) Rašković, A.; Mikov, M.; Škrbić, R.; Jakovljević, V.; Vasović, V.; Poša, M.; Kuhajda, K.; Kevrešan, S.; Tomić, Z.; Siladji, Dj. Effect of stevioside and

- sodium salt of monoketochohic acid on glycemia in normoglycemic and diabetic rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2008, 33, 17–22.
- 21) Poša, M.; Kuhajda, K. Influence of bile acids on the adsorption of lidocaine and verapamil in an in vitro experiment, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2010, 75(4), 433-440
- 22) Donovan JM, Carey MC. 1991. Physical-chemical basis of gallstone formation. In: Cooper AD, editor. Pathogenesis and therapy of gallstone disease. New York: Saunders. pp 47–66.
- 23) Danzinger RG, Hofmann AF, Schoenfield JL, Thistle JL. 1972. Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *N Engl J Med* 286:1–8.
- 24) Hofmann AF. 1984. Medical treatment of cholesterol gallstones by bile desaturating agents. *Hepatology* 4:199S–208S
- 25) Tint SG, Salen G, Colalillo A, Graber D, Verga D, Speck J, Sheffer S. 1982. Ursodeoxycholic acid: A safe and effective agent for dissolving cholesterol gallstone. *Ann Intern Med* 97:351–356.
- 26) Stiehl A, Raedsch R, Czygan P, Gotz R, Manner CH, Walker S, Kommerell B. 1980. Effects of biliary bile acid composition on biliary cholesterol saturation in gallstone patients treated with chenodeoxycholic acid and/or ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 79:1192–1198.
- 27) Roehrkasse R, Fromm H, Malavolti M, Tunuguntla AK, Ceryak S. 1986. Gallstone dissolution treatment with a combination of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. *Dig Dis Sci* 31:1032–1040.
- 28) Podda M, Zuin M, Battezzati PM, Ghezzi C, de Fazio C, Dioguardi ML. 1989. Efficacy and safety of a combination of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid for gallstone dissolution: A comparison with ursodeoxycholic acid alone. *Gastroenterology* 96:222–229.
- 29) Lee PH, Higuchi WI, Mazer NA. 1990. Cholesterol monohydrate dissolution rates and solubilities in aqueous taurocholate, taurochenodeoxycholate and tauroursodeoxycholate solutions: A comparative study. *J Colloid Interface Sci* 137:48–65.
- 30) Lee PH, Higuchi WI, Adachi Y, Mazer NA. 1992. Mechanisms of cholesterol monohydrate dissolution in aqueous taurocholate-, taurochenodeoxycholate-, and

- tauroursodeoxycholate-lecithin solutions—Correlation between micellar species and dissolution rates. *J Colloid Interface Sci* 154: 35–50.
- 31) Higuchi WI, Tzeng CS, Chang SJ, Chiang HJ, Liu CL. Estimation of Cholesterol Solubilization by a Mixed Micelle Binding Model in Aqueous Tauroursodeoxycholate:Lecithin:Cholesterol Solutions. 2008. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97: 1, 340-349.
- 32) Mitra S, dungan SR, 2001, Cholesterol Solubilization in Aqueous Micellar Solutions of Quillaja Saponin, Bile Salts, or Nonionic Surfactants, *J. Agric. Food Chem* 49, 384-394
- 33) Ed. Nair PP, Kritchevsky D, *The Bile Acids, Chemistry, Physiology and Metabolism, Volume 1: Chemistry,; The Physical Chemistry of Cholic Acid*, p331
- 34) Coreta-Gomes FM, Vaz WL, Wasielewski E, Geraldés CF, Moreno MJ, Quantification of cholesterol solubilized in bile salt micellar aqueous solutions using ¹³C nuclear magnetic resonance, 2012, *Anal Biochem*. 427(1):41-8. doi: 10.1016
- 35) Jain A, Ran Y, Yalkowsky S, Effect of pH-Sodium Lauryl Sulfate Combination on Solubilization of PG-300995 (an Anti-HIV Agent): A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*. 2004; 5(3): article 45.
- 36) Camile W.: *The Practice of Medicinal Chemistry*, p. 636. Academic Press, Oxford 2003.2.
- 37) Carey M., Small D.: *J. Colloid Interface Sci*. 1969, 31, 382.3.
- 38) Calabresi M., Andreozzi P., La Mesa C.: *Molecules* 2007, 12, 1731.4.
- 39) Mikov M., Fawcett J. P.: *Bile Acids*, p. 177. Medishet Publisher, Geneva 2007.
- 40) Reynolds J. E. F.: *Martindale – The Extra Pharmacopoeia*. McMillan, London 1996.
- 41) Bowe C., Mokhtarzadeh L., Venkatesen P., Babu S., Axelrod H., Sofia M. J., Kakarla R., Chan T. Y., Kim J. S., Lee H. J., Amidon G. L., Choe S. Y., Walker S., Kahne D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94, 12218.
- 42) Gordon G. S., Moses A. C., Silver R. D., Flier J. R., Carey M. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985, 82, 7419.

- 43) Murakami T., Sasaki Y., Yamajo R., Yata N.: *Chem. Pharm. Bull.* 1984, 32, 1948.
- 44) Longenecker J. P. in: *Delivery Systems for Peptide Drugs* (S. Davis, L. Illum and E. Tomlinson, Eds). Plenum, New York 1987.
- 45) Hirari S., Yashiki T., Mima H.: *Int. J. Pharm.* 1981, 9, 173.
- 46) Poša M., Kevrešan S., Mikov M., Ćirin-Novta V., Sârbu C., Kuhajda K.: *Colloids Surf., B*2007, 59, 179.
- 47) Poša M., Kevrešan S., Mikov M., Ćirin-Novta V., Kuhajda K.: *Colloids Surf., B* 2008, 64, 151.
- 48) Poša M., Guzsvány V., Csanádi J.: *Colloids Surf., B* 2009, 74, 84.
- 49) Poša M., Guzsvány V., Csanádi J., Borbas J., Gaal F.: *Acta Chim. Slov.* 2009, 56, 807.
- 50) Roda A., Hofmann A. F., Mysels K. J.: *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 6362.
- 51) Vasović V., Vukmirović S., Poša M., Mikov M., Rašković A., Jakovljević V.: *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 2006, 31, 311.
- 52) Poša M., Kevrešan S., Mikov M., Ćirin-Novta V., Kuhajda K.: *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 2007, 32, 109.
- 53) Poša M., Guzsvány V., Csanádi J., Kevrešan S., Kuhajda K.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008, 34, 281.
- 54) Parpart K. A., Lorenz B. P., Parpart R. E., Gregg R. J., Chase M. A.: *J. Clin. Invest.* 1947, 26, 636.
- 55) Schultz S. G.: *Basic Principles of Membrane Transport*. IUPAB Biophysics Series, p. 24. Cambridge University Press, London 1980.
- 56) Kuhajda, K.; Kandrak, J.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Fawcett, J.P. Structure and origin of bile acids: An overview. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 135–143.
- 57) Kevrešan, S.; Kuhajda, K.; Kandrak, J.; Fawcett, J.P.; Mikov, M. Biosynthesis of bile acids in mammalian liver. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 145–156.
- 58) Kuhajda, K.; Kevrešan, S.; Kandrak, J.; Fawcett, J.P.; Mikov, M. Chemical and metabolic transformations of selected bile acids. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 2006, 31, 179–235.

- 59) Carey, M.C.; Montet, J-C.; Phillips, M.C.; Armstrong, M.J.; Mazer, N.A. Thermodynamic and molecular basis for dissimilar cholesterol solubilizing capacities by micellar solutions of bile salts: cases of sodium chenodeoxycholate and sodium ursodeoxycholate and their glycine and taurine conjugates. *Biochemistry*, 1981, 20, 3637-3648.
- 60) Mazer, N.A.; Carey, M.C.; Kwasnick, R.F.; Benedek, G.B. Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size, shape and thermodynamics of bile salt micelles. *Biochemistry*, 1979, 18, 3064-3075.
- 61) Bertolasi, V.; Ferretti, V.; Fantin, G.; Fogagnolo, M. Solid state molecular assemblies of five bile acid derivatives. *Z. Kristallogr.*, 2008, 223, 515-523.
- 62) Camile, W. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; Academic Press: Oxford, 2003.
- 63) Pártai, B.L.; Segal, M.; Jedlovsky, P. Morphology of bile salts micelles as studied by computer simulation Methods. *Langmuir*, 2007, 23, 12322-12328.
- 64) Kyte, J. The basis of the hydrophobic effect. *Biophysical Chemistry*, 2003, 100, 193-203.
- 65) Tanford, C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*, 1978, 200, 1012-10118.
- 66) Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, 2005, 437, 640-647.
- 67) Silverstein, P.T. The real reason why oil and water don't mix. *J. Chem. Educ.*, 1998, 75, 116-118.
- 68) Haselmeier, R.; Holz, M.; Marbach, W.; Weingärtner H. Water dynamics near a dissolved noble gas. First direct experimental evidence for a retardation effect. *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 2243-2246.
- 69) Poša, M.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Ćirin-Novta, V.; Kuhajda, K. Critical micellar concentrations of keto derivatives of selected bile acids: Thermodynamic functions of micelle formation. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2008, 64, 151-161.
- 70) Poša, M.; Pilipović, A.; Lalić, M. The influence of NaCl on hydrophobicity of selected, pharmacologically active bile acids expressed with chromatographic

- retention index and critical micellar concentration. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2010, 81, 336-343.
- 71) Tanford, C. *The Hydrophobic Effect - Formation of Micelles and Biological Membranes*, 1rd ed.; Wiley-Interscience: New York, 1973.
- 72) King, F.D. *Medicinal Chemistry Principles and Practice*, 2rd ed.; R.S.C.: Cambridge, 2002.
- 73) Sârbu, C.; Onișor, C.; Poša, M.; Kuhajda, K.; Kevrešan, S. Modeling and prediction (correction) of partition coefficients of bile acids and their derivatives by multivariate regression methods. *Talanta*, 2008, 75, 651-657.
- 74) Sârbu, C.; Kuhajda, K.; Kevrešan, S. Evaluation of the lipophilicity of bile acids and their derivatives by thin-layer chromatography and principal component analysis. *J. Chromatogr. A*, 2001, 917, 361-366.
- 75) Onișor, C.; Poša, M.; Kevrešan, S.; Kuhajda, K.; Sârbu, C. Modeling chromatographic lipophilicity of bile acids and their derivatives estimated by HP-RPTLC. *J. Sep. Sci.*, 2010, 33(20), 3110-3118.
- 76) Onișor, C.; Poša, M.; Sârbu, C. Modeling of chromatographic lipophilicity indices of bile acids and their derivatives. *Rev. Roum. Chim.*, 2011, 56(3), 217-229.
- 77) Poša, M.; Pilipović, A.; Lalić, M.; Popović, J. Determination and importance of temperature dependence of retention coefficient (RPHPLC) in QSAR model of nitrazepam's partition coefficient in bile acid micelles. *Talanta*, 2011, 83, 1634-1642.
- 78) Natalini, B.; Sardella, R.; Camaioni, E.; Gioiello, A.; Pellicciari, R. Correlation between CMC and chromatographic index: simple and effective evaluation of the hydrophobic/hydrophilic balance of bile acids. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 1681-1688.
- 79) Natalini, B.; Sardella, R.; Camaioni, E.; Macchiarulo, A.; Gioiello, A.; Carbone, G.; Pellicciari, R. Derived chromatographic indices as effective tools to study the self-aggregation process of bile acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, 50, 613-621.
- 80) Lucangioli, E.S.; Carducci, N.C.; Tripodi, P.V.; Kenndler, E. Retention of bile salts in micellar electrokinetic chromatography: relation of capacity factor to

- octanol–water partition coefficient and critical micellar concentration. *J. Chromatogr. B*, 2001, 765, 113–120.
- 81) Poša, M.; Rašeta, M.; Kuhajda, K. A contribution to the study of hydrophobicity (lipophilicity) of bile acids with an emphasis on oxo derivatives of 5 β -cholanoic acid. *Hem. Ind.*, 2011, 65(2), 115-121.
- 82) Poša, M.; Pilipović, A.; Lalić, M.; Popović J. Hydrophobicity and retention coefficient of selected bile acid oxo derivatives. *Acta Chim. Slov.*, 2010, 57(4), 828-835.
- 83) Karger, L.B.; Gant, R.J.; Martkopf, A.; Weiner, H.P. Hydrophobic effects in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1976, 128, 65-78.
- 84) Poša, M. QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentrations of bile acids. *Steroids*, 2011, 76(1-2), 85-93.
- 85) Poša, M.; Guzsány, V.; Csanádi, J. Determination of critical micellar concentration of two monoketo derivatives of cholic acid. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2009, 74, 84-90.
- 86) Bowe, L.C.; Mokhtarzadeh, L.; Venkatesen, P.; Babu, S.; Axelrod, H.; Sofia, J.M.; Kakarla, R.; Chan, Y.T.; Kim, S.J.; Lee, J.H.; Amidon, L.G.; Choe, Y.S.; Walker, S.; Kahne, D. Design of compounds that increase the absorption of polar molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 12218-12223.
- 87) Gordon, G.S.; Moses, A.C.; Silver, R.D.; Flier, J.R.; Carey, M.C. Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 7419-7423.
- 88) Madenci, D.; Egelhaaf, U.S. Self-assembly in aqueous bile salt solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, 15, 109-115.
- 89) Mukerjee, P.; Mysels, K.J. Critical micelle concentration of aqueous surfactant systems, NSR-DS, NBS: Washington-DC, 1971.
- 90) Shinoda, K.; Hutchinson, E. Pseudo-phase separation model for thermodynamic calculations on micellar solutions. *J. Phys. Chem.*, 1958, 62, 577-582.
- 91) Small, D.M. In: *The bile acids*; Nair, P.P.; Kritchevsky, D.; Eds.; Plenum Press: New York, 1977; Vol. 1, pp. 249-356.
- 92) Kratochvil, J.P.; Hsu, W.P.; Kwok, D.I. How large are the micelles of di-a-hydroxy bile salts at the critical micellization concentrations in aqueous

- electrolyte solutions? Results from sodium taurodeoxycholate and sodium deoxycholate. *Langmir*, 1986, 2, 256-258.
- 93) Funasaki, N.; Nomura, M.; Ishikawa, S.; Neya, S. Hydrophobic self-association of sodium taurochenodeoxycholate and tauroursodeoxycholate. *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104, 7745-7751.
- 94) Sugioka, H.; Matsuoka, K.; Moroi, Y. Temperature effect on formation of sodium cholate micelles. *J. Colloid Interface Sci.*, 2003, 259, 156-162.
- 95) Ninomiya, R.; Matsuoka, K.; Moroi, Y. Micelle formation of sodium chenodeoxycholate and solubilization into the micelles: comparison with other unconjugated bile salts. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1634, 116-125.
- 96) Reis, S.; Guimarães Moutinho, C.; Matos, C.; de Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J.L.F.C. Noninvasive methods to determine the critical micelle concentration of some bile acid salts. *Anal. Biochem.*, 2004, 334, 117-126.
- 97) Paula, S.; Süss, W.; Tuchtenhagen, J.; Blume, A. Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: a high sensitivity titration calorimetry study. *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 11742-11751.
- 98) Mysels, K.J. Surface tension studies of bile salt association. *Hepatology*, 1984, 4, 80S-84S.
- 99) Kratochvil, J.P. Size of bile salts micelles: techniques, problems and results. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1986, 26, 131-154.
- 100) Bouchemala, K.; Agnelya, F.; Koffib, A.; Djabourov, M.; Ponchela, G. What can isothermal titration microcalorimetry experiments tell us about the self-organization of surfactants into micelles? *J. Mol. Recognit.*, 2010, 23, 335-342.
- 101) Poša, M.; Guzsány, V.; Csanádi, J.; Borbás, J.; Gaál, F. Study of Association of 12-Monoketocholic Acid by ¹H NMR Relaxation Method. *Acta Chim. Slov.*, 2009, 56(4), 807-814.
- 102) Gouin, S.; Zhu, X.X. Fluorescence and NMR studies of the effect of a bile acid dimer on the micellization of bile salts. *Langmuir*, 1998, 14, 4025-4029.

- 103) Small, D.M.; Penkett, S.A.; Chapman, D. Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta*, 1969, 176, 178-189.
- 104) Garidel, P.; Hildebrand, A. Thermodynamic properties of association colloids. *J. Therm. Anal. Cal.*, 2005, 82, 483-489.
- 105) Garidel, P.; Hildebrand, A.; Neubert, R.; Blume, A. Thermodynamic characterization of bile salt aggregation as a function of temperature and ionic strength using isothermal titration calorimetry. *Langmuir*, 2000, 16, 5267-5275.
- 106) Roda, A.; Hofmann, A.F.; Mysels, K.J. The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 6362-6370.
- 107) Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85(1), 9-15.
- 108) Singh, S.T.; Mitra, S. Fluorescence properties of trans-ethyl-p-(dimethylamino) cinnamate in presence of bile acid host. *J. Photochem. Photobiol. A: Biol.*, 2009, 96, 193-200.
- 109) Poša, M.; Kevrešan, S.; Mikov, M.; Ćirin-Novta, V.; Sarbu, C.; Kuhajda, K. Determination of critical micellar concentration of cholic acid and its keto derivatives. *Colloids Surf. Biointerf.*, 2007, 59, 179-163.
- 110) Poša, M.; Tepavčević, V. Mixed micelles of 7,12-dioxolithocholic acid and selected hydrophobic bile acids: interaction parameter, partition coefficient of nitrazepam and mixed micelles haemolytic potential, *Colloids Surf. Biointerf.*, 2011, 86, 285-291.
- 111) K. Kalnayasundaram, J.K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 2039
- 112) K. Kalnayasundaram, *Photomechemistry in Microheterogenous Systems*, Academic Press, New York, 1987
- 113) C. Carnero Ruiz, A. Aguiar, *Mol. Phys.* 97 (1999) 1095; C. Carnero Ruiz, A. Aguiar, *Mol. Phys.* 98 (2000) 699; C. Carnero Ruiz, A. Aguiar, *Langmuir* 16 (2000) 7946

- 114) C. Carnero Ruiz, F. Garcia Sanchez, J. Colloid Interface Sci. 165 (1994) 110; C. Carnero Ruiz, Mol. Phys. 86 (1995) 535; C. Carnero Ruiz, Colloid Polym. Sci. 273 (1995) 1033
- 115) J. Aguiar et al., Journal of Colloid Interface and Science 258 (2003) 116-122
- 116) R. Zana, H. Levy, K. Kwekat, J. Colloid Interface Sci. 197 (1998) 370
- 117) J. Aguiar et al., Journal of Colloid Interface and Science 258 (2003) 116-122
- 118) Vemulapalli, G.K. Physical Chemistry; Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, 1993; p 946
- 119) Rodriguez-Pereto, M.F.; Rios-Rodriguez, M.C.; Mosquera-Gonzales, M.; Rios-Rodriguez, A.; Mejuto-Fernandez, J.C. J. Chem. Educ., 1995, 72,662
- 120) Dominguez A., Fernandez A., Gonzalez N., Iglesias E., Montenegro L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, Journal of Chemical Education, 1997, Vol 74., No 10, p 1227-1231
- 121) Ekwall P., Rosendahl T., Löfman N. (1957) The dissociation constants of the cholic and desoxycholic acids. Acta Chem Scand 11:590-598.
- 122) Miljković D., Kuhajda K., Hranisavljević J (1996) J. Chem.Res., Synop.106.
- 123) Tullar B.F. (1951) U.S. 2,549,947: Chem Abstr. 45, 50088.
- 124) Roda A, Hofmann AF, Mysels K J (1983): J. Biol. Chem. 258: 6362.
- 125) Rontó GY., Tarján I., A biofizika alapjai, p. 246. Semmelweis Kiadó, Budapest 1997.
- 126) Miljković D., Kuhajda K., Hranisavljević J.: J.Chem. Res. (S) 1996, 106-107.
- 127) Tullar B. F.: US Patent 2, 549, 947 (1951).
- 128) Kuwada S., Furushiro S., Kawashima M.: Am. Rept. Takeda Res. Lab. 1949, 8, 50-61.
- 129) Fieser L. F., Rajagopalan S.: J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 5530-5536.
- 130) Roda A., Hofmann A. F., Mysels K. J.: J. Biol. Chem. 1983, 258, 6362-6370.
- 131) Armstrong M. J., Carey M. C.: J. Lipid Res. 1982, 23, 70-80.

- 132) Posa M, Kuhajda K. (2010) Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acids. *Steroids*. 75(6):424-31. doi: 10.1016
- 133) Jakovljević V.: Eksperimentalna Farmakologija, p. 40. AlfaGraf, Novi Sad 2006.
- 134) Gion G.: Labordiagnostikai lehetőségek a gyakorló orvos számára, p. 46. Medicina Könyvkiadó, Budapest 1992.
- 135) Partay B. L., Jedlovsky P., Sega M.: *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 9886-9896.
- 136) Poša M., Kevrešan S., Mikov M., Ćirin-Novta V., Sârbu C., Kuhajda K.: *Colloids Surf. B:Biointerf* 2007, 59, 179.
- 137) Poša M., Kevrešan S., Mikov M., Ćirin-Novta V., Kuhajda K.: *Colloids Surf. B:Biointerf* 2008, 64, 151-161.
- 138) Poša M., Guzsavány V., Csanádi J.: *Colloids Surf. B:Biointerf* 2009, 74, 84-90.
- 139) http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/59907788EN_Cary_Eclipse_Brochure.pdf
- 140) Atanacković M., Poša M., Heinle H., Gojković-Bukarica Lj., Cvejić J.: *Colloids Surf. B:Biointerf* 2009, 72, 148-155.
- 141) Gadriel P., Hildebrand A., Neubert R., Blume A.: *Langmuir* 2000, 16, 5267-5275.
- 142) Kawamura H., Murata Y., Yamaguchi T., Igimi H., Tanaka M., Sugihara G., Kratochvil J. P.: *J. Phys. Chem. B* 1989, 93, 3321-3326.
- 143) Sârbu C., Onișor C., Poša M., Kevrešan S., Kuhajda K.: *Talanta* 2008, 75, 651-657.
- 144) Bertolasi V., Ferretti V., Pretto L., Fantin G., Fogagnolo M., Bortolini O.: *Acta Crystallogr. Section B: Struct. Sci* 2005, 61, 346-356.
- 145) Poša M (2012) Hydrophobicity and self-association of bile acids with a special emphasis on oxo derivatives of 5- β -cholanic acid. *Current Organic Chemistry* 16(16): 1876-1904.

- 146) Pártai LB, Jedlovszky P, Segá M (2007) Molecular aggregates in aqueous solutions of bile acid salts. Molecular dynamics simulation study. *J Phys Chem B* 111: 9886-9896
- 147) Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH (2007) The Martini Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J Phys Chem B* 111: 7812-7824.
- 148) Martínez JM, Martínez L (2003) Packing Optimization for Automated Generation of Complex System's Initial Configurations for Molecular Dynamics and Docking. *J Comput Chem* 24: 819-825.
- 149) Martínez L, Andrade R, Birgin EG, Martínez JM (2009) Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations. *J Comput Chem* 30: 2157-2164.
- 150) Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. (2013) GROMACS 4.5: A High-Throughput and Highly Parallel Open Source Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics* 29: 845-854.
- 151) Berendsen HJC, Postma JPM, DiNola A, Haak JR (1984) Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J Chem Phys* 81: 3684–3690.
- 152) J.H. Kim, M.M. Domach, R.D. Tilton, Pyrene Micropartitioning and Solubilization by Sodium Dodecyl Sulfate Complexes with Poly(ethylene glycol), *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 10582-10588.
- 153) Paula S, Süss W, Tuchtenhagen J, Blume A (1995) Thermodynamics of micelle formation as a function of temperature: a high sensitivity titration calorimetry study. *J Phys Chem* 99: 11742-11751.
- 154) Poša M (2011) QSPR Study of the Effect of Steroidal Hydroxy and Oxo Substituents on the Critical Micellar Concentrations of Bile Acids. *Steroids* 76:85-93.
- 155) Jalili S, Akhavan M, (2009) A Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulation of a Sodium Dodecyl Sulfate Micelle in Aqueous Solution. *Colloid Surfaces A* 352: 99-102.
- 156) Marrink SJ (2004) Molecular dynamics simulation of cholesterol nucleation in mixed micelles modelling human bile. In: Adler G; Blum HE,

- Fuchs M, Stange EF, editors. Gallstones: pathogenesis and treatment. Dordrecht; London: Kluwer Academic. pp. 98-105.
- 157) Manning GS (2010) The Interaction between a Charged Wall and Its Counterions: A Condensation Theory. *J PhysChem B* 114: 5435–5440. doi: 10.1021/jp912234x
- 158) M. Poša, D. Ćirin, Mixed micelles of sodium salts of bile acids and Tween 40: Effect of the steroid skeleton on the coefficient of interaction in mixed micelles, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51(45) (2012) 14722-14728.
- 159) Clint J.H, Micellization of mixed nonionic surface active agents. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* 71 (1975) 1327-1334.
- 160) Mittal K.L., *Solution Chemistry of Surfactants*. Plenum Press, New York, 1979.
- 161) Mittal K.L., *Solution Chemistry of Surfactants*. Plenum Press, New York, 1979.
- 162) Poša M., QSPR study of the effect of steroidal hydroxy and oxo substituents on the critical micellar concentrations of bile acids, *Steroids* 76(1-2) (2011) 85-93.
- 163) Subuddhi U., Mishra A.K., Micellization of bile salts in aqueous medium: A fluorescence study. *Colloids Surf. Biointerface* 57 (2007) 102-105.
- 164) Manning GS, 1996, Counterion condensation Theory constructed by different models, *Physica A* 231:236-235. DOI:10.1016/0378-4371(95)00452-1;
- 165) Manning GS 2002, Electrostatic free energy of the DNA double helix in counterion condensation theory. *Biophysical Chemistry* 101-102:461-473. DOI: 10.1016/S0301-4622(02)00162-x
- 166) Manning GS, 1996, Counterion condensation Theory constructed by different models, *Physica A* 231:236-235. DOI:10.1016/0378-4371(95)00452-1;
- 167) Manning GS 2002, Electrostatic free energy of the DNA double helix in counterion condensation theory. *Biophysical Chemistry* 101-102:461-473. DOI: 10.1016/S0301-4622(02)00162-x
- 168) Tullar B.F. (1951) U.S. 2,549,947: Chem Abstr. 45, 50088.