

VLASTNOSTI BENZETHONIUM CHLORIDU V MICELÁRNÍCH ROZTOCÍCH A VLIV PŘÍDAVKU CHLORIDU SODNÉHO

KOPECKÝ F.¹, KOPECKÁ B.², KACLÍK P.¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra fyzikálnej chémie liečiv

²Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie

SOUHRN

Vlastnosti benzethonium chloridu v micelárních roztocích a vliv přidavku chloridu sodného

Vodné roztoky antimikrobiálně účinné kvarterní amoniové soli benzethonium chloridu (hyamin 1622) byly studovány UV spektrofotometrií a zčásti konduktometricky. Ve spektrech micelárních roztoků benzethonium chloridu byl pozorován koncentračně závislý bathochromní a hyperchromní posun slabého UV absorpčního pásu v oblasti 250–300 nm. Na tomto základě bylo vypracováno spektrofotometrické stanovení CMC benzethonium chloridu a koncentrace volných benzethoniových kationů v micelárních roztocích bez přidavku a s konstantním přidavkem NaCl 0,003, 0,1 a 0,15 mol/l. Premicelární asociace se nepozorovala a v roztocích bez NaCl byla spektrofotometricky stanovena CMC 0,0028 mol/l. Přídavek NaCl měl za následek zvětšení hyperchromního efektu a posílení micelizace, projevující se až více než desetinásobným poklesem CMC i koncentrace volných benzethoniových kationů v micelárních roztocích. Průběh stanovených koncentrací volných benzethoniových kationů v roztocích bez přítomnosti i za přítomnosti NaCl byl zcela podobný, jejich maximální hodnoty byly vždy jen o málo větší než odpovídající CMC a při dalším růstu celkové koncentrace benzethonium chloridu nastával naopak výrazný pokles koncentrace jeho volných kationů v micelárním roztoku. Diskutovány jsou možné důsledky poklesu koncentrace volných benzethoniových kationů vlivem přidaného elektrolytu na antimikrobiální účinnost a tvorbu iontových párů.

Klíčová slova: benzethonium chlorid – kationový tenzid – micelární roztoky – spektrofotometrie – konduktometrie

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 175–180

SUMMARY

Properties of Benzethonium Chloride in Micellar Solutions and the Effect of Added Sodium Chloride

Aqueous solutions of the antimicrobially effective quaternary ammonium salt benzethonium chloride (hyamine 1622) were studied using UV spectrophotometry and partially conductometry. The spectra of micellar solutions of benzethonium chloride revealed a concentration-dependent bathochromic and hyperchromic shift of a weak UV absorption band in the region 250–300 nm. This served to elaborate the spectrophotometric determination of the critical micellar concentration (CMC) of benzethonium chloride and the concentration of free benzethonium cations in micellar solutions without an addition of NaCl and with a constant addition of NaCl 0.003, 0.1 and 0.15 mol/l. Premicellar associations were not observed and in NaCl-free solutions CMC 0.0028 mol/l was spectrophotometrically determined. An addition of NaCl resulted in an increased hyperchromic effect and strengthening of micellization, manifested by a more than ten-times decrease in the CMC as well as the concentration of free benzethonium cations in micellar solutions. The courses of the determined concentrations of free benzethonium cations in the solutions both without and with the presence of NaCl were quite similar; their maximal values were always just a little higher than the corresponding CMC and with a further growth of the total concentration of benzethonium chloride there was, on the other hand, a marked decrease in the concentration of its free cations in micellar solution. Possible effects of a decreased concentration of free benzethonium cations due to an added electrolyte on antimicrobial activity and formation of ionic pairs are discussed.

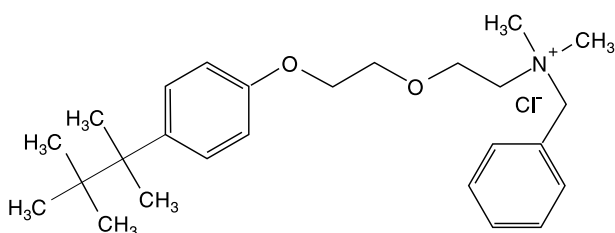
Key words: benzethonium chloride – cationic surfactant – micellar solutions – spectrophotometry – conductometry

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 175–180

Má

Úvod

Antimikrobiálně účinné kvarterní amoniové soli mají vesměs vlastnosti kationtových tenzidů, poněvadž nezbytnou podmínkou antimikrobiálního účinku je amfifilní charakter kvarterního kationu^{1,2)}. Znamená to, že ku kladně nabitému dusíkovému atomu, představujícímu hydrofilní část kationu, musí být připojena jedna nebo dvě hydrofobní skupiny přiměřené velikosti. V nejjednodušším případě se jedná o delší nevětvený alkylový řetězec, bývají to však i složitější strukturální útvary¹⁻³⁾ a jedním z takových příkladů je námi studovaný benzethonium chlorid (obr. 1),



Obr. 1. Benzethonium chlorid (BtCl)
syn. Hyamine 1622, *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-*N*-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenoxyethoxyethyl]amonium chlorid,
 $C_{26}H_{40}ClNO_2$

používaný jako antiseptikum. Anionem antimikrobiálních kvarterních amoniových solí, neboli protiionem tenzidového kationu, bývá kromě chloridového také bromidový ion. V důsledku svého charakteru se amfifilní kvarterní kationy účastní tvorby četných asociátů či agregátů. Známa je zejména micelizace^{2,4-8)} kvarterních amoniových solí ve vodných roztocích, tvorba iontových párů a asociátů amfifilních kvarterních kationů s aniontovými barvivy⁹⁻¹¹⁾ i tvorba směsných micel. Micelizace se nápadně projevuje teprve při dosažení a překročení určité kritické micelární koncentrace (CMC) dané kvarterní amoniové soli, poněvadž na iontovou micelu se sdružuje prakticky najednou až několik desítek amfifilních iontů za částečné spoluúčasti iontů opačného znaménka^{2,4-7)}. Micelizace ve vodném roztoku je sice nevyhnutelnou vlastností antimikrobiálně účinných kvarterních amoniových solí, ale může být i komplikací z hlediska biologického účinku^{2,3)}, při extrakčním stanovení s barevnými činidly, nebo pokud kvarterní soli slouží naopak jako analytická činidla⁹⁻¹¹⁾.

Kritická micelární koncentrace je též určitým ukazatelem biologické dostupnosti micelizujících kvarterních kationů²⁾. Kvarterní amoniové soli se v dostatečně zředěných vodných roztocích zpravidla chovají jako dobře disociované elektrolyty a premicelární asociace je poměrně vzácná, takže při koncentracích nižších, než je příslušná CMC, jsou amfifilní kvarterní kationy prakticky volné^{12,13)}. Podle dosud neúplných údajů však při zvyšování koncentrace kvarterní amoniové soli nad příslušnou hodnotu CMC dochází naopak ke snižování koncentrace volných amfifilních kationů v micelárním roztoku, v důsledku jejich progresivně postupujícího sdružování na iontové micely^{2,13)}. Nízká koncentrace volných, nemicelizovaných kvarterních kationů v micelárním roztoku zřejmě přispívá k tzv. „cut off“ efektu, čili poklesu

antimikrobiální účinnosti silně micelizovaných kvarterních amoniových solí s příliš nízkou hodnotou CMC, v důsledku přítomnosti příliš velkých hydrofobních skupin²⁾. V tomto smyslu vyznívají i závěry autorů nedávné studie kationtových tenzidů se spermicidním a anti-HIV účinkem³⁾. CMC kvarterní amoniové soli nebo jiného iontového tenzidu však závisí nejen na struktuře příslušného amfifilního iontu, ale je ovlivňována i druhem iontu opačného znaménka a hlavně přítomností aditiv, neboli přidavkem další rozpuštěné látky do roztoku^{2,4-7)}.

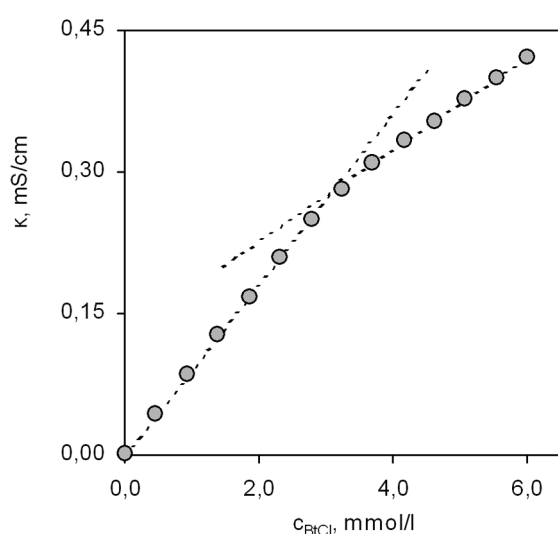
Přídavek silného elektrolytu, zejména anorganické soli, do vodného roztoku iontového tenzidu podporuje micelizaci, takže snižuje hodnotu CMC^{2,4-8,14)} a podle novějších poznatků též způsobuje tvorbu větších micel, přičemž se v nepřilíš koncentrovaných micelárních roztocích iontových tenzidů se stálou koncentrací příslušného protiiontu vytvářejí micely stálé velikosti⁷⁾. Publikované údaje o vlivu různých elektrolytů na CMC kvarterních amoniových solí jsou však nezřídka navzájem rozporné a z důvodu experimentálních komplikací je dosud velmi málo údajů o koncentraci volných, nemicelizovaných amfifilních kvarterních kationů v micelárních roztocích, neboli při vyšších koncentracích kvarterní amoniové soli, než je příslušná CMC. Naši práci motivovala skutečnost, že v případě chloridu benzethonia takovéto potřebné údaje byly rovněž dosud málo dostupné, i když se jedná o dlouhodobě používané antiseptikum a jeho micelizace ve vodných roztocích byla podrobně studována především z hlediska velikosti a tvaru vytvářených micel^{5,6)}.

Benzethonium chlorid je sice bezbarvá látka, avšak benzethoniový kation se vyznačuje přítomností dvou benzenových jader (obr. 1), což nám umožnilo využít při našem studiu absorpční spektrofotometrii v UV oblasti, doplněnou konduktometrií. V první řadě bylo potřebné zjistit, zda ve zředěných vodných roztocích, v koncentrační oblasti pod CMC, nastává nebo nenastává premicelární asociace, potom jsme vypracovali spektrofotometrickou metodu stanovení CMC a koncentrace volných, nemicelizovaných benzethoniových kationů v micelárním roztoku. Uvedená měření jsme uskutečnili v roztocích samotného benzethonium chloridu i v roztocích s konstantní koncentrací přídavného chloridu sodného, až do koncentrace NaCl 0,15 mol/l, přibližně odpovídající fyziologickému roztoku.

POKUSNÁ ČÁST

Chemikálie a přístroje

Roztoky benzethonium chloridu (BtCl) (Hyamine 1622, ≥99%, M_r 448,1) (obr. 1) a NaCl byly připravovány v deionizované vodě, UV absorpční spektra roztoků se měřila spektrofotometrem Specord M40 v křemenných kyvetách s optickou dráhou 0,1–5 cm, na měření měrné elektrické vodivosti a pH roztoků se používal konduktometr LF 538 (WTW) s elektrodou TetraCon 325 (WTW) a pH metr HI 931401 (Hanna Instruments) s originální kombinovanou elektrodou a standardními roztoky. Měrná vodivost použité deionizované vody byla nižší než 0,2 μ S/cm; připravované vodné roztoky BtCl a roztoky BtCl + NaCl měly pH v rozmezí 5,5–6,0 a vzhledem ke známé citlivosti kritické micelární koncentrace iontových tenzidů na přítomnost dalších látek



Obr. 2. Koncentrační závislost měrné vodivosti (κ , mS/cm) roztoků benzethonium chloridu (koncentrace c_{BtCl} , mmol/l)

Tab. 1. Kritické micelární koncentrace (CMC) benzethonium chloridu (BtCl) a maximální koncentrace volných benzethoniových kationů (Bt^+) v micelárních roztocích bez přídavku nebo s přídavkem NaCl

c_{NaCl} mol/l	CMC mol/l	maximum [Bt^+] mol/l	při c_{BtCl} mol/l
0	$2,8 \cdot 10^{-3}$ a) $3,1 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$
0,003	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$
0,1	$0,30 \cdot 10^{-3}$	$0,33 \cdot 10^{-3}$	$0,45 \cdot 10^{-3}$
0,15	$0,23 \cdot 10^{-3}$	$0,25 \cdot 10^{-3}$	$0,35 \cdot 10^{-3}$

a) konduktometricky; všechny další údaje zjištěny spektrofotometricky; střední chyby hodnot CMC jsou v průměru $\pm 3\%$

nebylo pH nijak upravováno. Při vodivostním a potenciometrickém měření byly roztoky temperovány na teplotu $25,0 \pm 0,1$ °C, při spektrofotometrickém měření na $25,0 \pm 0,5$ °C.

Konduktometrické stanovení CMC benzethonium chloridu

Na základě orientačních literárních údajů⁵⁾ byly měřeny vodivosti zředěných roztoků BtCl až do nalezení zlomu, určujícího hledanou CMC (obr. 2). Hodnota CMC byla určena jako průsečík dvou regresních křivek závislosti měrné vodivosti na koncentraci benzethonium chloridu (c_{BtCl}). Regresní křivky byly nalezeny metodou nejmenších čtverců, přičemž pro koncentrace c_{BtCl} nižší než CMC byla statisticky nejvhodnější přímka a při koncentracích nad CMC byla vhodnější parabola. Konduktometricky stanovená CMC je uvedena v tabulce 1.

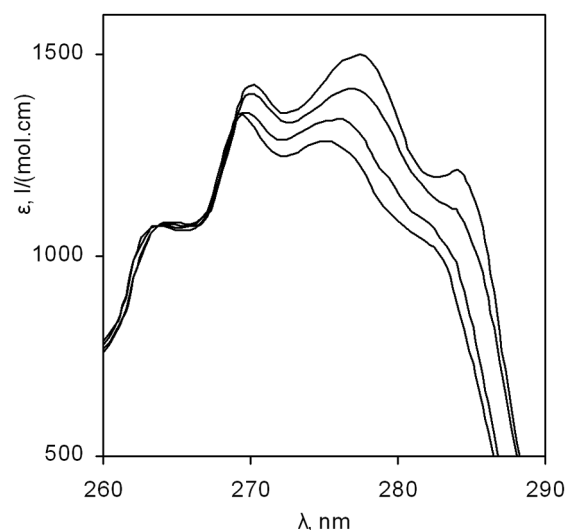
Spektrofotometrická měření a výpočtové postupy

UV absorpční spektrum benzethonium chloridu

Absorpční spektrum vodných roztoků benzethonium chloridu bez přídavku a s přídavkem NaCl bylo změřeno v UV oblasti v co nejširším koncentračním rozsahu. Jde o elektronové spektrum¹⁶⁾ sloučeniny se substituovanými benzenovými jádry, takže pozůstává především z velmi intenzivního absorpčního pásu s lokálními maximy při vlnových délkách λ 210 a 215 nm a poměrně sla-

bého pásu v oblasti vyšších vlnových délek, zhruba 250–300 nm. Velmi intenzivní pás zde nebyl použitelný už proto, že neumožňoval měření koncentrovanějších roztoků; pro sledování micelizace BtCl se však ukázal být výhodný právě slabý absorpční pás při vyšších vlnových délkách. Zvolený málo intenzivní pás byl systematicky měřen v květách s optickou dráhou b 0,1–5 cm, přičemž byla měřena série roztoků samotného BtCl a tři série roztoků s konstantní koncentrací přidaného NaCl 0,003, 0,1 a 0,15 mol/l. Koncentrace BtCl byla v každé sérii měřených roztoků proměnná v celkovém rozsahu c_{BtCl} $5 \cdot 10^{-5}$ – $1,3 \cdot 10^{-2}$ mol/l, ale v roztocích s přídavkem NaCl 0,15 mol/l pouze do c_{BtCl} 0,012, vzhledem k níže uvedenému hyperchromnímu efektu. Při měření roztoků BtCl s NaCl byl jako porovnávací vzorek použit NaCl o téže koncentraci, při měření roztoků samotného BtCl byla porovnávacím vzorkem voda. Z naměřených absorbancí A (do hodnoty 2,0) byly vypočteny molární absorpční koeficienty $\epsilon = A/(bc_{\text{BtCl}})$ a sledovaný absorpční pás roztoků BtCl je zčásti znázorněn na obrázku 3 ve formě závislosti ϵ na vlnové délce.

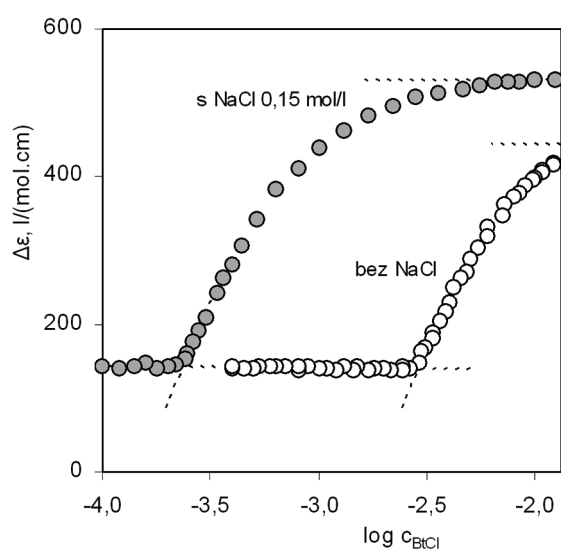
Ukázalo se, že ve zředěném roztoku, v oblasti pod předpokládanou CMC, nezávisí sledovaný absorpční pás na koncentraci



Obr. 3. Sledovaný absorpční pás UV spektra roztoku benzethonium chloridu při různých koncentracích; ϵ ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) molární absorpční koeficient, λ (nm) vlnová délka; spektrální křivky odpovídají koncentracím c_{BtCl} 0,0125 mol/l (nejvyšší křivka), 0,006 mol/l, 0,00387 mol/l a 0,0018 mol/l (nejnižší křivka)

BtCl a není podstatně ovlivňován ani přídavkem NaCl. V koncentrační oblasti pod příslušnou CMC je charakterizován lokálním maximem při 269 nm, $\epsilon = 1370 \pm 10$ $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (nejnižší křivka na obrázku 3) a poněkud méně intenzivním maximem při 275 nm, $\epsilon = 1310 \pm 9$ $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, bez ohledu na eventuelní přídavek NaCl. Podle zjištěných vlnových délek a nevelkých intenzit se zřejmě jedná o pás elektronového přechodu $n \rightarrow \pi^*$ ¹⁵⁾, v daném případě zapříčiněný přítomností éterického kyslíkového atomu na benzenovém jádře v postranním řetězci benzethoniového kationu (obr. 1). Při překročení určité koncentrace BtCl, interpretované jako CMC, se v micelárním roztoku začíná sledovaný pás na straně vyšších vlnových délek měnit, projevuje se zde malý bathochromní a poněkud výraznější hyperchromní posun, v závislosti na koncentraci BtCl (vyšší křivky na obrázku 3). Za přítomnosti NaCl jsou pozorované spektrální změny intenzivnější a začínají se projevovat už od nižších koncentrací BtCl, čímž se demonstruje snížení CMC vlivem přídavku NaCl.

Při dostatečně vysokých koncentracích micelárního roztoku BtCl (v rámci měřeného rozsahu) se sledovaný spektrální pás opět



Obr. 4. Závislost rozdílu molárních absorpčních koeficientů benzethonium chloridu změřených při dvou vlnových délkách ($\Delta\epsilon = \epsilon_2 - \epsilon_1$, $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) na logaritmu koncentrace BtCl (jednotky c_{BtCl} mol/l), v roztocích bez přídavku a s přídavkem NaCl 0,15 mol/l

ustaluje a od určité koncentrace BtCl se už prakticky nemění, avšak původně slabší maximum při vyšší vlnové délce se zde stává nejintenzivnějším (nejvyšší křivka na obrázku 3). Tak například v prostředí NaCl 0,15 mol/l, kde je hyperchromní efekt nejvýraznější, se spektrum přestává měnit počínajíc od koncentrace BtCl 0,004 mol/l a posunutá maxima sledovaného pásu jsou v takovémto micelárním roztoku při 270 nm, kde je $\epsilon = 1470 \pm 13 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, a při 278 nm, kde je $\epsilon = 1620 \pm 12 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Na druhé straně pásu se však poloha a intenzita plytkého absorpčního minima, pozorovaného zhruba při 265 nm (obr. 3), mění při všech sledovaných koncentračních změnách jen velmi málo, od nejzřednějšího roztoku BtCl ($c_{\text{BtCl}} 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l) bez NaCl až po nejkoncentrovanější micelární roztoky ($c_{\text{BtCl}} 0,012\text{--}0,013$ mol/l) s NaCl se zde intenzita pohybuje pouze v úzkém rozmezí hodnot $\epsilon = 1060\text{--}1110 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Spektrofotometrické stanovení CMC a koncentrace volných benzethoniumových kationů v micelárním roztoku benzethonium chloridu

Zjištěné koncentrační změny zvoleného UV absorpčního pásu jsou sice nepříliš výrazné, umožnily však vypracovat spektrofotometrické stanovení CMC i přibližné koncentrace volných, nemichelizovaných kvarterních benzethoniumových kationů v oblasti nad CMC, tedy v micelárním roztoku BtCl, bez přídavku nebo s konstantním přídavkem NaCl (0,003, 0,1 a 0,15 mol/l). Poněvadž pozorované koncentrační spektrální posuny jsou skutečně nevelké, bylo potřebné vycházet z rozdílu dvou molárních absorpčních koeficientů ($\Delta\epsilon$) naměřených vždy v tomtéž roztoku, ale při dvou odlišných vlnových délkách:

$$\Delta\epsilon = \epsilon_2 - \epsilon_1 \quad [1]$$

Pro měření ϵ_1 byla zvolena vlnová délka 265,3 nm (zmiňované plytké minimum), kde je citlivost na koncentrační změny velmi malá, a ϵ_2 bylo měřeno při 277,8 nm, kde je počínajíc od CMC citlivost na koncentrační změny naopak poměrně výrazná. Na obrázku 4 jsou znázorněny dva příklady závislosti hodnot $\Delta\epsilon$ na logaritmu koncentrace BtCl ($\log c_{\text{BtCl}}$) v roztocích bez přídavku NaCl a v roztocích s největší použitou konstantní koncentrací NaCl 0,15 mol/l; zcela analogické jsou i křivky naměřené při dvou dalších koncentracích NaCl.

Závislosti na obrázku 4 pozůstávají vždy nejprve z téměř vodorovného přímkového úseku se stálou hodnotou $\Delta\epsilon$ při nízkých koncentracích BtCl a vodorovný úsek přechází zlomem do vzestupné části, charakterizované rostoucím $\Delta\epsilon$ při zvyšování koncentrace BtCl (zvyšování $\log c_{\text{BtCl}}$). Uvedený zlom vyznačuje hledanou hodnotu logaritmu CMC. Uvedený zlom vyhodnocen analogickým postupem jako v případě konduktometrických křivek a odlogaritmované výsledné CMC jsou uvedeny v tabulce 1. Neměnnost hodnot $\Delta\epsilon$ při koncentracích BtCl nižších, než je odpovídající CMC (vodorovné úseky závislosti před zlomem), a poměrně ostrý zlom indikují absenci premicelární asociace benzethoniumových kationů Bt⁺. Následující vzestup hodnot $\Delta\epsilon$ pak indikuje vznik micelárního roztoku a postupující sdružování kationů Bt⁺ na micely. Při dalším zvyšování koncentrace BtCl příslušná závislost opět přestává stoupat a $\Delta\epsilon$ se opět blíží určité stálé hodnotě, což zřejmě znamená, že převážná většina kationů Bt⁺ je zde již asociovaná na micely. Závislosti $\Delta\epsilon$ na $\log c_{\text{BtCl}}$ tedy popisují koncentračně proměnnou rovnováhu mezi benzethoniumovými kationy ve dvou formách, ve formě volných kationů a kationů asociovaných na micely. Podle fotometrických vztahů popisujících analogické rovnováhy¹⁶⁾ lze pro koncentraci volných benzethoniumových kationů ([Bt⁺]) odvodit:

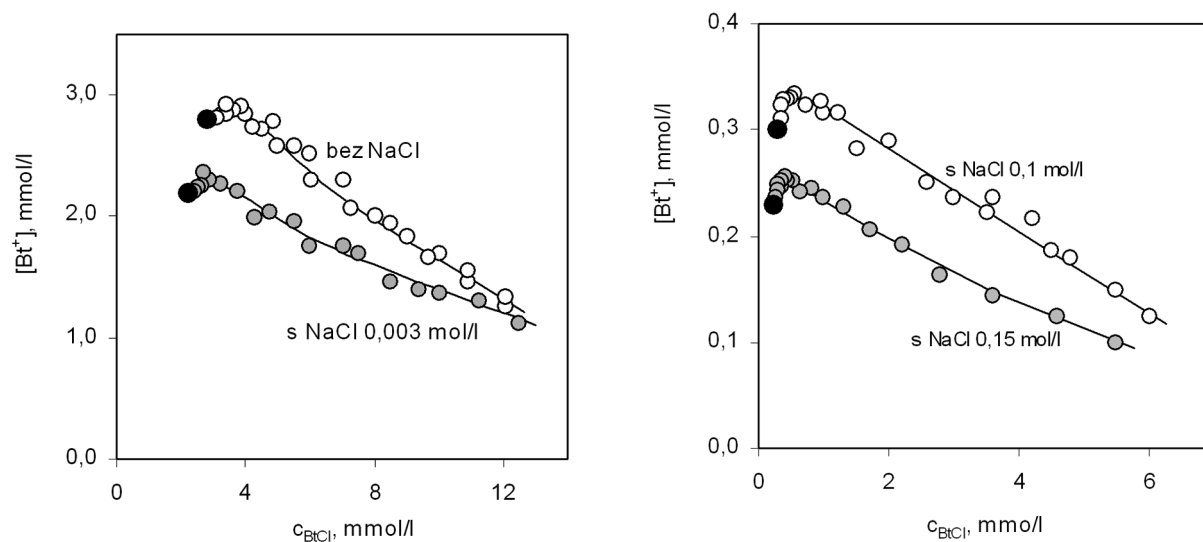
$$[\text{Bt}^+] = c_{\text{BtCl}} \cdot (\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_A) / (\Delta\epsilon_F - \Delta\epsilon_A) \quad [2]$$

V rovnici [2] je $\Delta\epsilon$ rozdíl molárních absorpčních koeficientů podle rovnice [1], odpovídající směsi volných a micelizovaných kationů Bt⁺ v roztoku o celkové koncentraci benzethonium chloridu c_{BtCl} , $\Delta\epsilon_F$ je stejným způsobem definovaný rozdíl molárních absorpčních koeficientů volných kationů Bt⁺ a $\Delta\epsilon_A$ odpovídá roztokům, kde jsou kationy Bt⁺ již téměř zcela asociovány na micely. Do rovnice [2] se proto dosazují dvojice hodnot $\Delta\epsilon$ a c_{BtCl} odpovídající vzestupnému úseku příslušné závislosti na obrázku 4, hodnota $\Delta\epsilon_F$ odpovídá vodorovnému úseku závislosti při koncentracích c_{BtCl} nižších, než je dané CMC (před zlomem) a hodnota $\Delta\epsilon_A$ odpovídá nejvyšším koncentracím c_{BtCl} , kde se spektrum opět již nemění. Rovnice [2] je tedy použitelná v omezeném rozsahu micelárních roztoků, kde je c_{BtCl} vyšší než CMC, avšak hodnota $\Delta\epsilon$ signifikantně nižší, než je $\Delta\epsilon_A$, k němuž se $\Delta\epsilon$ blíží při rostoucí c_{BtCl} (rostoucím $\log c_{\text{BtCl}}$).

Vyhodnocená $\Delta\epsilon_F$ měřených sérií roztoků jsou v rozmezí 135–150 $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, takže v rámci experimentálních chyb nezávisí na přítomnosti NaCl v roztoku BtCl. Naproti tomu hodnoty $\Delta\epsilon_A$ se pohybují v rozmezí 450–530 $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ od série roztoků BtCl bez NaCl až po roztoky s NaCl 0,15 mol/l, v čemž se odráží prohlubování hyperchromního efektu v micelárním roztoku vlivem přidaného NaCl. Z rovnice [2] byly v použitelném rozsahu vypočteny koncentrace volných benzethoniumových kationů [Bt⁺] v závislosti na c_{BtCl} , a to v micelárních roztocích samotného BtCl i v roztocích s přídavky NaCl a jsou znázorněny na obrázku 5. Ukázalo se, že koncentrace [Bt⁺] vždy nejprve vzrostou o něco málo nad příslušnou CMC, ale při dále rostoucí celkové koncentraci c_{BtCl} naopak systematicky klesají. Byly proto vyčísleny také maximální koncentrace [Bt⁺] a pro porovnání s příslušnými CMC jsou uvedeny v tabulce 1.

VÝSLEDKY A DISKuze

S přihlédnutím k navzájem odlišné metodice je třeba konstatovat dobrou shodu mezi konduktometricky a spektrofotometricky stanovenou CMC kationového tenzidu benzethonium chloridu ve vodném roztoku, uvedenou na začátku v tabulce 1. Fotometrické měření je sice experimentálně podstatně náročnější a ne vždy realizovatelné, ale na rozdíl od konduktometrie umožňuje spolehlivé stanovení CMC i za přítomnosti přidaného elektrolytu, v daném případě NaCl. Větším přídavkem silného elektrolytu do roztoku iontového tenzidu, například NaCl o koncentraci



Obr. 5. Stanovené koncentrace volných benzethoniových kationů ($[Bt^+]$, mmol/l) v micelárních roztocích benzethonium chloridu (celková koncentrace c_{BtCl} , mmol/l) bez přídavku a s přídavkem NaCl; plný černý bod odpovídá příslušné hodnotě CMC

0,15 mol/l, se totiž vodivost roztoku řádově zvětší, takže se zlom na křivce měrné vodivosti na obrázku 2, a tím i konduktometrické stanovení CMC stává neurčitým. Naproti tomu však přidaný NaCl v podobných koncentracích nijak nezhoršuje ostrost zlomu na fotometrických křivkách, jak je vidět na obrázku 4. Proto jsou všechny fotometricky stanovené CMC vedené v tabulce 1 zatíženy přibližně stejnou relativní chybou $\pm 3\%$, ačkoliv hodnoty CMC v roztocích s přidaným NaCl jsou až mnohonásobně nižší. Fotometrické křivky na obrázku 4 zároveň ukazují, že v roztocích benzethonium chloridu zřejmě nedochází k pre-micelární asociaci ani za přítomnosti NaCl.

Popsané stanovení CMC benzethonium chloridu absorpční spektrofotometrií v UV oblasti bez přídavku jiného absorbujícího nebo fluoreskujícího barviva (sondy) pochopitelně souvisí s aromatickou strukturou benzethoniového kationu. Takovouto příznivou okolnost je vhodné využít, poněvadž i malý přídavek amfifilní sondy může výrazně pozměnit hodnotu CMC a při fluorescenčním měření se navíc CMC nezdá obtížně zjišťuje nikoliv ze zlomu, ale z inflexního bodu příslušné křivky¹⁴. Rozptyl literárních hodnot CMC bývá obecně dosti značný, včetně CMC stanovených měření povrchového napětí. Z tohoto hlediska jsou výsledky v tabulce 1 poměrně ve shodě i s literární CMC samotného benzethonium chloridu $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l ve vodném roztoku a hodnotou $0,44 \cdot 10^{-3}$ mol/l v roztoku s přídavkem dvou solí, Tris.HCl 0,01 mol/l a NaCl 0,075 mol/l, přičemž však u těchto a dalších hodnot CMC autoři⁶ přesně nespecifikují způsob měření.

Posuny parametrů UV spektra, pozorované při micelizaci, zřejmě souvisí se změnou solvatace benzethoniových kationů v důsledku jejich vzájemného sdružování na micely, skládající se podle všeho až ze 60 kationů^{5,6}. Benzenové jádro s kyslíkovým substituentem v postranním řetězci kationů Bt^+ (obr. 1) se při micelizaci částečně zbavuje kontaktu s polárním vodným prostředím, poněvadž tyto řetězce přecházejí do málo polárního nitra vytvářených micel. U sledovaného absorpčního pásu typu $n \rightarrow \pi^*$ se to

projevuje bathochromním a hyperchromním posunem, charakteristickým pro přenos látky z vodného do málo polárního prostředí^{15,17}. Prohloubení hyperchromního efektu vlivem přídavku NaCl (obr. 4) zároveň poukazuje na odlišnost micel vytvářených v roztocích s přídavkem NaCl (horní křivka, vyšší $\Delta\epsilon$) oproti roztokům bez přídavku NaCl (dolní křivka). Prohloubení hyperchromního efektu může být především důsledkem tvorby větších micel, v nichž jsou pak postranní řetězce dokonaleji zbaleny kontaktem s vodou. Výsledky předložené práce jsou tedy v soulase s poznatky, podle nichž přídavek NaCl podporuje micelizaci tak, že snižuje CMC a zapříčiňuje tvorbu větších micel iontových tenzidů^{7,8,14}.

Spektrofotometrií v UV oblasti se nám též podařilo vypracovat aspoň přibližné stanovení koncentrace volných benzethoniových kationů v omezené koncentrační oblasti micelárních roztoků $BtCl$, opět i za přítomnosti NaCl. Přibližné stanovení koncentrace volných amfifilních iontů v rovnováze s micelami je sice v principu uskutečnitelné také potenciometrií s membránovými elektrodami^{2,12,13}, která však podle našich zkušeností za přítomnosti dalšího elektrolytu často selhává, a proto jsou údaje tohoto druhu dosud málo dostupné. Při popsání fotometrické metodě se přitom nečiní žádný předpoklad o velikosti vytvářených micel. V každé sérii měřených roztoků $BtCl$, tzn. bez přídavku NaCl, nebo s danou konstantní koncentrací NaCl, se však předpokládá, že vytvářené micely mají navzájem stejné UV spektrum, každá série měřených roztoků se tedy má vyznačovat micelami pouze jednoho typu, s podobnou distribucí velikostí. Poněvadž v každé ze sledovaných sérií roztoků se pozorovala vždy jen jedna CMC (jeden zlom), lze při použitých nepřilíš vysokých koncentracích $BtCl$ důvodně očekávat přibližné splnění uvedeného předpokladu, zejména pak v sériích roztoků s konstantní koncentrací NaCl^{7,8,14}.

Koncentrace stanovených volných benzethoniových kationů ($[Bt^+]$) v micelárních roztocích, vynesené na obrázku 5 v závislosti na celkové koncentraci benzethonium chloridu (c_{BtCl}) vykazují těsně nad CMC nejprve malou

oblast vzestupu, po níž však následuje trvalý pokles v celém měřeném rozsahu. Byly proto vyhodnoceny též maximální hodnoty $[Bt^+]$, které jsou spolu s koncentracemi c_{BICl} odpovídající těmto maximům, uvedeny v tabulce 1. Na základě přibližných potenciometrických měření se již dříve usoudilo, že CMC amfifilní kvarterní amoniové soli (kationového tenzidu) představuje zároveň nejvyšší možnou koncentraci volného kationu této soli ^{2, 13)}, chyběly však zejména údaje o micelárních roztocích s přidaným dalším elektrolytem. Předložené spektrofotometrické výsledky upřesňují předchozí poznatky v tom smyslu, že stanovené maximální koncentrace volného benzethoniového kationu bez přítomnosti i za přítomnosti NaCl jsou o něco málo vyšší než příslušné hodnoty CMC (tab. 1). Jednoznačně se však i zde potvrzuje nejen pokles CMC vlivem přídavku NaCl, ale i výrazný systematický pokles koncentrace volných benzethoniových kationů v micelárním roztoku, při zvyšování celkové koncentrace benzethonium chloridu nad odpovídající CMC (obr. 5).

I za přítomnosti přidaného elektrolytu zůstává tedy CMC přibližnou mírou maximální možné koncentrace volných kationů micelizující kvarterní amoniové soli a snížení CMC přidáním silného elektrolytu znamená také snížení koncentrace volných kvarterních kationů v důsledku posílení micelizace. Podle tabulky 1 a obrázku 5 způsobuje již nevelká koncentrace NaCl 0,003 mol/l výrazný pokles koncentrace volných benzethoniových kationů a za přítomnosti NaCl 0,15 mol/l, což přibližně odpovídá fyziologickému roztoku, poklesne koncentrace volných benzethoniových kationů v micelárním roztoku pod desetinu příslušné hodnoty bez přídavku NaCl. Na druhé straně je ovšem micelizace rovnovážný proces ^{2, 4)}, takže dostatečným zředěním roztoku až pod příslušnou CMC se antimikrobiálně účinné benzethoniové kationy z micel zase postupně uvolní, nicméně dopad micelizace na biologickou dostupnost a účinnost si zřejmě zasluhuje detailní studium. Na snížení antimikrobiálního účinku micelizujících kvarterních amoniových solí vlivem přídavku běžné soli do kulturačního média upozornila už starší práce ¹⁸⁾ a micelizace se ukázala být omezujícím faktorem i při výzkumu kationových tenzidů se spermicidním a anti-HIV účinkem ³⁾.

Pokles koncentrace volných kvarterních kationů ve vodném micelárním roztoku je též možnou příčinou paradoxních jevů, pozorovaných při studiích extrakce benzethoniového kationu a podobných micelizujících kvarterních kationů ve formě iontového páru s aniontovým barvivem. Aniontové barvivo se do vodného roztoku kvarterní soli zpravidla přidává jako sodná sůl a pokud barvivo zůstává při daném pH v dobře disociované formě, pak se při přebytku přidaného barviva paradoxně snižuje výtěžek extrakce ⁹⁻¹¹⁾. Podle našeho názoru přebytek sodné soli barviva ve vodném roztoku posilňuje micelizaci kvarterního kationu podobně jako přídavek jiného silného elektrolytu ²⁾, takže snižuje CMC a koncentraci volného kvarterního kationu. Rovnováha ve vodné fázi se tím posouvá v neprospěch tvorby extrahovatelných iontových párů a poněvadž aniony

barviva jsou rovněž amfifilní, může mít posílení micelizace za následek i tvorbu neextrahovatelných směsných micel kvarterních kationů s aniony barviva.

Práce byla podporována grantem č. 1/1184/04 Vědecké grantové agentury Ministerstva školství Slovenské republiky.

LITERATURA

1. **Fredell, D. L.:** In Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation. Surfactants Science Series 53 (Cross, J., Singer, E. J., eds.), New York, Marcel Dekker, 1994, s. 31.
2. **Kopecný, F.:** Pharmazie, 1996; 51, 135-144.
3. **Wong, Y.-L., Curfman, C. L., Doncel, G. F. et al.:** Tetrahedron, 2002; 58, 45-54.
4. **Moroi, Y.:** Micelles: Theoretical and Applied Aspects. New York, Plenum Press, 1992.
5. **Paradies, H. H., Hinze, U., Thies, M.:** Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem., 1994; 98, 715-725.
6. **Paradies, H. H., Hinze, U., Thies, M.:** Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem., 1994; 98, 938-946.
7. **Griffiths, P. C., Paul, A., Heenan, R. K. et al.:** J. Phys. Chem. B, 2004; 108, 3810-3816.
8. **Varade, D., Joshi, T., Aswal, V. K. et al.:** Colloids Surfaces A, 2005; 259, 95-101.
9. **Kubíček, V., Němcová K.:** Dyes Pigments, 2006; 68, 183 až 189.
10. **Sedmíková, A., Gasparič, J.:** Čes. slov. Farm., 1996; 45, 132-138.
11. **Němcová, I., Čermáková, L.:** Tenside Surf. Det., 1994; 31, 331-336.
12. **Kopecný, F., Vojteková, M., Kováčová, S., Juričková, M.:** Collect. Czech. Chem. Commun., 2004; 69, 384-396.
13. **Kale, K. M., Cussler, E. L., Evans, D. F.:** J. Solution Chem., 1982; 11, 581-592.
14. **Chakraborty, H., Sarkar, M.:** J. Colloid Interface Sci., 2005; 292, 265-270.
15. **Williams, D. H., Fleming, I.:** Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. 4. vydání, New York, McGraw-Hill, 1987.
16. **Sommer, L.:** Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet Region. The Principles. Budapest, Akadémiai Kiadó, 1989, s. 121.
17. **Reichardt, Ch.:** Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. 2. vydání. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1990, kap. 6.
18. **Tomlinson, E., Brown, M. R. W., Davis, S. S.:** J. Med. Chem., 1977; 20, 1277-1282.

Došlo 15. 1. 2006.

Přijato ke zveřejnění 22. 5. 2006.

doc. RNDr. František Kopecný, CSc.
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR
e-mail: kopecny@fpharm.uniba.sk