



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYDROGELY NA BÁZI MIKROEMULZÍ A POLYELEKTROLYTŮ

HYDROGELS BASED ON MICROEMULSIONS AND POLYELECTROLYTES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Růžičková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1403/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kristýna Růžičková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Hydrogely na bázi mikroemulzí a polyelektrolytů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Prostudovat dosavadní stav přípravy fázově separovaných hydrogelů ze systémů polyelektrolyt–tenzid a způsob přípravy mikroemulzí. Zpracovat literární rešerši.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodné oleje pro přípravu mikroemulzí na bázi Septonexu.
- 3) Otestovat vybrané mikroemulze v kombinaci s hyaluronanem na přípravu fázově separovaných hydrogelů.
- 4) Pomocí vhodné techniky připravené gely charakterizovat a zhodnotit jejich aplikační použití ve farmacii a kosmetice.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Kristýna Růžičková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací fázově separovaných hydrogelů na bázi mikroemulzí za použití nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu. Mikroemulze byly připraveny z řepkového, slunečnicového, citronového a tea tree oleje. Ke zkoumání vlivu mikroemulzí na chování a vlastnosti hydrogelů bylo použito hydrofobní barvivo olejová červeň O, které simuluje hydrofobní léčivo. Stěžejní částí práce je studium uvolňování barviva z hydrogelů metodou UV-VIS spektrofotometrie. Množství uvolněného barviva bylo měřeno po 24, 48 a 72 hodinách. Na základě naměřených dat lze stanovit, že hydrogely z nízkomolekulárního hyaluronanu uvolňují více barviva než hydrogely z hyaluronanu vysokomolekulárního. Po 72 hodinách uvolnil hydrogel z mikroemulze s tea tree olejem a hydrogel z mikroemulze s citronovým olejem více barviva než hydrogel bez mikroemulze. Oba zmíněné hydrogely navíc vykazují vyšší tuhost, což je přínosem pro aplikační využití ve farmacii či kosmetice. Obsah slunečnicového a řepkového oleje v hydrogelu projevoval spíše negativní vliv na chování hydrogelů.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with preparation and characterization of microemulsion based phase separated hydrogels while using low molecular weight and high molecular weight hyaluronan. Microemulsions were prepared from canola oil, sunflower oil, lemon oil and tea tree oil. As a dye for studies of behaviour of hydrogels was used Oil red O which simulates hydrophobic drug. The main part of this thesis studies the release of this dye from hydrogels by using UV-VIS spectroscopy. The content of the dye in hydrogels was monitored after 24, 48 and 72 hours. Based on measured data we can state that hydrogel prepared from low molecular weight hyaluronan release bigger amount of the dye than hydrogel from high molecular weight hyaluronan. Based on measured data after 72 hours we can say that hydrogel from microemulsion with tea tree oil and hydrogel from microemulsion with lemon oil released bigger amount of the dye than hydrogel without microemulsion. Another advantage of these two hydrogels is increased toughness. Content of sunflower and canola oil indicated rather negative influence on behaviour of hydrogels.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hydrogel, hyaluronan, karbethependecinium bromid, mikroemulze, uvolňování, UV-VIS spektrofotometrie

KEYWORDS

Hydrogel, hyaluronan, microemulsion, karbethependecinium bromid, uvolňování, UV-VIS spectrophotometry

RŮŽIČKOVÁ, Kristýna. Hydrogely na bázi mikroemulzí a polyelektrolytů [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-23]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113587>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnoval. Mé díky patří také kolegům z laboratoře 2002 za pomoc a cenné rady. V neposlední řadě děkuji také rodině, partnerovi a přátelům za podporu při studiu.

OBSAH

ABSTRAKT	3
1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Polyelektrolyty	8
2.1.1 Hyaluronan	8
2.2 Tenzidy	9
2.2.1 Klasifikace	9
2.2.2 Septonex	10
2.2.3 Micely	10
2.2.4 Solubilizace	10
2.3 Interakce polymer–tenzid	11
2.4 Gel	12
2.4.1 Fyzikálně síťované gely	12
2.4.2 Hydrogely	12
2.5 Mikroemulze	13
2.5.1 Struktura	13
2.5.2 Příprava	14
2.5.3 Výhody a nevýhody	14
2.6 Olejová fáze	14
2.6.1 Potravinářské oleje	15
2.6.2 Esenciální oleje	16
2.7 Transdermální aplikace léčiv	17
2.7.1 Akceleranty transdermální penetrace	17
2.8 Hydrogely z mikroemulzí	17
2.9 UV/VIS spektrofotometrie	18
2.9.1 Instrumentace	18
2.10 Dynamický rozptyl světla	19
2.10.1 Instrumentace	20
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	21
3.1 Interakce polyelektrolyt-tenzid	21
3.2 Uvolňování z hydrogelů	21
3.3 Hydrogely z mikroemulzí	22
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1 Chemikálie	23
4.1.1 Tenzid	23
4.1.2 Polyelektrolyt	23
4.1.3 Oleje	23
4.1.4 Barvivo	23
4.1.5 Ostatní	23
4.2 Pracovní postup	24
4.2.1 Příprava zásobního fyziologického roztoku	24
4.2.2 Příprava zásobního roztoku Septonexu	24

4.2.3	Příprava mikroemulze.....	24
4.2.4	Příprava zásobního roztoku hyaluronanu	24
4.2.5	Příprava fázově separovaného hydrogelu z mikroemulze.....	24
4.2.6	Příprava hydrogelu s olejovou červení O	24
4.2.7	Příprava vzorků pro měření na UV/VIS spektrofotometru	24
4.2.8	Příprava kalibračních roztoků.....	24
4.3	Nastavení přístroje.....	25
4.3.1	UV/VIS spektrofotometrie	25
4.3.2	Dynamický rozptyl světla.....	25
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
5.1	Mikroemulze	26
5.1.1	Solubilizace oleje.....	26
5.1.2	Charakterizace mikroemulzí pomocí DLS	26
5.2	Příprava a vlastnosti hydrogelů z mikroemulzí.....	27
5.2.1	Příprava a fázová separace	27
5.2.2	Objem hydrogelů	28
5.3	Charakterizace hydrogelů pomocí UV/VIS spektrofotometrie.....	29
5.3.1	Vliv LMW a HMW hyaluronanu na uvolnění barviva z hydrogelu.....	29
5.3.2	Vliv jednotlivých mikroemulzí na uvolňování barviva z hydrogelu.....	35
6	ZÁVĚR.....	38
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	39
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	44
8.1	Seznam použitých zkratk.....	44
8.2	Seznam použitých symbolů.....	44
9	PŘÍLOHY	45

1 ÚVOD

Hydrogely jsou systémy tvořené trojrozměrnou polymerní sítí. Díky jejich viskoelastickým vlastnostem, schopnosti pojmout velké množství vody, biodegradabilitě a biokompatibilitě je o hydrogely stále větší zájem, a to především v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Jejich podobnost s živými tkáněmi otevírá mnoho možností pro využití také v oblasti biomedicíny, kde si hydrogely získaly pozornost jako nosiče léčiv, jelikož díky své struktuře mohou léčivo pojmout a následně kontrolovaně uvolňovat.

Mezi další typ nosiče léčiv patří mikroemulze, transparentní disperze složené z oleje, surfaktantu, kosurfaktantu a vodné fáze. Mezi výhody mikroemulzí patří jednoduchá příprava, schopnost solubilizovat hydrofobní i hydrofilní aktivní látky, dobrá termodynamická stabilita, biologická dostupnost, schopnost kontrolovaného uvolňování léčiva a usnadnění prostupu aktivní látky přes biologické membrány. V poslední době byly mikroemulze připravovány ve spojení s hydrogelovou maticí, jakou je například hyaluronan. Tímto spojením vzniká hydrogel z mikroemulze, který je díky vyšší viskozitě vhodnější pro dermální aplikaci než samotná mikroemulze.

Cílem této bakalářské práce je připravit a charakterizovat hydrogely na bázi mikroemulzí a zhodnotit jejich aplikační použití ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Potenciálním využitím hydrogelů z mikroemulzí v těchto odvětvích jsou právě hydrogely jako nosiče bioaktivních látek. Díky přítomným mikroemulzím jsou hydrogely schopny pojmout větší množství hydrofobního léčiva a následně jej snadněji uvolnit. Stěžejní částí práce je proto měření uvolňování hydrofobního barviva, které simuluje hydrofobní léčivo, z hydrogelu do slunečnicového oleje. K přípravě mikroemulzí byly použity čtyři druhy oleje. Třidu potravinářských olejů zastupují řepkový a slunečnicový olej, ze třídy esenciálních olejů byly vybrány oleje citronový a tea tree. Kromě vlivu mikroemulze byl sledován i vliv molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu na tvorbu a vlastnosti hydrogelů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty jsou polymery, které obsahují ionizovatelné skupiny schopné disociovat v polárních rozpouštědlech. Disociací makromolekulární látky vzniká makroion s velkým počtem elementárních nábojů a příslušné množství menších iontů s opačným nábojem. Podle povahy disociovatelných skupin dělíme polyelektrolyty na kyselé, zásadité a amfoterní [1].

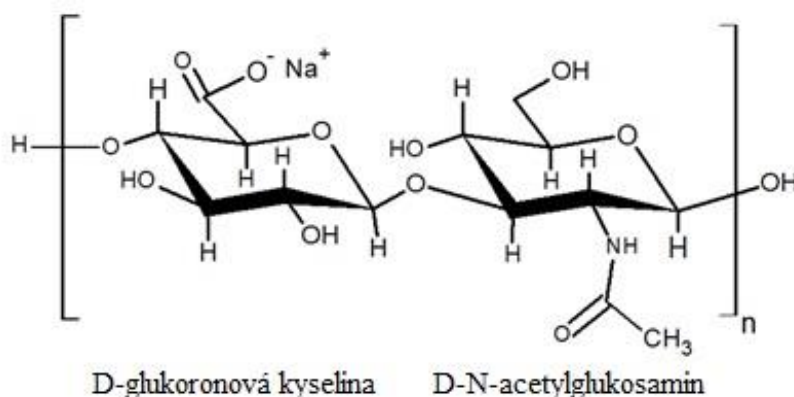
Dále tyto látky dělíme i podle náboje, a to na kationtové s kladně nabitými skupinami, aniontové se záporně nabitými skupinami a polyamfolyty, které nesou oba typy náboje. Mezi polyelektrolyty se řadí spousta biologických makromolekul, jako jsou DNA nebo kyselina hyaluronová [2]. Využívají se ve farmaceutických a biomedicínských aplikacích, protože mohou tvořit polyelektrolytové komplexy různé velikosti, stability, viskozity a morfologie [3].

2.1.1 Hyaluronan

Kyselina hyaluronová (HA) je přírodní lineární polysacharid, který se skládá z opakujících se disacharidových jednotek. HA je široce rozšířena v přírodě, vyskytuje se u obratlovců, bakterií rodu *Streptococcus*, některých řas a kvasinek rodu *Cryptococcus*. Nenachází se v houbách, rostlinách a hmyzu [4].

2.1.1.1 Struktura

Disacharidické jednotky HA jsou tvořeny N-acetyl-D-glukosaminem a kyselinou D-glukoronovou, které jsou střídavě spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickou vazbou. Jestliže jsou oba monosacharidy v β -konfiguraci, dochází ke stabilizaci struktury, protože objemné funkční skupiny (hydroxyl, karboxyl, acetamid a anomerní uhlík) jsou ve stericky výhodné ekvatoriální pozici, zatímco malé atomy vodíku zaujímají méně energeticky výhodnou axiální polohu. Při fyziologickém pH, má každá karboxylová skupina záporný náboj, který může být vyrovnán kationty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} . Ve vodném roztoku je tedy kyselina nabitá záporně a tvoří sůl, takzvaný hyaluronan (Hya), jehož struktura je znázorněna na Obrázek 1. Jde o silně hydrofilní látku, která je schopna vázat velké množství vody. Molekuly vody se váží na karboxyl a acetamid vodíkovými můstky a stabilizují tak sekundární strukturu biopolymeru [4].



Obrázek 1: Struktura disacharidové jednotky hyaluronanu [4].

2.1.1.2 Vlastnosti a biologická funkce

Hyaluronan se nachází v rozdílných částech těla v různé formě, velikosti a koncentraci. Vyskytuje se volně v lymfatickém systému, krevním oběhu a extracelulární matrix, a také je vázán ke specifickým povrchovým buněčným receptorům. Téměř polovina celkového obsahu v těle se nachází v kůži, asi čtvrtina v kostře, kloubech a vazivu a zbytek je rozložen mezi dalšími orgány.

Hyaluronan se řadí se mezi glykosaminoglykany (GAGs). Z této skupiny látek má Hya nejjednodušší strukturu, není kovalentně vázán na proteiny, má odlišnou syntézu a neobsahuje sulfonovou skupinu. Většina GAGs se vytváří v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu, ale Hya je syntetizován speciálními enzymy, které se nachází ve vnitřní stěně plazmatické membrány některých buněk. Mezi funkce v lidském těle patří hydratace a optimální lubrikace kloubů. Při poranění tkáně a hojení ran se syntetizuje ve větším množství a reguluje proces obnovy tkáně [5].

2.1.1.3 Využití

Hyaluronan byl objeven vědci z Kolumbijské univerzity Karlem Meyerem a Johnem Palmerem v roce 1934. Od roku 1950 byl využíván jako medicínská aplikace pro oční operační zákroky. Později se s ním pracovalo v různých oblastech medicíny, například v ortopedii, dermatologii a při léčbě kardiovaskulárních onemocnění. V klinické medicíně se používá jako diagnostický marker při léčbě rakoviny nebo revmatoidní artritidy. Dále se uplatňuje v oftalmologii a v kosmetickém průmyslu [5].

2.2 Tenzidy

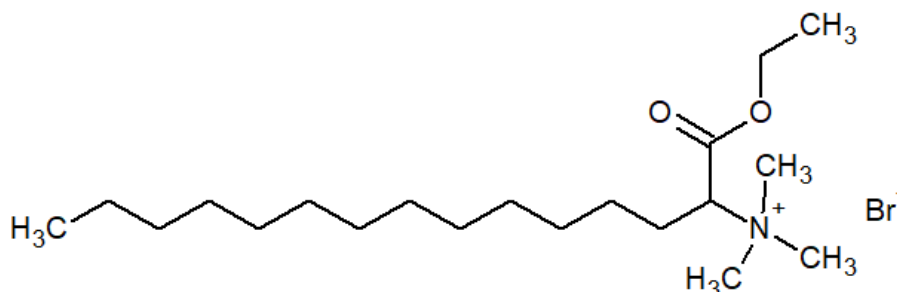
Tenzidy neboli surfaktanty jsou látky, které se při nízké koncentraci shromažďují na fázovém rozhraní a snižují povrchovou energii. Při překročení určité koncentrace, tzv. kritické micelární koncentrace, začínají tyto látky v roztoku samovolně vytvářet molekulární shluky (micely). Tvorba micel je podmíněna speciální chemickou strukturou. Molekuly tenzidu obsahují skupinu, která je afinitní k rozpouštědлу a podporuje rozpustnost v daném prostředí. Zbytek molekuly je sám o sobě v prostředí nerozpustný a většinou je tvořen dlouhým uhlovodíkovým řetězcem. Takové molekuly se označují jako amfipatické nebo amfifilní [6].

2.2.1 Klasifikace

Podle schopnosti disociovat ve vodném roztoku jsou tenzidy děleny na ionogenní (aniontové, kationtové, amfoterní) a neionogenní [1]. Neionogenní tenzidy nejsou schopny disociace v roztoku, jejich rozpustnost zajišťují polární neionogenní skupiny na konci dlouhého uhlovodíkového řetězce. Aniontové tenzidy vytvářejí disociaci ve vodě záporně nabitě povrchově aktivní ionty. Příkladem těchto látek jsou mýdla a soli sulfokyselin [6]. Kationtové tenzidy tvoří disociaci ve vodě povrchově aktivní kationty a používají se v nejrůznějších aplikacích molekulární biologie, především pro jejich micelární chování, antiseptické vlastnosti a dostupnost. Potenciální aplikací v medicínské a molekulární biologii jsou systémy pro řízené uvolňování léčiv. Příkladem kationtového tenzidu je Septonex [7].

2.2.2 Septonex

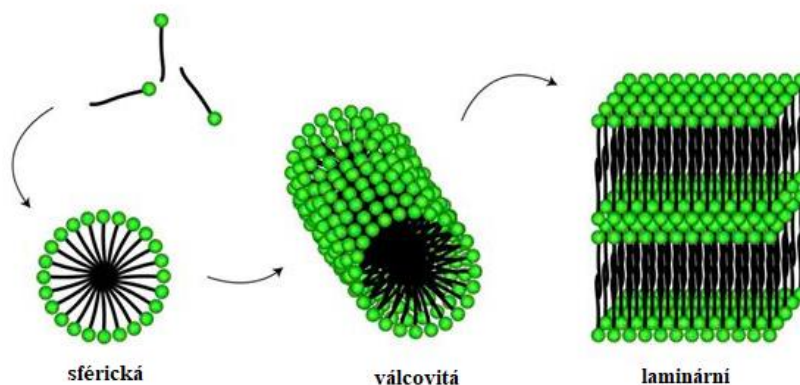
Septonex neboli karbethopendecinium bromid je kvarterní amoniová sůl (Obrázek 2). Jedná se o bílý až nažloutlý krystalický prášek, který je vysoce rozpustný ve vodě, ethanolu a chloroformu. Díky antiseptickým a dezinfekčním účinkům má využití ve farmacii [8]. Najdeme jej v přípravcích jako jsou spreje na hojení ran, kožní dezinfekce nebo oční kapky [7].



Obrázek 2: Strukturální vzorec Septonexu [8].

2.2.3 Micely

Jak již bylo uvedeno výše, při překročení kritické micelární koncentrace, dochází k samovolnému seskupení molekul tenzidu a vzniku útvarů koloidní velikosti, takzvaných micel. Ve vodném prostředí je jádro micely tvořeno spletenými alifatickými řetězci molekul tenzidu. Aby se dosáhlo minimálního styku mezi molekulami vody a hydrofobním uhlovodíkovým řetězcem, jsou hydrofilní části molekuly umístěny na vnějším povrchu micely a hydrofobní oblast tvoří jádro micely. Při nízkých koncentracích tenzidu se v roztoku vyskytují sférické micely, které se při zvýšené koncentraci mohou přeměňovat na válcové micely a při ještě větší koncentraci na micely laminární [1].



Obrázek 3: Typy micel [9].

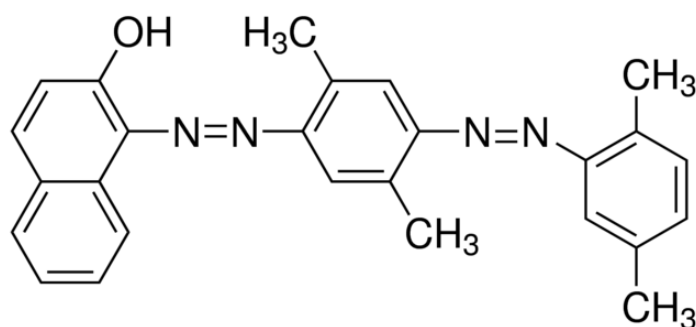
2.2.4 Solubilizace

Významnou vlastností micel je schopnost solubilizace. Pokud je do dostatečně koncentrovaného roztoku tenzidu zavedena nepolární látka, dochází ke koloidnímu rozpouštění neboli solubilizaci. Rozpuštěná látka je pak označována jako solubilizát. Každá povrchově aktivní látka má různou solubilizační kapacitu. Platí, že čím delší je uhlovodíkový řetězec molekuly tenzidu, tím větší množství látky se může solubilizovat. Solubilizaci ovlivňuje i struktura solubilizátu. Pokud jde o uhlovodík, zvyšuje se rozpustnost s poklesem molekulové

hmotnosti uhlovodíku [6]. Umístění molekuly solubilizátu v micelle je dáno strukturou molekuly. Při solubilizaci nepolárních uhlovodíků jsou uhlovodíky úplně pohlceny hydrofobním jádrem micely. Solubilizací nepolárních barviv dochází ke změně absorpčního spektra. Změna barvy je způsobena přechodem z polárního do nepolárního prostředí [9].

2.2.4.1 Olejová červeň O

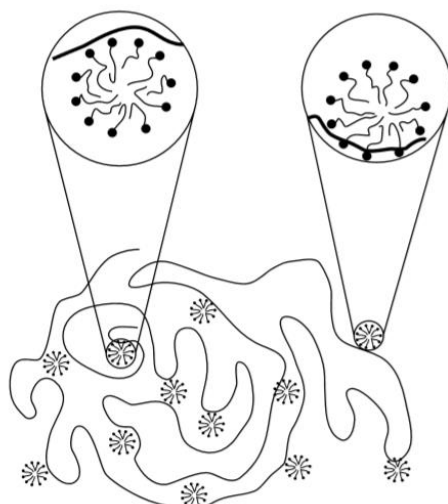
Jedná se o červený prášek, který se řadí mezi lyzochromy, látky důležité pro důkaz lipidů. Lyzochromy jsou barviva rozpustná v tucích a nerozpustná ve vodě. Mezi tukem a barvivem se nevytváří chemická vazba, ale dochází k fyzikální interakci – barvivo se v tuku solubilizuje, čímž ho obarví. Olejová červeň O barví i velice malé kapičky tuku, a proto je hojně využívána především ke studiu buněk a tkání v mikroskopii, při obarvování neutrálních triglyceridů, lipidů a lipoproteinů, kde slouží k diagnostice liposarkomů, tukové embolie nebo Burkittova lymfomu [11], [12].



Obrázek 4: Strukturální vzorec olejové červeně O [12].

2.3 Interakce polymer–tenzid

Interakce polymer–tenzid může probíhat dvěma způsoby. První možností je asociace a vazba tenzidu s polymerem, druhou alternativou je micelizace tenzidu v okolí polymerního řetězce. Polymery s hydrofobními skupinami preferují první typ průběhu interakce, tedy asociaci a vazbu tenzidu na polymer díky hydrofobním interakcím. U hydrofilních homopolymerů dojde s větší pravděpodobností k formaci micel. U polyelektrolytů se tedy budou častěji projevovat elektrostatické interakce, které se uplatňují, pokud má tenzid i polymer opačný náboj. Strukturu vzniklého systému popisuje model perlového náhrdelníku, kdy tenzid vytváří micelám podobné klastry podél polymerního řetězce viz Obrázek 5. Velikost vytvořených micel z tenzidu a polymeru je podobná jako velikost micel v samotném tenzidu [13].



Obrázek 5: Model perlového náhrdelníku [13].

2.4 Gel

Gely jsou disperzní soustavy tvořené trojrozměrnou sítí. Tato síť vytváří souvislou strukturu a prostupuje disperzním prostředím, které je s disperzním podílem spojitě. Částice nejsou v disperzním prostředí schopny pohybu. Kvůli své struktuře mají gely mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav i přesto, že je disperzní prostředí kapalné. Podle přítomnosti rozpouštědla dělíme gely na lyogely a xerogely. Pokud je rozpouštědlem voda používá se označení hydrogel. Xerogel vzniká vysušením lyogelu a botnáním lyogelu vzniká opět xerogel. Pokud na gel působí menší napětí, gel se nedeformuje trvale, ale vratně [1].

2.4.1 Fyzikálně síťované gely

Fyzikálně síťovaný gel je formován působením fyzikálních sil a to tak, že se části makromolekulárních řetězců shromažďují a vytvářejí uzly. Makromolekulární řetězec je dlouhý a může vytvářet uzlů více, díky čemuž se v molekule střídá uzlová oblast s volnými úseky a zachovává se tepelný pohyb i ohebnost. Na rozdíl od kovalentních gelů, ve fyzikálně síťovaných gelech po čase uzly zanikají, ale mohou opět vznikat v jiném uspořádání. Životnost a pevnost uzlů určuje vlastnosti gelů a jejich reologické chování. Silné gely obsahující pevně vázané uzly jsou elastické. Spoje slabých gelů jsou málo trvanlivé, a proto se gely chovají elasticky pouze při malém mechanickém napětí [9].

2.4.2 Hydrogely

Hydrogely jsou trojrozměrné, hydrofilní polymerní sítě, které jsou schopny absorbovat obrovské množství vody. Hydrogely mohou být chemicky stabilní nebo se mohou rozpadat a rozpouštět. Pokud je příčinou vytvoření gelu spletení řetězců nebo působení fyzikálních interakcí, jako jsou elektrostatické interakce, vodíkové můstky nebo hydrofobní síly, mluvíme o fyzikálních nebo reverzibilních hydrogelech. Podle funkčních skupin přítomných ve struktuře mohou být hydrogely nabitý nebo bez náboje. Díky vysokému obsahu vody, nízkému mezivrchovému napětí, porozitě a konzistenci podobné tkáním jsou hydrogely zkoumány na poli biomedicíny [14].

2.4.2.1 Botnání

Důležitým parametrem pro aplikaci hydrogelu ve farmaceutickém, oftalmologickém a tkáňovém inženýrství je botnání. Díky vodě přítomné na povrchu hydrogelu, se snižuje mezipovrchová volná energie ve fyziologickém prostředí, čímž se zlepšují biologické vlastnosti. Při botnání molekuly vody hydratují nejdříve nejpolarnější hydrofilní skupiny. Absorbovaná voda se označuje jako primárně vázaná voda. Při procesu vázání vody síť botná a odkrývá hydrofobní skupiny, které jsou schopny interakce s vodou. Takto navázaná voda se nazývá sekundárně vázaná voda. Primárně i sekundárně vázaná voda se souhrnně označuje jako celková vázaná voda. Systém je ovšem schopen absorbovat další vodu, tzv. volnou vodu, a to díky osmotické hnací síle síťových řetězců [15].

2.4.2.2 Využití

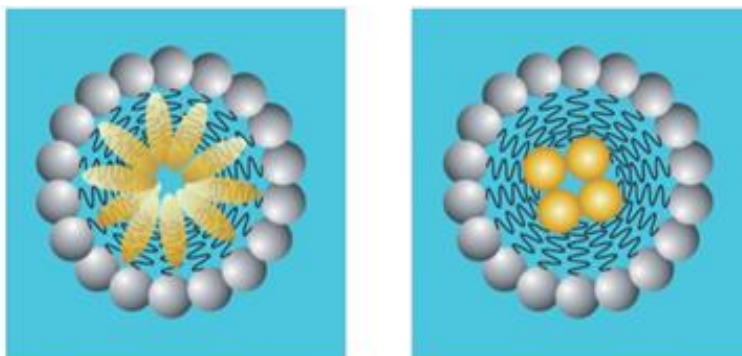
Flexibilita hydrogelů je daná obsahem vody a umožňuje použití od průmyslových odvětví po odvětví biologická. Materiály pro vytvoření hydrogelů mohou být biokompatibilní a netoxické, což posunuje aplikaci i do oblasti medicíny. V tomto oboru jsou hydrogely využívány jako nosiče pro bioaktivní molekuly, využívají se také při řízeném uvolňování a cílené distribuci léčiv. Hydrogel díky své porozitě léčivo solubilizuje a poté pomalu uvolňuje. Aktivace uvolnění může být provedena změnou pH, teploty nebo specifickým enzymem. Výhodou hydrogelů je, že je jejich struktura podobná struktuře extracelulární matrix mnoha tkání, a že jsou tvořeny za mírných podmínek. Dalším možným použitím je výroba kontaktních čoček, kde hydrogely musí splňovat několik podmínek: určitý obsah vody, dobré mechanické vlastnosti, dobrá propustnost kyslíku, stabilita a biokompatibilita [16].

2.5 Mikroemulze

Mikroemulze jsou definovány jako termodynamicky stabilní, izotropicky čisté a opticky transparentní disperze dvou nemísitelných kapalin (olej a voda), které jsou stabilizovány mezipovrchovou vrstvou molekul surfaktantu. Obvykle surfaktant nedokáže snížit mezifázové napětí mezi olejem a vodou natolik, aby mohla vzniknout mikroemulze, proto je potřebné přidat kosurfaktant, který dále snižuje mezifázové napětí a redukuje potřebné množství surfaktantu [17]. Mikroemulze obsahují částice velikosti 1–100 nm, které se tvoří spontánně. Podobně nanoemulze obsahují částice velikosti stovek nanometrů, ale na rozdíl od mikroemulzí, je k jejich vzniku potřeba mechanická síla [18].

2.5.1 Struktura

Molekuly surfaktantu v mikroemulzi typu olej ve vodě jsou organizovány tak, že nepolární části dohromady tvoří hydrofobní jádro, čímž redukuje nechtěný kontakt nepolárních skupin a vody. Molekuly oleje mohou být inkorporovány do hydrofobního jádra micely jako samostatné jádro nebo jsou umístěny mezi hydrofobní ocásky surfaktantu. Pokud má molekula oleje polární skupinu může být inkorporována v micelle tak, že polární skupiny oleje interagují s polárními hlavičkami surfaktantu nebo vyčnívají přímo do vodného prostředí viz Obrázek 6. Mikroemulze typu olej ve vodě obsahují částice sférického nebo válcovitého tvaru [19].



Obrázek 6: Inkorporace molekul oleje v micelle [19].

2.5.2 Příprava

Mikroemulze tedy vznikají spontánně pouhým smícháním složek, bez potřeby použití vnějších sil. Pro přípravu je důležité znát poměr tří hlavních složek mikroemulze: olej, voda a směs surfaktantu a kosurfaktantu. K určení přesného podílu daných komponent pro vznik stabilní mikroemulze, je potřeba sestavit fázový diagram. K jeho sestavení a k přípravě mikroemulze se nejčastěji používá metoda fázové inverze, kdy dochází k výměně fází a z mikroemulze typu v/o (voda v oleji) se stává mikroemulze typu o/v (olej ve vodě).

Nejdříve se připraví vzorky sloučením směsi surfaktantu a kosurfaktantu s olejovou fází v různých poměrech, čímž dojde k vytvoření reverzních micel. Postupně je přidávána voda, která se solubilizuje v jádře micel, ze kterých se při dalším přidavku vody vytváří mikroemulze typu v/o. Se zvyšováním množství vody dochází k vytvoření tekutého krystalu, kdy je voda uzavřena mezi dvěma vrstvami surfaktantu. Nakonec se s dalším přidáním vody lamelární struktura rozbije a voda vytvoří kontinuální fázi obsahující kapičky oleje stabilizované surfaktantem a kosurfaktantem (o/v mikroemulze) a vzniká čirý roztok [18], [20].

2.5.3 Výhody a nevýhody

Mezi výhody mikroemulzí patří termodynamická stabilita, optická průhlednost, vysoká rychlost difúze a jednoduchá příprava. Významnou vlastností je vysoká solubilizační kapacita. Mikroemulze zlepšují rozpustnost ve vodě špatně rozpustných aktivních farmaceutických složek díky existenci mikrodomén rozdílné polarity. Kvůli těmto unikátním vlastnostem se o mikroemulzích stále více uvažuje jako o nosných mediích pro cílenou distribuci léčiv. Nevýhodou mikroemulzí je vyšší cena, jelikož jsou k přípravě používány surfaktanty a kosurfaktanty. Také je obtížné stabilizovat tyto systémy kvůli nízké viskozitě. Tento problém může být vyřešen vytvořením hydrogelu na bázi mikroemulze [21].

2.6 Olejová fáze

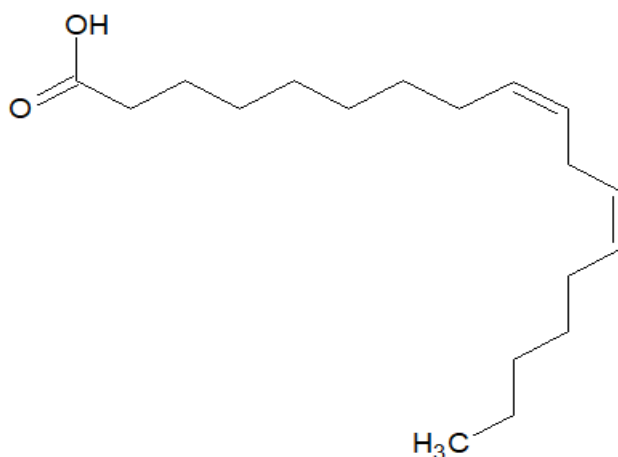
Olejová fáze je důležitou složkou mikroemulze především díky schopnosti solubilizovat molekuly lipofilních léčiv. Také zlepšuje absorpci přes lipidovou vrstvu přítomnou v kůži, jelikož olej dokáže proniknout přes buněčnou stěnu. Penetraci ovlivňuje délka alkylového řetězce – čím je řetězec kratší, tím snadnější je penetrace [17].

2.6.1 Potravinářské oleje

Potravinářské (jedlé) oleje jsou komplexní směsi, které obsahují širokou škálu sloučenin. Jsou tvořeny především triacylglyceroly, dále obsahují malé množství diacylglycerolů, volných mastných kyselin, fosfolipidů a dalších méně významných složek [22]. Triacylglyceroly představují 95–98 % celkového složení. Jsou tvořeny molekulou glycerolu, na kterou jsou vázány zbytky mastných kyselin. Každá mastná kyselina je s glycerolem spojena esterovou vazbou a má středně dlouhý nebo dlouhý uhlíkatý řetězec. Mastné kyseliny mohou být dle stupně nasycení děleny do tří skupin: nasycené mastné kyseliny, mononenasyčené (jedna dvojná vazba v řetězci) a polynenasycené (dvě a více dvojných vazeb v řetězci). Fyzikální a chemické vlastnosti olejů jsou ovlivněny typem, strukturou a polohou mastné kyseliny na glycerolu [23].

2.6.1.1 Slunečnicový olej

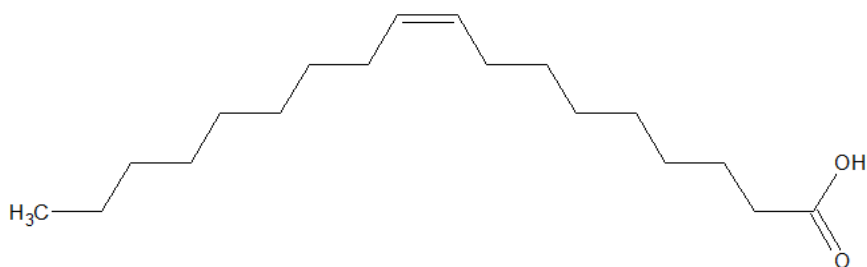
Slunečnicový olej se získává ze semen rostliny slunečnice. Hlavní složkou oleje je kyselina linolová, nenasycená mastná kyselina se dvěma dvojnými vazbami. Její obsah ve slunečnicovém oleji je přibližně 50 %. Kyselina linolová má pozitivní účinky na kůži, zvyšuje integritu *stratum corneum*, nejsvrchnější vrstvy pokožky, a zlepšuje hydrataci kůže. Díky vysoké koncentraci této kyseliny v oleji, nachází slunečnicový olej využití v kosmetice a v kožních léčivých přípravcích [24], [25].



Obrázek 7: Struktura kyseliny linolové [25].

2.6.1.2 Řepkový olej

Řepkový olej je získáván ze semen řepky olejné. Hlavními složkami tohoto oleje jsou kyselina olejová (60 %) a kyselina linolová (20 %). Kyselina olejová je nejrozšířenější nenasycenou mastnou kyselinou s jednou dvojnou vazbou. Nachází se téměř ve všech rostlinných i živočišných lipidech. Rostlinné oleje jsou významnými zdroji vitamínu E. V surovém řepkovém oleji se nachází 360–1000 mg.kg⁻¹ podobně jako v surovém slunečnicovém oleji, který obsahuje 270–1240 mg.kg⁻¹ [25], [26].



Obrázek 8: Struktura kyseliny olejové [25].

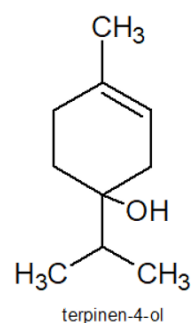
2.6.2 Esenciální oleje

Esenciální oleje neboli silice jsou komplexní směsi těkavých, ve vodě nerozpustných látek. Získávají se destilací rostlinného materiálu vodní parou, extrakcí nepolárními rozpouštědly nebo lisováním. Většina silic obsahuje velký podíl terpenů, uhlovodíků, tvořených izoprenovými jednotkami. Terpenové uhlovodíky jsou součástí složek aroma téměř všech druhů ovoce, zeleniny a koření. Omezují rozpustnost silice v ethanolu a zhoršují kvalitu silic, protože mohou na vzduchu oxidovat nebo polymerovat. Podle struktury terpeny rozlišujeme na monoterpeny ($C_{10}H_{16}$) a seskviterpeny ($C_{15}H_{24}$). Další součástí složek silic jsou monoterpenové alkoholy, které jsou nositeli vůně a chutě [25].

2.6.2.1 Tea tree olej

Tea tree olej (TTO) je světle žlutý esenciální olej, který se získává z rostlin rodu *Melaleuca* pocházejících z Austrálie. Vyrábí se parní destilací listů a větví a po zkonduování je separován z vodního destilátu. Výtěžek tvoří asi 1–2 % hmotnosti rostliny. Stabilitu oleje může ovlivnit světlo, teplo, vzduch a vlhkost, proto by měl být řádně uskladněn. Tea tree olej je složen z monoterpenů, sesquiterpenů, jejich alkoholů a celkově obsahuje přibližně sto různých složek. Hlavní složkou je terpinen-4-ol, kterému jsou přičítány antimikrobiální vlastnosti, díky nimž se přidává jako aktivní složka do mnoha přípravků pro léčení kožní infekce [27]. TTO inhibuje gram pozitivní i gram negativní bakterie rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* a je účinný i proti plísni *Candida albicans* a viru *Herpes simplex* [28].

Sloučenina	Typické složení %
terpinen-4-ol	40,1
γ -terpinen	23,0
α -terpinen	10,4
1,8-cineol	5,1
terpinolen	3,1
α -pinen	2,6
limonen	1,0



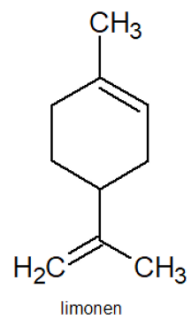
Obrázek 9: Hlavní složky tea tree oleje [29].

2.6.2.2 Citronový olej

Citronový olej je esenciální olej získávaný lisováním oplodí citronovníků, rostoucích v jižní Evropě, Indii, Střední a Jižní Americe. Hlavní složkou oleje je D-limonen, monocyklický monoterpen, který rozpouští cholesterol a využívá se při léčbě žlučových kamenů. Mezi další

významné komponenty oleje patří β -pinen, který je spolu s D-limonenem nositelem citronové vůně. Právě díky svému aroma je citronový olej široce využíván jako vonná složka v parfémtech, kosmetických a farmaceutických produktech. Olej má osvěžující, antiseptické a bělící účinky, ulevuje od únavy, napomáhá od bolesti hlavy a při infekcích dýchacích cest, čistí pleť a působí jako repelent [25], [30].

Sloučenina	Typické složení %
limonen	66,1
β -pinen	12,6
γ -terpinen	9,2
sabinen	1,9
α -pinen	1,9
myrcen	1,5
β -bisabolen	0,6



Obrázek 10: Hlavní složky citronového oleje [31].

2.7 Transdermální aplikace léčiv

Jde o způsob podání léčiva, kdy se substance s léčivem aplikuje na zdravou kůži. Tento postup má řadu výhod oproti klasickým metodám podání léčiva (orální nebo injekční). Transdermální aplikací léčiva se vylučuje first-pass efekt, vznikající po průchodu léčiva játry a gastrointestinálním systémem. Také se předchází traumatizaci, zejména dětských pacientů, způsobenou používáním jehel a snižuje se množství nebezpečného odpadu. Jde o neinvazivní, bezbolestnou metodu a pacient může léčivo aplikovat sám. Další výhodou je, že se léčivo uvolňuje po delší dobu a je ho potřeba menší množství, čímž se snižuje cena [32]. Systémy pro topické podání léku mohou být polotuhé, tekuté nebo ve formě spreje. Nejvyužívanější jsou polotuhé přípravky, mezi které patří gely, krémy a masti [33].

2.7.1 Akceleranty transdermální penetrace

Pro některá léčiva je obtížné překonat kožní bariéru, tento problém pomáhají zdat akceleranty transdermální penetrace. Jde o pomocné látky, které usnadňují prostup léčiva přes kůži do přilehlých tkání. Akceleranty transdermální penetrace jsou schopny zajistit průnik léčiva přes kůži v odhadnutelném množství a čase a to tak, že reverzibilně snižují bariérové vlastnosti kůže. Tyto látky musí splňovat řadu podmínek: nesmí být toxické, dráždivé, alergizující, a je potřeba, aby byly kompatibilní s léčivy. Po odstranění systému se musí bariérové vlastnosti kůže rychle obnovit. Mezi akceleranty transdermální penetrace patří zástupci alkoholů, aminů, hydroxykyselin, mastných kyselin (kyselina olejová přítomná ve slunečnicovém a řepkovém oleji) a jejich esterů, terpenů (limonen, který se nachází v citronovém oleji) a terpenických alkoholů (terpinen-4-ol, složka tea tree oleje) [34].

2.8 Hydrogely z mikroemulzí

Jedním ze systémů používaných pro transdermální aplikaci léčiv jsou hydrogely z mikroemulzí. Mikroemulzní systém zajišťuje kromě rozpuštění a uvolnění léčiva také penetraci přes kůži, která může být podpořena akceleranty transdermální penetrace. Kvůli nízké viskozitě se pro dermální aplikace používají mikroemulze ve spojení s různými hydrogelovými matricemi.

Vzniklý produkt, tedy hydrogel z mikroemulze, je pak znamenitým prostředkem pro transdermální podání léčiv [35].

2.9 UV/VIS spektrofotometrie

Spektrofotometrické metody jsou založeny na sledování interakcí elektromagnetického záření s daným vzorkem a využívají se pro důkaz, stanovení koncentrace a studium struktury zkoumaného vzorku. V UV-VIS spektrofotometrii dochází k výměně energie mezi látkou a zářením, což je dáno skutečností, že atomy a molekuly mohou přijetím nebo vyzářením energie změnit svůj energetický stav. Látka absorbuje ultrafialové a viditelné záření (200–800 nm) a dochází k excitaci valenčních elektronů. Podle vlnové délky λ absorbovaného záření můžeme zkoumanou látku identifikovat nebo určit její strukturu, a podle intenzity naměřené absorpce lze látku kvantifikovat. Pro měření absorpce záření se transmitance T_λ neboli propustnost definuje jako poměr toku záření propuštěného látkou po absorpci k toku vstupujícího záření. Absorbance A je pak definována jako záporný dekadický logaritmus transmitance.

$$A = -\log T_\lambda = \frac{I}{I_0}, \quad (1)$$

kde T_λ je transmitance, I_0 je dopadající zářivý tok a I je prošlý zářivý tok.

K posouzení absorpce záření vzorkem slouží absorpční spektrum, závislost absorbance (méně často transmitance) na vlnových délkách záření. Absorpční spektrum je složeno ze souboru pásů odpovídajících jednotlivým energetickým přechodům. Poloha těchto pásů se využívá při kvalitativní analýze. U kvantitativní analýzy se uplatňuje Bouguer-Lambert-Beerův zákon [36].

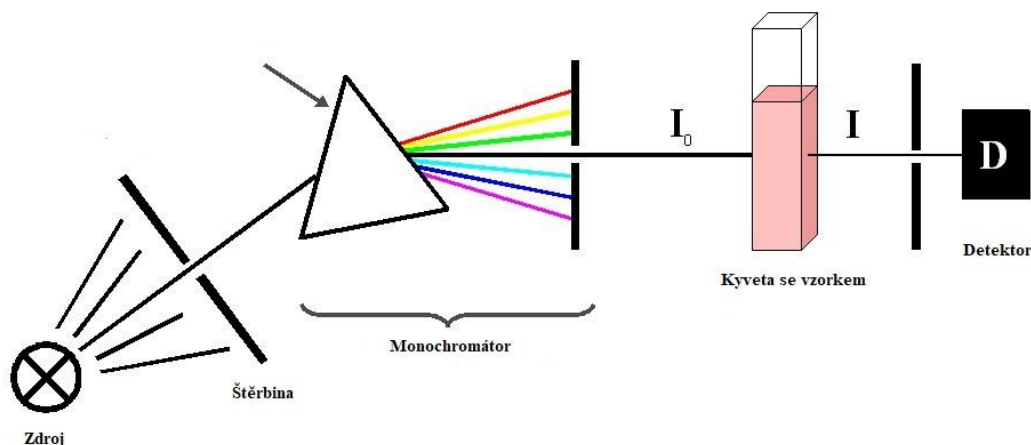
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (2)$$

kde ε je molární absorpční koeficient, c je látková koncentrace a l tloušťka absorpční vrstvy. Tento zákon platí pro nízké koncentrace absorbujících složek a pro monochromatické záření. Závislost absorbance na koncentraci je přímková a její směrnice udává molární absorpční koeficient [37].

2.9.1 Instrumentace

Přístroje pro měření emisních nebo absorpčních spekter se nazývají spektrofotometry. Spektrofotometry obsahují tyto základní komponenty: zdroj záření, optickou soustavu pro vedení paprsku, prvek pro výběr vhodné vlnové délky, zařízení pro umístění vzorku a detektor záření (viz Obrázek 11). Jako zdroj záření se používá pro viditelnou oblast světla wolframová a halogenová žárovka, pro ultrafialovou oblast deuteriová lampa. Monochromátor je zařízení, které rozkládá vstupující polychromatické záření na jednotlivé monochromatické paprsky, ze kterých je vybrána požadovaná vlnová délka. Je složen ze vstupní štěrbin, disperzního prvku a výstupní štěrbin. Disperzním prvkem může být hranol, filtr nebo mřížka. Štěrbiny vybírají pouze určitou část dopadajících paprsků. Šířkou štěrbin lze měnit intenzitu záření dopadající na detektor. K umístění vzorku slouží kvjeta, pro viditelnou oblast světla se používá skleněná a pro ultrafialovou oblast křemenná. Poslední součástí spektrometru je detektor elektromagnetického záření, který slouží k měření intenzity záření, které vzorkem prošlo.

Detektory mohou být fotonásobiče, polovodičové fotoelektrické články, diodová pole a CCD detektory. V UV-VIS spektrometrii se běžně využívají fotonásobiče [38].



Obrázek 11: Schéma UV-VIS spektrofotometru [39].

2.10 Dynamický rozptyl světla

Optické vlastnosti koloidních soustav jsou dány fyzikálními vlastnostmi přítomných koloidních částic, a to především jejich velikostí, elektrickou vodivostí a absorpcí světla disperzní fází. Nejvíce informací o vzorku lze získat z měření rozptylu a absorpce světla. Při obecném rozptylu světla nedochází k jeho interferenci, protože je světlo, rozptýlené od různých částic, v náhodné fázi. Pokud je ale zdrojem světla laser, světlo je koherentní a po interakci s částicemi k interferenci světla dochází. Vzdálenost, kterou musí urazit rozptýlené světlo k detektoru se mění, jelikož částice ve vzorku podléhají Brownovu pohybu. S rostoucí rychlostí pohybu částic se rychleji mění i intenzita rozptýleného záření. Metoda dynamického rozptylu světla neboli foton korelační spektroskopie pak měří fluktuaci intenzity rozptýleného záření okolo průměrné hodnoty intenzity za účelem stanovení velikosti částic ve vzorku [40].

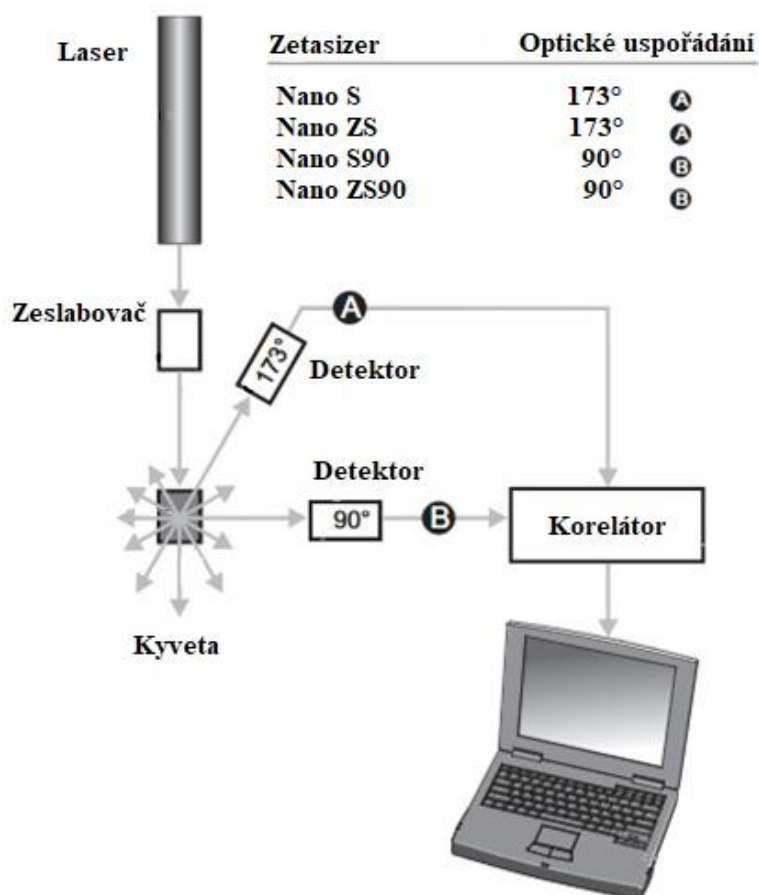
Hydrodynamický průměr částic lze určit na základě difúzního koeficientu pomocí Stokes–Einsteinovy rovnice.

$$d(h) = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (3)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota, η viskozita, D difúzní koeficient a d hledaný průměr. Průměr získaný touto technikou je průměr koule, která má stejný difúzní koeficient jako částice. Difúzní koeficient je závislý nejen na velikosti jádra částice, ale i na jeho povrchu, dále na koncentraci a typu iontů v roztoku [41].

2.10.1 Instrumentace

Pro měření velikosti částic se využívají přístroje řady Zetasizer Nano. Přístroj se skládá z šesti základních částí (viz Obrázek 12). První z nich je laser, který je používán jako zdroj světla k ozáření vzorku v kyvetě. Většina světla projde vzorkem beze změny, ale část je rozptýlena částicemi ve vzorku. K měření intenzity rozptýleného světla se používá detektor. Jelikož částice rozptyluje světlo ve všech směrech, detektor může být umístěn v jakékoliv pozici. V přístrojích Zetasizer Nano series je detektor umístěn v úhlu 173° nebo 90° . Intenzita rozptýleného světla se musí nacházet v určitém rozmezí, které může detektor změřit. Aby se zamezilo přetížení detektoru přílišným množstvím světla, je součástí přístroje zeslabovač, který sníží intenzitu laseru a tím i intenzitu rozptylu. Při použití vzorků s velmi malou koncentrací nebo malými částicemi je naopak potřeba množství světla zvýšit. V tomto případě zeslabovač zvýší intenzitu paprsku procházejícího vzorkem. Další součástí přístroje je digitální korelátor, který porovnává intenzitu rozptýleného světla v daných časových intervalech. Všechny informace jsou pak přeneseny do počítače, kde jsou data vyhodnocena a je zjištěna velikost částic [42].



Obrázek 12: Schéma přístroje Zetasizer Nano [42].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Interakce polyelektrolyt-tenzid

Jednou z prvních prací, které se zabývaly studiem fázově separovaných hydrogelů tvořených interakcí polyelektrolyt-tenzid je práce vědeckého týmu **K. Thalberga** z roku 1989. Tým připravil hydrogely ze záporně nabitého polymeru hyaluronanu a kladně nabitého tenzidu alkyltrimetylamonium bromidu. Délka alkylových řetězců tenzidu byla různá (8, 9, 10, 12 a 16 uhlíků). Bylo zjištěno, že fázově separované hydrogely vytvářejí tenzidy s alkylovým řetězcem obsahujícím minimálně 10 atomů uhlíku. Tenzid s 8 a 9 atomy uhlíku vytváří volné micely, které jsou pro ně energeticky výhodnější. Dále bylo zjištěno, že fázová separace probíhá rychleji za použití nízkomolekulárního hyaluronanu [43].

Fázově separovanými hydrogely vzniklými interakcí nabitého polyelektrolytu a opačně nabitého tenzidu se také zabývá skupina BioKol sídlící na Fakultě chemické, Vysokého učení technického v Brně. Ke studiu hydrogelů přispěli z této skupiny **Kargerová A. a Pekař M.**, kteří se zabývali interakcemi mezi hyaluronanem a kationtovým tenzidem Septonexem. Pro studium byla použita metoda vysokorozlišovací ultrazvuková spektroskopie. Nejdříve byl sledován proces micelizace v samotném Septonexu a dále interakce tenzidu s hyaluronem. Chování bylo srovnáváno s dalšími kationaktivními tenzidy, konkrétně s CTAB a TTAB. Bylo zjištěno, že agregáty hyaluronanu se Septonexem jsou méně stlačitelné než micely či molekuly samotného Septonexu. Molekulová hmotnost hyaluronanu příliš neovlivnila tvorbu nebo vlastnosti těchto agregátů ve vodném roztoku. Přítomnost NaCl potlačila mikrofázovou separaci, ale neeliminovala elektrostatické interakce mezi hylauronem a Septonexem. V tomto prostředí měla rozdílná molekulová hmotnost hyaluronanu větší vliv na tvorbu agregátů, což může být způsobeno citlivostí hyaluronanu na iontovou sílu. Celkově se Septonex interakcemi s hylauronem více přibližuje CTAB než TTAB [7].

Cílem další práce skupiny Biokol, kterou se zabývali **Venerová T. a Pekař M.** bylo charakterizovat reologické chování gelů připravených z hyaluronanu sodného a opačně nabitého tenzidu nad jeho kritickou micelární koncentrací. Pro přípravu byl použit hyaluronan o různých molekulárních hmotnostech a různé koncentraci v roztoku (0,5 a 2 %) a roztok tenzidu také o dvou různých koncentracích (50 a 200 mM). Bylo zjištěno, že všechny gely vykazovaly viskoelastické chování. Strukturní vlastnosti molekul tenzidů ovlivnily reologické vlastnosti gelů při použití hyaluronanu o nízké a střední molekulové hmotnosti. Další vliv na tvorbu gelu měla doba skladování a koncentrace roztoku hyaluronanu [44].

3.2 Uvolňování z hydrogelů

Na Fakultě chemické se tématu uvolňování z hydrogelů ve své bakalářské práci věnovala **Martina Havlíková**. Práce se zaměřuje na uvolňování solubilizovaných látek z fázově separovaného hydrogelu. Hydrogely byly připraveny za použití záporně nabitého hyaluronanu a kladně nabitého Septonexu o různých koncentracích. Jako sondy sloužící k určení solubilizační kapacity byla použita barviva fluorescein a akridinová oranž. Uvolněné látky byly měřeny pomocí metod UV-VIS spektroskopie a fluorescenční korelační spektroskopie. Bylo zjištěno, že fluorescein se z hydrogelů uvolňuje méně než akridinová oranž [45].

3.3 Hydrogely z mikroemulzí

Cílem práce týmu vědců **Zhang Yong-Tai a spol.** bylo zhodnotit kyselinu hyaluronovou jako hydrogelovou matici pro mikroemulzi a prozkoumat analgetický efekt léčiv evodiaminu a rutaecarpinu podaných ve formě hydrogelu z mikroemulze. K přípravě hydrogelu byla použita kyselina hyaluronová a mikroemulze, která byla připravena z ethyl oleátu jako olejové fáze, Cremophoru EL jako surfaktantu, polyethylenglykolu 400 jako kosurfaktantu a vody. Byl zkoumán průnik léčiva kůži in vitro pomocí Franzových difúzních cel na kůži z myši a následně bylo množství léčiva detekováno pomocí kapalinové chromatografie. Dále byl zkoumán případný negativní vliv hydrogelu jeho dlouhodobou aplikací na kůži morčat. Výsledky ukázaly, že propustnost léčiv aplikovaných pomocí hydrogelu z mikroemulze byla 2,6x vyšší oproti kontrolnímu gelu. Kyselina hyaluronová nezpůsobila zvířatům žádné podráždění a potvrdila se jako vhodná biokompatibilní hydrogelová matrice [46].

Tým **Ji Zhanga a spol.** zkoumal hydrogely z mikroemulzí jako nosiče pro antitykotikum clotrimazol. Hydrogel byl připraven sloučením 1 % Carbopolu980 a mikroemulze připravené z isopropyl myristátu jako olejové fáze, Labrasolu a Cremophoru EL jako surfaktantu a kosurfaktantu a vody. Jedním z cílů práce bylo zjistit vliv mikroemulze na prostupnost léčiva kůži. K experimentům byly využity Franzovy difúzní cely a lidská kůže, množství léčiva v kůži bylo dále analyzováno pomocí kapalinové chromatografie. V porovnání s komerčním krémem CLOT Lotrimin® byla koncentrace léčiva v kůži 2,4x vyšší a bylo tedy potvrzeno, že hydrogel z mikroemulze jako nosič léčiva zvyšují průnik léčiva kůži. Dále byly srovnávány mikroemulze typu o/v a v/o. Pro tento experiment byl zvolen fluorescein izothiokyanát, který představoval hydrofobní léčivo. Oba druhy mikroemulze byly aplikovány na kůži opět za využití Franzových cel. Množství proniklého léčiva do kůže bylo vyhodnoceno pomocí fluorescenční mikroskopie. Lepších výsledků dosáhla mikroemulze typu o/v [47].

Na Fakultě chemické se hydrogely z mikroemulzí zabývala **Katarína Kacvinská**. Ve své bakalářské práci zkoumala vliv použití mikroemulze na vznik fázově separovaného hydrogelu. Mikroemulze vytvářela ze slunečnicového a olivového oleje. Z reologického hlediska měl nejlepší výsledky hydrogel vytvořený z vysokomolekulárního hylauronanu a z mikroemulze s obsahem olivového oleje. Hydrogely byly dále analyzovány metodou časově rozlišené anizotropie a z měření bylo zjištěno, že v hydrofilní části hydrogelu se nachází sférické útvary obsahující olej a navázané molekuly tenzidu. To vedlo k předpokladu, že se jedná o obrácené emulze typu v/o [48].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

4.1.1 Tenzid

Septonex $M_w = 422,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, č.šarže: 511SEP003, GNB chem, a. s.
 $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{BrNO}_2$

4.1.2 Polyelektrolyt

Hyaluronan sodný $M_w = 340 \text{ kDa}$, vlhkost: 4,2 %, č. šarže: 120218-E1

$M_w = 1\,670 \text{ kDa}$, vlhkost: 9,4 %, č. šarže: 160218-E1

4.1.3 Oleje

Řepkový olej Lukana, Glencore Agriculture Czech s.r.o

Slunečnicový olej Slunka, Fabio Produkt, spol. s.r.o

Citronový olej CAS: 8008-56-8, č. šarže: MKBW5777V,
Sigma Aldrich, spol. s.r.o

Tea tree olej Australian Bodycare Continental Aps

4.1.4 Barvivo

Olejová červeň $M_w = 408,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, CAS: 1320-06-5,
 $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$ č. šarže: 018K0669, Sigma Aldrich, spol. s.r.o

4.1.5 Ostatní

Deionizovaná voda Systém ELGA
 H_2O

Chlorid sodný $M_w = 58,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ CAS: 7647-14-5,
NaCl č. šarže: 2106210616, Penta, spol. s. r. o

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Příprava zásobního fyziologického roztoku

Navážka 8,776 g NaCl byla rozpuštěna a doplněna deionizovanou vodou na objem 1 l. Roztok byl uskladněn při laboratorní teplotě.

4.2.2 Příprava zásobního roztoku Septonexu

Pro přípravu 200 mM roztoku Septonexu byla navážka Septonexu rozpuštěna v odpovídajícím množství připraveného fyziologického roztoku. Roztok byl den ponechán na magnetické míchače a poté uskladněn při laboratorní teplotě.

4.2.3 Příprava mikroemulze

Příprava mikroemulze nemohla proběhnout podle postupu přípravy popsaném v rešerši, kvůli určené koncentraci Septonexu pro tvorbu hydrogelu, která je 200 mM. Proto byl zvolen jiný postup, kdy došlo k nasycení micel olejem a vzniku mikroemulze typu o/v. Do vialky bylo napipetováno 6,5 ml zásobního roztoku Septonexu a bylo přidáno příslušné množství oleje. Vialka byla ponechána na třepače 2 dny, aby došlo k řádné solubilizaci.

4.2.4 Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

K přípravě hydrogelů byl použit nízkomolekulární hyaluronan (LMW Hya) a vysokomolekulární hyaluronan (HMW Hya). Bylo naváženo takové množství hyaluronanu, aby po rozpuštění ve fyziologickém roztoku byla koncentrace roztoku 2 hm. %. Roztok byl ponechán den na magnetické míchače a poté byl uskladněn v lednici.

4.2.5 Příprava fázově separovaného hydrogelu z mikroemulze

Do vialky byly napipetovány 3 ml roztoku hyaluronanu a 3 ml mikroemulze. Vialky byly krátce vortexovány a den nechány na třepače, aby došlo k řádnému promíchání složek. Poté byly hydrogely ponechány v klidu, aby mohlo dojít k fázové separaci.

4.2.6 Příprava hydrogelu s olejovou červení O

Nejdříve byl připraven zásobní roztok olejové červeně O, a to tak, že navážené množství barviva bylo rozpuštěno v odpovídajícím množství acetonu, aby výsledná koncentrace roztoku byla 5 mM. Do vialky bylo napipetováno 60 μ l roztoku a po odpaření veškerého acetonu byly přidány 3 ml mikroemulze. Vialka byla krátce ponechána na třepače, aby došlo k solubilizaci barviva a poté byly přidány 3 ml roztoku hyaluronanu. Vialky byly vortexovány, den nechány na třepače a poté ponechány v klidu.

4.2.7 Příprava vzorků pro měření na UV/VIS spektrofotometru

Z připravených hydrogelů s olejovou červení O byl slit supernatant a na povrch hydrogelu byly napipetovány 4 ml slunečnicového oleje.

4.2.8 Příprava kalibračních roztoků

Byly připraveny kalibrační roztoky olejové červeně O v roztoku Septonexu a ve slunečnicovém oleji. V obou případech byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci barviva 0,5 mM, které byly dále ředěny pro vznik kalibrační řady.

4.3 Nastavení přístroje

4.3.1 UV/VIS spektrofotometrie

Pomocí metody UV/VIS spektrofotometrie byla měřena absorbance olejové červeně O v supernatantu a ve slunečnicovém oleji, který byl nalit na hydrogel po odstranění supernatantu. Absorbance barviva v oleji byla měřena po 24, 48 a 72 hodinách na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary50 Probe. K měření byla použita skleněná kyveta o délce 1 cm. Pro zobrazení výsledků sloužil software CaryWinUV, ze kterého byla následně data exportována do programu Excel. Olejová červeně O má absorpční maximum při 520 nm, proto byly k výpočtům použity naměřené hodnoty absorbance právě při této vlnové délce.

4.3.2 Dynamický rozptyl světla

Pomocí metody dynamického rozptylu světla byla měřena velikost připravených mikroemulzí na přístroji ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments). K měření byla použita skleněná kyveta, poloha v kyvetě pro měření byla nastavena na fixní hodnotu 1,00. Kalibrace probíhala 60 vteřin a měřilo se při teplotě 25 °C. Všechny vzorky byly změřeny třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Data byla vyhodnocena v programu Excel, kde byl sestaven graf závislosti intenzity rozptýleného světla na velikosti částic.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole jsou popsány výsledky studia vlastností hydrogelů z mikroemulzí. V první podkapitole jsou charakterizovány samotné mikroemulze, druhá podkapitola se věnuje vizuální charakterizaci hydrogelů a poslední podkapitola shrnuje výsledky měření pomocí metody UV/VIS spektrofotometrie.

5.1 Mikroemulze

5.1.1 Solubilizace oleje

Mikroemulze byly připravovány jednoduchým smísením roztoku Septonexu s olejem. Nejdříve ale bylo potřeba zjistit, jaké množství oleje je potřebné k úplnému nasycení micel v roztoku. Pokud bychom přidali oleje více, přebytné množství by ovlivňovalo solubilizaci olejové červeně O, která byla použita pro další zkoumání. Proto bylo cílem tohoto experimentu zjistit, jaká je hraniční koncentrace oleje, který se v roztoku Septonexu solubilizuje bez nadbytku. Výsledná množství přidaného oleje jsou uvedena v Tabulce 1.

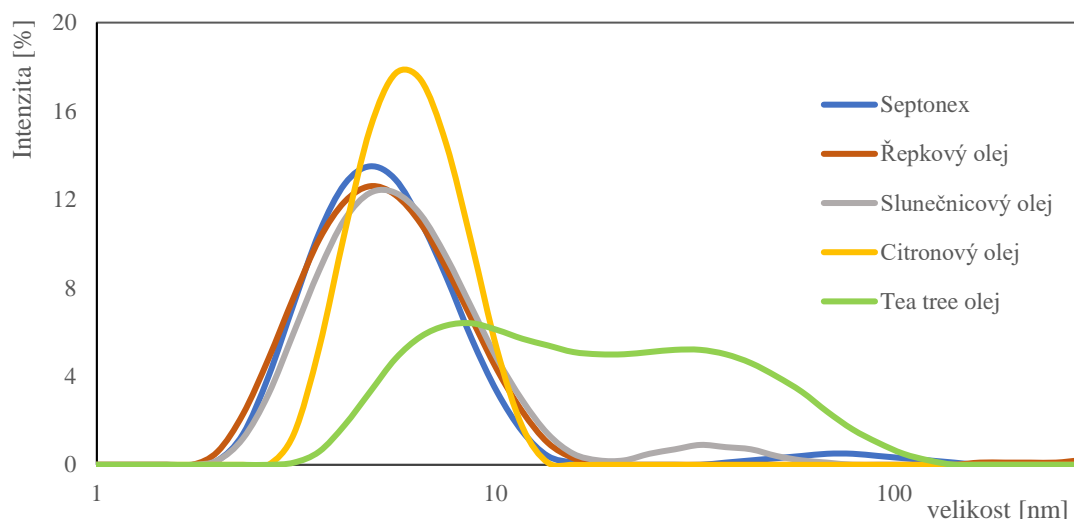
Tabulka 1: Solubilizace oleje v roztoku Septonexu.

olej	množství oleje na 1 ml roztoku Septonexu [μl]	solubilizace
řepkový	3	nesolubilizováno
slunečnicový	3	nesolubilizováno
tea tree	45	max. solubilizované množství
citronový	30	max. solubilizované množství

Nejvíce se v roztoku Septonexu solubilizoval tea tree olej, citronového oleje se solubilizovalo menší množství. V případě řepkového a slunečnicového oleje nebyla hraniční koncentrace určena, jelikož nedošlo k solubilizaci ani velmi malého objemu. Při nadbytku oleje v roztocích se vytvářely olejové kapičky na povrchu roztoku u všech olejů vyjma tea tree oleje, kdy se s větším přídavkem vytvářel mléčně zabarvený roztok. Mikroemulze obsahují částice v řádech nanometrů, a proto jsou čiré, v případě nadbytku tea tree oleje pravděpodobně došlo ke vzniku emulzí, které obsahují větší částice rozptylující světlo, což se projevuje právě zákalem. Pro tvorbu hydrogelu a k měření velikosti částic byly mikroemulze připravovány podle Tabulky 1

5.1.2 Charakterizace mikroemulzí pomocí DLS

Ke stanovení velikosti částic byla použita metoda dynamického rozptylu světla. Z naměřených hodnot byl vytvořen graf intenzitní distribuce velikosti částic v roztoku samotného Septonexu a v připravených mikroemulzích viz Obrázek 13.



Obrázek 13: Distribuce velikosti částic mikroemulzí. Osa x je v logaritmickém měřítku.

Velikost mikroemulzí s řepkovým a slunečnicovým olejem je podobná jako u samotného roztoku Septonexu, tudíž se potvrdilo, že se v micelách solubilizuje jen nepatrné množství. U citronového oleje lze pozorovat mírný nárůst a užší distribuci velikosti částic vzhledem k ostatním mikroemulzím. V mikroemulzi z tea tree oleje vznikají částice o široké distribuci velikosti, to znamená, že se v micelách solubilizuje různé množství oleje. Také lze předpokládat, že kromě mikroemulzí vznikají i jiné útvary jako jsou supermicely nebo válcovité micely.

5.2 Příprava a vlastnosti hydrogelů z mikroemulzí

Chování, vlastnosti a vzhled hydrogelů byly nejdříve sledovány vizuálně. K experimentům bylo použito hydrofobní barvivo olejová červeň O. Experimenty byly prováděny s hydrogely připravených ze čtyř druhů mikroemulzí a s hydrogelem ze samotného roztoku Septonexu. Také je zkoumán vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na přípravu a vlastnosti hydrogelů.

5.2.1 Příprava a fázová separace

Byly připraveny hydrogely z mikroemulzí a pro srovnání i hydrogel ze Septonexu. Na základě interakce polyelektrolyt-tenzid, v našem případě tedy hyaluronan-Septonex vznikl fázově separovaný hydrogel z mikroemulze. Ověření bylo provedeno s barvivem olejová červeň O. Olej s barvivem je solubilizován v micelách, které jsou díky elektrostatickým interakcím navázány na řetězec hyaluronanu, a proto je hydrogel obarven. Mírně zabarven je i supernatant, kde se vyskytují volné micely. Na Obrázku 14 lze pozorovat, že přidané oleje mají různý vliv na zabarvení supernatantů. Více je o této záležitosti řečeno v kapitole 5.3.2.1, kde byly supernatanty podrobeny analýze na UV/VIS spektrofotometru.

Pro přípravu hydrogelů byl použit jak nízkomolekulární, tak vysokomolekulární hyaluronan. Fázová separace hydrogelů z LMW Hya probíhala rychleji než v případě použití HMW Hya, což lze vidět na Obrázku 14, kde jsou zachyceny hydrogely třetí den jejich fázové separace. U hydrogelů z LMW Hya byly pozorovány drobné změny v průběhu fázové separace způsobené mikroemulzemi. Všechny hydrogely se vytvářely na fázovém rozhraní a postupně stékaly po stěnách vialky a klesaly ke dnu. V případě použití mikroemulze z citronového a tea

tree oleje stékaly hydrogely až 3x déle než zbylé hydrogely. V těchto dvou případech je pro přípravu mikroemulze přidáno nejvíce oleje, který se zakomponuje do hydrogelu, čímž snižuje jeho hustotu, a to vede k pomalejšímu usazování hydrogelu ke dnu. V případě gelů z HMW Hya se výrazný vliv mikroemulze neprojevoval, všechny hydrogely se také vytvořily na fázovém rozhraní a stékaly ke dnu přibližně stejnou dobu.



Obrázek 14: Na obrázku jsou zachyceny hydrogely po třech dnech průběhu fázové separace. Vlevo hydrogely z LMW Hya, vpravo hydrogely z HMW Hya.

Dále byl sledován vliv mikroemulze na tuhost gelu. U hydrogelů z HMW Hya se vliv mikroemulze dá zanedbat, jelikož jsou hydrogely velmi tuhé samy o sobě. Hydrogely z LMW Hya jsou méně tuhé a přídavek oleje se na tuhosti projevil. Nejvýraznější zvýšení tuhosti proběhlo u hydrogelu s tea tree olejem. Stejně tak hydrogel z citronového oleje vykazoval větší tuhost než hydrogel z roztoku Septonexu. U hydrogelů s řepkovým a slunečnicovým olejem nebyla zaznamenána výrazná změna v tuhosti.



Obrázek 15: Srovnání hydrogelů z mikroemulzí z LMW Hya. Zleva: bez oleje, řepkový, slunečnicový, citronový, tea tree olej.

5.2.2 Objem hydrogelů

Na Obrázku 14 si lze všimnout, že hydrogely z LMW Hya z tea tree a citronového oleje mají nepatrně menší objem. Pro ověření byly hydrogely připraveny ve zkumavkách se stupnicí a byl změřen jejich objem, který je uveden v následující Tabulce 2.

Tabulka 2: Objem hydrogelů připravených z LMW Hya.

Hydrogel z LMW hyaluronanu	Objem [ml]
bez oleje	1,15
řepkový olej	1,15
slunečnicový olej	1,10
tea tree olej	1,00
citronový olej	1,00

Nejmenší objem mají hydrogely s tea tree a citronovým olejem. Hydrogel se slunečnicovým olejem má o něco menší objem než hydrogel s řepkovým olejem a hydrogel bez oleje, jejichž objemy jsou stejné.

5.3 Charakterizace hydrogelů pomocí UV/VIS spektrofotometrie

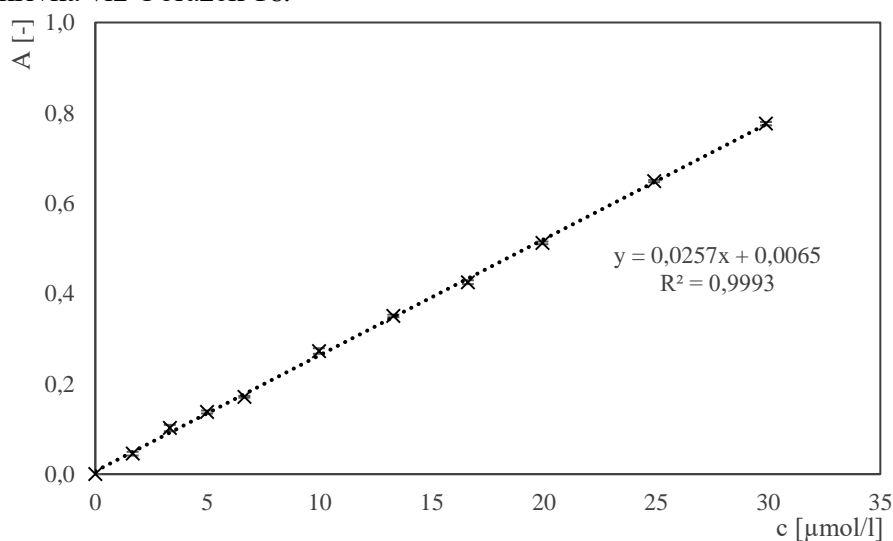
V této kapitole jsou nejdříve srovnány schopnosti uvolňování barviva u hydrogelů z LMW a HMW Hya. Na základě naměřených dat a pozorování je vyhodnoceno, jaká molekulová hmotnost hyaluronanu je vhodnější k přípravě hydrogelů z mikroemulzí. Dále je zkoumán vliv jednotlivých mikroemulzí na hydrogel připravený z vybraného hyaluronanu.

5.3.1 Vliv LMW a HMW hyaluronanu na uvolnění barviva z hydrogelu

Cílem experimentu bylo zjistit, jaký vliv má molekulová hmotnost použitého hyaluronanu na uvolňování barviva z hydrogelů do slunečnicového oleje, proto byl každý vzorek připraven pouze dvakrát.

5.3.1.1 Kalibrační křivka olejové červeně O v roztoku Septonexu

Byla připravena koncentrační řada roztoku Septonexu s olejovou červení O naředěním zásobního roztoku viz kapitola 4.2.8. Koncentrační řada byla připravena a proměřena celkem 3x. Naměřené hodnoty pro jednotlivé koncentrace byly zprůměrovány a byla sestrojena kalibrační křivka viz Obrázek 16.



Obrázek 16: Kalibrační křivka olejové červeně O v roztoku Septonexu. Tečkovaně vyznačená rovnice lineární regrese. Chybové úsečky nejsou viditelné z důvodu malých odchylek.

5.3.1.2 Množství barviva v supernatantu

Hydrogely byly připraveny podle postupu uvedeném v kapitole 4.2.6 a uchovány ve tmě při laboratorní teplotě po 10 dní, aby došlo k úplné fázové separaci a usazení gelu. Supernatant byl slit a byla změřena jeho absorbance. Koncentrace barviva byla vypočtena pomocí rovnice regrese. Z koncentrace bylo vypočteno množství barviva v supernatantu (m). Odečtením uvolněného množství barviva od původního množství v hydrogelu ($122,5 \mu\text{g}$) bylo získáno nové množství barviva v hydrogelu, které je nezbytné k dalším výpočtům (m_{hydrogel}). Dále bylo množství uvolněného barviva z hydrogelu vyjádřeno v procentech ($m \%$) viz Tabulka 3 a Tabulka 4.

Tabulka 3: Hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O v supernatantu, LMW Hya.

Hydrogel	LMW Hya			
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m_{hydrogel} [μg]	m %
Bez oleje	$7,85 \pm 0,27$	$16,03 \pm 0,56$	$106,52 \pm 0,56$	$13,08 \pm 0,45$
Řepkový	$6,25 \pm 0,19$	$12,76 \pm 0,40$	$109,79 \pm 0,40$	$10,42 \pm 0,32$
Slunečnicový	$4,01 \pm 0,33$	$8,19 \pm 0,68$	$114,36 \pm 0,68$	$6,68 \pm 0,55$
Tea tree	$1,32 \pm 0,02$	$2,70 \pm 0,04$	$119,85 \pm 0,04$	$2,20 \pm 0,03$
Citronový	$0,58 \pm 0,25$	$1,19 \pm 0,52$	$121,35 \pm 0,52$	$0,97 \pm 0,42$

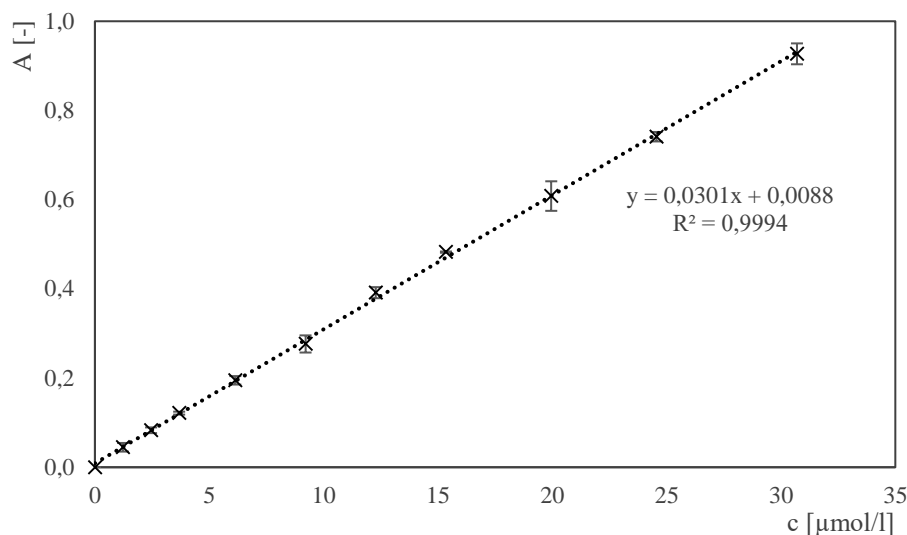
Tabulka 4: Hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O v supernatantu, HMW Hya.

Hydrogel	HMW Hya			
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m_{hydrogel} [μg]	m %
Bez oleje	$9,01 \pm 1,29$	$18,41 \pm 2,63$	$104,14 \pm 2,63$	$15,02 \pm 2,14$
Řepkový	$6,52 \pm 1,21$	$13,32 \pm 2,47$	$109,23 \pm 2,47$	$10,87 \pm 2,01$
Slunečnicový	$2,35 \pm 0,19$	$4,81 \pm 0,40$	$117,74 \pm 0,40$	$3,92 \pm 0,32$
Tea tree	$1,71 \pm 0,41$	$3,50 \pm 0,84$	$119,05 \pm 0,84$	$2,85 \pm 0,68$
Citronový	$0,15 \pm 0,21$	$0,32 \pm 0,44$	$122,23 \pm 0,44$	$0,26 \pm 0,36$

U hydrogelů z LMW hylauronanu lze pozorovat menší odchylky u dvou stejných vzorků. Kvůli větším odchylkám u hydrogelu z HMW Hya, nelze jednoznačně říci, jaký vliv má molekulární hmotnost hyaluronanu použitého pro přípravu hydrogelu na množství barviva v supernatantu. U obou molekulových hmotností je vliv mikroemulze na hydrogel stejný. Nejvíce volných micel s barvivem se nachází v supernatantu u hydrogelu ze Septonexu, nejmenší u hydrogelu s tea tree a citronovým olejem.

5.3.1.3 Kalibrační křivka olejové červeně O v oleji

Podle postupu přípravy uvedeném v kapitole 4.2.8 byla připravena koncentrační řada slunečnicového oleje s olejovou červení O. Koncentrační řada byla připravena a proměřena celkem 3x. Po naměření absorbance všech vzorků byla sestrojena kalibrační křivka viz Obrázek 17.



Obrázek 17: Kalibrační křivka olejové červeně O ve slunečnicovém oleji. Tečkovaně vyznačená rovnice lineární regrese.

5.3.1.4 Solubilizace barviva oleji

Po slití a proměření absorbance barviva v supernatantu byly na hydrogely napipetovány 4 ml slunečnicového oleje. Absorbance olejové červeně O v oleji byla měřena po 24, 48 a 72 hodinách od doby přípravy. Po každém měření absorbance byl olej vrácen zpět do vialky. Koncentrace barviva byla vypočtena pomocí rovnice regrese a poté přepočtena na množství v oleji. Ve většině případů byl olej již po 24 hodinách mírně zakalený, ale zákal byl odstraněn zahřátím. Další potíže způsobovaly bublinky zbylého supernatantu, které se zdržovaly na povrchu hydrogelu. Olej s barvivem byl tedy před slitím promíchán jen jemně, aby nedošlo ke smísení s bublinkami, a tudíž k nepřesnému měření. Nicméně promíchání mohlo být nedostatečné, což mohlo vést k odchylkám. Při měření ulpívala část oleje na stěnách vialky a také se malá část oleje zakomponovala do hydrogelu, což mohlo vést k dalším odchylkám, jelikož pro výpočty není znám úplně přesný objem.

V Tabulce 5, 6 a 7 jsou vypočteny hodnoty koncentrací a množství uvolněného barviva za 24, 48 a 72 hodin. Pro lepší přehlednost byly vytvořeny grafy, které srovnávají procentuální množství barviva uvolněného z hydrogelů z LMW a HMW Hya za 24, 48 a 72 hodin viz Obrázky 18, 19 a 20. Grafy na Obrázcích 21 a 22 zobrazují množství barviva uvolněného za 24 hodin v jednotlivých dnech.

Tabulka 5: Vypočtené hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O v oleji po 24 hodinách.

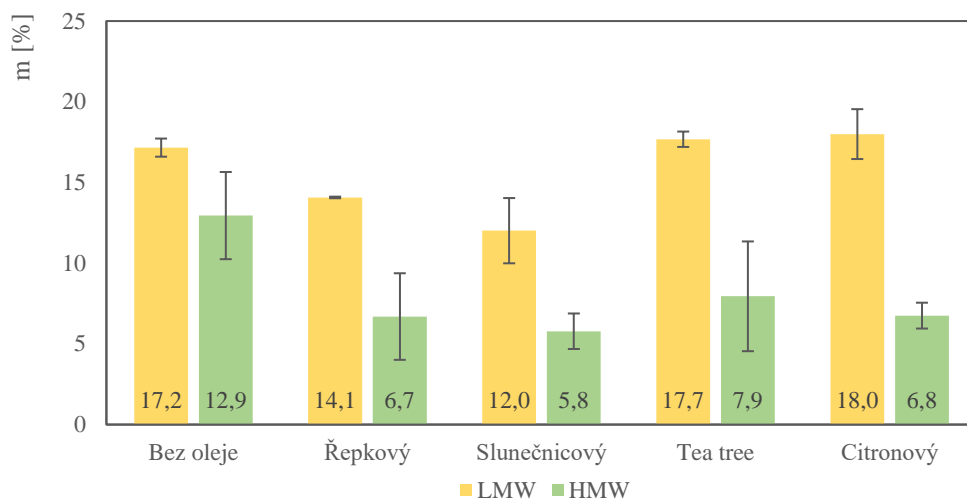
24 hodin	LMW			HMW		
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %
Bez oleje	11,19 \pm 0,37	18,28 \pm 0,60	17,16 \pm 0,56	8,44 \pm 1,75	13,79 \pm 2,85	12,95 \pm 2,68
Řepkový	9,46 \pm 0,03	15,45 \pm 0,05	14,06 \pm 0,05	4,50 \pm 1,83	7,35 \pm 2,99	6,69 \pm 2,72
Slunečnicový	8,41 \pm 1,41	13,74 \pm 2,31	12,01 \pm 2,02	4,05 \pm 0,78	6,61 \pm 1,28	5,78 \pm 1,12
Tea tree	12,97 \pm 0,35	21,19 \pm 0,57	17,68 \pm 0,48	5,83 \pm 2,50	9,52 \pm 4,08	7,95 \pm 3,40
Citronový	13,37 \pm 1,15	21,84 \pm 1,88	18,00 \pm 1,55	5,01 \pm 0,58	8,19 \pm 0,95	6,75 \pm 0,78

Tabulka 6: Vypočtené hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O v oleji po 48 hodinách.

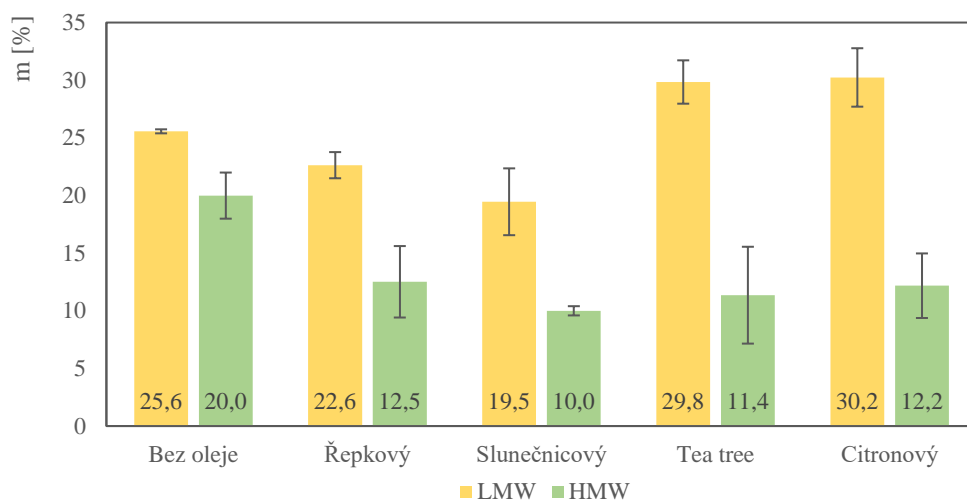
48 hodin	LMW			HMW		
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %
Bez oleje	17,09 \pm 0,12	27,23 \pm 0,19	25,56 \pm 0,17	13,37 \pm 1,38	21,29 \pm 2,20	19,99 \pm 2,07
Řepkový	15,60 \pm 0,78	24,84 \pm 1,25	22,63 \pm 1,13	8,62 \pm 2,16	13,74 \pm 3,45	12,51 \pm 3,14
Slunečnicový	13,96 \pm 2,08	22,25 \pm 3,31	19,45 \pm 2,90	7,18 \pm 0,32	11,43 \pm 0,50	10,00 \pm 0,44
Tea tree	22,45 \pm 1,41	35,77 \pm 2,25	29,84 \pm 1,88	8,54 \pm 3,18	13,61 \pm 5,06	11,35 \pm 4,22
Citronový	23,03 \pm 1,93	36,69 \pm 3,07	30,24 \pm 2,53	9,27 \pm 2,15	14,77 \pm 3,42	12,17 \pm 2,82

Tabulka 7: Vypočtené hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O v oleji po 72 hodinách.

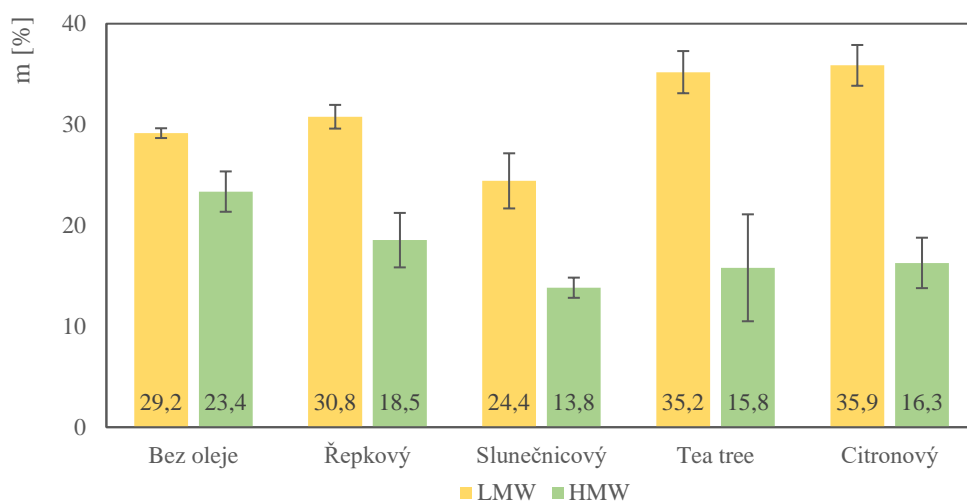
72 hodin	LMW			HMW		
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %
Bez oleje	20,00 \pm 0,33	31,05 \pm 0,52	29,15 \pm 0,48	16,03 \pm 1,38	24,88 \pm 2,14	23,36 \pm 2,01
Řepkový	21,77 \pm 0,83	34,79 \pm 1,29	30,78 \pm 1,18	13,12 \pm 1,90	20,36 \pm 2,94	18,54 \pm 2,68
Slunečnicový	17,99 \pm 2,01	27,93 \pm 3,13	24,42 \pm 2,73	10,19 \pm 0,73	15,81 \pm 1,14	13,83 \pm 0,99
Tea tree	27,18 \pm 1,61	42,18 \pm 2,51	35,20 \pm 2,09	12,20 \pm 4,11	18,94 \pm 6,38	15,80 \pm 5,32
Citronový	28,04 \pm 1,58	43,53 \pm 2,45	35,87 \pm 2,02	12,73 \pm 1,98	19,77 \pm 3,07	16,29 \pm 2,53



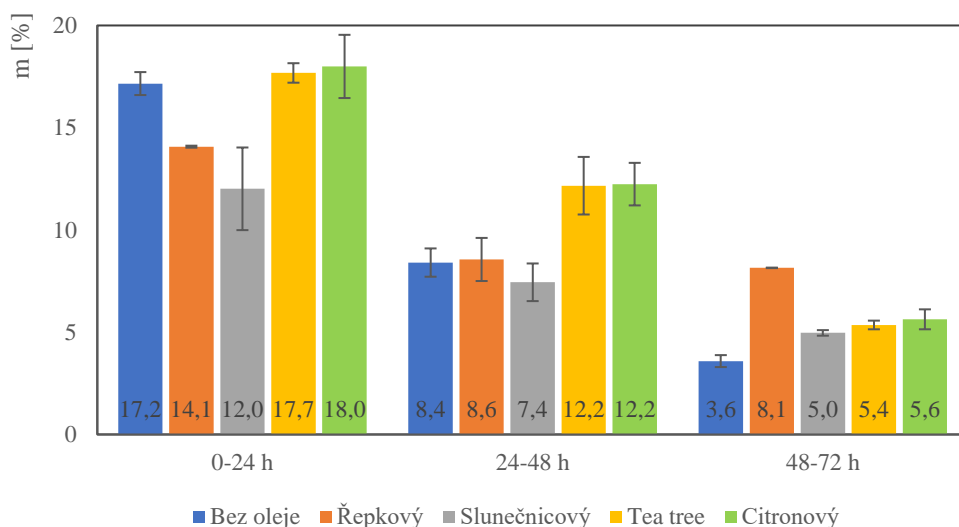
Obrázek 18: Procentuální množství uvolněného barviva z hydrogelů po 24 hodinách.



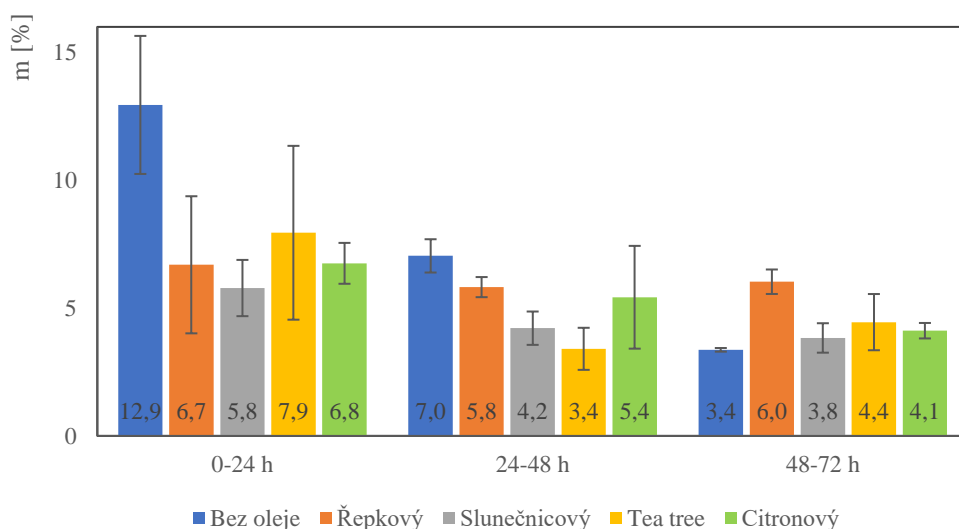
Obrázek 19: Procentuální množství uvolněného barviva z hydrogelů po 48 hodinách.



Obrázek 20: Procentuální množství uvolněného barviva z hydrogelů po 72 hodinách.



Obrázek 21: Procentuální množství barviva uvolněného z hydrogelů z LMW Hya v jednotlivých dnech.



Obrázek 22: Procentuální množství barviva uvolněného z hydrogelů z HMW Hya v jednotlivých dnech.

Z vypočteného množství solubilizovaného barviva v oleji, lze vyvodit závěr, že se z hydrogelu z HMW Hya barvivo uvolňuje méně. V případě LMW Hya intenzita uvolňování barviva s časem klesala. U HMW Hya je průběh podobný, výjimkou je hydrogel s tea tree a řepkovým olejem. U obou hydrogelů byla třetí den naměřena vyšší koncentrace barviva než den předešlý. Jelikož byla absorbance naměřena s vysokými odchylkami, a to především u hydrogelu s tea tree olejem, lze předpokládat klesající intenzitu uvolňování barviva s časem i u hydrogelů z HMW Hya.

Také můžeme konstatovat, že v případě LMW Hya citronový a tea tree olej zvyšují intenzitu uvolňování barviva, slunečnicový a řepkový naopak snižují. U hydrogelů z HMW Hya se nedá konstatovat, že by mikroemulze podpořily uvolňování barviva, protože nejvíce barviva bylo uvolněno z hydrogelu bez oleje.

HMW Hya byl vyhodnocen jako méně vhodný pro přípravu hydrogelů z mikroemulzí, a to kvůli přibližně 2x nižší intenzitě uvolňování barviva než u hydrogelů z LMW Hya, větším odchylkám měření a delší době trvání fázové separace.

5.3.2 Vliv jednotlivých mikroemulzí na uvolňování barviva z hydrogelu

Pro zjištění vlivu jednotlivých olejů na solubilizaci barviva byl k přípravě hydrogelů použit LMW Hya. Kvůli pravděpodobným odchylkám byly všechny hydrogely připraveny čtyřikrát, k výpočtům byly vybrány tři nejvíce odpovídající hodnoty absorbance. Hydrogely byly připraveny stejným způsobem, ale tentokrát byly ponechány v klidu pouze 5 dní, jelikož fázová separace hydrogelu z LMW Hya není tak časově náročná jako při použití HMW Hya.

5.3.2.1 Koncentrace barviva v supernatantu

Byla změřena absorbance a následně vypočtena koncentrace a množství barviva v supernatantu viz Tabulka 8.

Tabulka 8: Hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O v supernatantu.

LMW Hya	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m _{hydrogel} [μg]	m %
Bez oleje	11,67 \pm 0,72	23,84 \pm 1,46	99,17 \pm 1,02	19,46 \pm 1,19
Řepkový	11,45 \pm 0,26	23,38 \pm 0,54	99,60 \pm 0,25	19,08 \pm 0,44
Slunečnicový	6,22 \pm 0,35	12,70 \pm 0,71	109,45 \pm 0,79	10,36 \pm 0,58
Tea tree	0,81 \pm 0,11	1,66 \pm 0,23	120,97 \pm 0,14	1,36 \pm 0,19
Citronový	2,07 \pm 0,18	4,23 \pm 0,37	118,01 \pm 0,23	3,45 \pm 0,31

Nejméně barviva obsahoval supernatant z hydrogelu s tea tree olejem a následně s citronovým olejem. Olejová červeně je solubilizována v micelách, pokud je v supernatantu menší koncentrace barviva, může to znamenat, že jsou micely tenzidu přítomny v hydrogelu. Na řetězec hyaluronanu by tak bylo navázáno větší množství micel, což by vedlo k pevnějšímu zesíťování, které by se projevilo také již zmíněnou vyšší tuhostí gelu a menším objemem.

Při vizuálním zkoumání hydrogelů nebyla rozpoznána výrazná změna v tuhosti při použití řepkového a slunečnicového oleje. Avšak z vypočtených hodnot lze vyvodit teorii, že hydrogel z mikroemulze ze slunečnicového oleje by mohl být pevnější než hydrogel z mikroemulze z řepkového oleje a hydrogel bez oleje, jejichž množství barviva v supernatantu je srovnatelné.

5.3.2.2 Solubilizace barviva v oleji

Příprava hydrogelů proběhla stejným způsobem jako je popsáno v předchozích kapitolách. V Tabulce 9, 10 a 11 jsou vypočteny hodnoty koncentrací a množství uvolněného barviva za 24, 48 a 72 hodin. Pro lepší přehlednost byly opět vytvořeny grafy, které znázorňují procentuální množství barviva uvolněného z hydrogelů za 24, 48 a 72 hodin viz Obrázek 23. Graf na Obrázku 24 zobrazuje množství barviva uvolněného za 24 hodin v jednotlivých dnech.

Tabulka 9: Hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O ve slunečnicovém oleji po 24 hodinách.

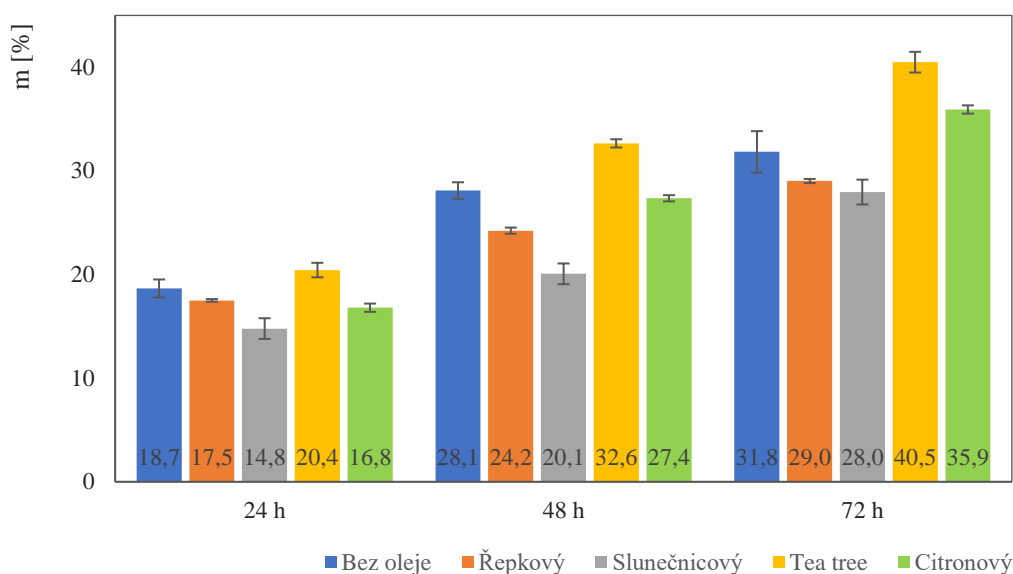
LMW Hya	24 h		
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %
Bez oleje	11,26 \pm 0,37	18,40 \pm 0,61	18,66 \pm 0,87
Řepkový	10,62 \pm 0,07	17,35 \pm 0,12	17,50 \pm 0,13
Slunečnicový	9,93 \pm 0,63	16,23 \pm 1,02	14,78 \pm 1,02
Tea tree	15,11 \pm 0,52	24,69 \pm 0,86	20,43 \pm 0,72
Citronový	12,16 \pm 0,32	19,87 \pm 0,53	16,79 \pm 0,40

Tabulka 10: Hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O ve slunečnicovém oleji po 48 hodinách.

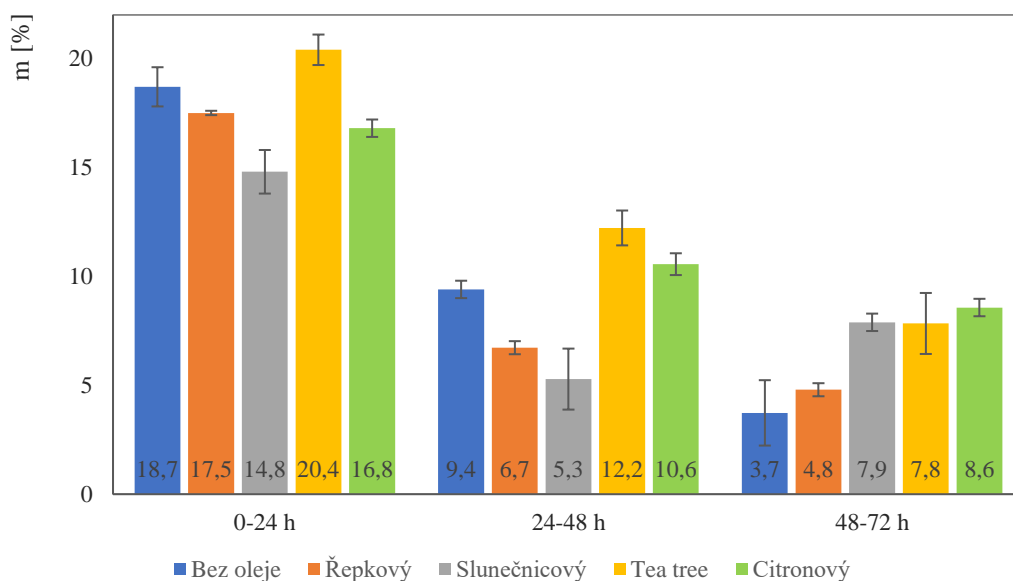
LMW Hya	48 h		
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %
Bez oleje	17,49 \pm 0,34	27,86 \pm 0,54	28,10 \pm 0,80
Řepkový	15,15 \pm 0,19	24,13 \pm 0,30	24,23 \pm 0,29
Slunečnicový	13,78 \pm 0,61	21,96 \pm 0,98	20,06 \pm 0,97
Tea tree	24,79 \pm 0,33	39,50 \pm 0,53	32,65 \pm 0,40
Citronový	20,31 \pm 0,18	32,36 \pm 0,29	27,35 \pm 0,29

Tabulka 11: Hodnoty koncentrace a množství olejové červeně O ve slunečnicovém oleji po 72 hodinách.

LMW Hya	72 h		
	c [$\mu\text{mol/l}$]	m [μg]	m %
Bez oleje	20,23 \pm 1,06	31,40 \pm 1,64	31,83 \pm 2,03
Řepkový	18,54 \pm 0,17	28,78 \pm 0,26	29,02 \pm 0,20
Slunečnicový	19,78 \pm 0,81	30,71 \pm 1,26	27,95 \pm 1,15
Tea tree	31,53 \pm 0,69	48,94 \pm 1,07	40,49 \pm 0,95
Citronový	27,38 \pm 0,23	42,50 \pm 0,36	35,92 \pm 0,41



Obrázek 23: Procentuální množství uvolněného barviva z hydrogelů po 24, 48 a 72 hodinách.



Obrázek 24: Procentuální množství uvolněného barviva z hydrogelů z LMW Hya za 24 hodin v jednotlivých dnech.

Po 72 hodinách se nejvíce barviva uvolnilo z hydrogelu s tea tree olejem (40,5 %) a následně z hydrogelu s citronovým olejem (35,9 %). Zajímavým výsledkem je, že srovnávací hydrogel bez mikroemulze (31,8 %) uvolňuje barvivo více než hydrogely s řepkovým (29,0 %) a slunečnicovým olejem (28,0 %).

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo otestovat a charakterizovat fázově separované hydrogely na bázi mikroemulzí. Pro přípravu mikroemulzí byl použit řepkový, slunečnicový, citronový a tea tree olej. Nejdříve byla připravena řada mikroemulzí s cílem zjistit maximální rozpustnost daných olejů v Septonexu. U esenciálních olejů proběhla solubilizace lépe než u potravinářských olejů a byla stanovena maximální koncentrace solubilizovaného oleje. Nejvíce se solubilizoval tea tree olej, následně olej citronový. U slunečnicového a řepkového oleje nedošlo k solubilizaci ani 10x menšího množství oleje.

Z měření velikosti částic mikroemulzí lze potvrdit, že řepkový a slunečnicový olej se v micelách Septonexu téměř nesolubilizuje. Citronového oleje se v micelách solubilizuje více a dochází k mírnému nárůstu velikosti mikroemulzí. V případě tea tree oleje došlo ke vzniku částic s různou velikostí, tea tree olej se tedy v micelách solubilizuje v různém množství. Také lze předpokládat vznik jiných útvarů, než jsou micely a mikroemulze, např. supermicel nebo válcovitých micel.

Po přípravě fázově separovaných hydrogelů z mikroemulze, byly provedeny experimenty pro jejich vizuální charakterizaci. Připravené hydrogely vykazovaly odlišnou tuhost a různý objem. Nejtužší byly hydrogely připravené z mikroemulze z tea tree a citronového oleje. U těchto hydrogelů byl také naměřen menší objem a pomocí UV/VIS spektrofotometrie byla naměřena nejmenší koncentrace barviva v supernatantu. Možným vysvětlením je, že se více micel podílí na zesíťování hydrogelu, což se projevuje právě zvýšenou pevností a menším objemem. Mikroemulze ze slunečnicového a řepkového oleje neměly významný vliv na tuhost gelu.

Dále byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu na uvolňování barviva olejové červeně O z hydrogelu do slunečnicového oleje. U všech hydrogelů se nejvíce barviva uvolnilo první den, v dalších dnech se postupně intenzita uvolňování snižovala u všech hydrogelů z LMW Hya a téměř u všech hydrogelů z HMW Hya. Hydrogely z LMW Hya uvolňovaly více barviva a docházelo k menším odchýlkám v měření mezi dvěma stejnými vzorky, proto byl LMW Hya vyhodnocen jako vhodnější matrice pro přípravu hydrogelů z mikroemulzí.

V poslední části byl zkoumán vliv mikroemulzí na uvolňování barviva z hydrogelu z LMW Hya. Výsledky měření ukázaly, že uvolňování barviva nejvíce podporuje tea tree a citronový olej. Z hydrogelu z tea tree oleje se po 72 hodinách uvolnilo o 8,7 % více barviva a z hydrogelu z citronového oleje 4,1 % více barviva než z hydrogelu bez oleje. Naopak hydrogely s řepkovým a slunečnicovým olejem uvolnily přibližně o 3% barviva méně než hydrogel bez mikroemulze.

Nejlepší výsledky vykazoval hydrogel připravený z mikroemulze s tea tree olejem a následně hydrogel z mikroemulze s citronovým olejem, oba připravené z LMW hyaluronem. Tyto hydrogely se projevovaly vyšší tuhostí a uvolnily nejvíce barviva, proto jsou vyhodnoceny jako nejvhodnější hydrogely pro využití ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [2] NYLANDER, Tommy, Yulia SAMOSHINA a Björn LINDMAN. Formation of polyelectrolyte–surfactant complexes on surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2006, 123-126, [cit. 2019-01-24]. DOI: 10.1016/j.cis.2006.07.005. ISSN 00018686.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868606001023>
- [3] MEKA, Venkata, et al. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, 22(11), 1697-1706 [cit. 2019-01-24]. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.06.008. ISSN 13596446.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644617301265>
- [4] FALLACARA, Arianna, et al. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers* [online]. 2018, 10(7) [cit. 2019-01-21]. DOI: 10.3390/polym10070701. ISSN 2073-4360.
Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4360/10/7/701>
- [5] ROSTAMI, Sahar a Hadi PARSIAN. Hyaluronic Acid: From Biochemical Characteristics to its Clinical Translation in Assessment of Liver Fibrosis. *Hepatitis Monthly* [online]. 2013, 13(12) [cit. 2019-03-31]. DOI: 10.5812/hepatmon.13787. ISSN 1735-143X.
Dostupné z: <http://hepatmon.com/en/articles/15335.html>
- [6] VOJUCKIJ, Sergej Sergejevič. *Kurs koloidní chemie*. Praha: SNTL, 1984.
- [7] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Ultrasonic study of hyaluronan interactions with Septonex—A pharmaceutical cationic surfactant. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, 204, 17-23 [cit. 2019-01-24]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.09.077. ISSN 01448617.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861718311457>
- [8] MOHAMED, Gehad et al. Septonex–tetraphenylborate screen-printed ion selective electrode for the potentiometric determination of Septonex in pharmaceutical preparations. *The Analyst* [online]. 2011, 136(7) [cit. 2019-01-24]. DOI:10.1039/c0an00662a. ISSN 0003-2654.
Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00662a>
- [9] Micellar shapes. In: *Surfactant Micelles Dr. Aws Alshamsan* [online]. [cit. 2019-05-18]. Dostupné z: <https://slideplayer.com/slide/7278996/>
- [10] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-422-X.
- [11] ČÍŽKOVÁ, Kateřina. *Základy histochemických metod*. 2018. ISBN 8024453169.
- [12] CHEBI:88213 - Oil red O [online]. [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:88213>
- [13] HOLMBERG, Krister, et al. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2002, s. 281-283 [cit. 2019-03-19]. ISBN 0471498831.
- [14] CALÓ, Enrica a Vitaliy V. KHUTORYANSKIY. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* [online]. 2015, 65, 252-267 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024. ISSN 00143057. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305714004091>

- [15] PATEL, Alpesh a Kibret MEQUANINT. Hydrogel Biomaterials. FAZEL, Reza, ed. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* [online]. InTech, 2011, 2011-08-01 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.5772/24856. ISBN 978-953-307-309-5.
Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydrogel-biomaterials>
- [16] BAHRAM, Morteza, Naimeh MOHSENI a Mehdi MOGHTADER. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. MAJEE, Sutapa Biswas, ed. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels* [online]. InTech, 2016, 2016-08-24 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.5772/64301. ISBN 978-953-51-2509-9.
Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/emerging-concepts-in-analysis-and-applications-of-hydrogels/an-introduction-to-hydrogels-and-some-recent-applications>
- [17] Liangmei Chen Fengping Tan, Jinfeng Wang, Feng Liu. Microemulsion: A novel transdermal delivery system to facilitate skin penetration of indomethacin. *Pharmazie* [online]. 2012, 4(67), 319–323 [cit. 2019-01-26]. Dostupné z: <https://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2012/00000067/00000004/art00010?crawler=true>
- [18] KALE, Santosh Nemichand a Sharada Laxman DEORE. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. *Systematic Reviews in Pharmacy* [online]. 2016, 8(1), 39-47 [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.5530/srp.2017.1.8. ISSN 09758453.
Dostupné z: <http://www.sysrevpharm.org/article/97>
- [19] MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*[online]. 2012, 8(6), 1719-1729 [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.1039/C2SM06903B. ISSN 1744-683X.
Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C2SM06903B>
- [20] KUMAR, Anoop, Vibha KUSHWAHA a Pankaj Kumar SHARMA. Pharmaceutical Microemulsion: Formulation, Characterization and Drug deliveries across skin. *Int. J. Drug Dev. & Res.* [online]. January – March 2014 (Vol. 6), 1-21 [cit. 2019-03-19]. ISSN 0975-9344.
- [21] SABALE, Vidya a Sejal VORA. Formulation and evaluation of microemulsion-based hydrogel for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* [online]. 2012, 2(3) [cit. 2019-01-25]. DOI: 10.4103/2230-973X.104397. ISSN 2230-973X. Dostupné z: <http://www.jpionline.org/text.asp?2012/2/3/140/104397>
- [22] INDELICATO, Serena, et al. Triacylglycerols in edible oils: Determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, 1515, 1-16 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.002. ISSN 00219673.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967317311445>
- [23] XENAKIS, Aristotelis, Vassiliki PAPADIMITRIOU a Theodore G. SOTIROUDIS. Colloidal structures in natural oils. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2010, 15(1-2), 55-60 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1016/j.cocis.2009.11.007 ISSN 13590294.
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029409001071>

- [24] LIN, Tzu-Kai, Lily ZHONG a Juan SANTIAGO. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(1) [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.3390/ijms19010070. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/70>
- [25] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [26] BOCIANOWSKI, Jan, Katarzyna MIKOŁAJCZYK a Iwona BARTKOWIAK-BRODA. Determination of fatty acid composition in seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.) by mutated alleles of the FAD3 desaturase genes. *Journal of Applied Genetics* [online]. 2012, 53(1), 27-30 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1007/s13353-011-0062-0. ISSN 1234-1983. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13353-011-0062-0>
- [27] CARSON, C. F., K. A. HAMMER a T. V. RILEY. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2006, 19(1), 50-62 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1128/CMR.19.1.50-62.2006. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>
- [28] SARKIC, Asja a Iris STAPPEN. Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics* [online]. 2018, 5(1) [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.3390/cosmetics5010011. ISSN 2079-9284. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-9284/5/1/11>
- [29] Chemical Composition of Tea Tree Essential Oil. In: *Science of Acne: The Definitive Acne Resource* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.scienceofacne.com/wp-content/uploads/2018/03/Chemical-Composition-of-Tea-Tree-Essential-Oil.jpg>
- [30] *100% přírodní esenciální olej—citron* [online]. [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <https://www.manufaktura.cz/100-prirodni-esencialni-olej-citron/p445041-1>
- [31] Chemical Composition of Lemon Essential Oil Mondello. In: *Science of Acne: The Definitive Acne Resource* [online]. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <http://www.scienceofacne.com/chemical-composition-of-lemon-essential-oil-mondello/>
- [32] PRAUSNITZ, Mark R a Robert LANGER. Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology* [online]. 2008, 26(11), 1261-1268 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1038/nbt.1504. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nbt.1504>
- [33] ASHNI Verma, et al. Topical Gels as Drug Delivery Systems: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 23(2), [online]. Nov – Dec 2013, (60), 374-382 [cit. 2019-03-24]. ISSN 0976 – 044X.
- [34] HRABÁLEK, Alexandr a spol. Akceleranty transderlmani penetrace. *Chem. Listy* 93, [online]. 1999, 107-119 [cit. 2019-03-24].

- [35] CHANDRA, Amrish, et al. Microemulsion-based hydrogel formulation for transdermal delivery of dexamethasone. *Asian Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, 3(1) [cit. 2019-01-26]. DOI: 10.4103/0973-8398.49172. ISSN 0973-8398. Dostupné z: <http://www.asiapharmaceutics.info/text.asp?2009/3/1/30/49172>
- [36] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. Spektrometrické analytické metody. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 802460776x.
- [37] SOMMER, Lumír. Základy analytické chemie II. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [38] KLOUDA P.: Moderní analytické metody, 2013, nakladatelství Pavel Klouda, ISBN: 80-86369-07-2
- [39] Schematische Darstellung eines Zweistrahl-Absorptionsspektrometers. [online]. [cit.2019-03-24]. Dostupné z: <http://www.unibielefeld.de/chemie/lehre/basispc/media/Spektrometer/>
- [40] DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ. Chemické listy [online]. 760 0, Zlín: Česká společnost chemická, 2013 [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf.
- [41] *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes* [online]. [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/MRK656.pdf>
- [42] Zetasizer Nano Series User Manual Zetasizer Nano Series User Manual [online]. 2003, 2004. Malvern Instruments [cit. 2019-03-24].
- [43] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1989, 93(4), 1478-1483 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1021/j100341a058. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100341a058>
- [44] VENEROVÁ, Tereza a Miloslav PEKAŘ. Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, 170, 176-181 [cit. 2019-05-17]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.087. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717304836>
- [45] HAVLÍKOVÁ, M. Uvolňování solubilizačních látek z fázově separovaných hydrogelů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. s 65. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.
- [46] ZHANG, Yong-Tai, Zhe LI, Kai ZHANG, Hong-Yu ZHANG, Ze-Hui HE, Qing XIA, Ji-Hui ZHAO a Nian-Ping FENG. Co-delivery of evodiamine and rutaecarpine in a microemulsion-based hyaluronic acid hydrogel for enhanced analgesic effects on mouse pain models. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, 528(1-2), 100-106 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.064. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317304878>
- [47] Ph.DZHANG, Ji a Bozena B. MICHNIAK-KOHN. Investigation of microemulsion and microemulsion gel formulations for dermal delivery of clotrimazole. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, 536(1), 345-352 [cit. 2019-03-24].

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.041. ISSN 03785173.

Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517317310918>

- [48] KACVINSKÁ, K.: Fázově separované hydrogely z mikroemulzí. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016.47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

HA	kyselina hyaluronová
Hya	hyaluronan
HMW	vysoká molekulová hmotnost
LMW	nízká molekulová hmotnost
GAGs	glykosaminoglykany
TTO	tea tree olej
DNA	deoxyribonukleová kyselina
UV-VIS	ultrafialovo-viditelný
CCD	charge-coupled device (druh detektoru)
v/o	voda v oleji
o/v	olej ve vodě

8.2 Seznam použitých symbolů

T_λ	transmitance
I	prošlý zářivý tok
I_0	dopadající zářivý tok
A	absorbance
c	koncentrace
ϵ	molární extinční koeficient
l	optická dráha
k_B	Boltzmannova konstanta
T	absolutní teplota
η	viskozita
D	difúzní koeficient
d	průměr

9 PŘÍLOHY

Tabulka 12: Hodnoty absorbancí kalibračních roztoků olejové červeně O v roztoku Septonexu.

c [$\mu\text{mol/l}$]	A ₁	A ₂	A ₃	A	odchylka
1,661	0,041	0,044	0,051	0,045	0,004
3,322	0,096	0,112	0,098	0,102	0,007
4,983	0,140	0,140	0,133	0,138	0,003
6,645	0,169	0,171	0,174	0,171	0,002
9,967	0,277	0,277	0,264	0,273	0,006
13,289	0,347	0,350	0,354	0,350	0,003
16,611	0,429	0,419	0,427	0,425	0,004
19,934	0,515	0,513	0,508	0,512	0,003
24,917	0,652	0,646	0,649	0,649	0,002
29,900	0,772	0,775	0,781	0,776	0,004

Tabulka 13: Hodnoty absorbancí pro kalibrační roztoky olejové červeně O ve slunečnicovém oleji.

c [$\mu\text{mol/l}$]	A ₁	A ₂	A ₃	A	odchylka
1,228	0,031	0,049	0,054	0,045	0,010
2,456	0,074	0,088	0,087	0,083	0,006
3,684	0,119	0,119	0,126	0,121	0,003
6,140	0,186	0,191	0,208	0,195	0,009
9,210	0,268	0,258	0,303	0,276	0,019
12,280	0,381	0,384	0,409	0,391	0,012
15,350	0,484	0,482	0,481	0,482	0,001
19,955	0,574	0,597	0,653	0,608	0,033
24,560	0,741	0,754	0,728	0,741	0,011
30,700	0,894	0,942	0,945	0,927	0,023

Tabulka 14: Naměřené hodnoty absorpance olejové červeně O v supernatantu.

Hydrogel	Absorbance [-]	
	LMW Hya	HMW Hya
Bez oleje	0,208 ± 0,007	0,238 ± 0,033
Řepkový	0,167 ± 0,005	0,174 ± 0,031
Slunečnicový	0,110 ± 0,009	0,067 ± 0,005
Tea tree	0,041 ± 0,001	0,051 ± 0,011
Citronový	0,022 ± 0,007	0,011 ± 0,006

Tabulka 15: Naměřené hodnoty absorpance olejové červeně O v oleji po 24, 48 a 72 hodinách.

Hydrogel	Absorbance [-]					
	LMW Hya			HMW Hya		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Bez oleje	0,345 ± 0,011	0,523 ± 0,004	0,610 ± 0,010	0,263 ± 0,053	0,411 ± 0,042	0,491 ± 0,042
Řepkový	0,293 ± 0,001	0,478 ± 0,024	0,663 ± 0,025	0,144 ± 0,055	0,268 ± 0,065	0,403 ± 0,057
Sluneční	0,262 ± 0,042	0,429 ± 0,062	0,550 ± 0,061	0,131 ± 0,024	0,225 ± 0,010	0,315 ± 0,022
Tea tree	0,399 ± 0,011	0,684 ± 0,043	0,826 ± 0,049	0,184 ± 0,075	0,266 ± 0,096	0,376 ± 0,124
Citronový	0,411 ± 0,035	0,701 ± 0,058	0,852 ± 0,048	0,160 ± 0,180	0,288 ± 0,065	0,392 ± 0,060

Tabulka 16: Naměřené hodnoty absorpance olejové červeně O v supernatantu.

LMW Hya	Absorbance [-]
Bez oleje	0,306 ± 0,018
Řepkový	0,301 ± 0,007
Slunečnicový	0,166 ± 0,009
Tea tree	0,027 ± 0,003
Citronový	0,060 ± 0,005

Tabulka 17: Naměřené hodnoty absorpance olejové červeně O v oleji po 24, 48 a 72 hodinách.

LMW Hya	Absorbance [-]		
	24 h	48 h	72 h
Bez oleje	0,347 ± 0,011	0,534 ± 0,010	0,617 ± 0,032
Řepkový	0,328 ± 0,002	0,464 ± 0,006	0,566 ± 0,005
Slunečnicový	0,307 ± 0,019	0,423 ± 0,018	0,603 ± 0,024
Tea tree	0,463 ± 0,016	0,754 ± 0,010	0,956 ± 0,021
Citronový	0,374 ± 0,010	0,619 ± 0,005	0,832 ± 0,007