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

STUDIUM VOLNÉ A VÁZANÉ VODY V HYDROGELOVÝCH SYSTÉMECH VHODNÝCH PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE
STUDY OF BULK AND HYDRATION WATER IN HYDROGEL SYSTEMS SUITABLE FOR MEDICAL APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE Marek Řihák
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2021

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1666/2020	Akademický rok:	2020/21
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie		
Student:	**Marek Řihák**		
Studijní program:	Chemie a chemické technologie		
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace		
Vedoucí práce:	**Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**		

Název bakalářské práce:

Studium volné a vázané vody v hydrogelových systémech vhodných pro medicínské aplikace

Zadání bakalářské práce:

Připravit hydrogelové systémy na bázi hyaluronanu a vybraného surfaktantu.
Vypracovat aktuální literární rešerši na téma nových možností studia volné a vázané vody v hydrogelových systémech.
Na základě vypracované literární rešerše navrhnout a realizovat metodu studia volné a vázané vody v připravených hydrogelech.
Dále navrhnout a optimalizovat kvantitativní stanovení hyaluronanu a vybraného tenzidu v supernatantu po gelaci vzorku.
Diskutovat získané experimentální výstupy, zhodnotit praktickou využitelnost navržené metody studia populace volné a vázané vody.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Marek Řihák student(ka)	Ing. Vojtěch Enev, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo připravit hydrogely na bázi hyaluronanu a Septonexu a navrhnout a optimalizovat kvantitativní stanovení hyaluronanu a Septonexu v supernatantu po gelaci vzorku. K měření byl použit hyaluronan o dvou rozdílných molekulových hmotnostech. K vyhodnocení experimentálních dat byly sestrojeny kalibrační křivky hyaluronanu a Septonexu. K charakterizaci vzorků a jejich vlastností byla provedena termogravimetrická analýza a infračervená spektrometrická analýza s Frourierovou transformací. Ze získaných výsledků byla diskutována využitelnost dané metody ke studiu subpopulací molekulární vody.

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on a preparation of hydrogel systems based on hyaluronan and Septonex and on a design and optimalization of quantitative analysis of hyaluronan and Septonex in a supernatant after gelation. This work compares hydrogels formed from hyaluronan of two different molecular weights. The calibration curves of hyaluronan and Septonex were used to evaluate the experimental data. The thermogravimetric analysis and Fourier-transform infrared spectroscopy were used for the characterization of properties of the samples. The utilisation of the mentioned techniques to study molecular water subpopulations was discussed according to the obtained results.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, Septonex, hydrogely, subpopulace molekulární vody

KEY WORDS

hyaluronan, Septonex, hydrogels, molecular water subpopulations

ŘIHÁK, Marek. *Studium volné a vázané vody v hydrogelových systémech vhodných pro medicínské aplikace* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-25]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131392. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato bakalářská práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

……
Marek Řihák

Rád bych poděkoval panu Ing. Vojtěchu Enevovi, PhD. nejen za vedení mé bakalářské práce, ale především za obětavost, trpělivost a neustávající optimismus, se kterým mě vítal na každé konzultaci. Dále bych chtěl poděkovat paní laborantce Leoně Kubíkové za přínosné informace a psychickou podporu mou i pana doktora.
V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia a dodali mi odvahu propojit svět chemický a divadelní.

OBSAH

1. ÚVOD 7
2. TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1 Gely 8
2.2 Gelace 8
2.2.1 Lineární polymery 8
2.2.2 Rozvětvené polymery 8
2.2.3 Bod gelace 9
2.3 Dělení gelů 9
2.3.1 Chemicky síťované gely 9
2.3.2 Fyzikálně síťované gely 9
2.4 Koloidní soustavy 10
2.4.1 Molekulové koloidy 10
2.4.2 Fázové koloidy 10
2.5 Vznik gelu 10
2.6 Rozdělení gelů podle vlastností ve formě xerogelu 11
2.7 Hydrogely 11
2.8 Surfaktanty 12
2.8.1 Vlastnosti 12
2.8.2 Tvorba micel 12
2.8.3 Typy surfaktantů 13
2.9 Polyelektrolyty 16
2.9.1 Kyselina hyaluronová 16
2.9.2 Dextran 17
2.10 Polyamfolyty 17
2.11 Využití hydrogelů v medicíně 18
2.11.1 Léčba kloubních onemocnění 18
2.11.2 Léčba popáleniny a dekubitů 18
2.11.3 Kosmetické zákroky 18
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÍ PROBLEMATIKY 20
3.1 Výzkumy předcházející tématu bakalářské práce 20
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 22
4.1 Použité chemikálie 22

4.2 Použité přístroje a zařízení ... 22
4.3 Příprava vzorků pro kalibraci ... 22
4.3.1 Hyaluronan ... 22
4.3.2 Septonex ... 22
4.4 Příprava vzorků hydrogelu ... 22
4.5 TG analýza ... 23
4.5.1 Teplotní stabilita nativního hyaluronanu ... 23
4.5.2 Izotermická TG analýza ... 24
4.6 FTIR spektrometrie ... 24
4.6.1 Steady-state infračervená spektrometrie ... 24
4.6.2 Časově rozlišená infračervená spektormetrie ... 26
5. VÝSLEDKY A DISKUZE ... 27
5.1 TG Analýza ... 27
5.1.1 Množství vlhkosti v práškovém hyaluronanu (HMW a LMW) ... 27
5.1.2 Izotermální sušení hydrogelů ... 27
5.2 Steady-state infračervená spektrometrie ... 29
5.3 Časově rozlišená infračervená spektrometrie ... 30
5.3.1 Charakterizace vzorků hydrogelu ... 30
5.3.2 Profily sušení ... 32
5.3.3 3D grafy vysychajících gelů ... 36
5.3.4 Dekonvoluce absorpčních pásů valenčních vibrací O–H skupin ... 36
6. ZÁVĚR ... 41
7. LITERATURA ... 42
8. SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK ... 45
8.1 Symboly ... 45
8.2 Zkratky ... 45
9. PŘÍLOHY ... 46

1. ÚVOD

Hyaluronan nachází široké využití jak ve farmacii, tak v medicíně. Jedná se o tělu vlastní polyelektrolyt s vysoce hydrofilním charakterem, čehož je možno v kombinaci s povrchově aktivní látkou využít k tvorbě hydrogelových systémů. Právě formací takovýchto systémů se zabývá tato bakalářská práce. Konkrétně byly předmětem výzkumu gely na bázi hyaluronanu o dvou molekulárních hmotnostech, kde coby zesíťovací činidlo byl použit Septonex. Tato povrchově aktivní látka je kvarterní amoniovou solí se čtrnáctiuhlíkatým lineárním nasyceným řetězcem, který ve vodném prostředí vykazuje hydrofobní charakter.

Hyaluronan se stal oblíbenou látkou nejen v lékařském a výzkumném prostředí, ale také v kosmetice. Dalo by se říci, že se jedná o jednu z mála komplexnějších sloučenin, jejíž název si i chemií nepolíbený člověk zapamatoval díky velkému množství reklam nejrůznějších kosmetických společností, které poukazují na přítomnost hyaluronanu ve svém přípravku. Významnou vlastností hyaluronanu je jeho netoxicita, biodegradabilita a biologická aktivita. Můžeme jej najít v kloubech, mezibuněčných prostorech nebo v očním sklivci. Nachází tak využití při léčbě kloubních onemocnění, při bezjizevnatém hojení ran, léčbě popálenin a dekubitů, při transportu léčiv a v neposlední řadě při estetických plastických zákrocích a v přípravcích vizuálně omlazujících pleť.

Přestože je hyaluronan i hydrogely na jeho bázi studován již po řadu let, závislostí mezi molekulární hmotností hyaluronanu, koncentrací použitého zesíťovacího činidla a vodou se zabývaly dle dostupných zdrojů pouze výzkumné týmy v řádu jednotek. Pro charakterizaci hydrogelů na bázi hyaluronanu s využitím Septonexu, coby zesíťovacího činidla, byla v této práci zvolena infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací doplněná o termogravimetrickou analýzu. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací je technika, která je schopna nám zprostředkovat informace o chemické struktuře látky, o změnách v této struktuře v průběhu času, a matematickou analýzou jsme z ní také schopni získat informace o subpopulacích molekulární vody.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Gely

Makromolekulární gely jsou polymerní sloučeniny tvořené trojrozměrnou sítí molekul, která v sobě nese velké množství rozpouštědla. Tato síť může vzniknout dvěma způsoby – prostřednictvím kovalentních vazeb mezi jednotlivými monomery, kdy hovoříme o tzv. kovalentně zesíťovaných gelech, tedy gelech permanentních, nebo skrze slabé vazebné interakce typu vodíkových můstků a Van der Waalsových sil, kdy mluvíme o tzv. fyzikálně zesíťovaných gelech, tedy gelech reverzibilních [1].
Celý systém se může vyskytovat ve dvou stavech – v případě, že váže rozpouštědlo, jedná se o lyogel; pokud rozpouštědlo neobsahuje, hovoříme o xerogelu. Vysušením lyogelu je možno získat xerogel, přičemž jeho objem se zmenší přibližně o objem odpařeného disperzního prostředí. Z xerogelu reverzně lyogel připravíme tzv. bobtnáním. Bobtnání je jev, při kterém dochází k pohlcování nízkomolekulárního rozpouštědla, resp. disperzního prostředí xerogelem. V případě fyzikálně zesíťovaných gelů je bobtnání v podstatě neomezené a dochází k rozpuštění gelu. U permanentních gelů tento jev není možný. Pokud bychom chtěli připravit roztok ireverzibilního gelu, museli bychom porušit kovalentní vazby mezi částmi polymerního řetězce a síťovacími činidly. Tyto vazby jsou však natolik silné, že přidáváním rozpouštědla k rozpuštění gelu nedochází [1].

2.2 Gelace

Gelace je základním procesem při tvorbě samotného gelu. Je to děj, při kterém dochází k vytvoření trojrozměrné struktury důsledkem vzniku vazebných interakcí mezi jednotlivými monomery polyelektrolytu. Ke gelaci může dojít síťováním lineárního či rozvětveného polymeru.

2.2.1 Lineární polymery

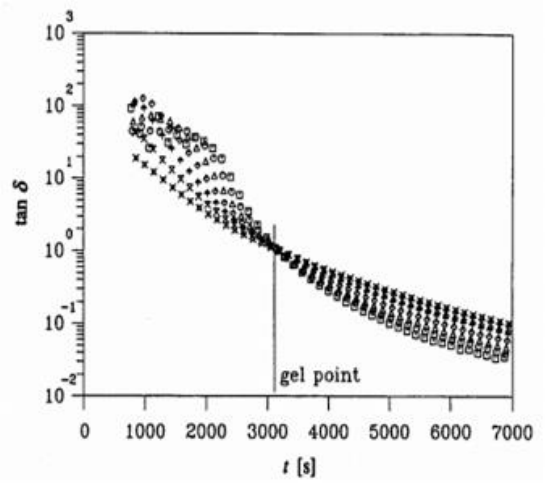
Aby mohlo dojít k zesíťovaní lineárních polymerů, musí tyto polymery nést ve své struktuře reaktivní místa, která v interakci se síťovacím činidlem vytvoří chemicky příčné vazby. V některých případech jsou síťovací činidla přímo součástí příčné vazby. Jindy pouze iniciují reaktivní místa dvou polymerních jednotek ke spojení. Zpočátku pouze se vznikem příčných vazeb vzrůstá molární hmotnost polymeru, ale netvoří se trojrozměrná síť. Její vznik je podmíněn dosažením jisté koncentrace příčných vazeb, kdy se soustava dostává do tzv. bodu gelace [1], [2].

2.2.2 Rozvětvené polymery

Kromě lineárních polymerů existují i polymery rozvětvené. Podmínkou pro vznik rozvětveného polymeru je přítomnost dvojfunkčního anebo vícefunkčního monomeru. Vícefunkční monomer poté přebírá roli síťovacího činidla, čímž vzniká požadovaná trojrozměrná struktura schopná v sobě poutat rozpouštědlo, které vytváří disperzní prostřední této trojrozměrné sítě [2].

2.2.3 Bod gelace

Z reologického hlediska je pro bod gelace charakteristická hodnota smykového napětí, kdy tan δ=1; δ je velikost úhlu fázového posunu. Bod gelace tedy nastává, je-li úhel fázového posunu roven 45 °. Tato hodnota nám říká, že gel je přesně na rozhraní mezi vlastnostmi ideálně elastické látky (δ=0°) a ideálně viskózní látky (δ=90°). V tomto bodě je reologické chování nezávislé na velikosti deformace. V následujícím grafu (Graf 1) vidíme závislost tangentu úhlu fázového posunu na čase během procesu gelace [3].



Graf 1 Gelace polybutadienu (M=18000 g/mol) jako závislost tan δ na čase [3].

2.3 Dělení gelů

Gel je tedy makromolekulární látka, ve které je polymerní síť rozptýlena v disperzním prostředí, kde disperzní prostředí a dispergované částice tvoří spojitou fázi. Propojení jednotlivých polymerních řetězců je zprostředkováno dvěma typy vazeb – pevnými kovalentními vazbami nebo slabými vazebnými interakcemi, jako jsou vodíkové můstky či Van der Waalsovy síly. Dle typu vazby rozlišujeme gely chemické (primární vazby – kovalentní) a gely fyzikální (sekundární vazby – slabé vazebné interakce) [4].

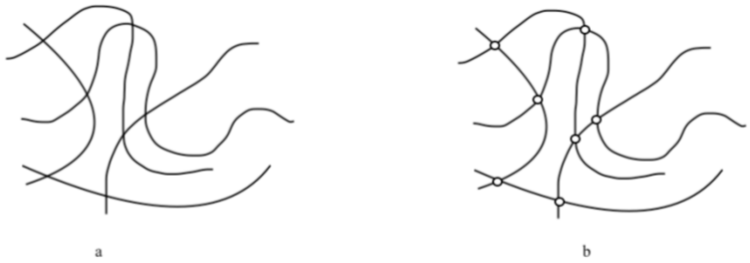
2.3.1 Chemicky síťované gely

Jak již bylo řečeno, vazby trojrozměrné struktury jsou pevné, kovalentní. Ke vzniku dochází nelineární kondenzační nebo adiční polymerizací, případně použitím síťovacího činidla. Vzhledem k tomu, že se jedná o pevné vazby, není možno tyto gely převést v roztoky. U xerogelů, které by vznikly vysušením, a tedy odstraněním disperzního prostředí, by bylo možno pozorovat jen omezené bobtnání. Nemožnost převodu v polymerní roztoky a omezené bobtnání je způsobeno faktem, že by muselo dojít k porušení kovalentních vazeb, což by mělo za následek rozpad celé struktury polymeru [4].

2.3.2 Fyzikálně síťované gely

U fyzikálně síťovaných gelů se projevují vazby vodíkovými můstky či slabé vazebné interakce van der Waalsova typu. Vznikají tzv. *uzly*, přičemž jedna makromolekula může obsahovat několik uzlů a sama být zapojena do většího množství uzlových oblastí. Slabé

vazby mohou zanikat velmi snadno – příkladem může být mechanické namáhání. Jev, při kterém dochází k narušení struktury působením vnější síly a k následné tvorbě nových vazeb, se nazývá tixotropie. Pokud bychom vynesli do grafu závislost tečného napětí na smykové rychlosti, získali bychom hysterezní křivky, přičemž platí – čím větší hystereze, tím je systém tixotropnější [1], [4].



Obr. 1 a) fyzikálně zesíťovaný gel b) chemicky zesíťovaný gel s uzlovými body

2.4 Koloidní soustavy

Gely se formují důsledkem narušení stabilizačního obalu koloidních soustav, tedy soustav, v nichž se velikosti částic pohybují od 1 nm po 1 μm. Rozlišujeme dva typy koloidů: molekulové a fázové.

2.4.1 Molekulové koloidy

Molekulové koloidy mají lyofilní charakter. Částice jsou obklopeny solvatačním obalem a celý systém je velmi podobný pravým roztokům. Fyzikálně chemické vlastnosti jsou tedy v celém objemu spojité. Významnou podskupinou molekulových koloidů jsou micelární koloidy. Micely jsou tvořeny z molekul, jejichž jedna část má lyofobní a druhá lyofilní charakter. Lyofilní část je tvořena polární skupinou, která se při použití polárního disperzního prostředí orientuje takovým způsobem, aby byla s tímto prostředím ve styku. Lyofobní část směřuje do pomyslného středu micel kulovitého tvaru a snaží se tak vyvarovat kontaktu s polárním rozpouštědlem [5].

2.4.2 Fázové koloidy

Opakem jsou koloidy fázové, tedy lyofobní. Zde dochází ke skokovým změnám vlastností na fázovém rozhraní. Lyofobní soustavy jsou obecně označovány jako soly. Podmínkou jejich vzniku je pouze nepatrná rozpustnost v disperzním prostředí. Částice mají určitý náboj a vzájemně se odpuzují. Přidáním elektrolytu je však možno docílit koagulace částic, jejíž rychlost je nejvyšší v izoelektrickém bodě [5].

2.5 Vznik gelu

Gely mohou vznikat jak z fázových koloidů, tak z molekulových. Při tvorbě gelu musí dojít k rozrušení solvatačního obalu, případně elektrické dvojvrstvy, což vede k tvorbě vazeb jak

mezi jednotlivými monomery, tak mezi monomery a molekulami rozpouštědla. Výsledný gel má trojrozměrnou strukturu. Aby byly tyto požadavky splněny, musí některý monomer obsahovat alespoň tři funkční skupiny vstupující do polymerizačních reakcí. Dále dochází k větvení řetězců a vzniku požadované makromolekulární sítě. Bod konverze, při němž dochází k zesíťovaní struktury, je již zmíněný bod gelace. Příprava gelu se tedy provádí dvěma způsoby: prvním je použití síťovacího činidla, které propojí jednotlivé řetězce, druhým je zmíněné vnášení trojvazných článků řetězce [4].
Podstatným jevem gelů je jejich bobtnání. K tomu dochází při kontaktu vysušeného gelu a rozpouštědla. Zesíťovaná struktura způsobí přijímání rozpouštědla mezi jednotlivé řetězce, a tedy nárůst objemu celé soustavy. Bobtnání je zapříčiněno snahou soustavy gel-rozpouštědlo snížit svou volnou energii směšování na minimum. Pro funkčnost soustavy gel-rozpouštědlo je podstatné, aby výsledná volná energie byla nižší než volná energie jednotlivých fází [4].

2.6 Rozdělení gelů podle vlastností ve formě xerogelu

Gely je možno rozdělit podle rozdílného chování ve vysušeném stavu, v případě hydrogelů nehydratovaném stavu. Reverzibilní gely při vysušení zmenšují svůj objem. Jakmile však přijdou znovu do kontaktu s vhodným disperzním prostředím, dochází k bobtnání, a tedy nárůstu objemu. Ireverzibilní gely mají ve formě xerogelu objem jen nepatrně menší ve srovnání s původním lyogelem a jsou porézní. Při kontaktu s disperzním prostředím absorbují jen nepatrné množství kapaliny.

2.7 Hydrogely

Hydrogel je speciální typ gelu, v němž je jako rozpouštědlo vázána voda. Obecně je – podobně jako gely samotné – definován jako makromolekulární trojrozměrná síť přírodního či syntetického původu obsahující ve své struktuře výrazné množství vody. Hydrogely jsou také děleny do dvou kategorií – chemické a fyzikální. Podle typu vazeb se toto dělení dále větví na slabé a silné, přičemž silný fyzikální hydrogel odpovídá hydrogelu chemickému. Ten je charakteristický přítomností kovalentních vazeb, k jejichž vzniku dochází pomocí cross-linkingových neboli síťovacích činidel [6], [7].
Molekuly hydrogelu obsahují jak polární, hydrofilní část, tak nepolární, hydrofobní část. Vzhledem k přítomnosti vody coby polárního rozpouštědla, dochází v první řadě k navázání vody na polární část – primární vazba vody. Do interakce s rozpouštědlem však přichází také nepolární část, formující strukturu tak, aby byl kontakt co nejmenší – tato interakce se nazývá sekundární vazba vody. Kromě takto vázané vody obsahuje hydrogel i vodu nevázanou, která vyplňuje prostor mezi jednotlivými řetězci a je důvodem elasticity gelu. Přijímáním nevázané vody hydrogel bobtná až do ustanovení rovnováhy. K její adsorpci dochází na základě osmotické síly způsobující rozšiřování dutin hydrogelu [8].

2.8 Surfaktanty

Surfaktanty jsou sloučeniny obsahující dvě rozdílné skupiny ve své struktuře – polární a nepolární. Příkladem mohou být krátké mastné kyseliny. Karboxylová skupina je polární, zato uhlíkatý řetězec nepolární. Souhrnně tyto sloučeniny označujeme jako amfifilní. Molekuly tohoto typu tvoří na rozhraní dvou prostředí rozdílné polarity monovrstvu, kde polární část směřuje do prostředí polárního a nepolární do prostředí nepolárního. Touto aktivitou snižují povrchové napětí a jedná se tedy o tzv. povrchově aktivní látky. Co se názvu týče, v České republice se nejčastěji tyto látky označují jako tenzidy. Mezinárodně se preferuje název surfaktanty (z angl. *surfactant*, od slova *surface*, tedy povrch) odkazujícího právě na zmíněnou povrchovou aktivitu. Zajímavostí je, že původně šlo jen o komerční název jedné konkrétní povrchově aktivní látky, ale postupem času se začal používat jakožto označení pro celou skupinu sloučenin. V praxi často dochází k chybnému užití slova detergenty coby homonyma k tenzidům a surfaktantům. Detergenty jsou však směsí surfaktantů s detergenčními účinky, tj. mající schopnost převádět nečistoty z pevného povrchu do roztoku [9], [10].

2.8.1 Vlastnosti

Vlastnost surfaktantů koncentrovat se na fázovém rozhraní je způsobena amfifilním charakterem molekul. Předpona slova amfifilní v řečtině znamená obojaký a filní mající rád či milující. V češtině tedy tento termín označuje látku, která má, volně přeloženo, ráda obojí. Oním obojím jsou z chemického pohledu myšleny jak látky polární (hydrofilní), tak látky nepolární (lipofilní či hydrofobní). Hydrofilní část má velkou afinitu k vodě. Hydrofobní část k nepolárním rozpouštědlům, přičemž tato část je nejčastěji tvořena uhlovodíkovými řetězci, které mohou být lineární nebo rozvětvené a mohou obsahovat aromatickou skupinu. Hydrofilní část je nejčastěji tvořena zbytky karboxylových nebo sulfonových kyselin, či kvarterními amoniovými kationty.

Nachází-li se molekuly surfaktantu v rozpouštědle v nízkých koncentracích – tedy je-li tento systém velmi zředěný, chová se celý systém jako pravý roztok. S rostoucí koncentrací povrchově aktivních látek se přibližujeme k tzv. *kritické micelární koncentraci*, což je hodnota, při které dochází ke shlukování molekul surfaktantů do útvarů koloidních velikostí. Struktura těchto útvarů je závislá na typu použitého rozpouštědla: je-li rozpouštědlo polární, je povrch micely taktéž polární a nepolární části jednotlivých molekul směřují do středu micely; je-li rozpouštědlo nepolární, je orientace jednotlivých molekul povrchově aktivní látky reverzní [5].

2.8.2 Tvorba micel

Obecně se při tvorbě micel pracuje se dvěma modely:

- První z nich říká, že tvorba micel je *vratnou reakcí*, tedy že z daného počtu monomerů *n* vzniká micela složená z těchto monomerů až do ustanovení rovnováhy. Zředěním takovéhoto roztoku obsahujícího micely se rovnováha posouvá k monomeru. Tato teorie však popisuje pouze jednoduché případy a první z mnoha kroků tvorby micel, protože jednotlivé micely spolu mohou dále agregovat ve větší celky.

- Druhá teorie považuje vznik micely za vznik tzv. pseudofáze, která obsahuje omezený počet molekul. Tuto teorii podporuje fakt, že fyzikálně-chemické vlastnosti se nad kritickou micelární koncentrací zlomově mění, což je typické právě pro vznik nové fáze [5].

2.8.3 Typy surfaktantů

Surfaktanty se nejčastěji dělí na základě iontového charakteru hydrofilní části molekuly. Dochází-li k disociaci funkční skupiny, hovoříme o surfaktantech ionických – dále dělených na kationické, anionické a amfoterní. Pokud ve vodném prostředí nevznikají ionty, mluvíme o neionických surfaktantech.

Neionické surfaktanty

Tento typ tenzidu ve vodném prostředí nedisociuje. Rozpustnost v polárním rozpouštědle (vodě) je zajištěna přítomností funkční skupiny s vysokou afinitou vůči vodě. Tato skupina nejčastěji obsahuje kyslík, na kterém se díky vysoké elektronegativitě hromadí záporný náboj. Následně dochází k tvorbě vodíkových můstků mezi vodíky molekul rozpouštědla a negativně nabitými kyslíky surfaktantu. Rozpustnost neionických surfaktatntů je nepřímo úměrně závislá na teplotě, tj. s vyšší teplotou klesá rozpustnost. Dostaneme-li se na tzv. teplotu zákalu, převládne hydrofobní charakter molekul a dojde k tvorbě samostatné fáze tvořené neionickými surfaktanty. Tento typ tenzidů není dobrou kyselinou (dle teorie Brønsted-Löwryho) a nemění tedy pH roztoku. Zároveň má tato skupina obecně vyšší hodnotu kritické micelární koncentrace, což může být výhodou, chceme-li připravit roztok o poměrně vysoké koncentraci surfaktantu bez nechtěné tvorby micel [11], [12].
Nejvýznamnějšími neionickými surfaktanty jsou sloučeniny na bázi glykosidů. Vzhledem k přítomnosti glykosidové vazby, nepodléhá tento typ surfaktantů hydrolytickému štěpení v bazickém prostředí a může být použit jako součást pracích prášků s vyšší hodnotou pH. Jeho další využití najdeme v kosmetice v podobě emulgátoru či čisticího prostředku.

Ionické surfaktanty

- Kationické surfaktanty

Název této skupiny povrchově aktivních látek vychází z vlastnosti surfaktantu kationtového typu ve vodném roztoku disociovat za vzniku kladně nabité molekuly. Oproti tomu pevné povrchy jsou ve většině případů nabity záporně čili kationické surfaktanty jsou k těmto povrchům přitahovány. V praxi se tohoto jevu využívá při likvidaci mikroorganismů (patogenů) na nejrůznějších površích. G. E. McDonnell popsal mechanismus interakce surfaktantu s mikroorganismem následovně:

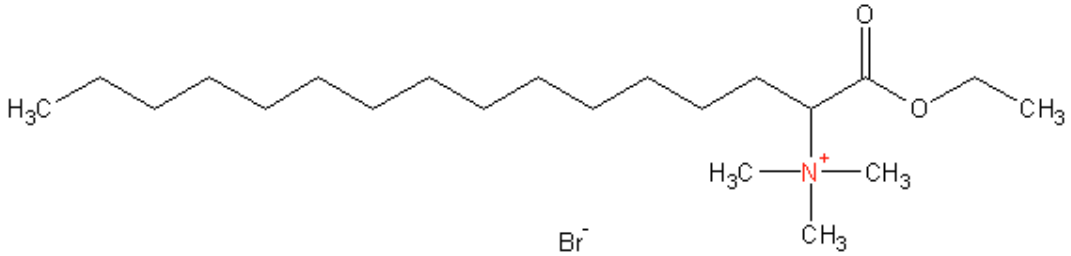
1) V prvním kroku dojde ke kontaktu mezi mikroorganismem a surfaktantem, k jeho přichycení na buňku a následnému narušení buněčné stěny.
2) Po průchodu buněčnou stěnou narušuje povrchově aktivní látka cytoplazmatickou membránu.

3) Buňku opouštějí menší struktury vzhledem k poškozené funkci cytoplazmatické membrány.
4) Surfaktant způsobuje degradaci proteinů a nukleových kyselin.
5) V posledním kroku dochází k lyzi buňky a její smrti [13].

Takto navržený mechanismus byl potvrzen také studií na univerzitě v Pekingu, kde se vědecký tým zabýval interakcí bakterie Escherichia Coli s kationickým i anionickým surfaktantem. Užitím měření fluorescence emitované navázanými surfaktanty na buněčnou stěnu bakterie bylo potvrzeno, že kationické surfaktanty vykazují mnohem vyšší odezvu oproti anionickým a jsou tedy účinnější při hubení bakterií [14].
Tímto způsobem působí surfaktanty jak na buňky prokaryotické (bakterie), tak buňky eukaryotické (houby) a nebuněčné organismy (viry).
Mezi nejužívanější detergenty kationtového typu patří kvartérní amoniové soli. Ty ve své struktuře obsahují jeden víceuhlíkatý (C 10–16) nepolární řetězec a tři řetězce kratší. Zápornou část představují halogenidy – bromidy, případně chloridy.

- *Septonex*

Chemický název této sloučeniny zní cerbethopendecinii bromidum a za normálních podmínek se jedná o bílou krystalickou látku s možnými odstíny dožluta. Jak již bylo zmíněno u kationických surfaktantů obecně, jedná se o látku působící proti bakteriím a virům. Z výzkumu vyplývá, že Septonex má výraznější účinek na grampozitivní bakterie (př. rod Staphylococcus), které ve své buněčné stěně na rozdíl od gramnegativních bakterií obsahují kyselinu tejchoovou. Účinnost septonexu je také vyšší v neutrálním až slabě zásaditém prostředí a v přítomnosti ethanolu. Ve vodném roztoku vytváří po zatřepání pěny [15].



Obr. 2 Vzorec carbethopendecinii bromidum

- Anionické surfaktanty

Při disociaci anionických surfaktantů ve vodném prostředí dochází ke vzniku povrchově aktivního aniontu a neaktivního kationtu. Vzhledem k přítomnosti záporného náboje na molekule jsou tyto sloučeniny vhodné k odstraňování kladně nabitých nečistot na površích. Jejich aktivita je nejvyšší v neutrálním až alkalickém prostředí, oproti tomu kyselé prostředí jejich aktivitu výrazně inhibuje. Podle funkční skupiny podléhající ionizaci anionické surfaktanty dělíme [9], [10]:

- *Soli karboxylových kyselin*

Jedná se o alkalické soli monokarboxylových kyselin, které ochotně disociují v zásaditém prostředí. Kyselé prostředí oproti tomu brání disociaci karboxylové skupiny. Typickým příkladem jsou mýdla – nejčastěji sodná nebo draselná sůl nasycené mastné kyseliny s lineárním řetězcem obsahujícím 8–20 uhlíků. Vzhledem k tomu, že vápenaté a hořečnaté ionty, které nacházíme ve tvrdé vodě, způsobují tvorbu nerozpustných povrchově neaktivních sraženin, přidávají se do mýdel další látky schopné vytvářet komplexy s těmito ionty [10].

- *Alkylsulfáty*

Jedná se o soli alkylesterů kyseliny sírové, které neztrácejí své účinky ani v kyselém prostředí. Pokud se ve struktuře nachází lineární uhlíkatý řetězec, jedná se o látky poměrně dobře biologicky rozložitelné. Jejich využití je široké – používají se v pracích prášcích, kosmetice, zubních pastách či šampónech [10].

- *Sulfonáty*

Z pohledu povrchově aktivních látek jde o průmyslově hojně využívané sloučeniny, jejichž výhoda oproti solím karboxylových kyselin je, že v přítomnosti vápenatých a hořečnatých iontů nevytvářejí sraženiny. V přírodě jsou však sulfonáty odbourávány pomalu a způsobují tak znečištění vodních toků [9].

Amfylitické surfaktanty

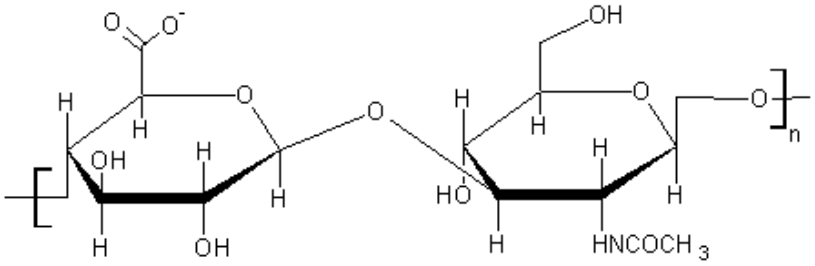
Amfylitické surfaktanty jsou sloučeniny obsahující ve své struktuře dvě funkční skupiny s hydrofilními vlastnostmi, které disociují s ohledem na pH prostředí, ve kterém se daná molekula nachází. Pokud je prostředí bazické, dochází k disociaci kyselé skupiny a druhá, bazická skupina, zůstává nedisociována. Molekula tak získává vlastnosti anionického surfaktantu. V kyselém prostředí obráceně dochází k disociaci zásadité skupiny a molekula vykazuje chování kationického tenzidu. Mezi kyselé skupiny se řadí například soli karboxylových kyselin, mezi zásadité amoniové soli. Amfylitciké surfaktanty se využívají v kosmetickém průmyslu díky šetrnosti k pokožce a sliznicím [10].

2.9 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty jsou makromolekulární sloučeniny skládající se z monomerních jednotek, které jsou ve vodném prostředí schopny disociovat za vzniku iontů – podle toho, jaký náboj nese disociovaný polymerní řetězec, rozlišujeme anioické respektive kationické polyelektrolyty. Makromolekuly nesou náboj dle pH roztoku, v němž se nacházejí. Reakcí polyelektorlytu obsahujícího kyselou skupinu s monomerní bází vznikají polyelektrické soli, které stejně jako běžné soli jsou vodiči elektrického proudu. Vzhledem k tomu, že se jedná o vedení proudu pomocí iontů, řadí se tyto sloučeniny mezi vodiče druhé třídy.
Vzhledem k elektrostatickým vlastnostem elektrolytu dochází k odpuzování, respektive přitahování daných skupin, což ovlivňuje makromolekulární konformaci celého polymeru. Čím více je polyelektrolyt disociován, tím je preferovanější lineární konformace.
Podstatnou vlastností elektrolytů je, že přidáním cross-linkingového činidla mohou tvořit gely. Ve vhodném (nejčastěji vodném) prostředí tak dochází k bobtnání. Kapacita bobtnání je ovlivněna přítomností iontových mraků tvořených malými ionty vzniklými disociací makromolekuly. Při přípravě hydrogelu z deionizované nebo destilované vody je xerogel schopen zvětšit svůj objem až 60krát [16].

2.9.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je lineární nevětvený glykosaminoglykan, složený z opakujících se jednotek – kyseliny D-glukoronové a N-acetyl-glukosaminu. Tyto jednotky jsou vázány střídajícími se β-1,4 a β-1,3 glykosidickými vazbami. Přestože se jedná o jednoduchou primární strukturu, kyselina hyaluronová vykazuje rozdílné biologické účinky v závislosti na velikosti molekuly a jejím prostorovém uspořádání. V přírodě se vyskytuje především ve formě své sodné nebo draselné soli, tj. hyaluronanu sodného nebo draselného. Tvoří jednu z hlavních složek mezibuněčné hmoty. Zajišťuje správnou funkci řídícího a komunikačního systému buněk. Jedná se o scaffold vzniklý buněčnou sekrecí do mezibuněčného prostoru. Díky schopnosti vázat velké množství vody slouží jako hydratační a lubrikační činidlo v kloubech – viskoelastické vlastnosti podporují tlumení nárazů. Dále se vyskytuje v očním sklivci, v kůži a v místech spojů rozličných tkání. Hyaluronan má významnou roli při hojení ran, kde zabraňuje tvorbě kolagenu a podporuje tedy bezjizevnaté hojení tzv. keloidní jizva. Z lékařského pohledu je výhodou hyaluronanu, že brání průchodu virů a bakterií přes pericelulární matrix v buňce. Z tohoto důvodu se při průmyslové výrobě léčiv využívajících hyaluronan jako scaffold přidávají do jeho struktur bakteriocidní látky typu Septonex. Množství aktivní látky, které je tato polymerní struktura schopna navázat, úzce souvisí s množstvím volné vody, která se ve struktuře vyskytuje [17].



Obr. 3 Vzorec aniontu kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je nejjednodušším glykosaminoglykanem. Na rozdíl od dalších zástupců této skupiny však není vázána na protein případně polypeptid za účelem tvorby proteoglykanu a zároveň není sulfátována. Liší se i místem svého vzniku – hyaluronan je syntetizován v buněčné membráně a je neprodleně extrahován do mimobuněčného prostoru. Ostatní zástupci glykosaminoglykanů jsou syntetizováni Golgiho aparátem a jejích cesta z buňky je mnohem komplikovanější. Hyaluronan zároveň nepodléhá post-polymeračním úpravám. Co se týče sekundární struktury, zaujímá tvar zkrácené levotočivé čtyřnásobné šroubovice. Tato struktura však může být ovlivněna hodnotou pH nebo přítomnými ionty, které se vážou na zbytek karboxylové skupiny. Terciální struktura je stabilizována pomocí vazeb vodíkovými můstky. Za energeticky nejvýhodnější se jeví konformace skládaného listu tzn. β-sheet, kdy dochází k tvorbě vodíkového můstku mezi karboxylovou skupinou a glukosaminovou skupinou. Ve vodném prostředí do interakce také vstupují molekuly vody [18], [19], [20].

Právě zmíněná kyselina hyaluronová je příkladem přírodního polyelektrolytu. Přidáním crosslinkingového činidla tak získáváme hydrogel. Crosslinkingovým činidlem bývají povrchově aktivní látky kationického typu. Karboxylová skupina kyseliny hyaluronové ve vodném prostředí nese záporný náboj a kationický surfaktant (v případě Septonexu kladně nabitá kvarterní amoniová skupina) reaguje s touto disociovanou skupinou za vzniku gelu. Pro tvorbu samotného gelu je podstatná koncentrace jednotlivých komponent. Pokud systém obsahuje příliš mnoho síťovacího činidla, surfaktantu, dochází místo k tvorbě trojrozměrné struktury ke shlukování molekul surfaktantu a tvorbě micel. Podstatnou roli hraje také molekulová hmotnost samotného hyaluronanu. Dle molární hmotnosti a koncentrace hyaluronanu a surfaktantu tedy xerogel přijme potřebné množství vody k tvorbě hydrogelu.

2.9.2 Dextran

Dextran je dalším příkladem sloučeniny schopné tvořit hydrogel. Jedná se o polymerní sacharid složený z glukózových monomerů. Ve struktuře nacházíme v převaze vazby α-1,6, lokálně α-1,3. V případě gelace se k dextranu přidává síťovací činidlo – molekula mající alespoň dvě funkční skupiny vhodné k propojení dextranových řetězců – a po překročení požadované koncentrace, tedy dosáhnutí bodu gelace, dochází k tvorbě gelu. Ten se využívá coby scaffold při transportu léčiv. Mezi další medicinská využití dextranu patří částečná náhrada krevní plazmy a využití jeho derivátu coby antikoagulačních činidel [21], [22].

2.10 Polyamfolyty

Kromě polyelektrolytů existuje i druhý typ nabitých polymerů a tím jsou polyamfolyty. Na rozdíl od polyelektrolytů, které nesou náboje pouze jednoho druhu, polyamfolyty obsahují jak kyselou, tak zásaditou skupinu čili podle pH prostředí nesou buď kladný nebo záporný náboj. Nachází-li se molekula v tzv. izoelektrickém stavu, dochází vlivem pH k vyrovnání nábojů a molekula se tak jeví jako neutrální. Při určitém pH může dojít k vyrovnání obou nábojů – tento stav se označuje jako izoelektrický a molekula se jeví jako neutrální. Mimo izoelektrický stav se polymerní řetězec snaží co nejvíce expandovat vlivem odpuzování disociovaných skupin. Jakmile však nastane stav izoelektrický, řetězec se balí a dochází k přitahování skupin opačného náboje [1].

2.11 Využití hydrogelů v medicíně

Hydrogely nacházejí v medicíně široké využití. Podstatnou roli hrají v tkáňovém inženýrství, kde slouží například jako scaffoldy při epitalizační fázi hojení rány, používají se jako nosiče aktivní látky při transportu léčiva do organismu či jako implantáty nejrůznějších tělních tkání. V posledních letech se v lékařství začalo hojně využívat tzv. inteligentních hydrogelů. Jedná se o gely, které reagují i na malé změny ve svém okolí. Může jít o změnu pH, přítomnost enzymů nebo například změnu teploty. Byly vyvinuty také gely citlivé na konkrétní sloučeniny – příkladem může být gel citlivý na glukózu, který by mohl nalézt uplatnění při léčbě diabetu [23].

2.11.1 Léčba kloubních onemocnění

Hyaluronan je součástí synoviální tekutiny v kloubech, pročeš nachází využití při léčbě osteoartrózy. Množství hyaluronanu v kloubech se snižuje biodegradací dlouhých molekul při zánětlivých onemocněních. Při potížích je tedy injekčně opakovaně zaváděn do kloubního pouzdra, kde způsobuje zvýšení viskozity kloubní tekutiny, a následné lubrikaci kloubu. Zároveň zpomaluje či úplně pozastavuje ztrátu elasticity chrupavky [24].

2.11.2 Léčba popáleniny a dekubitů

Hyaluronan hraje podstatnou roli při léčbě popálenin a dekubitů. Přítomnost hyaluronanu byla pozorována při zkoumání hojení ran jako takových. Tělo zvýší jeho produkci a následně ve spolupráci s fibrinem vytvoří vhodné podmínky pro zahojení rány. Přítomnost hyaluronanu v ráně navíc inhibuje tvorbu kolagenu a napomáhá tak k bezjizevnatému hojení. Co se týče užití syntetického hyaluronanu, ve formě hydrogelu poskytuje vhodné prostředí pro granulaci a následnou epitelizaci. Zároveň díky navázání pomocných látek vykazuje protizánětlivé účinky. Různá komerční léčiva využívají hyaluronanový hydrogel ve spojení s koloidním zlatem či stříbrem [25].
Výhodou hydrogelů je jejich transparentnost, tedy možno sledovat rány bez nutnosti stálého strhávání nově vytvořených vrstev buněk, ke kterému dochází odstraňováním gáz či jiného obvazového materiálu při léčbě poranění suchými metodami. Zároveň díky již popisované struktuře je možnost na ránu vnášet antiseptické látky a zabraňovat tak bakteriálnímu bujení. Hydrogely jsou schopny absorbovat, případně odvádět exsudát a mají schopnost snímat odumřelou část rány [26].

2.11.3 Kosmetické zákroky

Kromě již zmíněného použití hyaluronanu při léčbě kožních poranění, je hojně využíván také k drobným estetickým úpravám. V odvětví plastické chirurgie často nahrazuje botulotoxin, který, na rozdíl od hyaluronanu, není tělu vlastní látka, a proto výsledky chirurgických zákroků vpravujících tzv. botox do těla pacienta často nedopadají dle očekávání. Injekční vpichování hyaluronanu vede k vyplnění prostoru pod kožními ohyby a dodává pacientovi mladší vzhled. Během stárnutí totiž dochází ke snížení koncentrace hyaluronanu v pokožce a k jejímu následnému povadání a vysychání. Umělým zaváděním hyaluronanu do pokožky je tak možno jí alespoň částečně navrátit její pružnost a pevnost. Z tohoto důvodu se využívá na

vyhlazování drobných vrásek, zpevnění povadlé kůže kolem očí a na krku, nebo také ke zvětšení rtů [27].

K biorevitalizaci kůže může být také použit nezesíťovaný hyaluronan, který přispívá k regeneraci mezibuněčných částí podporujících obnovování pokožky. Z tohoto důvodu nachází své využití při zákrocích vyhlazení větších záhybů pokožky či hlubších vrásek [28].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÍ PROBLEMATIKY

Hydrogely nacházejí široké využití v medicíně, farmacii, kosmetickém a zemědělském průmyslu. Jednou z jejich nejvíce ceněných vlastností je schopnost vázat velké množství vody, která může být využívána k hydrataci rozličných tkání, anebo může být suchým hydrogelem zpětně vstřebávána, což může sloužit k odváděny nechtěných látek z místa potřeby. Široké uplatnění nacházejí také makroporózní gely, které kromě akumulace kapaliny slouží také jako transportní materiály, což kromě využití v tkáňovém inženýrství a při dopravě léků může být užitečné také například při selektivní filtraci [29].

Hyaluronan jako takový byl poprvé popsán ve 30. letech 20. století. O 30 let později byl připraven in vitro a získal si zájem vědců po celém světě. Jedná se o nejjednodušší glykosaminoglykan, který není kovalentně vázaný na protein. Mezi jeho nejpodstatnější vlastnosti patří vysoká schopnost vázat vodu [30].

Interakce polysacharidového řetězce s vodou má veliký vliv na jeho vlastnosti. Podle stupně hydratace hydrogelu se mění zastoupení subpopulací molekulární vody v systému. Jednotlivé zdroje nazývají tyto subpopulace různými odbornými termíny, obecně však hovoříme o třech subpopulacích, které se liší svým vzájemným uspořádáním a počtem vodíkových vazeb mezi jednotlivými molekulami. Vlastnosti hydrogelu jsou zároveň ovlivněny množstvím síťovacího činidla použitého k formaci gelu [30].

Bylo provedeno mnoho výzkumů zabývajících se interakcemi vody a polysacharidu. Kromě hyaluronanu bývá také zkoumán například dextran, chitosan a fytoglykogen. Na hyaluronan a poslední dva zmíněné polysacharidy se zaměřil tým Michaela Grossuttiho and Johna R. Dutchera, který zkoumal závislost mezi strukturou polysacharidu a subpopulacemi vody. V rámci výzkumu bylo zjištěno, že formace, které voda zaujímá, se mění v závislosti na relativní vlhkosti, v níž se polysacharid nachází. Zároveň bylo potvrzeno, že v interakci s větveným fytoglykogenem dochází k formaci pevnějších vazeb vodíkovými můstky mezi molekulami vody a k tvorbě přesněji definované síťové struktury. Oproti tomu lineární řetězce hyaluronanu a chitosanu nevedou svými interakcemi s vodou k tvorbě tak pevného zesíťování molekul vody [31].

3.1 Výzkumy předcházející tématu bakalářské práce

Interakce hyaluronanu a Septonexu byly zkoumány prof. Pekařem a kol.. Výzkum vycházel z prací Thalberga a Lindmana (1989) a Thalberga, Lindmana a Karlstroema (1991), kteří popsali interakce kationických surfaktantů s hyaluronanem. V laboratořích ústavu Fyzikální chemie VUT byly zkoumány reologické vlastnosti gelů vzniklých interakcí hyaluronanu a Septonexu a hyaluronanu a CTAB (cetyltrimethylammonium bromidu). Měření vedlo k výsledku, že viskoelastické vlastnosti gelovitých systémů jsou determinovány koncentrací jak hyaluronanu, tak použitých kationických surfaktantů a jejich strukturou [32].

Tato práce dále navazuje na výzkum zabývající se subpopulacemi vody v hydrogelu na bázi dextranu, k jehož zesíťování byl použit dodecylsulfát sodný (SDS) a tetradecylsulfát sodný (STS). Dextran, stejně jako hyaluronan, je biokompatibilní látka. Své využití nachází v medicíně, například jako krevní náhrada při masivním krvácení. Stejně jako hyaluronan, tento polysacharid je schopen vázat velké množství vody začleněné do struktury gelu ve formě různých subpopulací. Při výzkumu byla společně s FTIR spektrometrií, která byla

vyhodnocena jako vhodná metoda ku zkoumání subpopulací molekulární vody, použita také termogravimetrická analýza doplňující informace o dehydrataci hydrogelu na bázi dextranu a jeho schopnosti vázat vodu [33].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- vysokomolekulární hyaluronan sodný (1500–1750 kDa) – HMW;
- nízkomolekulární hyaluronan sodný (250–450 kDa) – LMW;
- Septonex (karbethopendeciniumbromid);
- deionizovaná voda (Mili-Q).

4.2 Použité přístroje a zařízení

- termogravimetrická analýza (TGA Q5000 TA instruments);
- FTIR spektrometrie (Nicolet *i*S50, Thermo Fisher Scientific, Inc).

4.3 Příprava vzorků pro kalibraci

4.3.1 Hyaluronan

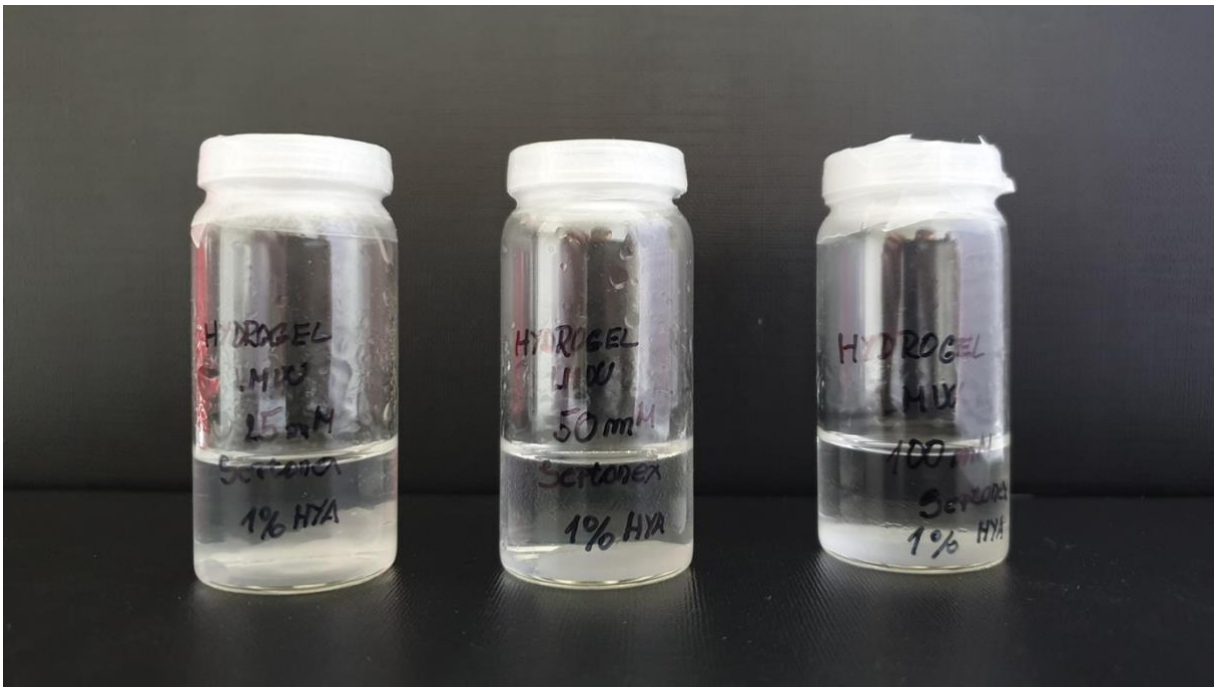
V prvním kroku byl do 50 ml baňky připraven zásobní roztok nízkomolekulárního hyaluronanu (250–450 kDa) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 2 hm. %. Vzhledem k vysoké hydroskopičnosti hyaluronanu bylo použitý hyaluronan potřeba nejprve změřit pomocí TG a zjistit jeho vlhkost. Po zjištění vlhkosti bylo přepočítáno množství navážky na přípravu zásobního roztoku. Pro sestavení kalibrační křivky byl tento roztok následně ředěn v 5 ml odměrných baňkách tak, aby výsledná kalibrační křivka byla v rozmezí 0,01–1 hm. %.
Příprava zásobního roztoku vysokomolekulárního (1500–1750 kDa) hyaluronanu probíhala obdobným způsobem, avšak měřená škála musela být upravena kvůli vysoké viskozitě koncentrovanějších roztoků, a tedy špatné možnosti nanášení vzorku na ATR krystal FTIR spektrometru. Rozmezí koncentrací pro kalibrační křivku tak bylo 0,01–0,2 hm. %.

4.3.2 Septonex

Zásobní roztok Septonexu byl připraven navážením potřebného množství práškovitého Septonexu tak, aby výsledná koncentrace roztoku v 50 ml baňce byla 200 mM. Následně byla ve třech sériích v 5 ml odměrných baňkách provedena příprava roztoků o koncentracích v rozsahu 1 mM – 30 mM.

4.4 Příprava vzorků hydrogelu

Pro výzkum byly připraveny vzorky využitím hyaluronanu sodného o dvou rozlišných molekulových hmotnostech. Konkrétně se jednalo o vysokomolekulární hyaluronan (1500–1750 kDa) a nízkomolekulární hyaluronan (250–450 kDa). Jako síťovací činidlo byl použit kationický tenzid Septonex.
Ze zásobního roztoku hyaluronanu (HYA 2 hm. %) byly do vialek odebrány 2 ml a přidány 2 ml roztoku Septonexu. Roztoky byly ponechány 10 minut k vortexování. Následně byl systém ponechán ke gelaci po dobu 24 hodin (Obr. 4).
Použitý roztok Septonexu byl připraven ředěním 100 ml zásobního roztoku Septonexu o koncentraci 200 mM v poměru 1:1 za vzniku roztoků o koncentracích 100, 50 a 25 mM.



Obr. 4 Vzorky 1% LMW hyaluronanu s koncentrací Septonexu: a) 25 mM, b) 50 mM, c) 100 mM

4.5 TG analýza

Termogravimetrická analýza je užitečná analytická metoda využívaná při sušení vzorků obsahujících velké množství vody. Podstatou je zaznamenávání úbytku hmotnosti vzorku v důsledku jeho dehydratace, resp. sušení. Obvykle se jedná o první krok vícenásobné analýzy a jde tedy o jisté doplnění například FTIR spektroskopie.
Termogravimetrickou analýzu je možno realizovat dvěma způsoby – vzorek (hydrogel) může být zahříván postupně od dané teploty t_0 po požadovanou teplotu t_{max} s předem definovaným krokem za jednotku času. Druhým způsobem, který byl využit v této práci, je vystavení vzorku dané konstantní teplotě a sledování úbytku hmotnosti v čase. Nicméně je zapotřebí říci, že ať už je měření realizováno teplotní rampou (zahřívání vzorku s konstantní rychlostí ohřevu např. 5 °C·min^{-1}) anebo pomocí tzv. izotermální analýzy je teplota tohoto ohřevu vždy pod teplotou degradace analyzovaného vzorku.

4.5.1 Teplotní stabilita nativního hyaluronanu

Vzorky hyaluronanu byly podrobeny TG analýze za účelem zjištění jejich teplotní stability, která by mohla ovlivnit následující měření. Práškový vzorek tak byl nanesen na platinovou pánvičku, vložen do pece analyzátoru a zahříván v dusíkové inertní atmosféře na finální teplotu 200 °C s krokem zahřívání 5 °C·min^{-1}.

4.5.2 Izotermická TG analýza

Vzorky hydrogelu byly podrobeny termogravimetrické analýze na přístroji Q5000 TA za účelem zjištění vlhkosti a rychlosti sušení při konstantní teplotě. Analýza byla provedena zahříváním vzorků nanesených na platinovou pánvičku v peci analyzátoru na teplotu 40 °C a následným postupným izotermickým vysoušením hydrogelu.
Zahřátí na teplotu 40 °C probíhalo z laboratorní teploty s krokem 0,3 $°C \cdot min^{-1}$. Následně došlo k izotermickému vysoušení gelu po dobu 360 min. Poté byla teplota znovu zvyšována s krokem 5,0 $°C \cdot min^{-1}$ na finální teplotu 120 °C, čímž došlo k odpaření veškerého residuálního množství vody.

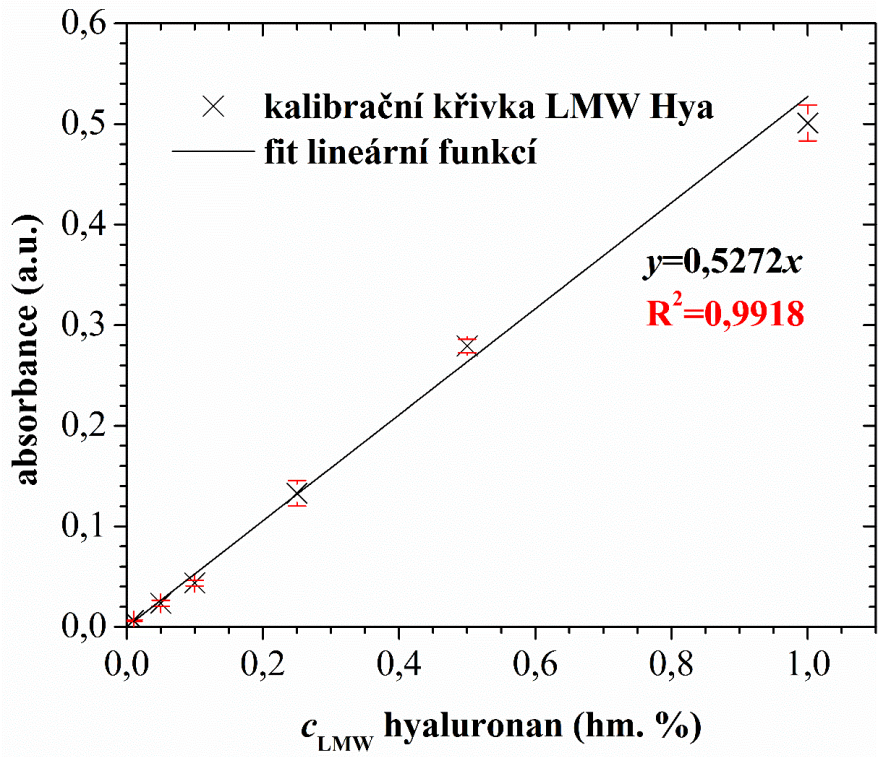
4.6 FTIR spektrometrie

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací je spektrometrická metoda využívající vibrací molekul v důsledku absorpce elektromagnetického záření, které se svojí vlnovou délkou pohybuje v oblasti infračerveného záření. Tato metoda je vhodná k analýze struktury vzorků a ke zjištění jejich koncentrace. Výstupem analýzy je spektrum, ze kterého jsme schopni určit, jaké funkční skupiny se ve vzorku nacházejí, a tedy o jakou látku se jedná.

4.6.1 Steady-state infračervená spektrometrie

Kalibrační křivka hyaluronanu

Proměření připravených roztoků o koncentracích 0,01–1 hm. % pro nízkomolekulární hyaluronan a 0,01–0,2 hm. % pro vysokomolekulární hyaluronan probíhalo nanesením kapky o objemu 0,75 μl na ATR krystal FTIR spektrometru (tento objem byl pro analýzu vyhodnocen jako nejvhodnější) a bylo provedeno ve třech sériích pro každý vzorek. Jako hodnotící kritérium pro spuštění měření bylo zvoleno neměnící se absorbance v oblastech vlnočtů 3700–3000 cm^{-1} a 1680–1620 cm^{-1}, které odpovídají valenčním vibracím O–H vazeb. Tímto způsobem bylo ověřeno odpaření rozpouštědla ze vzorků hyaluronanu, v důsledku čehož se měřený vzorek polysacharidu nacházel v rovnovážném stavu hydratace.
K měření byl použit spektrometr Nicolet *i*S50. Veškerá měření probíhala za pokojové teploty. Analýza na ATR diamantovém krystalu probíhala v rozmezí vlnočtu 4000–400 cm^{-1} při rozlišení 4 cm^{-1} a celkovém počtu skenů nastaveném na hodnotě 64. Nejprve bylo změřeno spektrum čistého suchého diamantové krystalu, které bylo použito jako pozadí (background) pro následující měření.
Pro sestrojení kalibrační křivky (Graf 2) byl použit ostrý a intenzivní absorpční pás (1040 cm^{-1}), který není ovlivněn přítomností ostatních pásů a je tak pro hyaluronan charakteristický.



Graf 2 Kalibrační křivka LMW hyaluronanu

Kalibrační křivka Septonexu

Po proměření všech vzorků v rozmezí koncentrací 1 mM – 30 mM nanášených v množství 0,75 µl ve třech opakováních na FTIR spektrometru byla vyhotovena kalibrační křivka užitím programu OriginPro 8.0. K měření došlo po odpaření rozpouštědla. Pro kalibraci byl použit ostrý a intenzivní absorpční pás (1735 cm^{-1}), který není ovlivněn přítomností ostatních pásů a je tak charakteristický právě pro Septonex.

Analýza supernatantu

Po gelaci byl supernatant pomocí FTIR spektrometru analyzován za účelem zjištění koncentrace Septonexu a hyaluronanu, které nebyly využity k formaci gelu. Měření probíhalo při stejném nastavení přístroje, jako tomu bylo v průběhu měření vzorků pro sestrojení kalibrační křivky, tj. v rozmezí vlnočtu 4000–400 cm^{-1} při rozlišení 4 cm^{-1} a celkovém počtu skenů nastaveném na hodnotě 64. Na ATR diamantový krystal bylo pomocí mikropipety nanášeno 0,75 µl vzorku. Analýza byla provedena vždy ve třech opakováních.

4.6.2 Časově rozlišená infračervená spektormetrie

Následně byl přístroj Nicolet *i*S50 nastaven do režimu Series. Pro sériové měření ke sledování zastoupení vody postupně vysychajícího gelu (Obr. 5), byl přístroj nastaven na snímání 8 skenů při rozlišení 4 cm^{-1} po dobu 600 minut a profilu Gram-Schmidt. Výsledná data byla ukládána do programu Omnic 9.2.106, Thermo Scientific.

Obr. 5 Hydrogel nanesený na ATR diamantový krystal pro series analýzu v hydratované formě.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 TG Analýza

5.1.1 Množství vlhkosti v práškovém hyaluronanu (HMW a LMW)

Tab. 1 Vlhkost nativního hyaluronanu

Molekulární hmotnost hyaluronanu	Vlhkost (% hm.)
LMW 250–450 kDa	8,31
HMW 1500–1750 kDa	10,23

TG analýzou bylo zjištěno, že jak nízkomolekulární, tak vysokomolekulární nativní hyaluronan v sobě vázaly jisté množství vody. Aby nedošlo ke zkreslení výsledků, byla tato vlhkost zohledněna při výpočtu potřebného množství hyaluronanu při přípravě zásobních roztoků.

5.1.2 Izotermální sušení hydrogelů

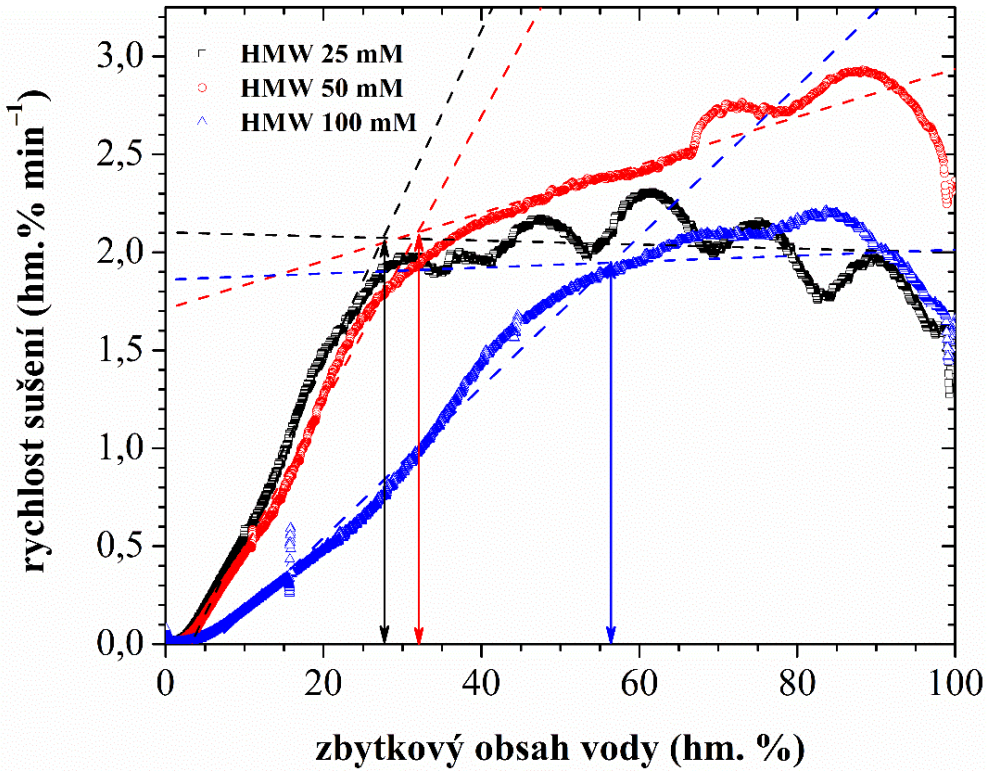
Z výsledků měření je zřetelné, že největší množství vody v sobě váže hydrogel vzniklý interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu se Septonexem o koncentraci 100 mM. Při porovnání vysokomolekulárního a nízkomolekulárního hydrogelu je však zřejmé, že nízkomolekulární hydrogel má větší schopnost poutat v sobě vodu.

Tab. 2 Zbytkový obsah vody v závislosti na koncentraci Septonexu a molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu.

	koncentace	zbytkový obsah vody
HMW	25 mM	27 hm. %
	50 mM	32 hm. %
	100 mM	56 hm. %
LMW	25 mM	37 hm. %
	50 mM	54 hm. %
	100 mM	42 hm. %

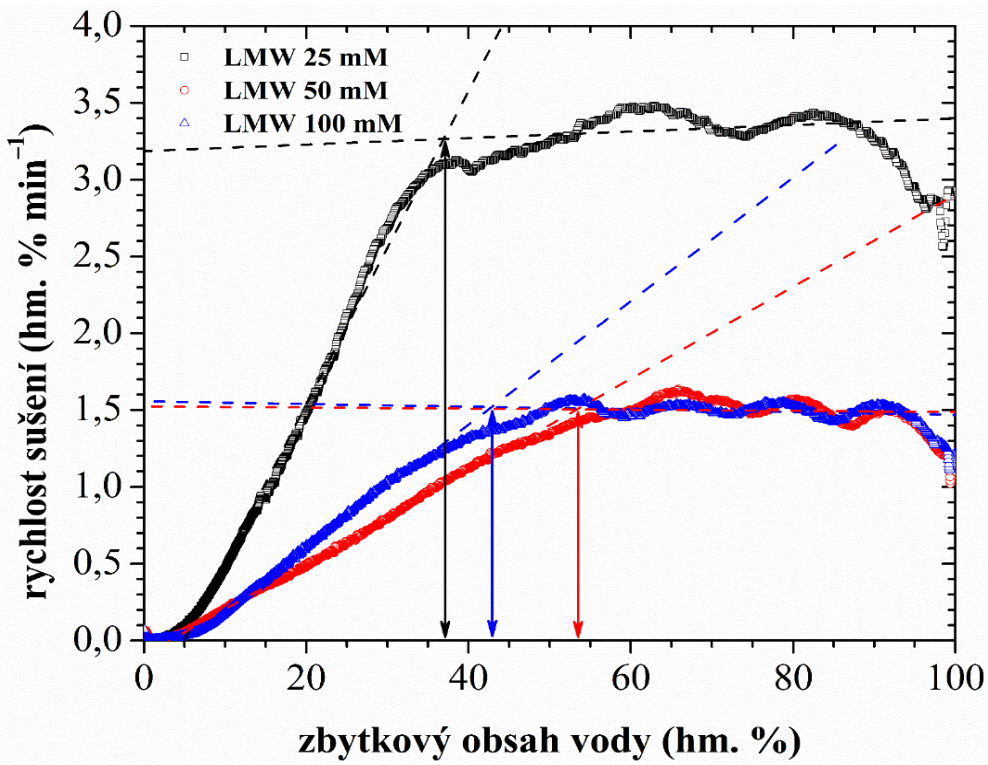
Co se týče procentuálního zastoupení zbytkového obsahu vody, nelze si nepovšimnout výrazného rozdílu mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou u nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu. Zatímco nejnižší a nejvyšší hodnota vysokomolekulárního hyaluronanu se liší o více než 25 % zbytkového obsahu vody v sušině, u nízkomolekulárního hyaluronanu je tento rozdíl pouhých 17 %.
V souvislosti se získanými daty z analýzy supernatantu by se tedy dalo předpokládat, že LMW hyaluronan díky vysoké schopnosti vstupovat do interakcí s crosslinkingovým činidlem (Septonexem) je zároveň díky této vlastnosti schopen vázat ve své struktuře výrazné množství vody.

Z Grafů 3 a 4 také můžeme vyčíst, že rychlost vysychání je při konstantní teplotě 40 °C v případě LMW hyaluronanu s 50 mM Septonexem téměř shodná s rychlostí vysychání 100 mM LMW hyaluronanu a je konstantní – pohybující se okolo hodnoty 1,5 hm. % · min^{-1}. Oproti tomu analogický HMW 50 mM hydrogel vysychá rychleji a tato rychlost není konstantní, nýbrž se lineárně snižuje. Obecně také platí, že rychlost vysychání gelů na bázi LMW hyaluronanu je nižší než rychlost u HMW hyaluronanu. Tento jev může být projevem pevnějších vazebných interakcí vodíkovými můstky zasíťované vody v hydrogelu připraveném z LMW hyaluronanu.



Graf 3 Závislost rychlosti sušení HMW hydrogelu na zbytkovém obsahu vody.

V Graf 3 a Graf 4 je také vhodno okomentovat strmost úseček, jimiž byla naměřená data proložena. V případě vysokomolekulárního hyaluronanu je zřetelné, že hydrogel zesíťvaný 25 mM Septonexem vykazuje nejnižší rezistenci k odpařování vody ze své struktury. Dalo by se tedy předpokládat, že vodíkovými můstky zesíťovaná struktura je zde reprezentována nejvíce náchylnými subpopulacemi vody k dehydrataci, resp. odpařování. Ze sklonu přímek v Graf 4 je rozdílná rychlost dehydratace ještě markantnější. U nízkomolekulárního hyaluronanu tzn. hydrogel připravený z 25 mM Septonexu uvolňuje, ve srovnání se systémy s vyšší koncentrací povrchově aktivní látky, vodu výrazně ochotněji. Nízkomolekulární hyaluronan zreagovaný s 50 mM Septonexem drží ve své struktuře vodu nejdéle, lze tedy konstatovat, že vzhledem k vysoké hustotě příčných vazeb vzniklých interakcí hyaluronanu a Septonexu, je schopen tento systém ve své struktuře poutat velké množství vody vzájemně propojené poměrně pevnou sítí vodíkových vazeb.



Graf 4 Závislost rychlosti sušení HMW hydrogelu na zbytkovém obsahu vody.

5.2 Steady-state infračervená spektrometrie

Supernatanty po formaci gelů byly analyzovány pomocí ATR-FTIR spektrometru. Využitím kalibračních křivek pro hyaluronan a Septonex byla zjištěna koncentrace jednotlivých látek v supernatantu a ze znalosti její původní koncentrace bylo následným výpočtem zjištěno množství jednotlivých komponent použité k formaci gelu.

Tab. 3 Procentuální množství hyaluronanu, respektive Septonexu, využité ke gelaci.

$c_{Septonex}$	HMW (%)	Septonex (%)
25 mM	72,5 ± 4	92,7 ± 2
50 mM	99,4 ± 0,0	97,9 ± 0,2
100 mM	nd	80,4 ± 0,8

$c_{Septonex}$	LMW (%)	Septonex (%)
25 mM	75,7 ± 0,5	93,7 ± 0,6
50 mM	99,4 ± 0,1	98,3 ± 0,2
100 mM	nd	89,4 ± 3

Pomocí FTIR spektrometru byla získána hodnota absorbance při vlnočtu 1040 cm^{-1} pro hyaluronan a při 1735 cm^{-1} pro Septonex. Právě tyto vlnočty odpovídají charakteristickým absorpčním pásům, které byly použity k sestrojení kalibračních křivek jednotlivých sloučenin. Koncentrace byla zjištěna z rovnice kalibrační křivky hyaluronanu a Septonexu. Výsledná hodnota byla odečtena od počáteční koncentrace a zpětným přepočtem byla zjištěna hmotnost hyaluronanu, resp. Septonexu, která byla vztažena na původní navážku.

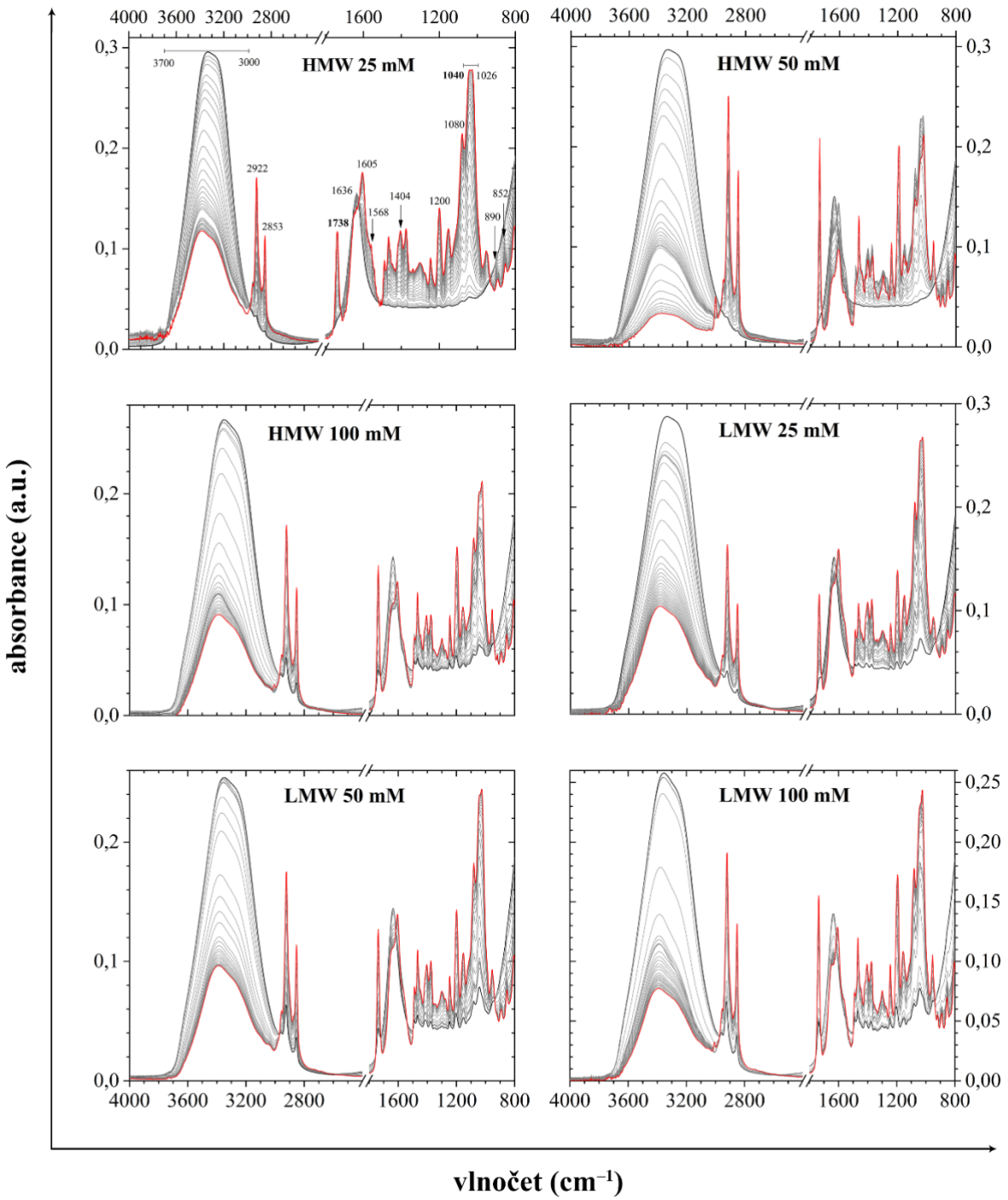
V Tab. 3 je zřetelné, že pro obě molekulární hmotnosti hyaluronanu je nejvýhodnější koncentrace Septonexu 50 mM. Přesto, že při koncentraci Septonexu 100 mM dochází k využití prakticky veškerého hyaluronanu k tvorbě gelu, poměrně velká část Septonexu

zůstává v supernatantu. Vzhledem k farmaceutické aktivitě této sloučeniny je vhodné, aby její koncentrace v odpadní kapalině byla co nejnižší.
Co se molekulární hmotnosti hyaluronanu týče, nízkomolekulární hyaluronan obecně pojímá během gelace větší množství Septonexu coby zesíťovácího činidla a jeho použití je tak výhodnější.
Jako nejméně vhodné se jeví použití vysokomolekulárního hyaluronanu s 25 mM Septonexem. Na tvorbě gelu se v tomto případě podílí výrazně menší množství navážky hyaluronanu a využití Septonexu je ve srovnání s vyššími koncentracemi také méně efektivní. Tento jev platí obdobně u nízkomolekulárního hyaluronanu.

5.3 Časově rozlišená infračervená spektrometrie

5.3.1 Charakterizace vzorků hydrogelu

Výsledné spektrum (Obr. 6) bylo primárně charakterizováno pásy typickými pro alkoholy, alifatické řetězce a polysacharidové skupiny, jako jsou β-1,4 a β-1,3 glykosidické vazby. V infračerveném spektru vzorku hydrogelu si nelze nepovšimnout širokého a intenzivního absorpčního pásu lokalizovaného v oblasti 3700–3000 cm^{-1}, který je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci N–H a O–H vazeb v amidových, alkoholových a polysacharidových funkčních skupinách. Nicméně je na tomto místě nutné podotknout, že výše zmíněný absorpční pás je výsledkem inter- a intramolekulárních interakcí rozličných subpopulací molekul vody. V oblasti nižších vlnočtů lze spatřit poměrně intenzivní absorpční pás při 1636 cm^{-1}, který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H anebo O–H···O (vodíkových můstků) vazeb v molekulách H_2O.
Ostrý a intenzivní absorpční pás lokalizovaný při 1605 cm^{-1} je výhradně spjat s valenční symetrickou vibrací C=O vazeb v karboxylátovém anionu. Avšak musíme mít na paměti, že v této oblasti nastává specifická absorpce C=O vazeb v sekundárních amidech (–NH–CO–). Přítomnost karboxylátového anionu je potvrzena absorpčním pásem při 1404 cm^{-1}, který odpovídá deformační symetrické vibraci COO^- skupin. V infračervených spektrech bylo přítomno méně výrazné raménko při 1568 cm^{-1}, které je zpravidla připisováno valenční symetrické vibraci C–N a deformační vibraci N–H vazeb v sekundárních amidech. Absorpční pás lokalizovaný při 1080 cm^{-1} odpovídá valenční asymetrické vibraci C–O–C vazeb v glukopyranozovém cyklu anebo β-1,3 glykosidické vazbě. Nicméně je zapotřebí říci, že tento absorpční pás lze přiřadit valenční symetrické vibraci C–O vazeb v terciálních alkoholech. Intenzivní a ostrý absorpční pás lokalizovaný v oblasti vlnočtů 1040–1026 cm^{-1} odpovídá valenční symetrické vibraci C–O vazeb v primárních alkoholech. Etherové funkční skupiny byly potvrzeny přítomností dubletu absorpčních pásů lokalizovaných při 890 cm^{-1} a 852 cm^{-1}, které odpovídají symetrické valenční vibraci C–O–C.



Obr. 6 Grafy závislosti absorbance na vlnočtu zobrazující charakteristické absorpční pásy.

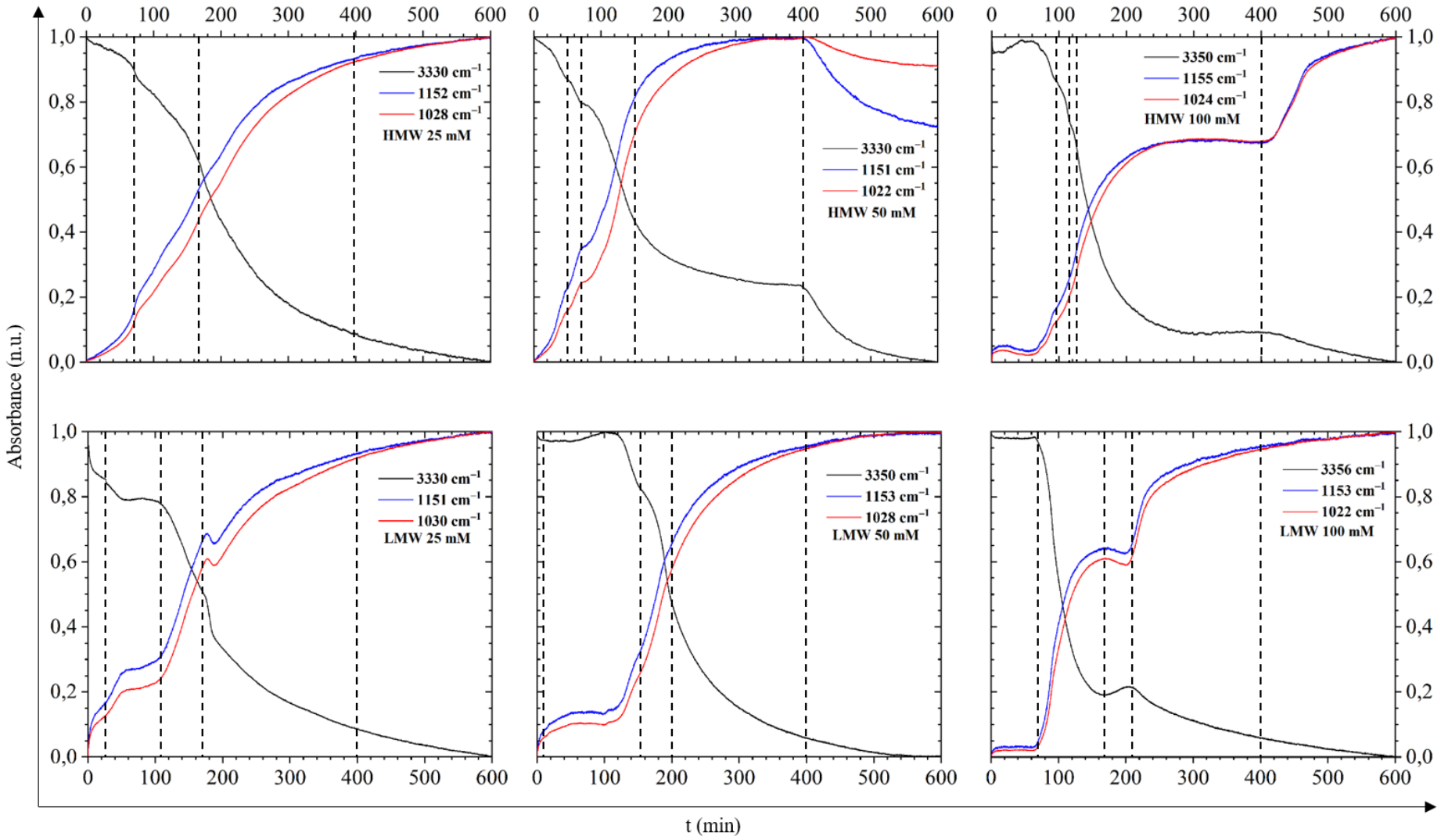
Přítomnost síťovacího činidla (Septonexu) byla v infračervených spektrech vzorků hydrogelů potvrzena zejména specifickými absorpčními pásy připadajícími alifatickým strukturním jednotkám a esterovým vazbám. Dublet ostrých a intenzivních absorpčních pásů lokalizovaných při 2922 cm^{-1} a 2853 cm^{-1} odpovídá valenční asymetrické a symetrické vibraci C–H vazeb v methylenových funkčních skupinách. Méně výrazný absorpční pás při 2955 cm^{-1} je výhradně připisován asymetrické valenční vibraci C–H vazeb v $–CH_3$ skupinách. Výše zmíněné stavební jednotky byly potvrzeny přítomností absorpčních pásů při 1467 cm^{-1}, 1375 cm^{-1} a 1340 cm^{-1}, které odpovídají symetrickým a asymetrickým vibračním

módům $–CH_2–$ a $–CH_3$ skupin. Ostrý a intenzivní absorpční pás lokalizovaný při 1738 cm^{-1} je výhradně připisován valenční symetrické vibraci C=O vazeb v alkyl-esterech. Mimo jiné si nelze nepovšimnout tripletu absorpčních pásů při 1246 cm^{-1}, 1200 cm^{-1} a 1152 cm^{-1}, které odpovídají asymetrické a symetrické vibraci C–C–O vazeb v saturovaných esterech Septonexu.
Z grafů je zároveň patrné, že v závislosti na čase dochází k postupnému, avšak velmi zřetelnému snižování absorbance absorpčního pásu odpovídajícího molekulární vodě v oblasti 3700–3000 cm^{-1}, což je důsledek postupného vypařování vody z hydrogelu. Oproti tomu absorpční pásy charakteristické pro hyaluronan a Septonex v čase zvyšují svou intenzitu.

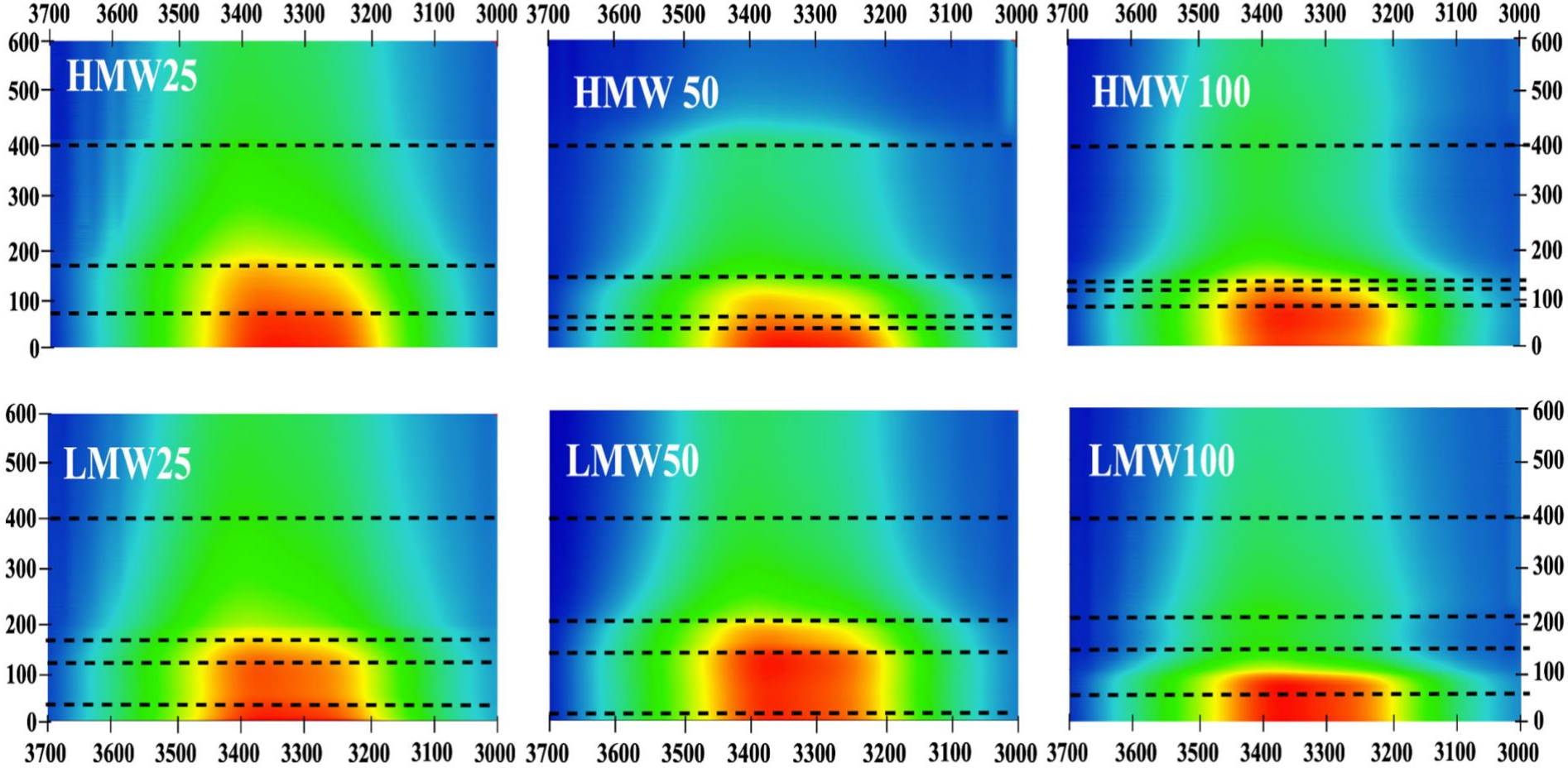
5.3.2 Profily sušení

Sušení hydrogelu procházelo několika fázemi, které jsou zřetelné z profilů dehydratace, tedy závislosti absorbance na čase. Na grafech na Obr. 7 jsou vyneseny křivky odpovídající změnám v absorbanci jednotlivých komponent, z nichž byl hydrogel připraven. Pro vodu byla jako vypovídající zvolena měnící se absorbance charakteristického absorpčního pásu o vlnočtu v rozmezí 3356–3330 cm^{-1}, což, jak je zřetelné z Obr. 8, odpovídá přibližně střední hodnotě v rámci sledovaného rozmezí vlnočtů charakteristických pro vibrace molekulární vody a zároveň místu s největší intenzitou absorbance.
Jak již bylo dříve zmíněno, pro hyaluronan byl jako referenční absorpční pás zvolen pás o vlnočtu v rozmezí 1022–1040 cm^{-1}, který je projevem valenční symetrické vibrace C–O vazeb v primárních alkoholech.
Pro Septonex byl v tomto případě zvolen ostrý izolovaný charakteristický pás v rozmezí vlnočtů 1151–1155, který je projevem C–C–O vazeb saturovaného esteru. Vzhledem k tomu, že i tento pás je stejně jako ten objevující se v oblasti 1738 cm^{-1} výhradně připisován Septonexu, mohlo dojít k jeho využití k charakterizaci změny absorbance sledovaných vzorků.
Nelze si nepovšimnout vzájemného propojení mezi vodou a komponentami, z nichž je zesíťovaná struktura gelu sestavena. S postupným úbytkem vody dochází k většímu prosazení se hyaluronanu a Septonexu, čímž získáváme křivky přibližně symetrické podle vodorovné osy procházející společným průnikem.
Ze strmosti křivek jsme dále schopni popsat rychlost sušení jednotlivých gelů, a to při laboratorní teplotě. Nejrychlejší dehydrataci vykazují gely zesíťované 100 mM Septonexem. Dále za povšimnutí stojí, že hydrogel získaný zesíťováním LMW hyaluronanu a 50 mM Septonexu, který byl již dříve zhodnocen jako pro přípravu nejvýhodnější, vykazuje obdobné chování jako hydrogely připravené s poloviční koncentrací zesíťovacího činidla. Rychlost dehydratace je tedy v tomto případě nižší než rychlost vysychání analogického hydrogelu připraveného z HMW hyaluronanu.
Dále je potřeba zmínit jisté prohnutí na počátku křivky vyskytující se u 50 mM LMW hydrogelu a obou molekulárních hmotností 100 mM hydrogelu. Toto prohnutí je způsobeno formací dutiny uvnitř hydrogelu, která po nanesení na ATR diamantový krystal byla po chvíli eliminována a celý gel tak dospěl do stavu jednotné struktury a byl podroben měření.

Z profilů sušení byly získány časy odpovídající inflexním bodům vyznačeným na grafech na Obr. 7, které průběh dehydratací rozdělují do několika fází. Jednotlivé fáze jsou charakterizovány změnami relativního zastoupení subpopulací molekulární vody, které byly zkoumáno dekonvoluováním pásů v těchto vyznačených časech.



Obr. 7 Profil vysychání gelů



Obr. 8 Series spektra vysychajících gelů v čase

5.3.3 3D grafy vysychajících gelů

Series analýzou byly získány trojrozměrné grafy závislostí absorbance na čase a vlnočtu. O průběhu vysoušení hovoří, kromě již rozebíraných profilů sušení, také barevné spektrum viditelné na grafech na Obr. 8.

Přestože je vysoušení kontinuální, při pozornějším pohledu je zřetelné, že průběh odpařování vody je rozdělen do několika fází. K nejvýraznější změně dochází u všech gelů přibližně do 150. minuty od počátku měření. Do této chvíle se gel zbavuje vody s vysoce narušenou sítí vodíkových vazeb, která nejsnadněji opouští systém hydrogelu, protože je poutána výrazně slabšími silami než zbylé dvě populace a mluvíme v tomto případě o volně vázané vodě.

Trojrozměrné grafy zároveň ukazují, že dle dlouhotrvající intenzity světle zelené barvy hydrogely zasíťované činidlem o nejnižší koncentraci a LMW 50 mM hydrogel v sobě udržují vyšší množství vody po delší dobu než zbylé tři hydrogely. Nicméně je zapotřebí říci, že tuto grafickou projekci nelze brát v absolutním pohledu, jelikož v této oblasti vlnočtů se projevují nejen rozličné subpopulace vody, ale i jejich interakce s ostatními funkčními skupinami, jako jsou hydroxylové a amidové skupiny hyaluronanu. Dále barevné rozmezí absorbance tzn. osy Z nebylo voleno vždy stejně, a to především z důvodu ucelené projekce mezi jednotlivými vzorky hydrogelů

5.3.4 Dekonvoluce absorpčních pásů valenčních vibrací O–H skupin

Vysychání gelu je spojeno s jeho strukturálními změnami. Tento jev je spojen s oslabováním vodíkových vazeb v systému, kdy obecně platí, že jedna molekula vody v hydrogelu je schopna být součástí až čtyř vodíkových vazeb. To má za důsledek vznik formací multimerů a síťované vody.

Vznik síťované struktury je charakteristický pro subpopulace molekulární vody označované jako kvazi krystalická voda a pevně vázaná voda.

Pomocí časově rozlišené infračervené spektrometrie byl studován vliv dehydratace na relativní obsah subpopulací molekulární vody v testovaných hydrogelech. Za tímto účelem byla provedena dekonvoluce širokého absorpčního pásů lokalizovaného při 3700–3000 cm^{-1}, a to v šesti specifických časech dehydratace. V případě vzorku HMW 25 mM probíhala dehydratace vzorku celkem v pěti znatelných krocích (viz. Obr. 8). Tyto časy byly vybrány na základě profilu časového záznamu procesu dehydratace pro absorpční pásy odpovídající molekulám vody 3356–3300 cm^{-1} a použitých komponentů ke vzniku hydrogelů tzn. 1155–1151 cm^{-1} valenční symetrická vibrace C–C–O vazeb v alkyl-esterech Septonexu a 1030–1022 cm^{-1} valenční vibrace C–O vazeb v primárních alkoholech hyaluronanu.

V rozsahu vlnočtů 3700–3000 cm^{-1} rozlišujeme tři hlavní subpopulace vody:

- V oblasti přibližně 3250 cm^{-1} hovoříme o molekulách vody silně vázaných prostřednictvím lineárních vodíkových vazeb (struktury koordinovaných čtyřbokých pentamerů). Tuto subpopulaci nazýváme semikrystalická voda.
- V oblasti okolo 3400 cm^{-1} se projevují vibrace molekul vody zformované do méně dokonale uspořádaných struktur (zkreslené pentamery a tetramery). Tato voda je označována jako voda podobná pevně vázané látce. Uplatňují se zde nelineární anebo částečně narušené vodíkové vazby.

- Poslední oblastí je oblast o vlnočtu 3600 cm^{-1}, odpovídající molekulám vody s vysoce narušenou sítí vodíkových vazeb. Tato subpopulace vody je označována jako volná voda – voda podobná kapalině.

Výsledky dekonvoluce absorpčního pásu odpovídajícího jednotlivým subpopulacím molekulární vody v příslušných fázích dehydratace jsou pro všechny vzorky uvedeny v Tab. 4 a Tab. 5. Z naměřených výsledků je zřejmé, že relativní plocha „strukturovanějších“ subpopulací vody tzn. kvazi-krystalická a pevně vázaná se v průběhu času mírně zvyšuje na úkor relativního zastoupení volné, resp. liquid-like vody. Na tomto místě je nutné říci, že relativní plocha příslušných dekonvoluovaných pásů přímo neodpovídá jejich relativnímu obsahu, a to zejména z důvodu, že struktury vázané pomocí vodíkových vazeb vždy vykazují zvýšenou intenzitu příslušného infračerveného pásu. Tento problém by mohl být vyřešen pomocí ATR korekce příslušného absorpčního pásu. Díky tomuto fenoménu bude absolutní obsah subpopulace volně vázané vody ve skutečnosti významně vyšší ve srovnání s procentuálními hodnotami uvedenými v Tab. 4 a Tab. 5.

Tab. 4 Relativní plocha píků charakterizující zastoupení subpopulací molekulární vody v hydrogelu vysokomolekulárního hyaluronanu získaná dekonvolucí inflexních bodů křivky získané sériovým snímáním vysychání gelu pomocí FTIR spektrometru.

HMW	t [min]	volná	pevná	semi-krystalická	volná	pevná	semi-krystalická
		frekvence [cm^{-1}]			relativní plocha píku [%]		
25 mM	0	3558	3393	3222	9	47	44
	75	3550	3402	3237	12	38	50
	170	3566	3422	3257	11	33	56
	400	3570	3438	3284	7	32	61
	600	3560	3439	3306	8	19	73
50 mM	0	3535	3399	3245	18	24	58
	50	3550	3410	3253	15	27	58
	70	3549	3410	3252	15	27	58
	150	3559	3431	3285	12	27	61
	400	3559	3426	3274	8	47	45
	600	3509	3403	3264	16	52	32
100 mM	0	3553	3409	3249	15	29	56
	97	3559	3416	3255	13	32	55
	117	3565	3420	3256	12	36	52
	127	3562	3421	3261	13	34	53
	400	3554	3408	3244	9	63	28
	600	3501	3388	3274	29	64	7

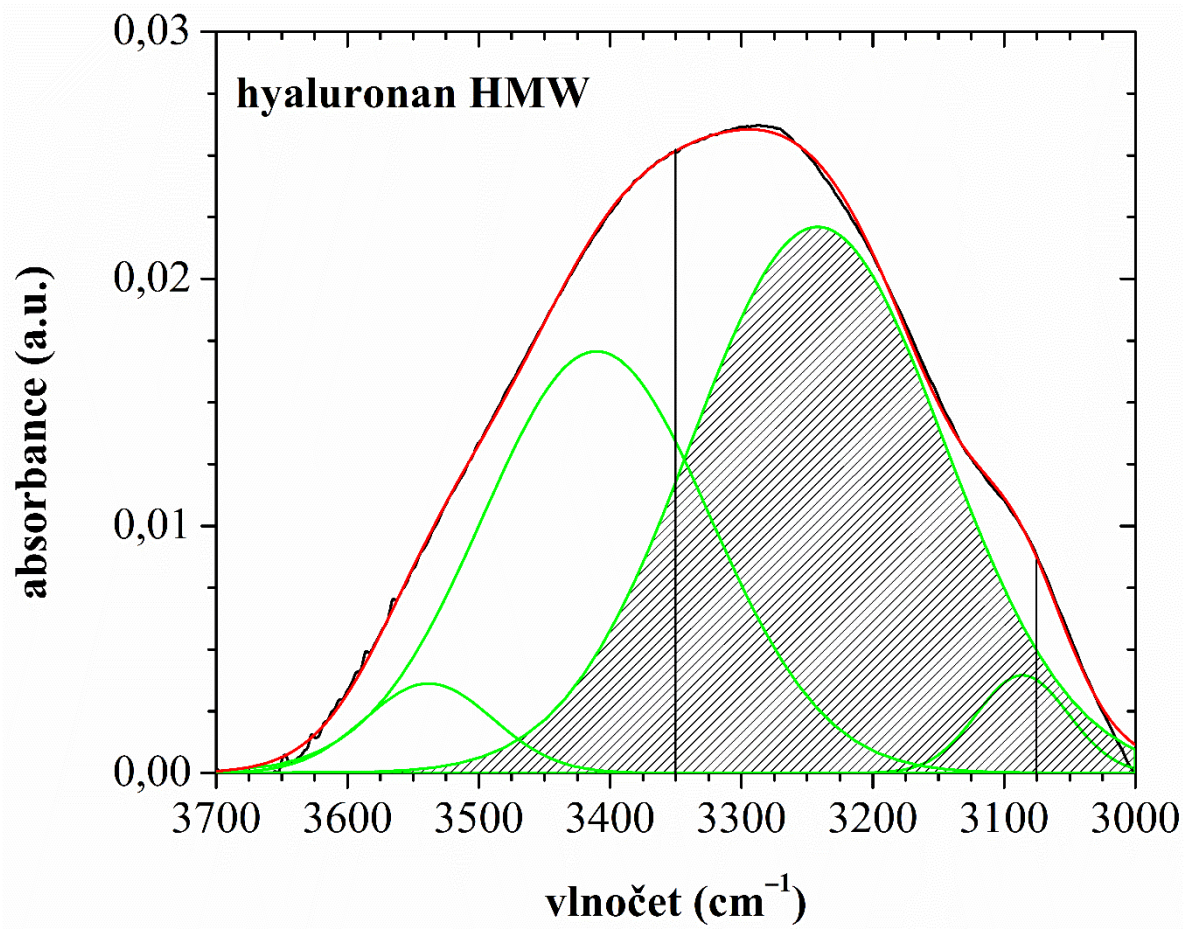
Je zřejmé, že relativní obsah volně vázané vody kontinuálně klesá v průběhu celého procesu dehydratace hydrogelů. Nicméně v případě vzorků HMW 50 mM a 100 mM si nelze nepovšimnout jedné skutečnosti, že finální čas dehydratace vzorku je spojen s výrazným

nárůstem relativního zastoupení multimerní (volně vázané) vody. Jak je vidět z Obr. 8, tak tento nárůst populace výše zmíněného typu molekulární vody není způsoben např. readsorpcí vzdušné vlhkosti v průběhu sušení, ale jako pravděpodobnější se zdá být fakt, že v příslušném rozmezí vlnočtů nastává příspěvek amidových funkčních skupin. Jinými slovy, relativní plocha tohoto absorpčního pásu je z velké části způsobena specifickou absorpcí amidových funkčních skupin nativního hyaluronanu. Dále si v Tab. 4 a Tab. 5 můžeme povšimnout, že relativní zastoupení subpopulace volné (multimerní) vody je na začátku procesu sušení pro všechny vzorky velmi podobné s typickým rozsahem 15–18 % mimo vzorku vysokomolekulárního hyaluronanu síťovaného nejnižším množstvím Septonexu. Z tohoto dílčího výsledku vyplývá, že tento vzorek hydrogelu může být tvořen i jistým zastoupením nezesíťovaného polyelektrolytu. Nicméně lze z výše zmíněných výsledků usoudit, že relativní zastoupení této subpopulace vody je prioritně řízeno polysacharidovou složkou spíše než morfologií a hustotou příčných vazeb v gelové matrici.

Tab. 5 Relativní plocha píků charakterizující zastoupení subpopulací molekulární vody v hydrogelu nízkomolekulárního hyaluronanu získaná dekonvolucí inflexních bodů křivky získané sériovým snímáním vysychání gelu pomocí FTIR spektrometru.

LMW	t [min]	volná	pevná	semi-krystalická	volná	pevná	semi-krystalická
		frekvence [cm^{-1}]			relativní plocha píku [%]		
25 mM	0	3542	3402	3246	17	26	57
	27	3539	3406	3254	18	22	60
	106	3535	3406	3261	20	20	60
	170	3552	3421	3272	14	23	63
	400	3554	3433	3299	9	21	70
	600	3560	3426	3271	9	45	46
50 mM	0	3547	3408	3249	16	27	57
	10	3546	3409	3252	16	27	57
	157	3554	3417	3261	14	29	57
	200	3552	3424	3277	14	26	60
	400	3556	3435	3303	9	24	67
	600	3535	3420	3280	15	35	50
100 mM	0	3541	3407	3256	18	24	58
	68	3540	3407	3258	18	23	59
	163	3546	3425	3292	13	30	57
	212	3549	3427	3293	12	29	59
	400	3543	3424	3281	14	37	49
	600	3553	3428	3283	10	40	50

Dále si můžeme povšimnout, že u všech vzorků se poloha absorpčních pásů, které reprezentují molekuly vody uspořádané do organizovaných struktur (semikrystalická a pevně vázaná voda) posouvají v průběhu sušení k vyšším vlnočtům (red-shift) vyjma výše zmíněných vzorků HMW 50 mM a 100 mM, jejichž pozice jsou ovlivněny majoritním příspěvkem amidových funkčních skupin. Naproti tomu poloha absorpčního pásu odpovídajícího multimerním subpopulacím vody zůstávala v průběhu sušení prakticky nezměněna s typickou hodnotou $\Delta\upsilon \pm 10$ cm^{-1}, avšak nepřevyšující 13 cm^{-1}. Obecně můžeme říci, že v časovém intervalu 0–150 min dehydratace byl pozorován méně výrazný posun k vyšším vlnočtům, zatímco tento red-shift se stával eminentním v následujících sušících časech pro subpopulace odpovídající pentamerům, tetramerům anebo porušeným pentamerům. Tyto výsledky naznačují, že v průběhu nadměrné dehydratace hydrogelu dochází ve struktuře organizovaných sítí molekul vody k progresivnímu narušení vodíkových vazeb. S největší pravděpodobností lze postupnou destrukci vodíkových struktur během procesu sušení přičíst zvyšujícímu se relativnímu obsahu vody, který je silně vázán v hydratační vrstvě polyelektrolytu. Tyto molekuly vody jsou pak méně přístupné k interakcím, které by vedly k vytvoření organizovaných molekulárních sítí. Tento výsledek je ve shodě s obecně přijímanou teorií, že celá řada hydrofilních polysacharidů, jako je dextran, chitosan, fytoglykogen aj. [31] jsou schopny vytvářet hydrogelové soustavy s vysokým relativním obsahem silně vázané anebo kvazi-krystalické hydratační vody.



Obr. 9 Dekonvoluce píku nativního HMW hyaluronanu.

Na tomto místě je zapotřebí vzít v úvahu, že v důsledku nadměrného vysychání hydrogelu se hydroxylové skupiny hyaluronanu rovněž uplatňují na celkovém tvaru příslušného absorpčního pásu valenčních vibrací –OH skupin. Avšak, jak je vidět na Obr. 9, tak analyzované absorpční pásy jsou v případě nativního (suchého) hyaluronanu posunuty ve vyšetřovaných frekvencích a v neposlední řadě i hodnotách relativního zastoupení subpopulací vody. To znamená, že v konečné fázi dehydratace hydrogelu jsou diskutovány výsledky odpovídající valenčním vibracím O–H vazeb příslušných subpopulací, i když nelze, jak se ukázalo vyloučit příspěvek valenčních vibrací N–H vazeb v amidových skupinách.

Tab. 6 Posun maxima charakteristického pásu O–H symetrických vibrací během vysychání

		mokrý	suchý	
	koncentrace	pozice (cm^{-1})		$\Delta \upsilon$ (cm^{-1})
LMW	25 mM	3334	3395	61
	50 mM	3348	3395	47
	100 mM	3359	3399	40
HMW	25 mM	3333	3388	54
	50 mM	3332	3394	62
	100 mM	3351	3407	56

6. ZÁVĚR

Předmětem výzkumu této bakalářské práce byla struktura gelů na bázi hyaluronanu s využitím povrchově aktivní látky Septonexu, coby zesíťovacího činidla, s důrazem na popis subpopulací molekulární vody vyskytujících se v hydrogelu. Jako nejvhodnější technika pro danou problematiku byla zvolena ATR-FTIR spektrometrie doplněná o TG analýzu, doplňující informace o termodynamických vlastnostech jednotlivých hydrogelů.

Stanovení struktury systému vzniklého po gelaci bylo provedeno pomocí kalibračních křivek jednotlivých kompotent. Při přípravě zásobních a následně kalibračních roztoků byl brán zřetel na vysokou hydroskopičnost hyaluronanu a před samotnou přípravou vzorků byl tak nativní hyaluronan podroben TG analýze za účelem zjištění vlhkosti.

Po gelaci byly získány hydrogely dvou molekulárních hmotností hyaluronanu (LMW 250–450 kDa, HMW 1500–1750 kDa) a tří rozlišných koncentrací Septonexu (25 mM, 50 mM a 100 mM), z nichž nejvyšší účinnost využití základních komponent vykazoval hydrogel připravený v poměru 1:1, tedy LMW 50 mM hydrogel.

TG analýza potvrdila, že gely připravené užitím nízkomolekulárního hyaluronanu obecně inklinují k pevnějšímu poutání vody v systému, což je podmíněno formací zesíťovaných struktur pomocí vodíkových vazeb mezi molekulami vody.

Pomocí Series režimu ATR-FTIR spektrometrie byla sledována dehydratace gelu projevující se změnami absorbance v závislosti na vlnočtu. Zatímco absorbance v oblasti absorpčních pásů charakteristických pro vodu měla klesající charakter, absorpční pásy výhradně připisované Septonexu a hyaluronanu v čase svou intenzitu zvyšovaly.

Z profilu změny absorbance v oblasti vlnočtů charakteristických pro symetrické vibrace O–H vazby byly získány časy, v nichž dochází k výrazné změně ve fázích sušení. V těchto časech byly dekonvoluovány pásy skládající se ze tří dílčích píků, vypovídajících o relativním zastoupení jednotlivých subpopulací molekulární vody. Během dehydratace zároveň docházelo k posunu maxima dekonvoluovaného pásu, což by mohlo být připisováno silnému narušování vodíkových vazeb v rámci zesíťovaných struktur a rostoucímu relativnímu podílu pevně vázané vody v hydratační vrstvě polyelektrolytu.

Ve vyšších časech došlo k jistému zkreslení relativního zastoupení dříve zmíněných subpopulací vlivem vibrací N–H vazeb, které se projevují při vlnočtu odpovídajícímu volně vázané vodě. Z tohoto důvodu by při budoucích interpretacích získaných spekter bylo vhodno provést korekturu získaných dat eliminací projevů N–H vibrací při dekonvoluci charakteristických pásů

7. LITERATURA

[1] POUCHLÝ, Julius, 2001. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0422-X.

[2] DUCHÁČEK, Vratislav, 2006. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití.* Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 80-708-0617-6.

[3] MIQUELARD-GARNIER, Guillaume, 2007. S*ynthese et propriétés mécaniques d'hydrogels polyélectrolytes modifiés par des groupements hydrophobes. Matériaux.* Université Pierre et Marie Curie - Paris VI,. Français.

[4] *Gely*, 2020. Fch-ped.bartovsky [online]. Praha: VŠCHT [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: http://fch-ped.bartovsky.eu/koloidy/18-texty/12-Gely.pdf

[5] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ, 2010. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT [cit. 2020-12-25]. ISBN 978-80-7080-745-3. Dostupné z: https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-745-3

[6] PATEL, Alpesh a Kibret MEQUANINT, 2011. Hydrogel Biomaterials. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* [online]. InTech, 2011-08-01 [cit. 2021-05-24]. ISBN 978-953-307-309-5. Dostupné z: doi:10.5772/24856

[7] *Polymerní gely*, 2019. Technická univerzita v Liberci [online]. Liberec: Technická univerzita v Liberci [cit. 2020-11-25]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/3021/mod_resource/content/0/4%20Polymern%C3%AD%20gely.pdf

[8] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O, 2011. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011-08-01 [cit. 2021-7-24]. ISBN 978-953-307-268-5. Dostupné z: doi:10.5772/24553

[9] ŠMIDRKAL, Jan, 1999. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy* [online]. Praha: Chemické listy [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf

[10] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana, *Chemie a technologie tenzidů II*, [online]. Fakulta Technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, [cit. 2020-12-23]. Dostupné z: https://docplayer.cz/29914679-Chemie-a-technologie-tenzidu-ii.html

[11] RAPP, Bastian E., 2017. Chapter 20 - Surface Tension, In Micro and Nano Technologies, *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*, Elsevier, , Pages 421-444, ISBN 9781455731411, https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3141-1.50020-4.

[12] ŠMIDRKAL, Jan, 2020. Tenzidy [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2021-01-22]. ISBN 978-807-5920-560. Dostupné z: https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7592-056-0.

[13] FALK, Nancy A., 2019, *Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity*. Journal of surfactants and detergents vol. 22,5. 1119-1127. doi:10.1002/jsde.12293

[14] ZHANG, Lijuan, Lulu JIAO, Jinpan ZHONG, Weijiang GUAN a Chao LU, 2017. Lighting up the interactions between bacteria and surfactants with aggregation-induced emission characteristics. Materials Chemistry Frontiers [online]. 1(9), 1829-1835 [cit. 2021-01-22]. ISSN 2052-1537. Dostupné z: doi:10.1039/C7QM00125H

[15] *Souhrn údajů o přípravku: Septonex 8,3 mg/ml kožní sprej, roztok*, 2019. Opava-Komárov: Teva Czech Industries, 32/363/69-C.

[16] Polyelectrolytes. Crow: *Polymer Properties Database* [online]. 2015 [cit. 2021-2-20]. Dostupné z: https://polymerdatabase.com/polymer%20classes/Polyelectrolyte%20type.html

[17] LAPČÍK, Lubomír, Lubomír LAPČÍK, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK, 1998. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. 98(8), 2663-2684 [cit. 2021-7-25]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr941199z

[18] DICKER, Kevin T., Lisa A. GURSKI, Swati PRADHAN-BHATT, Robert L. WITT, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA, 2014. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia* [online]. 10(4), 1558-1570 [cit. 2020-12-24]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.019

[19] GUPTA, Ramesh C., Rajiv LALL, Ajay SRIVASTAVA a Anita SINHA, 2019. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 6 [cit. 2021-1-15]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi: 10.3389/fvets.2019.00192

[20] ALMOND, Andrew, Paul L. DEANGELIS a Charles D. BLUNDELL, 2006. Hyaluronan: The Local Solution Conformation Determined by NMR and Computer Modeling is Close to a Contracted Left-handed 4-Fold Helix. *Journal of Molecular Biology* [online]. 358(5), 1256-1269 [cit. 2021-7-25]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2006.02.077

[21] *Compound Summary for CID 4125253, Dextran*, National Center for Biotechnology Information, 2020. PubChem. [cit. 2020-12-23]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dextran.

[22] *Dextran*, 2020. Merck KGaA [online]. Germany: Sigma-Aldrich [cit. 2021-01-22]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/dextran.html.

[23] ROY, Niladri, Nabanita SAHA, Lenka JELÍNKOVÁ, Petr SÁHA a Tomáš SÁHA, 2013. *Inteligentní hydrogely. Plasty a kaučuk* [online]. (3-4) [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/230710197_Inteligentni_hydrogely

[24] Kyselina hyaluronová a její přínos pro pohybový aparát. *Veterinární-lékaři.cz* [online]. Praha 2: MeDitorial, 15. 10. 2019 [cit. 2020-12-24]. Dostupné z: https://www.veterinarni-lekari.cz/kreditovane-kurzy/kyselina-hyaluronova-a-jeji-prinos-pro-pohybovy-aparat-115158/kyselina-hyaluronova-a-jeji-prinos-pro-pohybovy-aparat

[25] LONGINOTTI, C. 2014. *The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: A review*. Burn Trauma 2, 162–168. https://doi.org/10.4103/2321-3868.142398

[26] ZUBÍKOVÁ, Markéta, Bc., 2016. *Léčba dekubitů metodou vlhkého hojení*. Hradec Králové. Diplomová. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra Biologických a lékařských věd.

[27] VRENTZOS, Nicolaos, 2014. Hyaluronic Acid in Modern Cosmetic and Reconstructive Surgery. *Hyaluronic acid for biomedical and pharmaceutical applications*. 1. Shawbury, Shewsbury, Shropshire, UK: Smithers Information, 137 - 148. ISBN 978-190903-077-O.

[28] What Are Hyaluronic Acid Based Fillers?, 2020. *Skin Cancer and Cosmetic Surgery Center of New Jersey* [online]. New Jersey: Skin Cancer & Cosmetic Center of New Jersey [cit. 2020-12-15]. Dostupné z: https://sccsnj.com/news/what-are-hyaluronic-acid-based-fillers/

[29] DE FRANCE, Kevin J., Fei XU a Todd HOARE, 2018. Structured Macroporous Hydrogels: Progress, Challenges, and Opportunities. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 7(1), 1256-1269 [cit. 2021-05-15]. ISSN 21922640. Dostupné z: doi: 10.1002/adhm.201700927

[30] FALLACARA, Arianna, Erika BALDINI, Stefano MANFREDINI, 2018. Hyaluronic Acid in the Third Millennium: Progress, Challenges, and Opportunities. *Polymers* [online]. 10(7), 1256-1269 [cit. 2021-7-25]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10070701

[31] GROSSUTTI, Michael a John R. DUTCHER, 2016. Correlation Between Chain Architecture and Hydration Water Structure in Polysaccharides: Progress, Challenges, and Opportunities. *Biomacromolecules* [online]. 17(3), 1198-1204 [cit. 2021-7-25]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.6b00026

[32] VENEROVÁ, Tereza a Miloslav PEKAŘ, 2017. Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants. *Carbohydrate Polymers* [online]. 170, 176-181 [cit. 2021-7-25]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.087

[33] ENEV, Vojtěch, Petr SEDLÁČEK, Sabína JARÁBKOVÁ, Tomáš VELCER a Miloslav PEKAŘ, 2019. ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 575, 1-9 [cit. 2021-7-25]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2019.04.089

8. SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

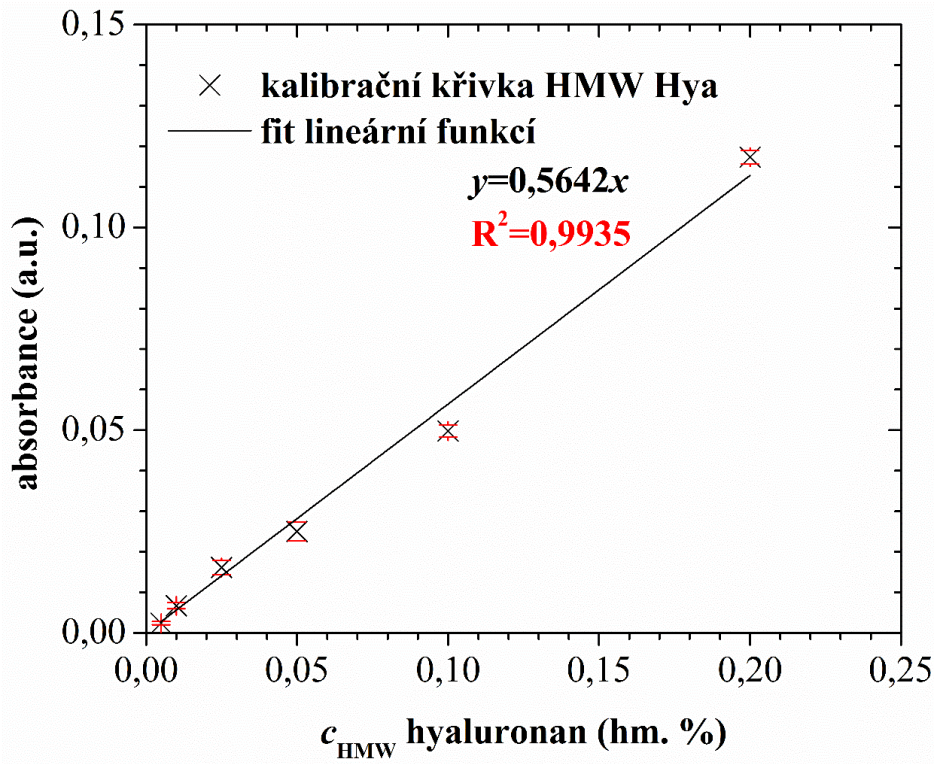
8.1 Symboly

Symbol	Název	Jednotka
t	čas	s
A	absorbance	a. u.
u	vlnočet	cm^{-1}
c	molární koncentrace	M
c hm.	hmotnostní koncentrace	a. u.

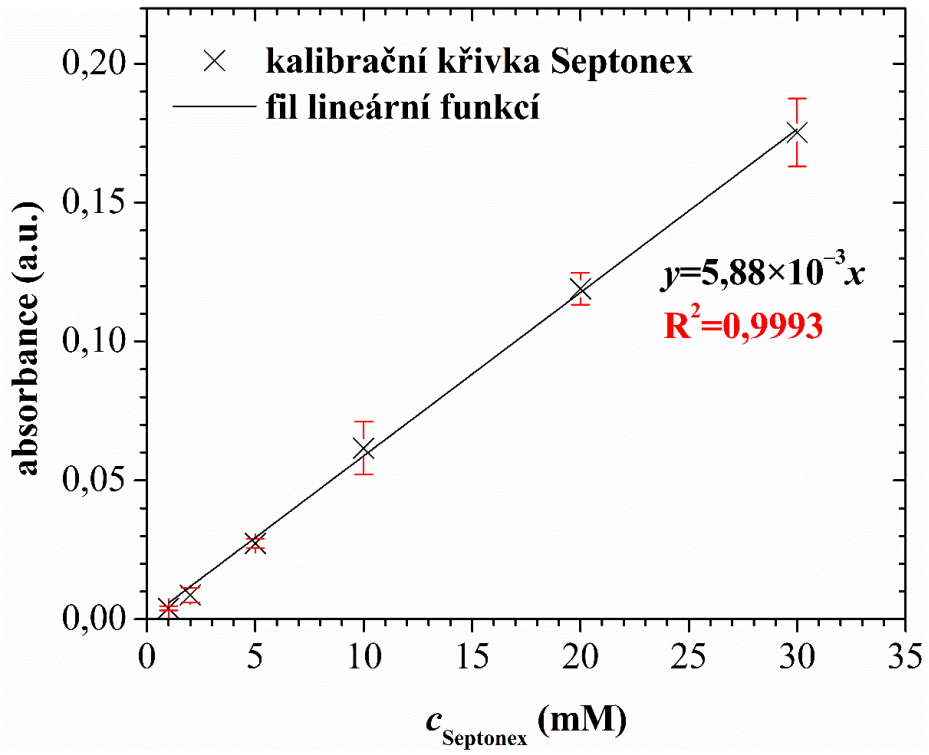
8.2 Zkratky

HMW	High molecular weight
LMW	Low molecular weight
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
ATR	Attenuated total reflectance
TGA	thermogravimetric analysis

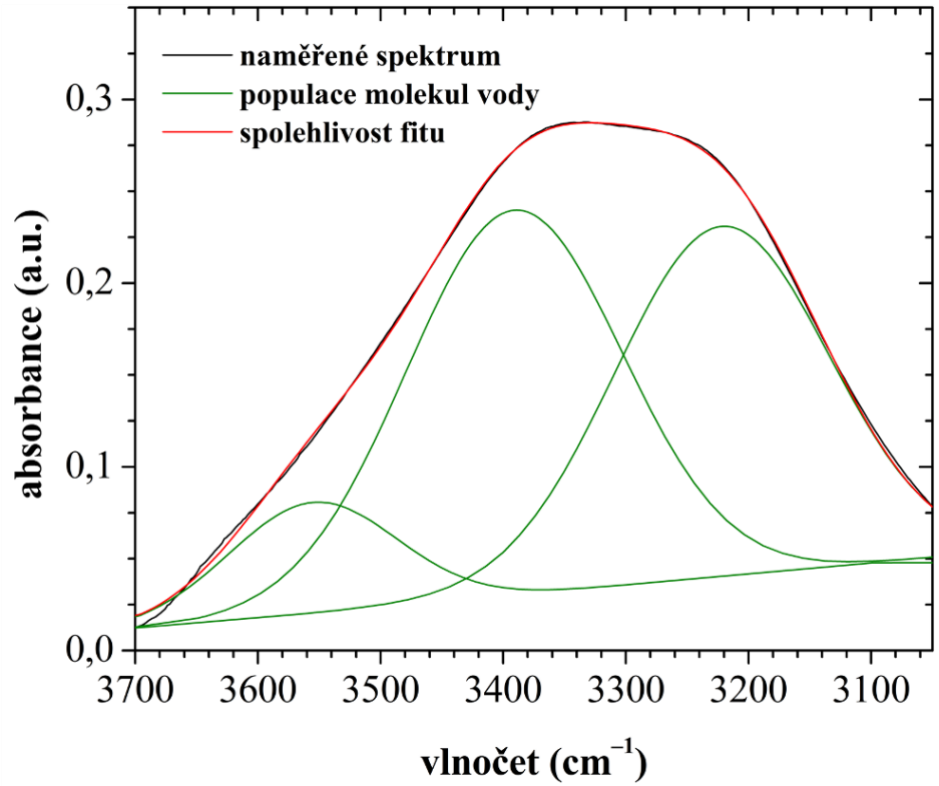
9. PŘÍLOHY



Příloha 1 Kalibrační křivka HMW hyaluronanu.



Příloha 2 Kalibrační křivka Septonexu.



Příloha 3 Dekonvoluce