



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

**VYUŽITÍ METOD ROZPTYLU SVĚTLA PŘI STUDIU
TVORBY POLYELEKTROLYTOVÝCH KOMPLEXŮ V
SYSTÉMU BIOPOLYMER-TENZID**

LIGHT SCATTERING TECHNIQUES IN THE STUDY ON FORMATION OF POLYELECTROLYTE COMPLEXES
IN THE SYSTEM BIOPOLYMER-SURFACTANT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vendula Valečková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0998/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Vendula Valečková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Využití metod rozptylu světla při studiu tvorby polyelektrolytových komplexů v systému biopolymer-tenzid

Zadání diplomové práce:

- 1) Vybrat vhodné zástupce biopolymerů a opačně nabitých tenzidů pro tvorbu polyelektrolytových komplexů s dalším využitím v oblasti hydrogelových nosičových systémů.
- 2) Využít a optimalizovat metody rozptylu světla pro účely charakterizace tvorby polyelektrolytových komplexů ve zvolených systémech.
- 3) Vzájemná korelace dat získaných jednotlivými metodami a jejich diskuze.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Vendula Valečková
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá využitím metod rozptylu světla při studiu tvorby polyelektrolytových komplexů v systému biopolymer-tenzid. Jako biopolymer byl vybrán hyaluronan sodný a jako tenzidy byly vybrány cetyltrimethylamonium bromid a karbethependecinium bromid. Jako první byly provedeny srážecí experimenty z důvodu nalezení rozsahu koncentrací tenzidů pro následující titrační měření provedené na přístroji Zetasizer Nano ZS a analýzu pomocí SEC-MALS. Prostřednictvím uvedených metod byly stanoveny kritické agregační koncentrace tenzidů v systémech hyaluronan-tenzid. Bylo zjištěno, že se zvyšující molekulovou hmotností hyaluronanu v systému tato koncentrace klesá. Kromě kritické koncentrační agregace byly sledovány i změny Z-průměru velikosti částic, zeta potenciálu, indexu polydispersity, konformačního koeficientu, gyračního poloměru a molekulové hmotnosti v systému hyaluronan-tenzid během provedených experimentů.

ABSTRACT

This master thesis is dealing with the use of light scattering techniques in the study on formation of polyelectrolyte complexes in the system biopolymer-surfactant. Sodium hyaluronate was chosen as biopolymer and cetyltrimethylammonium bromide and karbethependecinium bromide were selected as surfactants. The first precipitation experiments were performed to determine the optimal concentration range of surfactants for subsequent titration measurements performed on Zetasizer Nano ZS and for SEC-MALS analysis. The key parameters obtained from these measurements were the values of critical aggregation concentrations in hyaluronate-surfactant systems. It was found out that the increasing molecular weight of hyaluronan in these systems is causing reduction of obtained values of critical aggregation concentrations. Changes of Z-average particle size, zeta potential, polydispersity index, conformation plot, radius of gyration and molecular weight in the hyaluronan-surfactant system were monitored during experiments.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, tenzidy, polyelektrolytové komplexy, rozptyl světla, zeta potenciál, kritická agregační koncentrace, SEC-MALS

KEY WORDS

hyaluronate, surfactants, polyelectrolyte complexes, light scattering, zeta potential, critical aggregation concentration, SEC-MALS

VALEČKOVÁ, V. *Využití metod rozptylu světla při studiu tvorby polyelektrolytových komplexů v systému biopolymer-tenzid*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 59 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Michal Kalina, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. za odborný dohled, vstřícný přístup, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kyselina hyaluronová	8
2.1.1	Historie kyseliny hyaluronové	8
2.1.2	Vlastnosti a struktura kyseliny hyaluronové	9
2.1.3	Význam kyseliny hyaluronové v lidské těle	10
2.1.4	Chování kyseliny hyaluronové v roztocích	11
2.1.5	Zdroje kyseliny hyaluronové.....	11
2.2	Povrchově aktivní látky	12
2.2.1	Kationické povrchově aktivní látky	13
2.3	Polyelektrolyty.....	14
2.3.1	Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů	15
2.4	Komplexy polyelektrolyt-surfaktant.....	16
2.4.1	Interakce hyaluronanu s povrchově aktivními látkami	17
2.5	Metody studia polyelektrolytových systémů	18
2.5.1	Metody rozptylu světla.....	18
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Charakterizace materiálu	32
4.1.1	Hyaluronan	32
4.1.2	Tenzidy.....	32
4.1.3	Rozpouštědla	32
4.2	Použité přístroje.....	33
4.3	Příprava vzorků.....	34
4.3.1	Příprava zásobních roztoků pro měření velikosti částic a zeta potenciálu.....	34
4.3.2	Příprava zásobních roztoků a vzorků pro SEC-MALS	34
4.4	Popis nastavení měření	35
4.4.1	Termogravimetrická analýza.....	35
4.4.2	Elementární analýza	35
4.4.3	Měření na přístroji Zetasizer Nano ZS	35
4.4.4	Měření pomocí SEC-MALS.....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	37

5.1	Charakterizace použitých materiálů	37
5.1.1	Hyaluronan sodný	37
5.1.2	Tenzidy.....	37
5.2	Srážecí experimenty	38
5.3	Měření velikosti částic, zeta potenciálu a indexu polydisperzity	39
5.3.1	Titrace sledující velikost částic a zeta potenciál	39
5.3.2	Titrační křivka filtrovaného vs. nefiltrovaného hyaluronanu s tenzidem	42
5.4	Analýza polyelektrolytových komplexů metodou SEC-MALS	43
5.5	Porovnání výsledků z použitých metod.....	46
6	ZÁVĚR.....	48
7	POUŽITÁ LITERATURA	50
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	55
8.1	Seznam zkratk.....	55
8.2	Seznam symbolů.....	56
9	PŘÍLOHY	58

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová (HA) patří mezi velice zajímavé a významné polysacharidy. Tato pozoruhodná biokompatibilní látka se stala předmětem mnoha výzkumů a studií již od svého objevení roku 1934. Je neodmyslitelnou součástí lidského těla, plní zde mnoho funkcí a nachází se například v synoviální tekutině, ve sklivci, v buňkách, v kůži a dalších důležitých částech těla. V dnešní době se kyselina hyaluronová vyrábí fermentací bakterií rodu *Streptococcus*, dříve se získávala z kohoutích hřebínků.

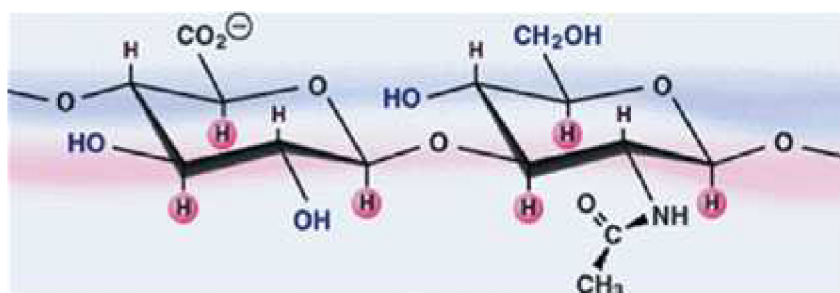
Tenzidy, neboli také povrchově aktivní látky, jsou nedílnou součástí našich životů, setkáváme se s nimi každý den a žádná domácnost by se bez nich neobešla. Nacházejí se ve všech čistících, úklidových a pracích prostředcích. Ovšem používání tenzidů má i stinné stránky. Nadměrné používání přípravků obsahující tenzidy v domácnostech způsobuje problémy v technologiích čištění vod, úhyn vodních tvorů a také přemnožení sinic ve stojatých vodách.

Interakce mezi polymery a tenzidy ve vodných roztocích přitahují velký zájem vědců již několik desítek let. Uplatnění těchto systémů je velice rozmanité a setkat se s nimi můžeme v řadě odvětví jako je kosmetika, potravinářství, farmacie a medicína. Tyto interakce mohou být zkoumány pomocí mnoha metod. V dostupných publikacích se využití metod rozptylu světla k charakterizaci těchto systémů vyskytuje zřídka, a proto se tato diplomová práce zabývá využitím metod rozptylu světla při studiu tvorby polyelektrolytových komplexů v systému biopolymer-tenzid. Jako biopolymer byla vybrána kyselina hyaluronová a jako vhodné tenzidy byly vybrány cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a karbethodendecinium bromid neboli Septonex. Cílem této diplomové práce bylo využít a optimalizovat metody rozptylu světla pro účely charakterizace tvorby polyelektrolytových komplexů v systémech hyaluronan-tenzid. K charakterizaci a zkoumání příslušných systémů byly použity přístroje Zetasizer Nano ZS a SEC-MALS. Získané výsledky byly vyhodnoceny, zpracovány a jsou představeny na konci této práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid, přesněji řečeno mukopolysacharid, přirozeně se vyskytující ve všech živých organismech [1]. Je známo, že se tato látka v organismu nachází většinou ve formě sodné soli, z toho důvodu se spíše používá označení hyaluronan či hyaluronát sodný [2]. Ve svém řetězci může obsahovat až několik tisíc disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a N-acetylglukosaminem vzájemně spojených střídající se β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou. Jedna tato jednotka má přibližnou molekulovou hmotnost 400 Da ($1 \text{ Da} = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a celková molekulová hmotnost HA může dosáhnout až 10^7 Da [1].



Obr. 1: Struktura molekuly kyseliny hyaluronové [3]

Hyaluronan je biokompatibilní látka, která je součástí tkání živočichů včetně člověka. Ve velkém množství se nachází zejména v kůži, sklivci a synoviální tekutině. Lidské tělo o průměrné hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 15 g tohoto polysacharidu, který je neustále obnovován [4]. HA se vyskytuje také jako složka extracelulární matrix a synovialních tekutin, ale může být i součástí intracelulární matrix, kde může dosahovat koncentrací až $2,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [1]. Jednou z dalších funkcí HA v těle je vázat vodu a promazávat pohyblivé části těla jako jsou svaly a klouby. Je používána v produktech pečující o pokožku jako vynikající přírodní zvlhčující složka. Unikátní viskoelastický charakter, kompatibilita a neschopnost vyvolávat imunitní odpověď vedly k tomu, že HA je používána v celé řadě klinických aplikací [2,5]. Karboxylové funkční skupiny, dostupné na řetězci HA, lze využít k přípravě zesíťovaných hydrogelů k zachycení DNA (DNA entrapment), ale také i k přípravě hydrogelů pro uvolňování léčiv. HA se může vyskytovat ve formě, kdy je přímo spojena s léčivem nebo slouží jako surovina pro přípravu mikrokapsulí s optimálním uvolňováním léčiv. Díky svým vlastnostem lze HA využít také ke zlepšení biologické kompatibility mikročástic chitosanu, které jsou používány jako kapsule s řízeným uvolňováním [1].

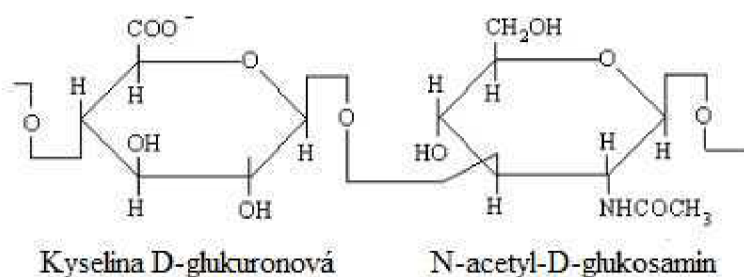
2.1.1 Historie kyseliny hyaluronové

V roce 1934 Karl Meyer a jeho kolega John Palmer izolovali dříve neznámou látku ze sklivce oka skotu. Zjistili, že objevená látka obsahuje dvě molekuly cukru, z nichž jednou molekulou byla uronová kyselina. Objevenou látku pojmenovali hyaluronová kyselina. Toto pojmenování vychází z řeckého slova „hyalos“, což v překladu znamená sklo, a z uronové kyseliny. V té době se ještě nevědělo, že objevili jednu z nejzajímavějších a nejužitečnějších přírodních makromolekul. HA byla poprvé komerčně využita v roce 1942, kdy ji Endre

Balazs použil jako náhradu vaječného bílku u pekařských výrobků. V roce 1950 se začala HA používat v medicíně [3].

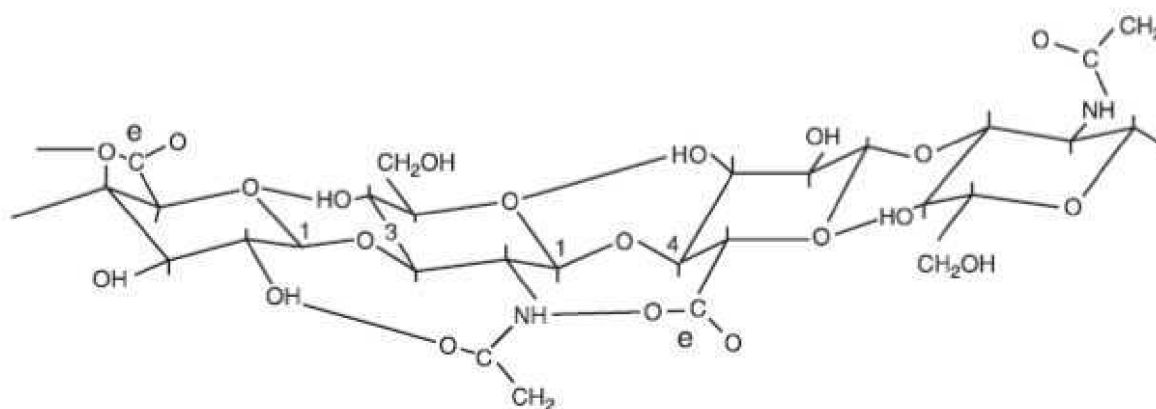
2.1.2 Vlastnosti a struktura kyseliny hyaluronové

Chemická struktura kyseliny hyaluronové byla popsána v 50. letech minulého století. Po chemické stránce se jedná o nevětvený mukopolysacharid složený z $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a $\beta(1,4)$ -N-acetyl-D-glukosaminu, tyto dvě jednotky jsou v poměru 1:1. Mezi každými sousedícími disacharidovými jednotkami se nacházejí vodíkové vazby. Jak už bylo zmíněno kyselina D-glukuronová a D-N-acetyl-glukosamin jsou spojeny dohromady prostřednictvím glykosidové vazby β -1,4 a β -1,3. Oba cukry prostorově souvisejí s glukózou, která v beta konfiguraci umožňuje všem svým objemným skupinám (hydroxylová, karboxylová část a anomerní atom uhlíku na sousedícím cukru), aby se vyskytovaly v prostorově příznivé ekvatoriální poloze, zatímco všechny malé atomy vodíku zaujímají méně stericky příznivé axiální polohy. Struktura disacharidu je tedy energeticky velmi stabilní [2,4].



Obr. 2: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [2]

Primární struktura HA je tvořena nerozvětveným řetězcem pravidelně se střídajících monosacharidových jednotek spojených glykosidickými vazbami. Sekundární struktura je podélně tvořena vodíkovými atomy z osmi uhlovodíkových (CH) skupin, které se střídají po stranách molekuly. Terciární struktura je stabilizována přítomností mezimolekulárních vodíkových vazeb. Hydrofobní charakter společně s vodíkovými vazbami v kombinaci s elektrostatickým odpuzováním umožňuje spojovat velký počet molekul do rozsáhlé molekulové sítě (matrice) HA [6].



Obr. 3: Primární struktura kyseliny hyaluronové [6]

Na rozdíl od jiných glykosaminoglykanů zastoupených v mezibuněčné hmotě (např. heparin nebo chondroitin) není HA sulfatována. Velikost jejích řetězců se pohybuje v rozmezí od 0,2 do 10 MDa, přičemž nejčastější je velikost 2–5 MDa.

Kyselina hyaluronová se rozpouští ve vodě za vzniku viskoelastického roztoku. Koncentrace HA $10 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ zvyšuje viskozitu vody přibližně 5 000násobně. Při aplikaci střížných sil však viskozita silně klesá, ale elastické vlastnosti přetrvávají [4].

2.1.3 Význam kyseliny hyaluronové v lidské těle

Kyselina hyaluronová je důležitou součástí lidského těla a vykonává zde mnoho důležitých funkcí. HA může v lidském těle vystupovat jako stavební jednotka mezibuněčné matrix, ale také jako signální molekula imunitních reakcí. Zároveň ovlivňuje zánětlivé, autoimunitní reakce a embryogenezi, urychluje regeneraci tkání a tkáňového epitelu, moduluje kancerogenezi a může ovlivňovat anglogenezi [4].

Kyselina hyaluronová jako stavební jednotka

O přítomnosti HA slyšíme nejvíce v souvislosti s těly obratlovců, lze ji nalézt rovněž u některých Prokaryot (*Streptococcus* či *Pasteurella*), kde bývá součástí buněčné stěny.

V lidském těle je však HA základní stavební jednotkou mezibuněčné matrix. Je tvořena řadou buněk, přičemž nejvýznamněji se na její syntéze podílejí především fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty. Její zvýšená tvorba je ovlivněna celou řadou faktorů, jako např. transformujícím růstovým faktorem TGF-beta 1, který podporuje expresivitu mRNA pro HA syntázu. Ještě výraznější účinek je možné pozorovat při podání PDGF (platelet derived growth factor) a v menší míře i EGF (epidermal growth factor).

Patologické hromadění HA v lidském těle se označuje jako hyaluronóza. Biodegradace probíhá především prostřednictvím specifických enzymů označovaných jako hyaluronidázy. Nejvýznamnější lokalizace HA je zachycena v tabulce 1. Odhadované množství HA v kůži je $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, ve sklivci $0,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [4].

Tab. 1: Kyselina hyaluronová v lidském těle [4]

Lokalizace	Množství HA	Biologický poločas	Molekulová hmotnost
Mezibuněčná hmota	$> 2,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$	hodiny až týdny	vysoká
Pupečník	$2-4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$	–	–
Synoviální tekutina	$2-4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$	hodiny	vysoká
Lymfa	$< 10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$	minuty	různá
Sérum	$0,01-0,10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$	minuty	různá

Kyselina hyaluronová jako signální molekula imunitních reakcí

Pro molekulu HA bylo na povrchu různých typů buněk identifikováno šest specifických struktur, které můžeme označit jako receptory:

- CD44,
- RHAMM (receptor for hyaluronan mediated motility),

- LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial HA receptor-1),
- HARE (hyaluronan receptor for endocytosis),
- Layilin,
- Toll-like receptor 4.

Mezi nejlépe popsané a nejlépe charakterizované dnes patří CD44 a RHAMM. Předpokládá se, že oba zasahují do procesu migrace zánětlivých a nádorových buněk, čímž ovlivňují jejich invazivitu, adhezivitu a proliferaci [4].

CD44

CD44 je transmembránový glykoprotein, na který se kompetitivně vážou polymery HA. Nachází se na leukocytech, na endotelu, na parenchymových a epiteliálních buňkách a má nejméně 17 různých izoform. Kromě funkce receptoru pro HA slouží také jako mediátor vyžrávání, adheze a přestupu aktivovaných T-lymfocytů z krevního řečiště do místa zánětu. Také koordinuje signály pro buněčné přežívání a smrt.

Přestože je HA především extracelulární glykosaminoglykan, působením protizánětlivých cytokinů (IL-15) uvolněných v místě infekce, poranění nebo zánětu (včetně autoimunitního zánětu), se exprese HA indukuje také na povrchu endoteliálních buněk přilehlých cév, ke kterým je HA přichycen právě pomocí CD44 [4].

RHAMM (CD168)

RHAMM není na rozdíl od CD44 transmembránovým proteinem, je totiž na buněčnou membránu napojen zvenčí. To umožňuje, že může snadno integrovat s přítomnými glykosaminoglykany. Vedle buněčné migrace urychluje přípravnou (G2) a mitotickou (M) fázi buněčného cyklu a podporuje tvorbu nově vznikajících cév [4].

2.1.4 Chování kyseliny hyaluronové v roztocích

Hyaluronan je silně hygroskopická látka, je schopná pojmout až tisícinásobek hmotnosti vody. Vodný roztok je viskózní a míra jeho viskozity závisí jak na molekulové hmotnosti rozpuštěného hyaluronanu, tak i na koncentraci roztoku.

V roztocích se chová jako polyaniont, vlastnosti prostředí udávají jeho chování. Alkalické pH způsobuje více flexibilní molekulovou strukturu, zatímco při nižším pH a vyšší iontové síle roztoku dochází ke kontrakci řetězce [7].

Reologické vlastnosti roztoků hyaluronanu vykazují jak viskoelasticitu, tak i smykovou závislost. Tyto vlastnosti jsou spojeny s lubrikační funkcí polysacharidů v kloubech a tkáních [8]. Struktura hyaluronanu je dána dvojnásobnou spirálou a je stabilizována pomocí molekul vody. Spirála obsahuje osm uhlíkatých jednotek CH, to odpovídá velikosti oktanové kyseliny. Z tohoto lze odvodit, že hyaluronan má amfifilní charakter díky vlastnostem hydrofilního materiálu a obsahu hydrofobních částí [9].

2.1.5 Zdroje kyseliny hyaluronové

Hyaluronan se vyskytuje prakticky ve všech tkáních obratlovců. Ve vysokých koncentracích ho lze nalézt v kohoutích hřebíncích, bulvách skotu a také ve žraločí kůži. Tyto živočišné zdroje poskytují vysokomolekulární HA. Hyaluronan je ve tkáních obklopen řadou molekul, jako jsou bakteriální endotoxiny, chondroitin sulfát, proteiny a nukleové kyseliny.

Průměrná molární hmotnost komerčně dostupného HA získaného z živočišných tkání je většinou v rozmezí od několika set tisíc Da až přibližně do 2,5 MDa [1].

Způsobem získávání čistého hyaluronanu je jeho izolace z některých druhů mikroorganismů. Mezi nejznámější využívané kmeny patří *Streptococcus*, a to zejména druhy *Streptococcus zooepidemicus* a *Streptococcus equi*. Roční světová produkce takto získaného hyaluronanu, který je přímo nabízen na trh, činí několik desítek tun [1].

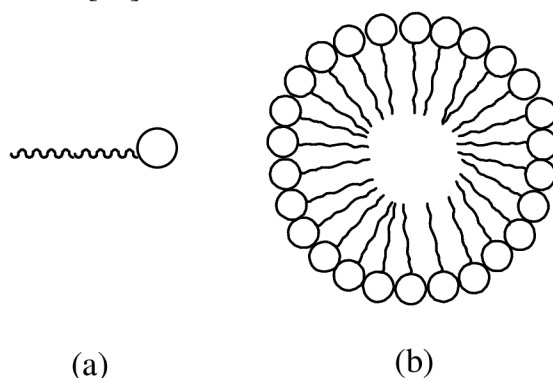
2.2 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látka (PAL), také tenzid či surfaktant, je organická látka, která má schopnost se hromadit již při nízkých koncentracích na fázovém rozhraní a tím snižovat mezifázovou energii soustavy [10,11].

Všechny povrchově aktivní látky se vyznačují charakteristickou chemickou a fyzikální strukturou molekul, která má asymetrický bipolární charakter. Jsou řazeny mezi amfifilní látky, jejichž typickým znakem je existence polární a nepolární části molekuly s přesným prostorovým vymezením. Každá molekula povrchově aktivní látky má svůj hydrofobní řetězec (nepolární) a hydrofilní skupinu (polární) [11].

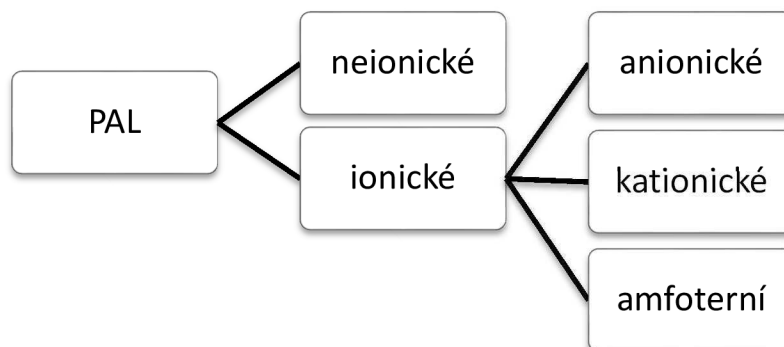
V polárním rozpouštědle se snaží hydrofobní část zaujmout takové uskupení, které co nejvíce omezuje jeho styk s rozpouštědlem. Hydrofilní část má vysokou afinitu k vodě, napomáhá orientaci molekul povrchově aktivní látky v rozpouštědle, ovlivňuje polaritu povrchově aktivní látky a rozdělení náboje. PAL ovlivňují procesy probíhající v heterogenních soustavách na rozhraní dvou nebo tří fází a také fyzikálně-chemické vlastnosti materiálů [11].

Odrázem specifického chování PAL ve vodných roztocích je kritická micelární koncentrace (CMC). Při CMC jsou v roztocích vytvářeny micely. Micely představují shluky molekul povrchově aktivních látek dispergované v kapalném médiu. Hnací silou pro tvorbu micel je snížení kontaktu mezi uhlovodíkovým řetězcem a vodou, přičemž dochází k poklesu volné energie systému. Micela (viz Obrázek 4) vytváří ve vodném roztoku agregáty s hydrofilní částí molekuly orientovanou do vodného prostředí a hydrofobní částí skrytou uvnitř. V nepolárním prostředí se mohou vytvářet reverzní micely s obráceným uspořádáním hydrofobních a hydrofilních částí [12].



Obr. 4: Struktura micely ve vodném prostředí
(a) molekula tenzidu, (b) micela

Povrchově aktivní látky lze klasifikovat podle řady kritérií. Nejčastěji se používá klasifikace podle povahy hydrofilní složky (Obrázek 5). Tato klasifikace je založena na schopnosti hydrofilní skupiny disociovat na ionty. Polární skupiny ionických povrchově aktivních látek disociují ve vodném prostředí (anionické, kationické a amfoterní povrchově aktivní látky) a u neionických k disociaci nedochází [13,14].



Obr. 5: Rozdělení PAL podle typu hydrofilní složky

2.2.1 Kationické povrchově aktivní látky

Mezi kationické povrchově aktivní látky řadíme sloučeniny obsahující ve své molekule jednu nebo více funkčních skupin, které ve vodě disociují. Při disociaci vznikají kladně nabitě organické ionty, které jsou nositeli povrchové aktivity. Téměř u všech kationických PAL je kationem kvartérní dusíkový atom [11,15].

Jejich typickou vlastností je silná adsorpce na negativně nabitě povrchy (celulóza, sklo, bílkoviny). Většinou jsou horšími detergenty než jiné třídy PAL a jejich biologická rozložitelnost je oproti anionickým tenzidům obecně horší [13,15].

Strukturní variabilita kationických PAL je poměrně vyšší než u anionických PAL, jsou to například kvartérní soli heterocyklů, imidazolinu, pyridinu atd. Je nutno poznamenat, že anionické PAL nelze kombinovat v recepturách s kationickými, neboť se vzájemně sráží na nerozpustný aglomerát. Pokud se i přesto tyto PAL vzájemně kombinují, pak jen ty typy, které mají v molekule kromě ionické části i část neionickou. Tato neionická část totiž zajišťuje rozpustnost nerozpustného aglomerátu ve vodě [15].

Funkční skupina PAL vykazuje významný mikrobicidní efekt, využívají se tedy jako dezinfekční přípravky chirurgických nástrojů, výrobních zařízení v potravinářském průmyslu a kůže v okolí ran. V kosmetickém průmyslu tvoří součást antiseptických krémů, tělových deodorantů, antiperspirantů, ústních vod a zubních past. Také zlepšují vzhled vlasů a usnadňují česání, proto jsou důležitou součástí vlasových kondicionérů [13,15,16].

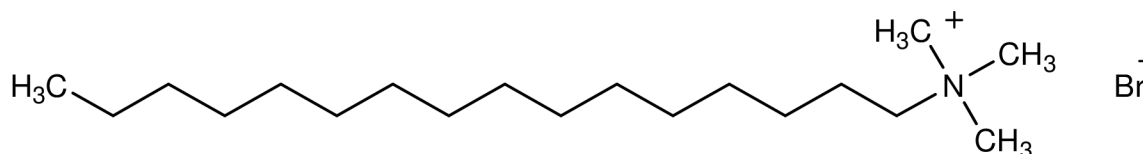
Cetyltrimethylamonium bromid

Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) také i hexadecyltrimethylamonium bromid, sumárním vzorcem $(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$, patří mezi kvartérní amoniové sloučeniny, jedná se tedy o kationický tenzid. Má antiseptické vlastnosti, je účinný proti bakteriím a plísním. Tvoří hlavní složku pufru pro extrakci DNA. Má široké využití, například v syntéze nanočástic zlata (např. kulovité nanočástice, nanotyčinky), nanočástic oxidu křemičitého (např. MCM-41) a tvoří důležitou složku vlasových kondicionérů. Vzhledem k jeho relativně

vysoké ceně se obvykle používá pouze ve vybrané kosmetice [17,18]. Je volně rozpustný v alkoholu a vodě, nerozpustný v etheru a benzenu [19].

Jeho aktivita je neutralizována pomocí mýdel a anionických tenzidů, například dodecylsírán sodný (SDS). Sloučeniny CTAB tvoří nerozpustné komplexy s SDS. Uvedený tenzid je aktivní v zásaditém pH proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím [19].

Stejně jako většina povrchově aktivních látek, CTAB tvoří micely ve vodných roztocích. Při 303 K (30 °C), tvoří micely s agregačním číslem 75 až 120 (v závislosti na způsobu stanovení, průměr ~ 95) a se stupněm ionizace $\alpha = 0,2-0,1$ [15,16]. Kritická micelární koncentrace CTAB byla stanovena na hodnotu $0,92-1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při teplotě 25 °C [20].

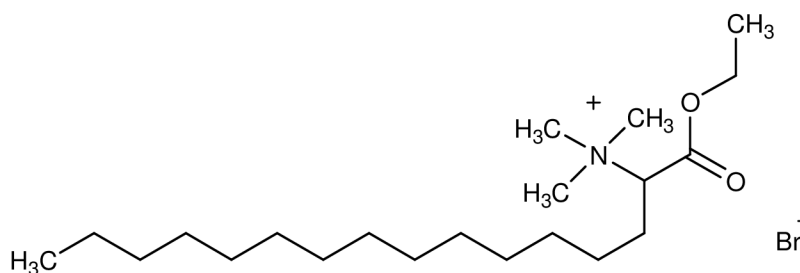


Obr. 6: Strukturální vzorec CTAB

Karbethopendecinium bromid

Karbethopendecinium bromid, známý spíše pod názvem Septonex, sumárním vzorcem ($\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{BrNO}_2$), patří mezi kvartérní amoniové sloučeniny. Používá se jako antiseptikum a dezinfekční látka hlavně proti grampozitivním mikrobům. Za běžných podmínek jde o bílý až nažloutlý prášek, je dobře rozpustný ve vodě, ethanolu a chloroformu. Měl by se uchovávat v dobře uzavřených obalech a zároveň by měl být chráněn před světlem [21]. Kritická micelární koncentrace Septonexu byla stanovena přibližně na hodnotu $0,80-0,96 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při teplotě 25 °C [22].

Vzhledem k nařízení Evropské unie č. 1223/2009 v platném znění se nesmí používat do kosmetických přípravků, výrobky s karbethopendecinium bromidem spadají do kategorie léčiv [21].



Obr. 7: Strukturální vzorec Septonexu

2.3 Polyelektrolyty

Polyelektrolyty (PE) řadíme mezi vysokomolekulární látky. Jsou to ve vodě rozpustné elektricky nabitě makromolekuly. Jejich vlastnosti jsou určovány vzájemným působením elektrických sil, Brownova pohybu makromolekulárního řetězce a mezimolekulárními Van der Waalsovými silami [23].

Postranní skupiny polyelektrolytů jsou schopné elektrolytické disociace. Disociací vzniká makroiont s velkým počtem elementárních nábojů a příslušný počet malých iontů opačného

náboje (protiiontů). Částice makromolekuly v roztocích tedy nesou elektrický náboj, který (na rozdíl od micel lyofobních solí) vznikl disociací.

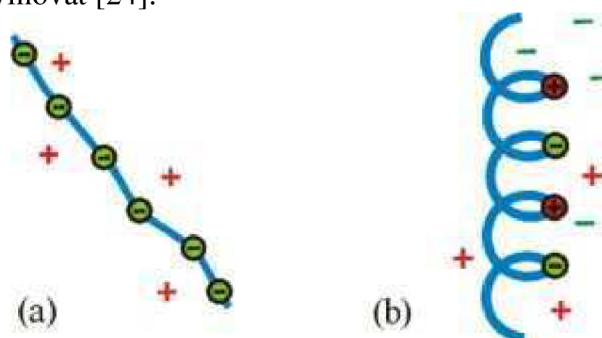
Podle povahy skupin schopných disociace jsou rozdělovány na:

- polyelektrolyty obsahující kyselé skupiny např. $-\text{COO}^-$,
- polyelektrolyty bazické, obsahující jen zásadité skupiny, např. $-\text{NH}_3^+$ (málo četné),
- amfoterní polyelektrolyty, které obsahují v postranních řetězcích jak zásadité, tak i kyselé skupiny (např. bílkoviny).

Silně kyselé skupiny disociují prakticky úplně, zatímco slabě kyselé a slabě zásadité skupiny jsou disociovány pouze do určitého stupně. Poměry v téže molekule jsou však složité, protože dvě stejné skupiny v jedné molekule mohou mít různou hodnotu disociační konstanty, má-li jejich nejbližší okolí v řetězci různou chemickou strukturu (např. náleží-li ke dvěma různým zbytkům v molekule bílkoviny). Nejsou-li dvě skupiny v téže molekule dostatečně vzdáleny, mohou navzájem ovlivňovat velikost svých disociačních konstant. U amfoterních makromolekul jsou při vysokých pH disociovány jen kyselé skupiny. Při nízkých pH disociují jen zásadité skupiny a při středních hodnotách pH disociují částečně jak kyselé, tak zásadité skupiny a vznikají obojetné ionty neboli amfionty s kladnými i zápornými náboji v jedné makromolekule. V izoelektrickém bodě je počet kladných i záporných nábojů stejný, takže celkový náboj makromolekuly je nulový [24].

2.3.1 Roztoky vysokomolekulárních elektrolytů

Lineární makromolekuly, které obsahují náboje pouze stejného znaménka, se jen velmi málo svinují v klubka a ve zředěných roztocích existují spíše ve formě nataženého řetězce (Obrázek 8a). To je způsobeno působením odpuzivých sil mezi souhlasně nabitými funkčními skupinami. Odpuzivé účinky elektrostatických sil do jisté míry zeslabují disociací vzniklé protiionty. Je-li do roztoku přidán nízkomolekulární elektrolyt, stoupá iontová síla roztoku, iontová atmosféra kolem nabitých skupin se stlačuje a může se více uplatnit vliv tepelného pohybu na svinutí makromolekuly v klubko. Již malými přídatky elektrolytu se původně natažený řetězec začne svinovat [24].



Obr. 8: Tvar lineárních polyelektrolytů v roztoku [24]

(a) Makromolekula se souhlasnými náboji v roztoku

(b) Amfoterní makromolekula v izoelektrickém bodě

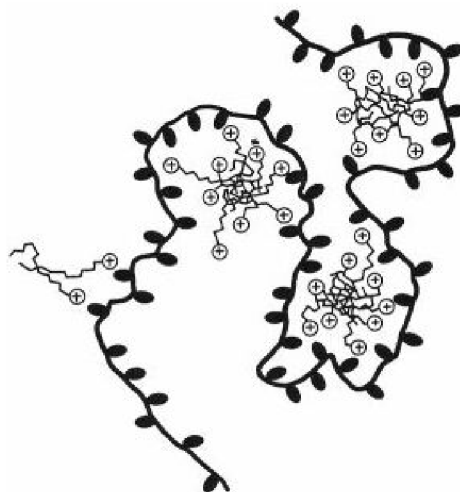
U amfoterních makromolekul, u nichž současně existují náboje kladné a záporné, které na sebe působí přitažlivými silami, se řetězec svinuje do útvaru, jehož podoba je určena způsobem střídání nábojů podél řetězce. V případě pravidelného střídání může vzniknout

šroubovice (Obrázek 8b). Nízkomolekulární ionty opět odstiňují vliv nabitých skupin makromolekuly na její tvar. Přídavkem elektrolytu se i v tomto případě přiblíží řetězec normálnímu stupni svinutí, charakteristickému pro nenabitou makromolekulu.

Nejznámějším příkladem amfoterních makromolekul jsou fibrilární proteiny, jejichž tvar není výsledkem nahodilého tepelného pohybu, ale vznikem vodíkových vazeb mezi CO a NH skupinami. Tyto skupiny se pravidelně střídají v polypeptidickém řetězci proteinů. Nejvhodnější podmínky pro svinutí makromolekuly do tvaru spirály jsou v blízkosti izoelektrického bodu. Trojrozměrné globulární proteiny vznikají složením bílkovinného řetězce o definované sekvenci aminokyselin do kompaktního útvaru, který obsahuje také spirální úseky. Jednotlivé části řetězců uvnitř globulární makromolekuly jsou spojeny hlavně fyzikálními, ale také chemickými vazbami. Tyto vazby jsou tak silné, že v určitém rozmezí podmínek udržují makromolekulu v definovaném tvaru, v němž jsou na některých místech vázány molekuly vody. Do styku s ostatním rozpouštědlem přicházejí pouze skupiny na povrchu makromolekuly [24].

2.4 Komplexy polyelektrolyt-surfaktant

Polyelektrolyty, stejně jako surfaktanty, vytvářejí trojrozměrné struktury ve vodných roztocích. Struktura těchto útvarů je založena na kombinaci hlavního řetězce polyelektrolytu a elektrostatických interakcí nebo elektostatických a hydrofobních interakcích [25]. Interakce mezi polyelektrolytem a surfaktantem jsou obzvláště silné, jestliže polyelektrolyt a ionický surfaktant mají opačný náboj. V tomto případě dojde k vytvoření silné vazby mezi iontem surfaktantu a polyiontem obvykle pod hodnotou CMC surfaktantu [26]. Takto vzniklé komplexy polyelektrolyt-surfaktant (PES-C), jsou vysoce stabilní, stechiometrické a ve vodě nerozpustné [27].



Obr. 9: Interakce molekul surfaktantu a micel s opačně nabitým polyelektrolytem [28]

PES-C se staly předmětem velkého vědeckého zkoumání z důvodu pochopení základního fyzikálního procesu samouspořádávání makromolekul hlavně v oblasti nanotechnologií. Molekulární samouspořádávání (tzv. “self-assembly”) je proces, kdy dochází ke spontánnímu sestavování molekul do strukturovaných, stabilních, nekovalentně spojených agregátů za podmínek termodynamické rovnováhy. Takto vytvořené struktury vyžadují specifickou geometrii. [29]

Termodynamické stability PES-C lze dosáhnout rovnováhou tří různých sil, a to:

- entropickými příspěvky volné energie z uvolněných protiiontů polyelektrolytového řetězce,
- elektrostatickými interakcemi mezi nábojem polyelektrolytu s opačně nabitými hlavičkami surfaktantu,
- hydrofobními interakcemi mezi alkyly surfaktantu a hydrofobní částí polyelektrolytových řetězců.

Tvoření rovnovážných struktur v PES-C je řízeno mnoha parametry. Mezi tyto parametry patří například délka polyelektrolytového řetězce, dielektrická konstanta média, kvalita rozpouštědla, koncentrace soli a surfaktantu a distribuce náboje na PE řetězci [27].

Vhodným parametrem k charakterizaci systémů polyelektrolyt-surfaktant je kritická agregační koncentrace (CAC), která se používá pro roztoky surfaktantů v přítomnosti polymeru a je obdobná kritické micelární koncentraci. Pojem kritická agregační koncentrace vede k představě agregátů surfaktantu podobných micelám. Tyto agregáty se začínají formovat v poměrně úzkém koncentračním rozmezí. CAC (podobně jako CMC) klesá se vzrůstající délkou uhlíkového řetězce surfaktantu. Hlavním rozdílem mezi CAC a CMC je, že CAC může být až o několik řádů nižší než CMC [30].

PES-C mají širokou škálu využití v biologických materiálech, při dodávání léčiv, povrchových modifikacích a flokulaci. Využívá se jich také ve velkém množství ve zdravotnických produktech [27].

2.4.1 Interakce hyaluronanu s povrchově aktivními látkami

Hyaluronan, jako záporně nabitý polyelektrolyt, může snadno interagovat s kladně nabitými povrchově aktivními látkami prostřednictvím silných elektrostatických interakcí mezi záporným nábojem na řetězci HA a kationtovou částí povrchově aktivních molekul. Tyto interakce vedou ke vzniku koloidů, které kombinují hydrofilní biopolymer s hydrofobními doménami schopné solubilizace nepolárních látek. Toho může být využito v cíleném transportu hydrofobních účinných látek [31,32].

Hyaluronan díky svému vysoce hydrofilnímu charakteru a hydratačnímu obalu ztrácí schopnost dopravovat ve vodě nerozpustné látky (např. hydrofobní léčiva používaná při léčbě rakoviny) z důvodu jejich hydrofobní povahy. Proto je třeba hyaluronan modifikovat s látkou, která zajistí rozpustnost i hydrofobního léčiva. Jednou z možností je chemická modifikace hyaluronanu. Chemickou modifikací pomocí navázaných ligandů na hyaluronan lze změnit jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a docílit trojrozměrných struktur, tzv. hydrogelů. Ty nacházejí uplatnění v tkáňovém inženýrství při tvorbě scaffoldů, krytů ran nebo popálenin, ale i jako nosiče léčiv. Mezi nevýhody chemické modifikace patří změny jak biologických vlastností, tak i kompatibility hyaluronanu. Mezi další možnosti modifikace patří "fyzikální" úprava, při které je dosaženo kombinací hyaluronanu s povrchově aktivní látkou. Tento způsob vede ke tvorbě koloidů, kdy hydrofobní domény PAL solubilizují hydrofobní látky. Hyaluronan tak hraje roli biokompatibilního nosiče. Vzhledem k jeho biokompatibilitě a existenci buněčných receptorů pro hyaluronan, by tyto koloidní systémy mohly být využity pro cílenou distribuci ve vodě nerozpustných léčiv. Komplexy hyaluronan-tenzid mají

výhodné vlastnosti, které získaly z individuálního chování polymerních nebo povrchově aktivních systémů [31–34].

Množství interakcí v systému hyaluronan-tenzid záleží na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Vysokomolekulární hyaluronan na sebe dokáže navázat více tenzidu ve vodném prostředí, naopak nízkomolekulární hyaluronan vykazuje více interakcí v přítomnosti chloridu sodného (NaCl). Oblast cílené distribuce léčiv je omezena na přípravu roztoků v přítomnosti NaCl. V roztocích s NaCl probíhají interakce obtížněji v důsledku deformace prostorové struktury řetězce hyaluronanu. V důsledku této deformace dochází ke snížení počtu dostupných vazebných míst [35].

2.5 Metody studia polyelektrolytových systémů

Mezi využívané metody pro studium polyelektrolytových komplexů (PECs) patří spektroskopické metody [36], membránové separační metody [31], metody rozptylu světla [37], turbidimetrie [38], tenziometrie [34], potenciometrie [38], konduktometrie [39], mikroskopie [40], fluorescenční techniky [41] a termická analýza [42]. Předmětem této diplomové práce je využít pro studium tvorby polyelektrolytových komplexů metody rozptylu světla. Jedná se o poměrně nové spojení, v publikacích se tyto metody pro charakterizaci polyelektrolytových komplexů vyskytují jen zřídka, z těchto důvodů se v dalších kapitolách budu zabývat teoretickým popisem právě těchto metod.

2.5.1 Metody rozptylu světla

Optické vlastnosti koloidních soustav jsou silně závislé zejména na fyzikálních vlastnostech koloidních částic. Mezi tyto vlastnosti patří jejich velikost, elektrická vodivost a vlastní absorpce světla látkou tvořící disperzní fázi. Z jevů spojených s interakcí světla s koloidními soustavami poskytují nejvíce informací rozptyl a absorpce světla [43].

Rozptyl světla je projev interakce záření s optickými nehomogenitami (disperzní částice, molekuly), které jsou menší než vlnová délka dopadajícího záření. U hrubých disperzí se rozptyl světla projevuje zákalem, který je pozorovatelný v libovolném směru. Koloidní disperze jsou vzhledem k menší intenzitě rozptylu světla obvykle světle čiré. Oproti hrubým disperzím mají schopnost opalescence [24].

Roztyl světla je jednou z mála dostupných absolutních metod pro stanovení molekulové hmotnosti a struktury látek. Je aplikovatelný na široké spektrum molekulových hmotností [44]. Mezi metody rozptylu světla patří dynamický, statický a elektroforetický rozptyl světla.

Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS), rovněž nazývaný jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS), je metoda vhodná pro měření částic až v submikronové oblasti. V současné době je široce využívána pro stanovení velikosti koloidních částic [43,45].

Základem této neinvazivní techniky je měření fluktuace intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje okolo její průměrné hodnoty. Tato fluktuace souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním světla rozptýleného na nestacionárních částicích disperzní fáze, podléhajících Brownovu pohybu, který je způsoben náhodnými srážkami částic s molekulami rozpouštědla [45,46]. Důležitým rysem Brownova pohybu pro DLS je to, že se malé částice

pohybují rychleji a velké částice se pohybují pomaleji. Částice suspendované v kapalině nikdy nejsou nehybné, ale jsou neustále v pohybu, bude se tedy zdát, že se obraz skvrny také pohybuje. Jak se částice pohybují kolem, konstruktivní a destruktivní fázový přírůstek rozptýleného světla způsobuje to, že jasné a tmavé oblasti přibývají a ubývají na intenzitě. Jinak řečeno, že dochází k fluktuaci intenzity detekovaného rozptýleného světla [43].

Jak již bylo zmíněno, malé částice se pohybují rychleji než ty velké. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění. Rychlost těchto změn je přímo závislá na pohybu molekuly. Okamžitou hodnotu fluktuace intenzity v čase τ popisuje pro monodisperzní systém autokorelační funkce (1).

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \quad (1)$$

kde $I(t)$ určuje intenzitu rozptýleného světla v čase t , výrazy v závorkách vyjadřují zprůměrování celkového času. Autokorelační funkce závisí na časové prodlevě.

Difúzní koeficient rozptylujících částic lze vyjádřit pomocí rovnice (2):

$$D = \frac{T}{q^2}, \quad (2)$$

kde T označuje rychlost poklesu korelace a q velikost rozptylového faktoru, který je závislý na vlnové délce dopadajícího světla ve vakuu λ_0 , indexu lomu disperzního prostředí n_0 a úhlu rozptylu θ podle rovnice (3):

$$q = \frac{4\pi \cdot n_0}{\lambda_0} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right). \quad (3)$$

Velikost částic lze pak vypočítat pomocí difúzního koeficientu D prostřednictvím Stokesovy-Einsteinovy rovnice:

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D}, \quad (4)$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částic, k_B je Boltzmannova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita disperzního prostředí. Hydrodynamický průměr je měřítkem toho, jak snadno se molekula dokáže v rozpouštědle pohybovat [45,47].

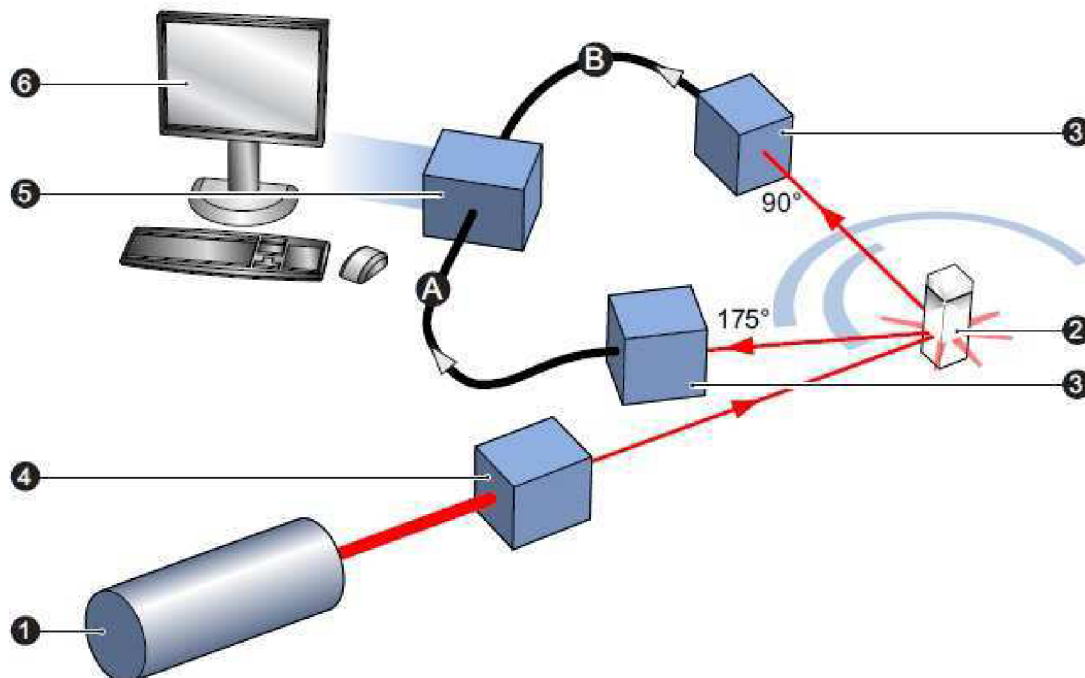
Výhodami této techniky je rychlý a jednoduchý průběh měření, které trvá obvykle od několika sekund do 10 minut. Patří mezi absolutní metody, kdy kalibrace pomocí standardů o známé velikosti a distribuci není nutná.

DLS je metoda, která je vhodná pro přesné stanovení velikosti částic v suspenzích. Lze ji proto využít při charakterizaci emulzí, micel, liposomů, latexů a pigmentů. Zajímavé uplatnění si tato metoda našla také v biologické a mikrobiologické oblasti pracující s materiálem, jako jsou bakterie, viry, proteiny a DNA [45].

Stanovení velikosti částic pomocí Zetasizeru Nano ZS

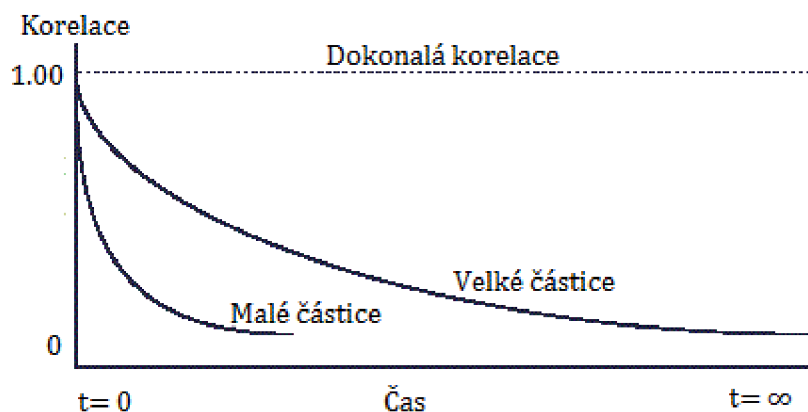
Mezi přístroje, které nabízí možnost měření dynamického rozptylu světla, patří Zetasizer Nano ZS. Zetasizer využívá jako budící zdroj světla červený laser o vlnové délce 633 nm a tímto laserem je osvětlen vzorek uvnitř cely. V těchto přístrojích je laser umístěn v úhlu 173° nebo 90°. Protože příliš mnoho světla by mohlo způsobit přetížení detektoru, zeslabovač

přístroje slouží ke snížení intenzity laserového paprsku, tím dojde i ke snížení intenzity rozptýleného světla. Toho se využívá u velmi koncentrovaných vzorků nebo při měření velkých částic. Zeslabovač může fungovat i obráceně a to tak, že propustí více laserového světla. Více laserového světla je potřeba při měření velmi malých velikostí částic nebo vzorků o nízké koncentraci [48].



Obr. 10: Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS zobrazující 6 hlavních komponent laser (1), cela (2), detektor (3), zeslabovač (4), korelátor (5) a počítač (6) [48]

Zetasizer měří fluktuaci intenzity rozptylu a používá ji pro výpočet velikosti částic ve vzorku. Součástí přístroje je komponenta zvaná digitální korelátor, který v zásadě měří stupeň podobnosti mezi dvěma signály po určité době. Při porovnávání intenzity signálu určité části skvrny v jednom časovém bodě (čas t) s intenzitou signálu o velmi krátkou dobu později ($t + \delta t$), bylo zjištěno, že tyto dva signály jsou si velmi podobné, neboli silně korelují. Intenzita signálu v čase t s intenzitou signálu mnohem později v čase nebudou mít k sobě navzájem žádný vztah, protože částice se pohybují v náhodných směrech. V této situaci neexistuje žádná korelace mezi oběma signály. Korelace se s časem zmenšuje, a proto u DLS pracujeme s velmi malými časovými měřítky. Dokonalá korelace bývá označována jako 1 a žádná korelace jako 0 [43].



Obr. 11: Korelační funkce pro malé a velké částice [43]

Jak je možné vidět na Obrázku 11, rychlost rozkladu pro korelační funkci souvisí s velikostí částic, protože rychlost rozkladu je mnohem rychlejší pro malé částice, než pro velké částice [43].

Elektroforetický rozptyl světla

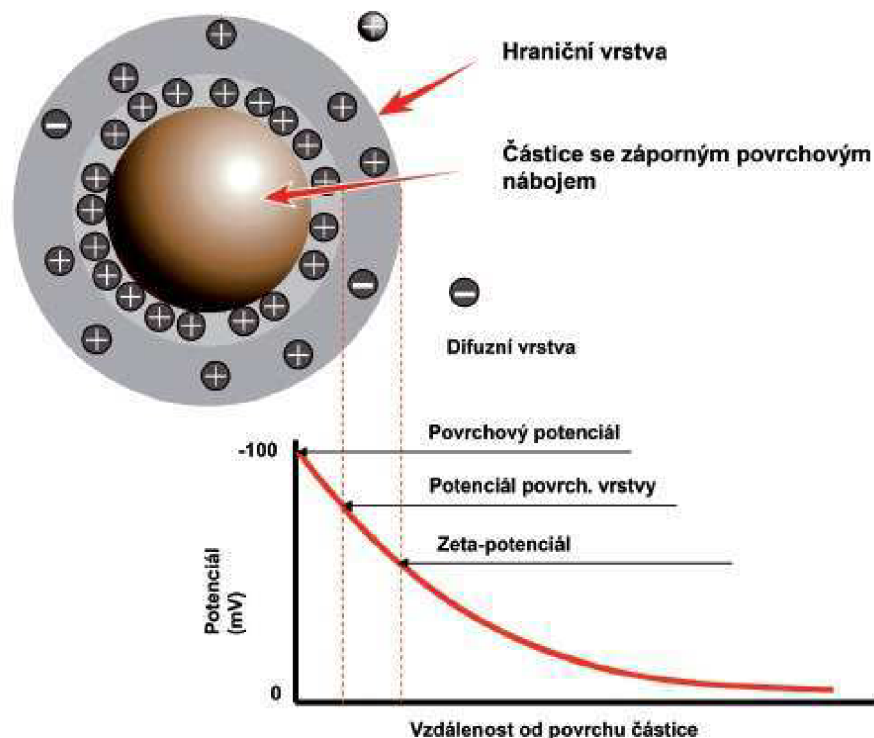
Druhou technikou měření rozptylu světla je detekce elektroforetického rozptylu světla. Tato metoda je používána k charakterizaci nábojů na povrchu koloidních částic v kapalném médiu. Koloidní částice jsou charakteristické tím, že při svých malých rozměrech mají extrémně velký specifický povrch. Velký specifický povrch těchto částic způsobuje, že fázové rozhraní částice-kapalina může silně ovlivnit mnoho fyzikálních vlastností koloidních roztoků, jako například disperzitu a stabilitu [49].

Podobně jako u malých jednoduchých iontů, které kolem sebe vytváří iontovou atmosféru protiiontů, tak se i kolem nabitých koloidních částic seskupují malé ionty opačného znaménka. Tímto dojde ke vzniku dvou protikladně nabitých vrstev na povrchu těchto částic. Tyto dvě nabitě vrstvy jsou známy pod názvem elektrická dvojvrstva.

V elektrické dvojvrstvě lze vymezit dvě základní části. Kompaktní část (také Sternova část) bližší k povrchu, kde působí adsorpční a elektrostatické síly, a vzdálenější difúzní část, kde lze tyto síly zanedbat. Vzhledem k povrchovému náboji koloidních částic existuje jistý potenciálový rozdíl mezi jejich povrchem a roztokem. Lze rozlišit tři druhy potenciálových rozdílů. Prvním z nich je elektrochemický (povrchový) potenciál, jehož hodnota je dána celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a objemem kapaliny. Jako druhý lze označit tzv. Sternův potenciál, který se nachází na rozhraní Sternovy a difúzní vrstvy. Třetím potenciálem je elektrokinetický potenciál, označovaný také jako ζ potenciál (zeta potenciál), který je dán potenciálovým rozdílem mezi objemem kapaliny a tenkou vrstvou protiiontů poutanou k povrchu částice. Nachází se tedy na rozhraní mezi kompaktní a difúzní částí elektrické dvojvrstvy [43,50].

Název elektrokinetický potenciál získal zeta potenciál díky existenci elektrokinetických jevů, tedy kinetických dějů způsobených vlivem elektrického pole na koloidní soustavu. Existují čtyři základní typy elektrokinetických jevů a patří mezi ně elektroforéza, elektroosmóza, sedimentační potenciál a potenciál proudění. Všechny tyto jevy jsou současně využitelné pro určení hodnoty elektrokinetického potenciálu [43,50].

Zeta potenciál představuje jeden z důležitých parametrů ovlivňující vlastnosti nano a mikročástic rozptýlených v kapalinách. Schématické znázornění získání hodnoty zeta potenciálu je znázorněno na Obrázku 12.



Obr. 12: Schéma zeta potenciálu částice v kapalině [51]

Zeta potenciál je veličina, která určuje míru interakce částic. Jestliže všechny částice v suspenzi mají vysoký negativní nebo pozitivní potenciál zeta, pak se budou částice odpuzovat a nebudou mít tendenci se shlukovat. Jestliže mají částice nízké hodnoty zeta potenciálu, odpuzování částic nebude dostatečně silné, dojde k jejich vysrážení ve formě vloček. Hranice mezi stabilním a nestabilním systémem se bere jako ± 30 mV. Částice, jejichž absolutní hodnota zeta potenciálu je vyšší než 30 mV se považují za stabilní. Zeta potenciál je závislý na pH rozpouštědla, protože koncentrace volných nábojů ovlivní strukturu a tloušťku elektrické dvojvrstvy na povrchu [51,52].

Ze schématu Sternova difúzního modelu elektrické dvojvrstvy je zřejmé, že celkový potenciálový rozdíl se skládá z poklesu potenciálu difúzní části dvojvrstvy a z rozdílu potenciálů mezi vrstvami. Po přidavku elektrolytu do systému se bude difúzní vrstva stlačovat, stále více protiiontů se ocitne v adsorpční vrstvě a zeta potenciál se bude snižovat, až dosáhne téměř nulové hodnoty. Při dosažení izoelektrického bodu, kdy je celá vnější vrstva stlačena za pohybové rozhraní, jsou tuhé povrch i kapalina elektroneutrální. V tomto případě je elektrokinetický potenciál roven nule a elektrokinetické jevy vymizí. Při ředění systému se difúzní vrstva rozšiřuje a zeta potenciál vzrůstá [43].

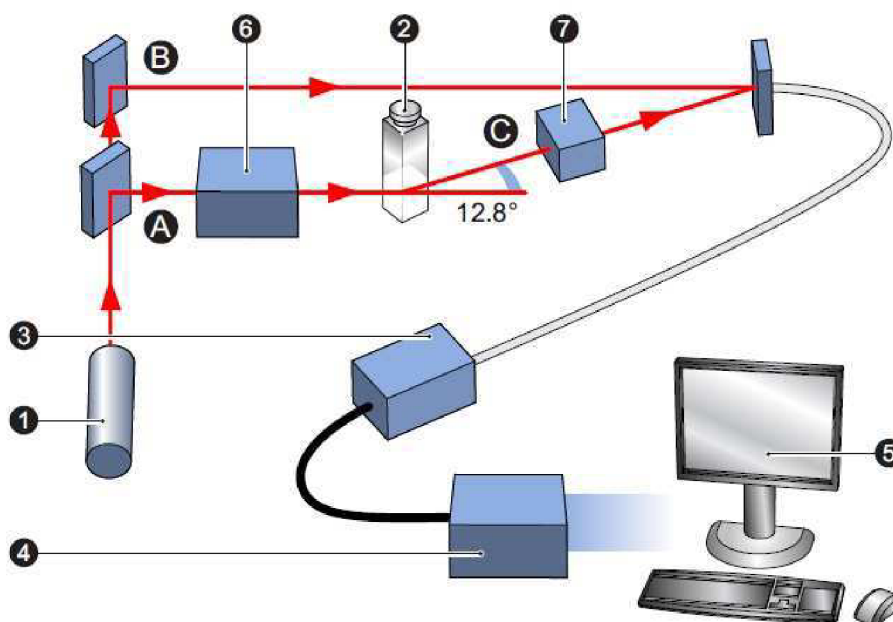
Metoda pro stanovení zeta potenciálu pomocí elektroforetické pohyblivosti částic v roztoku s využitím rozptylu světla na těchto částicích se nazývá elektroforetický rozptyl světla nebo také Laserová dopplerova velocimetrie (LDV). Při LDV se po aplikaci napětí sleduje rychlost, kterou se nabitě částice pohybují k opačně nabitě elektrodě. Ze získané elektroforetické mobility lze jednoduše při znalosti viskozity a permitivity rozpouštědla určit

zeta potenciál systému. Při této metodě je paprsek rozptýlen pod úhlem 17° a následně spojen s referenčním paprskem. Dojde ke vzniku fluktuace intenzity signálu a frekvence fluktuace by měla úměrně odpovídat rychlosti částic [48,53].

Stanovení zeta potenciálu pomocí Zetasizeru Nano ZS

Přístroj Zetasizer Nano ZS měří zeta potenciál opticky využitím laserového paprsku, kterým je nejčastěji argonový iontový laser nebo helium-neonový laser. Světelný paprsek je ze zdroje záření směřován do děliče, kde je pomocí dělicí optiky rozložen na dva paprsky. Tyto paprsky poté putují odlišnými směry, jeden jako referenční paprsek a druhý jako paprsek směřující ke kyvetě se vzorkem. Před kyvetou se nachází zeslabovač, který snižuje jak intenzitu záření laserového paprsku, tak i intenzitu rozptýleného světla. K tomuto snížení intenzit dochází z toho důvodu, aby detektor, který toto rozptýlené světlo zachytí, nebyl přetížen. Laserový paprsek pronikne středem kyvety a na částicích ve zkoumaném vzorku dochází k jeho rozptýlení, které je snímáno pod úhlem $12,8^\circ$.

Vložení elektrického pole do roztoku vzorku dojde k tomu, že snímaná intenzita rozptýleného světla bude díky pohybujícím se částicím fluktuovat, kdy frekvence fluktuace by měla úměrně odpovídat rychlosti částic. Referenční a rozptýlený laserový paprsek putují do optické soustavy sestávající z několika čoček, které paprsky sloučí a dopraví na detektor. Detektor dopraví informaci o světelném paprsku do digitálního procesoru signálu a poté do počítače. V počítači dojde k výpočtu elektroforetické pohyblivosti i zeta potenciálu. Jako detektory se zde využívají fotodiody nebo fotonásobiče [48].



Obr. 13: Schéma sedmi komponent přístroje ZetaSizer Nano ZS při měření zeta potenciálu laser (1), cely (2), detektor (3), digitální procesor signálu (4), počítač (5), zeslabovač (6), kompenzační optika (7), dopadající (A), referenční (B) a rozptýlený paprsek (C) [48]

Statický rozptyl světla

K čistému rozptylu světla dochází tehdy, když je vlnová délka světla λ podstatně větší, než koloidní částice v soustavě (o poloměru r), tedy platí-li podmínka $\lambda \gg r$. V opačném

případě dochází přednostně k odrazu světla a poté pozorujeme zákal (hrubě disperzní soustavy) [54].

Klasickou teorii statického rozptylu světla za podmínky $\lambda \gg r$ vypracoval Rayleigh. Podle této teorie se částice chovají jako oscilující dipóly vyzařující pohlcenou světelnou energii do všech stran beze změny vlnové délky. Intenzita rozptýleného světla I_s závisí na intenzitě dopadajícího světla I_0 , elektrických vlastnostech rozptylující částice (polarizovatelnost α), vlnové délce světla λ , velikosti částice r a úhlu rozptylu θ . Tato závislost je dána vztahem (5):

$$I = \frac{I_0 \cdot 8\pi^4 \cdot \alpha^2}{r^2 \cdot \lambda^4} (1 + \cos^2 \theta) \quad (5)$$

Pro částice, nesplňující podmínku $\lambda \gg r$, jejichž velikost je srovnatelná s vlnovou délkou dopadajícího záření, neplatí Rayleighova rovnice. Proto holandsko-americký fyzik Peter Debye vytvořil nadstavbovou teorii, která ukazuje, že rozptylová křivka již není zrcadlově symetrická a že původní Rayleighovy rovnice stačí upravit vynásobením vhodným korekčním faktorem. Pro ještě větší částice vytvořil novou teorii Mie. Ten poukázal na to, že závislost rozptýlené intenzity na úhlu pozorování je již značně nelineární a není prakticky použitelná pro výpočet rozměru rozptylující částice. Navíc závislost na vlnové délce použitého záření rovněž neodpovídá Rayleighově teorii a příslušná mocnina je menší než 4 [54,55].

Princip statického rozptylu světla

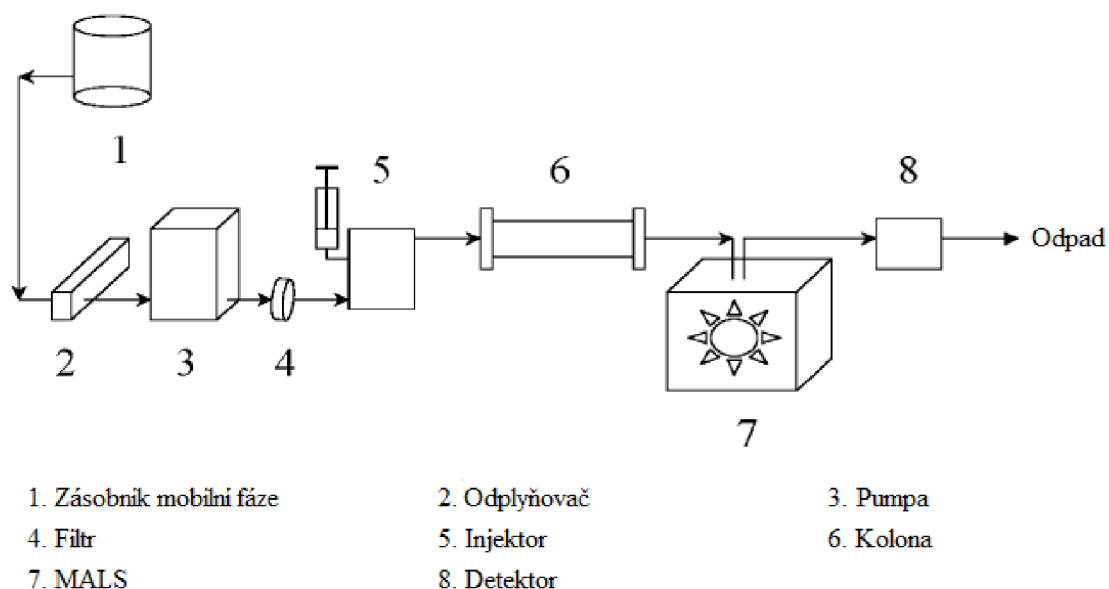
Po ozáření makromolekul laserovým paprskem dochází k tomu, že oscilující elektrické pole světla uvnitř makromolekul vyvolá oscilující dipól. Tento dipól vyzáří světlo, jehož intenzita závisí na velikosti zmíněného dipólu. Čím více bude makromolekula polarizovatelnější, tím větší bude indukovaný dipól v ní. Aby bylo možné na pozorovaných makromolekulách charakterizovat rozptyl, je nutné znát jejich polarizovatelnost. Toto lze vyřešit pomocí měření změn indexu lomu roztoku se změnou koncentrace. Přítomnost většího počtu makromolekul v roztoku dá vznik více oscilujícím dipólům, které budou více rozptylovat dopadající záření. Je tedy zřejmé, že intenzita rozptýleného světla je přímo úměrná koncentraci makromolekul v roztoku.

Při spojení dvou monomerních molekul v roztoku vzniká dimer. Tyto dvě molekuly se nebudou pohybovat každá zvlášť, ale dohromady stejným směrem. Rozptýlené světlo z dimeru je dvakrát intenzivnější než z každého odděleného monomeru. Z toho vyplývá, že při dvojnásobné hmotnosti molekuly (při zachování stejné koncentrace roztoku) se zdvojnásobí intenzita rozptýleného světla [56].

Kromě molekulové hmotnosti lze z měření rozptylu světla stanovit také druhý viriální koeficient, který nám poskytuje informaci o interakcích disperzních částic s disperzním prostředím. Pokud je druhý viriální koeficient kladný, tak částice jsou rozpuštěny v rozpouštědle. Může nabývat i záporných hodnot, to znamená, že částice budou mít tendenci k agregaci. Nastává i situace, kdy je druhý viriální koeficient roven nule, v tomto případě částice mají stejnou afinitu k rozpouštědлу i k ostatním částicím [43]. Z výsledků měření rozptylu světla lze stanovit i tzv. gyrační poloměr, což je parametr, který charakterizuje velikost částic libovolného tvaru. Je udáván jako vzdálenost od osy rotace, v níž by musela být soustředěna veškerá hmota částice, aby měla stejný moment setrvačnosti jako skutečná částice [24].

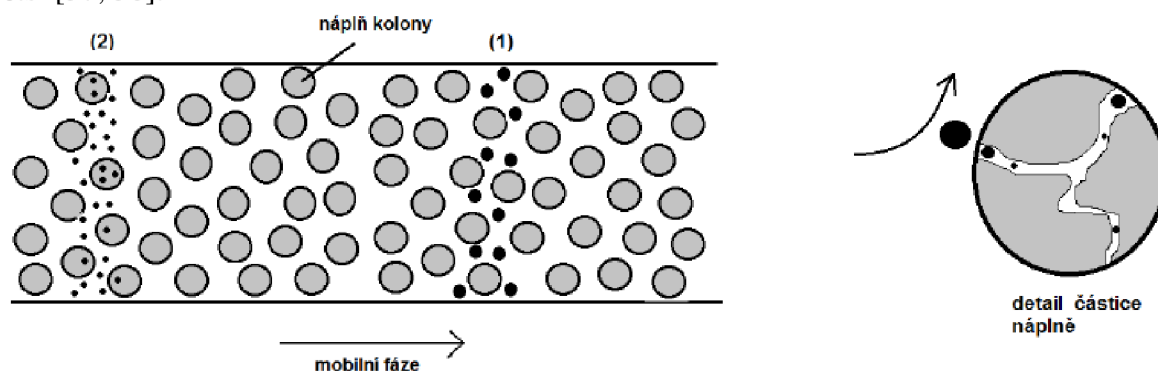
SEC-MALS

Metoda SEC-MALS spojuje dvě techniky, velikostně vylučovací chromatografii (Size Exclusion Chromatography – SEC) a statický rozptyl světla měřený ve více úhlech (Multi Angle Light Scattering – MALS). Tato metoda umožňuje souběžně stanovit molekulovou hmotnost a gyrační poloměr [57].



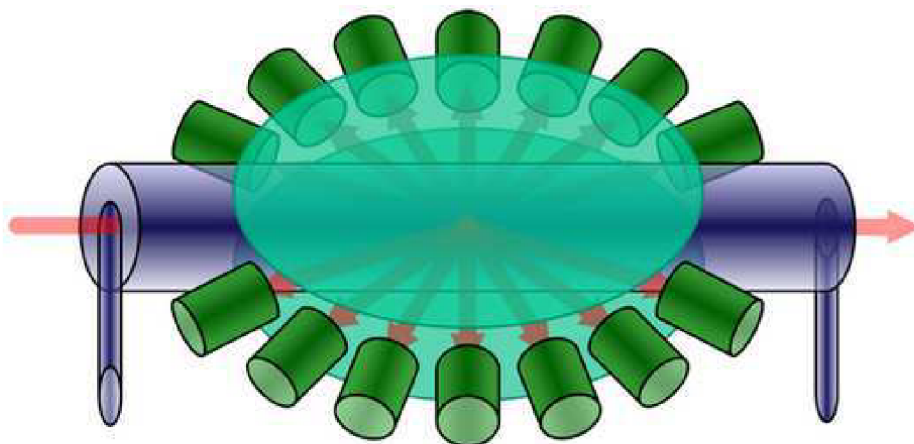
Obr. 14: Schématické znázornění SEC-MALS a jejích hlavních součástí [57]

Jak lze vidět na Obrázku 14, chromatograf se sestává ze zásobníku kapalné mobilní fáze, odplyňovače mobilní fáze, pumpy, filtru, komory, kde jsou vkládány vzorky v malých vialkách, ze kterých je autosamplerem nasáto dané množství vzorku a vstříknuto do kapalné mobilní fáze. Směs putuje ke koloně, která obsahuje stacionární fázi (náplň kolony) ve formě gelu. V tomto bodě dochází k separaci molekul podle molekulového síta. Jako první opouštějí kolonu makromolekuly, jejichž průměr je větší než velikost pórů kolony, které procházejí pouze prostorem mezi částicemi náplně. Čím menší jsou molekuly vzorku, tím hlouběji pronikají do pórů náplně, tím později jsou eluovány z kolony a jejich retenční čas je větší. Poslední opouštějí kolonu molekuly rozpouštědla, ve kterém byl vzorek připraven, jelikož tyto malé molekuly mohou pronikat i do nejmenších pórů náplně a jejich retenční čas je tak největší [57, 58].



Obr. 15: Princip dělení molekul podle velikosti v SEC [58]

Po separaci v koloně makromolekuly vstupují do MALS detektoru, kde jsou ozářeny laserovým paprskem. Systém MALS obsahuje několik detektorů statického rozptylu světla, které snímají intenzitu rozptýleného světla pod různými úhly [59].



Obr. 16: Tradiční MALS detektory a snímání rozptylu světla v podélné průtokové cele [60]

Po převodu signálu do příslušného softwaru v počítači lze vytvořit závislost rozptýleného světla na úhlu detekce. Extrapolací úhlu detekce na nulovou hodnotu a prostřednictvím rovnice (6) je vypočítána molekulová hmotnost.

$$\frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w \cdot P(\theta)} + 2 \cdot A_2 \cdot c, \quad (6)$$

ve výše uvedeném vztahu vyjadřuje $R(\theta)$ přebytečnou intenzitu rozptýleného světla, K optickou konstantu, která je závislá na indexu lomu rozpouštědla a jeho inkrementu, vlnové délce záření a Avogadrově konstantě, c koncentraci vzorku, M_w molekulovou hmotnost, $P(\theta)$ komplexní funkci úhlové závislosti na rozptýleném světle a A_2 druhý viriální koeficient [43,60].

Na systém SEC-MALS mohou být napojeny i další detektory jako například diferenční viskozimetr (differential viscometer – dVIS) a diferenční refraktometr (differential refractive index detector – dRI). Vysoce citlivý diferenční viskozimetr se velmi často používá ve spojení s SEC-MALS k určení velikosti a konformaci všech typů biopolymerů, syntetických polymerů a dokonce i proteinů a peptidů. Zmíněný detektor umožňuje měření specifické viskozity roztoku odečtením podílu rozpouštědla ve vyváženém kapilární mostu, který obsahuje čtyři kapiláry. V případě, že se v těchto kapilárách nachází čisté rozpouštědlo, výstupní tlak se bude rovnat vstupnímu tlaku. V přítomnosti polymerního roztoku dojde k tlakové nerovnováze systému, způsobené zvýšením viskozity v kapilárách. Kromě specifické viskozity umožňuje určit také molekulovou hmotnost. Detektor viskozity může být zapojen společně s detektorem indexu lomu. Princip tohoto detektoru spočívá v měření změn indexu lomu eluátu, procházejícího měřicí celou, v závislosti na koncentraci analytu [61,62,63]. DRI je vhodný pro řadu polymerů, patří mezi nejvíce běžně používané koncentrační detektory ve vylučovací chromatografii. Je považován za univerzální detektor, protože umožňuje detekovat jakoukoli látku, která má odlišný index lomu od rozpouštědla. Nicméně vykazuje některé nevýhody ve srovnání s ostatními detektory, jako je například

nízká citlivost ke koncentraci, závislost indexu lomu na molekulové hmotnosti a nežádoucí citlivost vůči teplotě a tlaku. Jak již bylo zmíněno, odezva detektoru je závislá na teplotě, tudíž je nutné detekční celu temperovat [64,65]. Pro zvýšení citlivosti měření a omezení rušivých vlivů, jsou refraktometry konstruovány v diferenčním vyhotovení, kde se porovnává index lomu eluátu s indexem lomu eluentu [66].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tato kapitola zahrnuje informace z dostupných publikací vztahujících se k tématu této diplomové práce. Postupně budou diskutovány jednotlivé vědecké publikace zabývající se přípravou polyelektrolytových komplexů hyaluronan-tenzid a využití různých instrumentálních metod pro jejich charakterizaci.

Několik dostupných vědeckých prací zabývajících se interakcemi hyaluronan-tenzid jsou kvůli záporně nabitému řetězci hyaluronanu zaměřeny zejména na kationické tenzidy. Níže jsou popsány některé poznatky a výsledky z článků týkajících se těchto systémů.

Jednou z prvních prací, která se zabývá výzkumem interakcí hyaluronanu a kationického tenzidu alkyltrimethylamonium bromid je článek Thalberga a kol. [39]. V této práci byl použit zmíněný kationický tenzid o délce řetězce 8, 9, 10, 12, 14 a 16 uhlíků v alkylové skupině. Pro charakterizaci tvorby polyelektrolytových komplexů autoři této práce využili konduktometrii, pozorování fázové separace, solubilizaci barviv a metodu ^1H NMR. Výsledky měření ukázaly, že v systémech obsahující tenzid s počty uhlíků 8 a 9 došlo k fázové separaci a precipitaci. Z toho vyplývá, že příslušný tenzid musí obsahovat alespoň deset uhlíků, aby docházelo k vytvoření ve vodě rozpustných systémů. Dále bylo prokázáno, že stačí velmi nízká koncentrace tenzidu k jeho navázání na hyaluronan. Nicméně tato vazba je slabší než vazba tenzidu s jinými karboxylovými polyelektrolyty v důsledku nízké lineární hustoty náboje hyaluronanu. Prostřednictvím interakcí hyaluronanu a kationických tenzidů tohoto typu dojde ke tvorbě agregátů podobných micelám. Tyto agregáty jsou vázány na kostře polyelektrolytu a velikostně jsou menší než volné micely tenzidu v roztoku bez přítomnosti polyelektrolytu.

V další práci Yin a kol. [41] využívali neionické (Cremophor EL, Tween 80) a anionické tenzidy (SDS). Interakce mezi hyaluronanem a těmito tenzidy byly studovány pomocí fluorescenčních metod za použití pyrenu jako fluorescenční sondy. Z naměřených dat bylo zjištěno, že interakce mezi hyaluronanem a neionickými tenzidy jsou extrémně slabé. Další výsledky ukazovaly téměř identickou hodnotu CMC pro tenzid Cremophor EL v přítomnosti i absenci hyaluronanu. Přídavek hyaluronanu do roztoku SDS způsobuje snižování jeho CMC v důsledku poklesu elektrostatické repulze. Toto naznačuje, že hyaluronan se chová podobně jako nízkomolekulární elektrolyt.

Jednou z dalších prací zabývajících se interakcemi hyaluronan-tenzid ve fyziologickém prostředí je práce Terezy Halasové a kol. [34]. Výsledky této práce ukázaly, že přítomnost NaCl může potlačit interakce mezi opačně nabitým polyelektrolytem a tenzidem, avšak tyto interakce mohou být stále přítomny v některých systémech hyaluronan-tenzid bez ohledu na ionickou povahu tenzidu. Tyto interakce byly prokázány hlavně pomocí techniky fluorescenční sondy, zatímco tenziometrie se zde moc neuplatnila. V přítomnosti hyaluronanu dochází k tvorbě agregátů (micel) pozvolna v určitém definovaném koncentračním rozmezí přidaného tenzidu. Největší vliv hyaluronanu byl pozorován u neionického tenzidu Tween 20, kdy CMC v přítomnosti hyaluronanu výrazně klesla, a kationického CTAB, kde se naopak CMC v přítomnosti hyaluronanu výrazně zvýšila, což může být způsobeno silnými hydrofobními interakcemi alkylových řetězců CTAB s hydrofobními částmi HA.

Práce Krouské [67] se zabývá vlivem hyaluronanu na micelizaci kationických tenzidů CTAB a TTAB (tetradecyltrimethylamonium bromid). K tomuto studiu byly použity různé

fyzikálně-chemické metody. Metoda izotermické titrační kalorimetrie byla použita pro stanovení entalpie micelizace a tenziometrie pro popis povrchového napětí daných vzorků. Součástí práce bylo také sledování vlivu různé molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu a délky alkylového řetězce tenzidu. Výsledky tenziometrického měření tenzidů v roztoku $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl s hyaluronanem ukazují, že agregační koncentrace CTAB a TTAB nebyly ovlivněny přidavkem hyaluronanu a žádná fázová separace nebyla zpozorována. Provedení stejných experimentů ve vodě ukázalo, že hyaluronan snižuje pouze hodnoty povrchového napětí a do agregační oblasti nezasahuje. Byly prokázány elektrostatické interakce a fázové separace, kdy fázová separace HA-CTAB je posunuta do vyšších koncentrací tenzidu a HA-TTAB do nižších koncentrací tenzidu. Mezi další práce Krouské a kol. [37] patří článek zabývající se termodynamikou tvorby micel kationických tenzidů CTAB a TTAB s přidavkem nebo absencí hyaluronanu. Experimenty byly provedeny ve vodném roztoku pomocí titrační kalorimetrie. Interakce mezi CTAB nebo TTAB a opačně nabitým hyaluronanem mohou být pozorovány vizuálně. V průběhu titrace roztoku tenzidu do roztoku hyaluronanu dochází ke změnám v systému, které lze pozorovat pouhým okem, kdy se systém změní z průhledného na neprůhledný, poté přechází v zakalený a nakonec dochází k fázové separaci. K fázové separaci dochází tehdy, když jsou náboje tenzidu i hyaluronanu v rovnováze. Prostřednictvím turbidimetrie a potenciometrie byly prokázáno, že molekuly tenzidu začínají interagovat s hyaluronanem již při velmi nízkých koncentracích, tedy v nadbytku hyaluronanu. Byly také pozorovány rozdíly mezi připravenými systémy s CTAB a TTAB. Tyto rozdíly byly interpretovány zejména z hlediska hydrofobních účinků, které vedle převládajících elektrostatických interakcí také přispívají k interakcím mezi hyaluronanem a kationickými povrchově aktivními látkami.

Felipe A. Oyarzun-Ampuero a kol. [68] se zabývali vývojem nových lékových nanonosičů, nazvaných hyaluronanové nanokapsle (HA nanokapsle), sloužící jako intracelulární nosičový systém pro hydrofobní léčiva s hlavním využitím zejména pro léčbu rakoviny. Příkladem takových účinných chemoterapeutických látek, které by mohly být tímto způsobem dodávány, jsou paclitaxel a docetaxel, neboli cytostatika přírodního původu extrahovaná z různých druhů tisů. Nanokapsle, složené z lipidového jádra a obalu tvořeného kyselinou hyaluronovou, byly připraveny technikou umožňující tvorbu polymerního pláště kolem lipidového jádra využívající kationický tenzid jako mezifázový můstek. Jako kationické tenzidy byly pro studii použity CTAB a BKC (benzalkonium chlorid). Modelový lék docetaxel byl efektivně zapouzdřený v jádru těchto nanokapslí a studie *in vitro* na buněčných kulturách (NCI-H460 buněčná linie rakoviny) ukázala, že cytotoxicita docetaxelu může být významně zvýšena právě díky jeho zapouzdření. Farmaceutické parametry jako uvolňování léčiv, stabilita během skladování, přeměna lyofilizací na prášek a lehká příprava činí z těchto nanokapslí slibné materiály pro intracelulární transport léčiv proti rakovině.

Cílem práce Krutišové a kol. [69] bylo připravit hyaluronanové nanočástice založené na elektrostatických interakcích s opačně nabitými molekulami, které byly zkoumány pomocí dvou metod: dynamický rozptyl světla a Laserová dopplerova velocimetrie. Metodou DLS byl zjištěn polydisperzní charakter hyaluronanu, systém HA-CTAB tvoří částice o velikosti stovky nanometrů. Částice vzniklé v roztoku NaCl byly menší než částice stejného systému vytvořeného ve vodném prostředí. Výsledky titračních experimentů prokázaly, že ke zvýšení

velikosti agregátů dochází v blízkosti bodu nulového náboje, systém hyaluronan-tenzid vykazuje v tomto bodě nulový potenciál a minimální stabilitu. Práce Pilgrové a Pekaře [70] se zabývá stabilitou nanočástic tvořených hyaluronanem a kationickým tenzidem Septonexem za využití metod DLS a fluorescenční spektroskopie. Nanočástice se skládaly ze dvou částí, hydrofobní jádro tvořené tenzidem a hydrofilní obal tvořený hyaluronovou vrstvou. Prostřednictvím těchto metod bylo prokázáno, že nanočástice hyaluronan-tenzid jsou ovlivňovány celou řadou aspektů, jako je teplota, iontová síla roztoku a doba skladování. Molekulová hmotnost hyaluronanu ovlivňuje stabilitu těchto systému nejméně. Připravené nanočástice byly dostatečně stabilní, ale nebyly schopny po zředění systému udržet aktivní hydrofobní látky v jádru. Tyto systémy jsou tedy velmi dynamické a reagují na sebemenší změny ve složení systému. I další práce Pilgrové a kol. [31] se zabývá tvorbou nanočástic tvořených hyaluronanem a kationickým tenzidem Septonexem. Interakce v těchto systémech byly studovány pomocí turbidimetrie a stabilita nanočástic pomocí dialýzy. Z výsledků provedených experimentů vyplývá, že tvorba agregátů závisí spíše na koncentraci hyaluronanu než na koncentraci tenzidu (zejména nad CMC tenzidu). Dále bylo zjištěno, že agregáty hyaluronan-tenzid jsou dostatečně stabilní po dobu 48 hodin a umožňují pomalé uvolňování tenzidu.

Následující části této kapitoly budou zaměřeny obecněji na charakterizace různých typů polyelektrolytových komplexů s důrazem na využití metod rozptylu světla.

Yin a kol. [71] se zabývali přípravou polyelektrolytových komplexů chitosanu a kyseliny poly(L-glutamové) (PLGA) při různém pH. Bylo zjištěno, že stechiometrie PECs je závislá na pH. Prostřednictvím metody infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) bylo prokázáno, že tvorba PECs je způsobena elektrostatickými interakcemi působícími mezi $-NH_3^+$ skupinami chitosanu a $-COO^-$ skupinami PLGA, interakce mezi těmito dvěma polymery jsou při nízkém pH relativně slabé. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie byl zjištěn kulovitý tvar komplexů. Vliv iontové síly na velikost PECs byl studován pomocí DLS, kdy velikost částic PECs je závislá na pH a s přidávkem NaCl se zvětšuje. PECs mají schopnost bobtnání a jsou citlivé vůči pH; tohoto může být využito při vývoji nosičů léčiv.

Wu a Delair [72] se podíleli na přípravě a stabilizaci polyelektrolytových komplexů hyaluronan/chitosan (HA/CH) za fyziologických podmínek. Tyto PECs nanočástice byly připraveny jednorázovým přidávkem daného množství hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti k chitosanu také o různé molekulové hmotnosti a stupni acetylce. V těchto případech měla molekulová hmotnost hyaluronanu i chitosanu významný vliv při tvorbě částic; při použití nízké a střední molekulové hmotnosti chitosanu ($2 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a nižší) došlo ke vzniku částic o stejné velikosti. V této práci byla použita metoda SEC-MALS k určení průměrné molekulové hmotnosti a indexu polydisperzity, jako mobilní fáze byl použit acetátový pufr. PECs vykazovaly stabilitu ve vodě po dobu nejméně jednoho měsíce při 4, 20 a 37 °C. Za fyziologických podmínek došlo k flokulaci částic a následně k jejich rozpuštění. Koloidní stabilita byla značně zvýšena prostřednictvím interakcí se zinkem (II). Pomocí DLS bylo zjištěno, že PECs jsou stabilní ve fosfátovém pufru (pH 7,3) po dobu delší než 35 dní při pokojové teplotě. Polyelektrolytovými komplexy hyaluronan/chitosan se zabýval také i Kayitmazer a kol. [73]. Pro zkoumání fázové separace těchto PECs byly

použity metody jako turbidimetrie, optická mikroskopie, DLS a měření zeta potenciálu. V závislosti na experimentálních podmínkách, nedošlo ve směsi HA/CH (čistý roztok) k interakcím a ani ke koacervaci, flokulaci nebo precipitaci. Na fázové chování systému HA/CH měly vliv následující faktory: iontová síla a pH média, stupeň ionizace biopolymerů, délka řetězce (molekulová hmotnost), stupeň deacetylace chitosanu a poměr nábojů HA/CH. Jedním z hlavních zjištění této studie je lineární vztah mezi iontovou silou a stupni ionizace na začátku fázové separace HA/CH. Vyšší stupeň deacetylace chitosanu (vyšší hustota náboje) a delší délka řetězce hyaluronanu za konstantní iontové síly usnadňují koacervaci. Zvýšení turbidity (zákalu) souvisí se změnami ve struktuře PECs; toto zjištění bylo potvrzeno metodou DLS. Poprvé byla koacervace pozorována při poměrech nábojů hyaluronan/chitosan ($[\text{COO}^-]/[-\text{NH}_3^+]$) mezi 0,09 a 0,46. Mimo tento rozsah byla koacervace nahrazena precipitací. V budoucích studiích se plánuje využití koacervátů HA/CH jako scaffoldů v regenerativní medicíně. Další prací zabývající se PECs hyaluronan/chitosan je článek, na kterém se podílel Lalevé a kol [74]. Byly zkoumány parametry, které ovlivňují proces tvorby HA/CH komplexů, a byl prokázán přímý vztah vizuálního pozorování (k lepší kvantifikaci) s DLS a reologickými vlastnostmi PECs. Pro kontrolu tvorby komplexů těchto dvou biopolymerů byla použita metoda přidavku NaCl do polyelektrolytového roztoku k zobrazení elektrostatických nábojů obou polyelektrolytů. Vlastnosti finálních komplexů jsou závislé na molární hmotnosti a stupni acetylace chitosanu stejně jako na zbytkové koncentraci soli. Při zvýšení poměru náboje $r = n_{\text{NH}_3^+}/n_{\text{COO}^-}$ (molární poměr mezi pozitivními náboji chitosanu a negativními náboji hyaluronanu) se PECs vyskytovaly ve formě koloidních suspenzí nebo koacervátů; ve které formě se budou vyskytovat, závisí na molekulové hmotnosti chitosanu. Hyaluronan i chitosan jsou známy pro své zajímavé biologické vlastnosti, proto studie a poznání HA/CH systémů je jedním z hlavních cílů v oblasti polyelektrolytů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakterizace materiálu

4.1.1 Hyaluronan

Hlavním používaným materiálem v této diplomové práci byl polysacharid hyaluronan sodný dodávaný společností Contipro Biotech s.r.o (Dolní Dobrouč, Česká Republika). Pro tuto práci byly vybrány tři vzorky hyaluronanu a různých molekulových hmotnostech.

Tab. 2: Přehled použitého hyaluronanu sodného

Materiál	Molekulová hmotnost	Šarže	CAS
LMW HA ^a	8–15 kDa	213-6147	9067-32-7
MMW HA ^b	250–450 kDa	230215-E1	9067-32-7
HMW HA ^c	1400–1600 kDa	181214-4-D1	9067-32-7

^a Low molecular weight hyaluronic acid

^b Medium molecular weight hyaluronic acid

^c High molecular weight hyaluronic acid

4.1.2 Tenzidy

Kromě hyaluronanu sodného byly v této diplomové práci použity také dva kationické tenzidy (Septonex a CTAB). Tenzid CTAB byl dodán společností Sigma-Aldrich s.r.o v podobě bílého prášku. Tenzid Septonex byl dodán společností GNB chem, a.s. také v podobě bílého prášku.

Tab. 3: Přehled použitých kationických tenzidů

Tenzid	Molekulová hmotnost	Šarže	CAS
CTAB	364,45 g·mol ⁻¹	SLBJ9504V	57-09-0
Septonex	422,28 g·mol ⁻¹	511SEPT003	10567-02-9

4.1.3 Rozpouštědla

Jako rozpouštědlo byla použita demineralizovaná voda PureLab flex ELGA.

4.2 Použité přístroje

Zetasizer Nano ZS

Stanovení velikosti částic a zeta potenciálu bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments, který byl používán současně se zapojeným titrátorem MPT-2 Multi Purpose také od firmy Malvern Instruments.

SEC-MALS

Stanovení molekulové hmotnosti bylo provedeno na přístroji SEC-MALS. Součástí toho přístroje je SEC chromatograf, pumpa, odplynovač, autosampler, UV-VIS detektor a kolona. Během experimentů byly použity dva typy kolon: obecná kolona PL aquagel-OH MIXED 8 μm pro měření molekulové hmotnosti v rozsahu 6 000 Da až 10 000 000 Da a dále byla použita kolona PL aquagel-OH 30 pro měření molekulové hmotnosti v rozsahu 100 Da až 60 000 Da. Všechny výše zmíněné části přístroje SEC-MALS jsou vyrobeny firmou Agilent Technologies. Hlavní měřicí část celé SEC-MALS sestavy je tvořena detektory – MALS detektor DAWN HELEOS II, diferenční viskozimetr VISCOSTAR II a diferenční refraktometr OPTILAB T-REX, vyrobené firmou Wyatt Technology.

Termogravimetrický analyzátor TGA Q5000

Pro stanovení obsahu popela a vlhkosti ve vzorcích byl použit termogravimetrický analyzátor TGA Q5000 od firmy TA Instruments.

EURO EA Elemental Analyzer

Pro určení elementárního složení vzorků byl použit přístroj EURO EA Elemental Analyzer od firmy Euro Vector Instruments & Software.

Analytické váhy

Pro navažování příslušného množství tenzidů a hyaluronanů při přípravě zásobních roztoků byly použity analytické váhy 224A od firmy DENVER INSTRUMENT. Tyto analytické váhy, s váživostí do 220 g, váží s přesností na 0,0001 g.

Pro navažování přesného množství tenzidů pro analýzu SEC-MALS byly použity analytické váhy Sartorius s váživostí na pět desetinných míst a přesností na 0,00001 g.

4.3 Příprava vzorků

Tato kapitola popisuje postup přípravy vzorků a zásobních roztoků pro jednotlivá měření. Během jejich přípravy byly využity automatické pipety, běžné laboratorní sklo a vybavení.

4.3.1 Příprava zásobních roztoků pro měření velikosti částic a zeta potenciálu

Na analytických vahách bylo naváženo příslušné množství hyaluronanu sodného dané molekulové hmotnosti, které bylo následně rozpuštěno v patřičném množství demineralizované vody v 50 cm³ odměrných baňkách. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky HA o koncentraci 1 g·dm⁻³ a molekulové hmotnosti 1400–1600 kDa, o koncentraci 2 g·dm⁻³ a molekulové hmotnosti 250–450 kDa a o koncentraci 5 g·dm⁻³ a molekulové hmotnosti 8–15 kDa. Pro dokonalé rozpuštění byly takto připravené roztoky míchány na magnetické míchačce po dobu 24 hodin. Hotové zásobní roztoky hyaluronanu byly uchovávány v lednici při teplotě do 5 °C.

Zásobní roztoky tenzidů (CTAB, Septonex) byly připraveny navážením požadovaného množství daného tenzidu do kádinky, která byla naplněna demineralizovanou vodou jen z části, poté byla ponechána na magnetické míchačce pro úplné rozpuštění tenzidu. Po dokonalém rozpuštění tenzidu byl roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn po rysku na požadovaný objem. Roztoky tenzidů byly ponechány na magnetické míchačce minimálně po dobu 12 hodin. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky CTAB a Septonexu o koncentraci 20 mmol·dm⁻³, které byly ponechány při laboratorní teplotě.

Stejným způsobem byly připraveny také zásobní roztoky hyaluronanu a tenzidů pro srážecí experimenty. Při těchto experimentech bylo vizuálně pozorováno chování systémů hyaluronan-tenzid.

4.3.2 Příprava zásobních roztoků a vzorků pro SEC-MALS

Na analytických vahách bylo naváženo vypočítané množství hyaluronanu, které bylo rozpuštěno v demineralizované vodě v 50 cm³ odměrných baňkách. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky hyaluronanu o koncentraci 2 g·dm⁻³ a molekulové hmotnosti 1400–1600 kDa, o koncentraci 4 g·dm⁻³ a molekulové hmotnosti 250–450 kDa a o koncentraci 10 g·dm⁻³ a molekulové hmotnosti 8–15 kDa. Pro dokonalé rozpuštění byly takto připravené roztoky míchány na magnetické míchačce po dobu 24 hodin. Všechny zásobní roztoky hyaluronanu byly uchovávány v lednici při teplotě do 5 °C.

Byly připraveny roztoky tenzidů o různých koncentracích. Vždy pro daný tenzid byla stanovena koncentrační řada vztahující se k hyaluronanu o dané molekulové hmotnosti (viz. Tab. 4). Rozsahy jednotlivých koncentračních řad vycházejí z výsledků titračního stanovení kritických agregačních koncentrací tenzidů v roztocích hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech získaných pomocí Zetasizeru Nano ZS (viz. Kapitola 5.3). Tyto řady byly připraveny navážením daného množství tenzidu na analytických vahách s přesností 0,00001 g do skleněné vialky. Navážené množství tenzidu bylo rozpuštěno ve 2,5 cm³ demineralizované vody, takto připravené roztoky byly ponechány na magnetické míchačce po dobu minimálně 12 hodin.

Pro konečnou přípravu směsných vzorků hyaluronan-tenzid bylo napipetováno 2,5 cm³ zásobního roztoku hyaluronanu do roztoku tenzidu. Výsledná koncentrace hyaluronanu ve vzorcích byla tedy poloviční oproti jejich zásobním roztokům. Připravené koncentrační řady vzorků byly ponechány na magnetické míchačce po dobu minimálně 12 hodin.

Tab. 4: Přehled připravených koncentračních řad tenzidů pro jednotlivé použité HA

Hyaluronan		Koncentrační řada tenzidů (mmol·dm ⁻³)	
Typ HA	Výsledná koncentrace (g·dm ⁻³)	CTAB	Septonex
LMW	5	0; 3,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5	0; 2; 4,5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5
MMW	2	0; 2,5; 3,5; 4; 4,25; 4,5	0; 2; 3,5; 4; 4,25; 4,5
HMW	1	0; 1; 1,5; 2; 2,25; 2,5	0; 1; 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5

4.4 Popis nastavení měření

4.4.1 Termogravimetrická analýza

U všech vzorků hyaluronanu byl termogravimetrickou analýzou (TGA) stanoven obsah popela a vlhkosti. Popel udává, kolik vzorek obsahuje nespalitelného anorganického zbytku. Jeho obsah byl stanoven z váhového úbytku hmoty při teplotě 550 °C. Vlhkost byla stanovena z váhového úbytku při 110 °C. K provedení této analýzy bylo potřeba ≈3,5 mg vzorku. Obsah popela a vlhkosti v analyzovaných vzorcích je vyjádřen v hmotnostních procentech.

Obdobně byl stanoven obsah popela i vlhkost rovněž pro použité kationické tenzidy. Pro provedení této analýzy bylo potřeba ≈3,3 mg CTAB a ≈7,2 mg Septonexu.

4.4.2 Elementární analýza

K charakterizaci vybraných vzorků hyaluronanu sodného a tenzidů byla také použita metoda elementární analýzy, pomocí které byl stanoven obsah jednotlivých organických prvků ve vzorcích. K provedení těchto experimentů byl použit ≈1 mg vzorku a každý vzorek byl proměřen vždy třikrát. Naměřené hodnoty byly v programu MS Excel zprůměrovány. Zastoupení obsažených prvků ve vzorcích je vyjádřeno v hmotnostních procentech. U každého vzorku byl určen obsah těchto prvků: C, H, N, S a O.

4.4.3 Měření na přístroji Zetasizer Nano ZS

Při každém měření bylo napipetováno vždy 10 cm³ ze zásobního roztoku hyaluronanu (titrovaný roztok) do plastové zkumavky se závitkem a magnetickým míchadlem. Tato zkumavka byla připevněna k automatickému titrátoru Zetasizeru Nano ZS. Do vialky byl převeden roztok již přichystaného tenzidu (titrační činidlo). Tato vialka byla rovněž umístěna do pozice pro titrační roztok na titrátoru.

Prostřednictvím softwaru přístroje byl nastaven průběh měření. Všechny vzorky byly vytemperovány na 25 °C po dobu 60 s. Při nastavení měření v módu titrace *Size and Zeta Potencial* byly nastaveny titrační experimenty, kdy byl roztok hyaluronanu titrován roztokem

tenzidu. V nastavení softwaru byla jako materiál vybrána kyselina hyaluronová a jako rozpouštědlo voda. V každém bodě analýzy byly proměřeny zeta potenciál a Z-průměr velikosti částic vždy třikrát. Délka měření se odvíjela od nastavení koncentračního rozmezí tenzidu během titračních experimentů. Nejčastěji bylo toto rozmezí nastaveno od 0 do 7 mmol·dm⁻³. Výjimkou však byla analýza LMW HA, kdy bylo toto rozmezí nastaveno od 0 do 9 mmol·dm⁻³ z důvodu zjištění izoelektrického bodu (IEP), který byl detekován až nad hodnotami koncentrace 7 mmol·dm⁻³.

Naměřené hodnoty zeta potenciálu a velikosti částic z provedených měření byly v programu MS Excel zprůměrovány a byly stanoveny jejich směrodatné odchylky. Tyto odchylky jsou v grafech zobrazeny v podobě chybových úseček.

4.4.4 Měření pomocí SEC-MALS

Před analýzou pomocí SEC-MALS byly všechny vzorky připravené dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.2 přefiltrovány přes stříkačkový filtr s póry o velikosti 0,45 μm. Vzhledem k molekulové hmotnosti vybraného roztoku kyseliny hyaluronové byla zvolena vhodná kolona. Jako mobilní fáze byl použit dusičnan sodný o koncentraci 0,1 mol·dm⁻³ s přídavkem azidu sodného o koncentraci 5 mmol·dm⁻³. Objem nástřiku každého analyzovaného vzorku do systému byl 100 μl a průtok tímto systémem byl nastaven na 0,6 cm³ za minutu. Jako inkrement indexu lomu byla zadána hodnota 0,165 cm³·g⁻¹, která přísluší kyselině hyaluronové. Každý vzorek byl proměřen minimálně třikrát a doba analýzy jednoho vzorku trvala 60 minut. Všechna naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru Astra 6.1.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace použitých materiálů

5.1.1 Hyaluronan sodný

Charakterizace použitých vzorků hyaluronanu sodného byla provedena prostřednictvím termogravimetrické a elementární analýzy, což jsou metody umožňující stanovit obsah popela, vlhkosti a obsah jednotlivých organických prvků ve vzorcích. Pro charakterizaci hyaluronanu byla rovněž využita metoda SEC-MALS, kterou byly určeny molekulové hmotnosti studovaných vzorků. Výsledné chromatogramy jsou uvedeny v příloze této diplomové práce. Z chromatogramů je patrné, že nejkratší eluční čas má vysokomolekulární hyaluronan, nejdéle byl v koloně zadržován nízkomolekulární hyaluronan a má tedy nejdelší eluční čas. Toto potvrzuje separaci molekul na koloně podle molekulového síta. Výsledky z použitých metod jsou shrnuty v Tabulce 5 a Tabulce 6.

Tab. 5: Charakteristika použitých vzorků hyaluronanu sodného

Materiál	Molekulová hmotnost (kDa)	Vlhkost (hm.%)	Popel (hm.%)
LMW HA	7,0±0,3	9,03	34,85
MMW HA	258±9	6,34	35,23
HMW HA	710±7	10,68	33,56

Tab. 6: Zastoupení jednotlivých prvků ve vzorcích hyaluronanu sodného

Hyaluronan	Zastoupení vybraných prvků (hm.%)				
	C	H	N	S	O
LMW	36,336	6,280	2,810	0	10,694
MMW	38,763	6,794	3,020	0	9,854
HMW	36,600	6,288	2,858	0	10,014

Ve vzorcích byl nejvíc zastoupen uhlík. Druhé největší zastoupení patří kyslíku, který je součástí funkčních skupin hyaluronanu (hydroxylová, karboxylová, ketonická). Ve vzorcích se nachází také dusík, který je součástí hyaluronanu jako amidová funkční skupina.

5.1.2 Tenzidy

Obdobně jako v případě hyaluronanu byly i použité tenzidy charakterizovány prostřednictvím TGA (stanovení obsahu popela a vlhkosti) a elementární analýzy pro stanovení obsahu jednotlivých prvků v tenzidech. Získané výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 7.

Tab. 7: Výsledky TGA a elementární analýzy

Tenzid	Zastoupení vybraných prvků (hm.%)					Obsah vlhkosti a popela (hm.%)	
	C	H	N	S	O	Vlhkost	Popel
CTAB	66,990	11,219	3,622	0	18,199	0,05	0
Septonex	60,507	11,045	3,089	0	25,330	0	0,03

Opět i v tenzidech byl nejvíce zastoupen uhlík, druhé největší zastoupení patří kyslíku a třetí vodíku. Ve vzorcích byl detekován také dusík, který je součástí vybraných kationických tenzidů ve formě kvartérního dusíkového atomu.

5.2 Srážecí experimenty

Při srážecích experimentech bylo postupováno tak, že do průhledné vialky byly napipetovány 2 cm³ hyaluronanu o příslušné koncentraci a molekulové hmotnosti. K těmto 2 cm³ bylo napipetováno takové množství 20 mmol·dm⁻³ tenzidu, aby konečná koncentrace tenzidu v roztoku odpovídala předem určené koncentraci (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mmol·dm⁻³). Vialky byly uzavřeny, pečlivě protřepány, chvíli ponechány a vizuálně pozorovány.

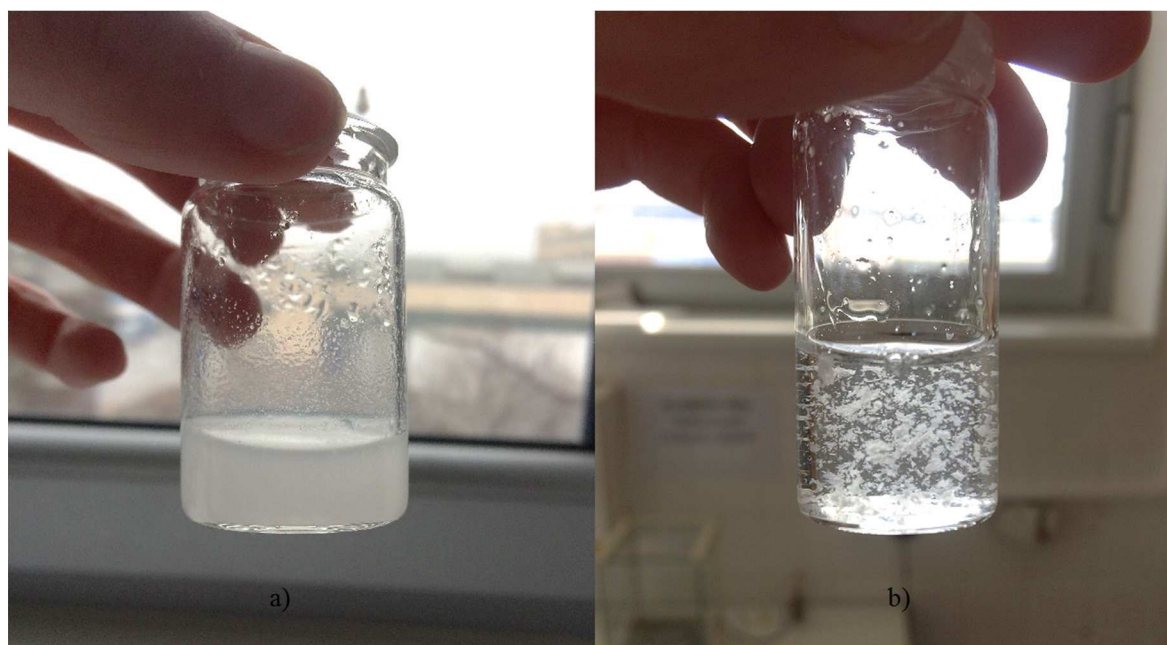
Po přidavku tenzidu do hyaluronanu došlo vždy k zakalení roztoku. V některých případech bylo pozorováno nejen zakalení, ale i vznik sraženiny volně se vznášející v roztoku. V tomto případě vznik sraženiny detekuje agregaci v systému. Bylo také vyzorováno, že se vznikem sraženiny ubývá zákalu a roztok přechází v transparentní. U systémů hyaluronan-CTAB byl počátek agregace vizuálně detekován lépe, z důvodu vytvoření dobře viditelné sraženiny. U systémů hyaluronan-Septonex byla zřetelná pouze změna zakalení a tvorba sraženiny byla odhalena až velmi pečlivým pozorováním. U systému nízkomolekulárního hyaluronanu se Septonexem se vizuálně nepodařilo agregaci detekovat. Vhodné koncentrační rozmezí Septonexu pro detekci agregace bylo nalezeno až během titračních experimentů. V tabulce 8 jsou zaznamenány koncentrační rozsahy tenzidů, při kterých dochází k agregaci v systému s hyaluronanem.

Tab. 8: Koncentrace tenzidů při agregaci zjištěná pomocí srážecích experimentů

Hyaluronan		Koncentrace tenzidu při agregaci (mmol·dm ⁻³)	
Typ	Koncentrace (g·dm ⁻³)	CTAB	Septonex
LMW HA	5	6–8	–
MMW HA	2	3–5	4
HMW HA	1	2–3	2–3

Obrázek 17 představuje dvě fotografie pořízené během srážecích experimentů. Obě dvě fotografie zachycují systém hyaluronan-tenzid, přičemž Obrázek 17 a) zobrazuje systém hyaluronan-Septonex a Obrázek 17 b) hyaluronan-CTAB. Na první pohled je viditelný rozdíl

mezi těmito systémy, a to v jejich zakalení a obsahu sraženiny. Jak již bylo zmíněno, u vzorků hyaluronan-Septonex bylo obtížné detekovat agregaci, což potvrzuje Obrázek 17 a), kde lze pozorovat zakalený roztok a nepatrné malé části sraženiny ulpěné na vialce. Na Obrázku 17 b) u systému hyaluronan-CTAB jsou patrné velké a dobře viditelné kousky sraženiny volně se vznášející v roztoku.



*Obr. 17: a) Systém hyaluronan-Septonex zobrazující mléčné zakalení
b) Systém hyaluronan-CTAB zobrazující transparentní roztok se sraženinou*

Výše uvedené srážecí experimenty byly provedeny s cílem nalézt vhodný rozsah koncentrací tenzidů pro následující titrační měření provedené na přístroji Zetasizer Nano ZS.

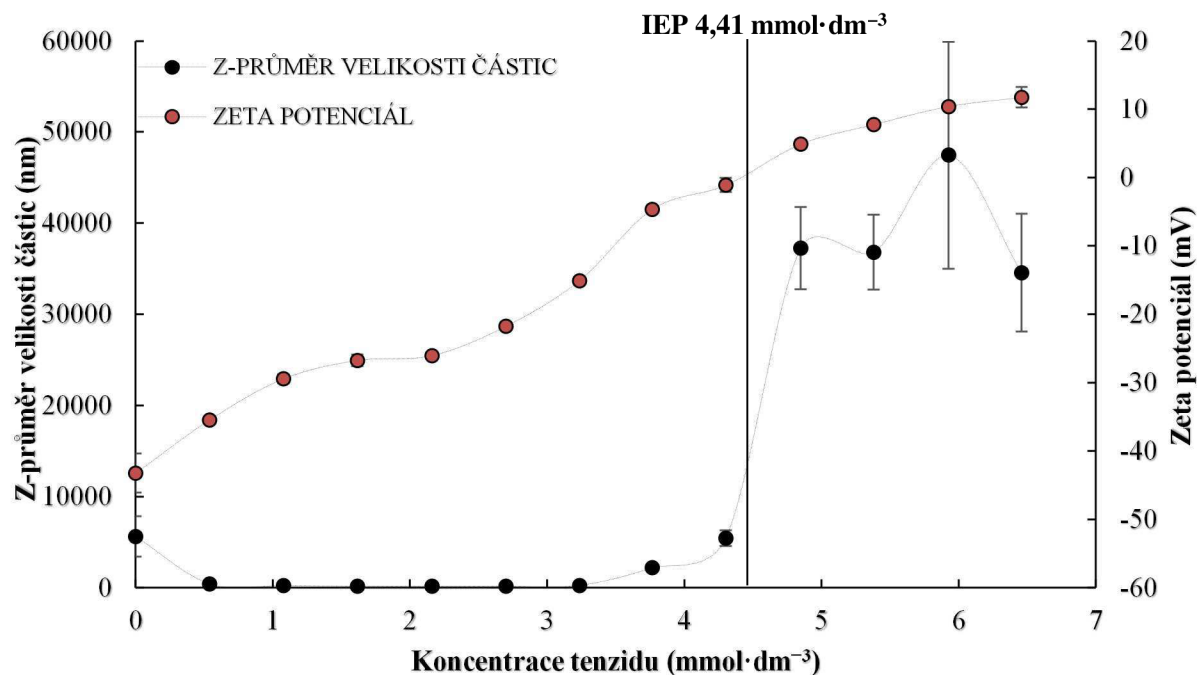
5.3 Měření velikosti částic, zeta potenciálu a indexu polydisperzity

Tvorba polyelektrolytových komplexů byla následně sledována měřením Z-průměru velikosti částic, zeta potenciálu a indexu polydisperzity (PDI) pomocí titračních experimentů.

Tato metoda je velice citlivá na přítomnost velkých částic (agregátů) a umožňuje stanovit prvopočáteční agregaci systému v závislosti na přídatku tenzidu.

5.3.1 Titrace sledující velikost částic a zeta potenciál

Byly provedeny titrační experimenty, kdy k roztoku hyaluronanu byl titrován roztok tenzidu. Byl použit hyaluronan o třech molekulových hmotnostech. Titrace hyaluronanu s vybraným tenzidem byly opakovány nejméně třikrát. Na Obrázku 18 je znázorněn příklad získané titrační křivky hyaluronanu o střední molekulové hmotnosti a koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a kationického tenzidu Septonexu o koncentraci $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obr. 18: Titrace MMW HA ($2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) Septonexem ($20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), závislost Z-průměru velikosti částic a zeta potenciálu na koncentraci tenzidu

Z naměřených hodnot byla sestrojena závislost Z-průměru velikosti částic (nm) a zeta potenciálu (mV) na koncentraci tenzidu ($\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Jako první metoda pro vyhodnocení titračních křivek byla vybrána metoda 2 přímk. Z Obrázku 18 je zřejmé, že k velkému nárůstu velikosti částic dochází přibližně při koncentraci $4,3 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Septonexu v systému. Pro určení přesné koncentrace při kritické agregační koncentraci byly vybrány vhodné body před a po detekované agregaci v systému, kterou lze identifikovat na základě skokového nárůstu Z-průměru velikosti částic hyaluronanu v měřeném vzorku. Tato závislost je představována dvěma přímkami s rozdílnými směrnici. První přímka odpovídá koncentraci tenzidu pod CAC, druhá přímka zase nad CAC. Pro zjištění hodnoty CAC tenzidu v roztoku měřeného hyaluronanu byla použita metoda průsečíku dvou rovnic regresních přímk, které byly položeny oběma lineárními úseky závislosti velikosti částic na koncentraci tenzidu (první přímka před agregací, druhá po agregaci). Vše bylo provedeno v programu MS Excel.

Vyhodnocení bylo také provedeno prostřednictvím programu Origin 7.5 za účelem nalezení koncentrace tenzidu při CAC. Z naměřených dat byla sestrojena závislost Z-průměru velikosti částic na přidavku tenzidu. Z derivace této křivky byla zjištěna hodnota CAC.

Třetí způsob získání hodnoty CAC vychází z měření zeta potenciálu během titračních experimentů. Přídavkem kationického tenzidu k záporně nabitému hyaluronanu postupně docházelo ke snižování absolutní hodnoty zeta potenciálu systému k nule, což je hodnota tzv. izoelektrického bodu. Z porovnání titračních křivek získaných pro detekci Z-průměru velikosti částic a zeta potenciálu je zřejmé, že pokles absolutní hodnoty zeta potenciálu je provázen rychlou agregací systému. Z toho důvodu byla stanovená hodnota IEP použita při výpočtu CAC jednotlivých systémů hyaluronan-tenzid.

Z Obrázku 18 lze vyčíst, že z počátku titrace zeta potenciál systému hyaluronan-tenzid nabývá vysoce záporných hodnot až -43 mV, avšak po dosažení IEP systém přechází z těchto hodnot k hodnotám kladným, a to 12 mV. V tomto případě je možné říci, že systém po dosažení izoelektrického bodu přechází ze stabilního stavu do nestabilního stavu.

Z naměřených hodnot byl sledován také index polydisperzity, pro který je typické, že se zvyšuje s rostoucí heterogenitou systému. Z výsledků bylo zjištěno, že tento index před dosažením kritické agregační koncentrace nabývá nízkých hodnot a po dosažení této koncentrace narůstá.

Všechna naměřená data z titračních experimentů byla zpracována a vyhodnocena výše popsaným způsobem. Byly stanoveny hodnoty kritické agregační koncentrace pro jednotlivé systémy hyaluronan-tenzid. Tyto hodnoty jsou zobrazeny v Tabulce 9.

Tab. 9: Výsledné CAC komplexů hyaluronan-tenzid

Materiál	Kritická agregační koncentrace ($\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	
	CTAB	Septonex
LMW HA	$6,925\pm 0,728$	$6,247\pm 0,640$
MMW HA	$4,328\pm 0,427$	$4,229\pm 0,148$
HMW HA	$2,668\pm 0,659$	$2,505\pm 0,339$

Z výsledků je zřejmé, že se zvyšující molekulovou hmotností hyaluronanu se snižuje CAC; to platí pro oba zkoumané systémy (hyaluronan-CTAB a hyaluronan-Septonex). Můžeme také říci, že výsledné hodnoty CAC získané titračními experimenty jsou v souladu s rozmezími koncentrací, kdy docházelo k agregaci vzorků během srážecích experimentů (kapitola 5.2). Stanovená hodnota kritické agregační koncentrace LMW HA je vyšší u systému s tenzidem CTAB než v systému se Septonexem. U vzorků HMW a MMW HA jsou stanovené hodnoty CAC pro oba tenzidy téměř totožné.

Tab. 10: Index polydisperzity (PDI) čistých vzorků HA a při kritické agregační koncentraci

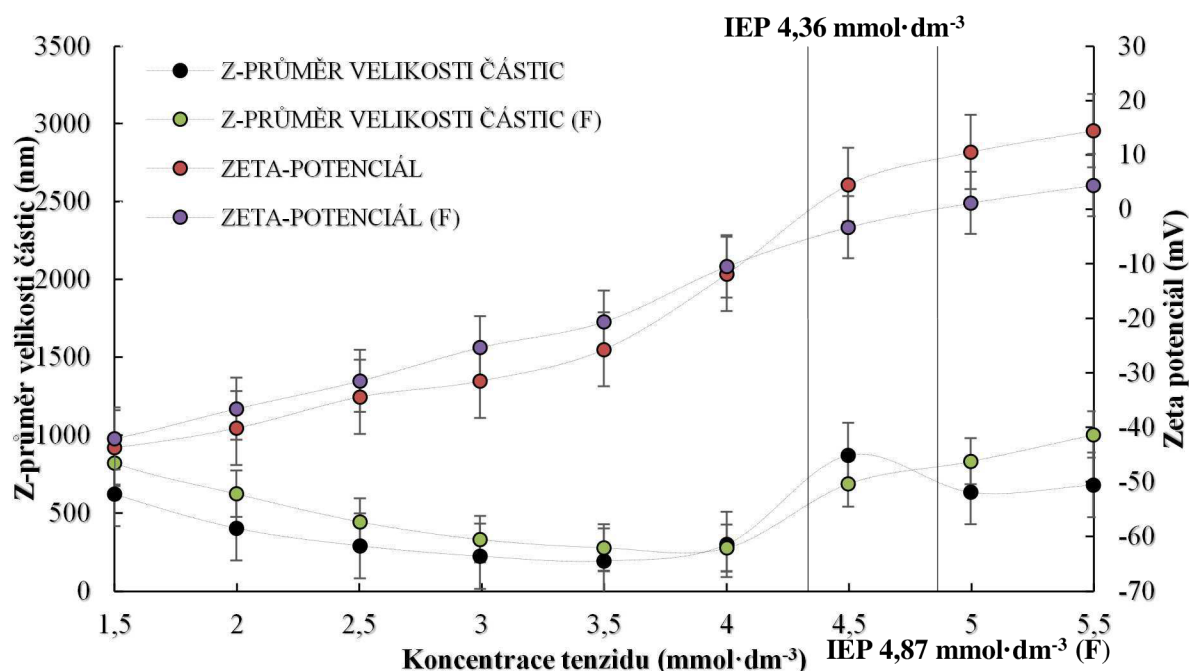
Materiál	Index polydisperzity (-)		
	Nepřítomnost tenzidu	CAC	
	Čistý vzorek HA	CTAB	Septonex
LMW HA	$0,421\pm 0,049$	$0,977\pm 0,042$	$0,984\pm 0,038$
MMW HA	$0,360\pm 0,012$	$0,986\pm 0,034$	$0,956\pm 0,082$
HMW HA	$0,325\pm 0,038$	$0,983\pm 0,041$	$0,936\pm 0,100$

Získané hodnoty indexu polydisperzity z provedených titračních měření byly v programu MS Excel zprůměrovány a byly stanoveny jejich směrodatné odchylky. Tyto hodnoty jsou uvedeny výše v Tabulce 10. Z výsledků měření je zřejmé, že se hodnoty PDI u vzorků čistého hyaluronanu pohybují v rozmezí cca 0,33 až 0,42, zatímco hodnoty PDI systémů hyaluronan-tenzid se při CAC blíží k 1.

Z výsledků získaných titračními experimenty se odvíjela nastavení následující analýzy pomocí SEC-MALS. Koncentrační řady jednotlivých vzorků analyzované na SEC-MALS byly zvoleny tak, aby vždy v každé řadě většina analyzovaných vzorků obsahovala koncentrace tenzidů předcházející CAC (4–6 vzorků), předposlední vzorek v každé řadě pak byl připraven v poměru odpovídající CAC a poslední vzorek v řadě byl vždy těsně za CAC.

5.3.2 Titrační křivka filtrovaného vs. nefiltrovaného hyaluronanu s tenzidem

Kromě klasických titračních experimentů bylo rovněž porovnáváno, jestli je nutné studovaný systém filtrovat před samotnou analýzou na Zetasizeru Nano ZS. V této části práce byla pro vybraný vzorek MMW HA porovnávána získaná data pro nefiltrovaný vzorek HA s měřením, ve kterém byl hyaluronan před titrací přefiltrován přes stříkačkový filtr (póry 0,45 μm). Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že filtrace hyaluronanu nemá na agregaci a hodnotu CAC žádný efekt. Výsledky tohoto měření jsou v souladu s předchozími provedenými titračními experimenty, kdy hyaluronan nebyl přefiltrován.



Obr. 19: Titrace filtrovaného a nefiltrovaného MMW HA ($2\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) tenzidem CTAB ($20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), závislost Z-průměru velikosti částic a zeta potenciálu na koncentraci tenzidu

Na Obrázku 19 jsou zobrazeny titrační křivky nefiltrovaného a filtrovaného hyaluronanu titrovaného tenzidem CTAB, které představují závislost Z-průměru velikosti částic (nm) a zeta potenciálu (mV) na koncentraci tenzidu ($\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Legenda s popiskem obsahující (F) náleží filtrovanému hyaluronu. Lze vidět, že po dosažení koncentrace $4\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tenzidu v systému dochází k nárůstu velikosti částic. Právě při této koncentraci CTAB dochází k agregaci v obou systémech. Titrační křivky, zobrazující závislost zeta potenciálu na koncentraci tenzidu, jsou téměř totožné pro oba systémy a přecházejí ze záporných hodnot do kladných. S narůstajícím objemem (tedy i koncentrací) tenzidu v systému hyaluronan-

tenzid přechází systém ze stabilního stavu do nestabilního stavu. Během titračních experimentů byly detekovány izoelektrické body odpovídající nulovému náboji na řetězcích hyaluronanu. Z naměřených hodnot byly vypočítány přesné koncentrace tenzidů při CAC, pomocí metody dvou přímek v programu MS Excel a prostřednictvím programu Origin 7.5, které jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tab. 11: Výsledky titračních experimentů filtrovaného a nefiltrovaného hyaluronanu s CTAB

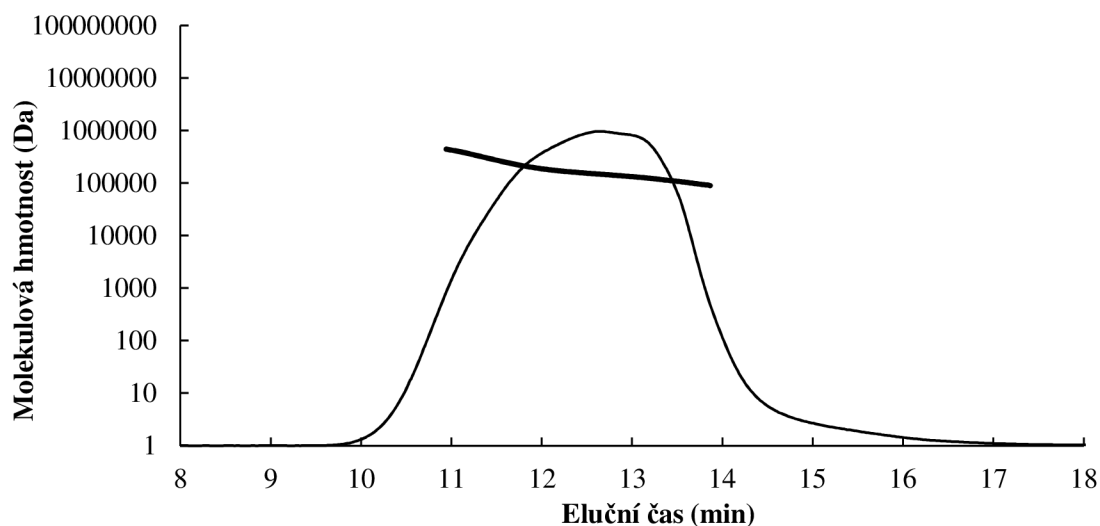
Hyaluronan	Koncentrace tenzidu při CAC ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)		
	IEP ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Metoda 2 přímek (Z-average)	Origin (derivate)
MMW HA	4,36	3,92	3,99
MMW HA (F) ^a	4,87	3,91	4,00

^a filtrovaný hyaluronan sodný

5.4 Analýza polyelektrolytových komplexů metodou SEC-MALS

Také metoda SEC-MALS byla využita ke stanovení kritické agregační koncentrace tenzidů v systémech hyaluronan-tenzid. Nastavení této analýzy se odvíjelo z výsledků, které byly získány z provedených titračních experimentů.

Výstupem z analýzy jednotlivých vzorků byl vždy chromatografický signál, který byl dále zpracován v programu Astra 6.1. Na Obrázku 20 je znázorněn získaný chromatografický signál, závislost molekulové hmotnosti (Da) na elučním čase (min), patřící hyaluronanu střední molekulové hmotnosti, který je kolonou vylučován mezi 10. až 17. minutou. Kromě chromatogramu je na Obrázku 20 zobrazena také křivka odpovídající naměřené molekulové hmotnosti a její distribuci podél píku daného vzorku.



Obr. 20: Chromatogram MMW HA, závislost molekulové hmotnosti na elučním čase

Z naměřených dat získaných metodou SEC-MALS byly vytvořeny následující Tabulky 12 a 13. Tabulka 12 obsahuje data příslušející systému hyaluronan-CTAB a Tabulka 13 obsahuje data příslušející systému hyaluronan-Septonex. Nalezneme v nich veličiny jako molekulová hmotnost, gyrační poloměr, polydisperzita, detekovaná hmotnost a konformační koeficient.

Tab. 12: Hodnoty získané analýzou SEC-MALS, systém hyaluronan-CTAB

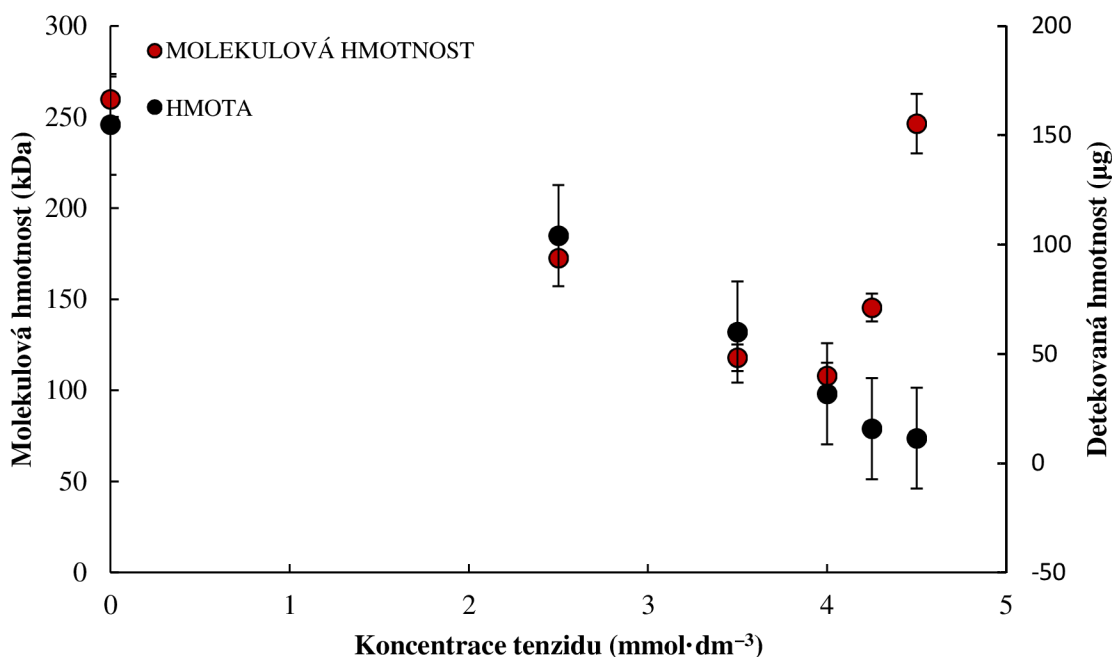
HA		CTAB				
Typ	Koncentrace (mmol·dm ⁻³)	Molekulová hmotnost (kDa)	Polydisperzita (-)	Gyrační poloměr (nm)	Detekovaná hmotnost (μg)	Konformační koeficient (-)
LMW HA	0,0	7,20±0,34	1,030±0,031	8,5±2,0	443,5±76,4	0,430±0,014
	3,5	5,26 ±0,13	1,026±0,023	7,5±0,6	329,5±26,8	0,418±0,000
	6,0	4,40±0,12	1,028±0,019	6,6±1,5	257,7±32,9	0,415±0,007
	6,5	4,19±0,04	1,025±0,016	6,4±0,5	226,0±23,4	0,390±0,014
	7,0	4,06±0,05	1,026±0,016	12,9±3,7	217,5±20,9	0,400±0,000
	7,5	3,94±0,14	1,016±0,014	13,3±1,2	189,0±4,2	0,395±0,007
	8,0	3,70±0,12	1,042±0,012	16,1±7,0	215,9±4,4	0,395±0,007
	8,5	3,65±0,06	1,034±0,024	20,5±5,2	199,1±15,3	0,385±0,007
MMW HA	0,00	259,7±12,5	1,042±0,017	60,6±1,1	159,9±6,2	0,475±0,021
	2,50	172,6±3,0	1,200±0,041	48,0±1,6	104,0±3,8	0,435±0,021
	3,50	117,9±7,3	1,182±0,049	37,2±2,1	60,0±9,0	0,405±0,021
	4,00	107,9±7,2	1,502±0,151	35,6±4,0	31,7±8,9	0,425±0,007
	4,25	145,4±7,7	1,596±0,058	37,2±2,4	15,8±5,5	0,440±0,042
	4,50	246,4±16,4	1,861±0,226	55,6±7,4	11,5±6,2	0,690±0,156
HMW HA	0,00	731,2±20,8	1,040±0,029	106,3±2,7	91,8±4,3	0,470±0,099
	1,00	706,6±13,1	1,048±0,023	101,5±1,2	59,0±2,4	0,470±0,014
	1,50	691,2±13,0	1,105±0,114	93,2±6,0	44,2±3,4	0,460±0,021
	2,00	652,5±13,1	1,206±0,130	89,5±2,1	29,1±3,2	0,440±0,057
	2,25	645,8±6,4	1,477±0,165	84,7±0,8	21,5±1,4	0,465±0,021
	2,50	964,2±75,2	1,883±0,031	194,9±43,5	4,2±1,1	0,715±0,134

Tab. 13: Hodnoty získané analýzou SEC-MALS, systém hyaluronan-Septonex

HA		Septonex				
Typ	Koncentrace (mmol·dm ⁻³)	Molekulová hmotnost (kDa)	Polydisperzita (-)	Gyrační poloměr (nm)	Detekovaná hmotnost (μg)	Konformační koeficient (-)
LMW HA	0,0	6,94±0,34	1,004±0,003	4,1±2,7	358,4±11,7	0,605±0,021
	2,0	5,80±0,10	1,007±0,003	4,7±3,5	352,8±6,4	0,480±0,014
	4,5	4,83±0,10	1,006±0,001	4,7±4,1	278,9±3,7	0,435±0,021
	5,5	4,53±0,05	1,008±0,002	4,4±3,8	248,6±4,8	0,445±0,007
	6,0	4,40±0,08	1,019±0,021	3,6±6,2	235,2±3,5	0,430±0,014
	6,5	4,03±0,08	1,007±0,001	10,6±1,6	197,5±9,6	0,415±0,007
	7,0	3,83±0,05	1,043±0,009	15,6±6,0	240,5±11,6	0,405±0,007
	7,5	3,73±0,05	1,028±0,013	20,4±4,6	213,8±18,2	0,390±0,014
MMW HA	0,00	256,2±4,0	1,040±0,016	61,0±0,8	152,6±12,0	0,480±0,020
	2,00	169,0±1,9	1,103±0,014	49,0±0,9	113,0±5,1	0,487±0,015
	3,50	104,5±4,8	1,159±0,051	33,6±1,0	38,0±1,1	0,450±0,076
	4,00	84,5±5,9	1,225±0,019	31,4±3,1	26,6±3,1	0,437±0,025
	4,25	111,2±25,8	1,331±0,052	35,5±3,9	18,5±4,1	0,578±0,088
	4,50	245,3±27,9	1,484±0,149	50,3±4,4	9,8±3,1	0,716±0,064
HMW HA	0,00	729,3±27,7	1,050±0,026	106,0±2,8	91,2±4,7	0,470±0,017
	1,00	688,1±17,3	1,093±0,069	101,4±4,7	59,0±4,4	0,435±0,026
	1,50	646,0±21,3	1,087±0,005	94,6±0,3	31,9±0,0	0,425±0,021
	1,75	619,1±0,2	1,268±0,029	91,3±1,5	25,8±3,1	0,425±0,035
	2,00	581,3±8,6	1,389±0,142	89,4±5,8	15,6±2,6	0,417±0,025
	2,25	997,7±120,7	2,021±0,092	131,6±12,9	1,3±0,7	0,645±0,092
	2,50	231,0±35,5	1,206±0,117	129,0±20,2	0,9±2,4	0,590±0,255

Z výše uvedených hodnot v Tabulkách 12 a 13 můžeme říci, že se zvyšující koncentrací tenzidu v systému hyaluronan-tenzid klesá molekulová hmotnost a gyrační poloměr, zatímco roste polydisperzita systému. Při dosažení CAC již dochází k agregaci celého systému, což se projeví v pozorovaném skokovém nárůstu molekulové hmotnosti a gyračního poloměru. Za bodem CAC již nebylo možné tyto hodnoty analyzovat, protože s největší pravděpodobností celá zagregovaná část systému byla zachycena na filtru při přípravě vzorků na měření. Výjimkou je však LMW HA; u těchto vzorků nebyla pozorována žádná skoková změna molekulové hmotnosti během analýzy. Z tohoto lze usuzovat, že agregace systémů LMW HA-tenzid probíhá jiným způsobem než u ostatních použitých vzorků hyaluronanu. Nejspíše je to z důvodu kratšího řetězce LMW HA a jiného způsobu vázání tenzidu na tento řetězec. CAC systému LMW HA-tenzid byla tedy určena ze skokového nárůstu hodnoty gyračního poloměru. Vývoj změn chromatografických signálů měřených vzorků v závislosti na koncentraci CTAB je uveden na ukázkovém vzorku systému MMW HA-CTAB v příloze diplomové práce. Dále je možné pozorovat kontinuální úbytek detekované hmoty ve vzorcích během celé analýzy. Před každou analýzou byly vzorky vždy přefiltrovány a s největší pravděpodobností došlo k tomu, že zagregovaná část systému byla zachycena na filtru, a proto byl během analýzy detekován na koncentračním detektoru tento úbytek hmoty. Z tohoto lze usoudit, že interakce mezi řetězcem hyaluronanu a tenzidem probíhají postupně; tedy agregace systému probíhá kontinuálně s rostoucí koncentrací tenzidu a prostřednictvím filtrace při přípravě vzorků byly vzniklé agregáty postupně odfiltrovány. Z hodnot konformačních koeficientů pro čistý hyaluronan lze říci, že čistý hyaluronan zaujímá konformaci náhodného klubka. Během analýzy dochází pravděpodobně k tomu, že s přidáním tenzidu se tato konformace postupně mění, zmenšuje se a stává se více kompaktní. U systému LMW HA-tenzid se v průběhu analýzy konformace přemění z náhodného klubka prakticky až do konformace tuhé koule [75]. Vývoj změn konformačních diagramů měřených vzorků v závislosti na koncentraci CTAB je uveden na ukázkovém vzorku systému MMW HA-CTAB v příloze této diplomové práce.

Byla sestrojena závislost naměřené molekulové hmotnosti (kDa) jednotlivých analyzovaných vzorků na koncentraci tenzidu ($\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a zároveň závislost stanovené hmotnosti materiálu (μg) v jednotlivých analyzovaných vzorcích tak, jak byla stanovena koncentračním detektorem (dRI), také v závislosti na koncentraci tenzidu ($\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$), viz Obrázek 21. Na tomto obrázku lze pozorovat pokles molekulové hmotnosti se vzrůstající koncentrací tenzidu v systému. Avšak dosáhne-li systém CAC (v tomto případě při koncentraci $4,25 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tenzidu v systému), dochází ke skokovému nárůstu molekulové hmotnosti. Zároveň lze na Obrázku 21 pozorovat kontinuální úbytek detekované hmoty ve vzorcích během celé analýzy. Z tohoto lze usoudit, že interakce mezi řetězcem hyaluronanu a tenzidem probíhají postupně a tedy agregace systému probíhá kontinuálně s rostoucí koncentrací tenzidu.



Obr. 21: Výsledky z analýzy SEC-MALS MMW HYA a tenzidu CTAB, Závislost molekulové hmotnosti a hmoty na koncentraci tenzidu

Všechna naměřená data byla zpracována a vyhodnocena. U všech vzorků hyaluronanu se podařilo analýzou SEC-MALS určit CAC systémů hyaluronan-tenzid. Výsledné hodnoty CAC získané analýzou SEC-MALS jsou uvedeny v Tabulce 14 a shodují se s hodnotami získanými z předchozích srážecích a titračních experimentů (viz kapitola 5.2 a 5.3).

Tab. 14: Hodnoty CAC systémů hyaluronan-tenzid

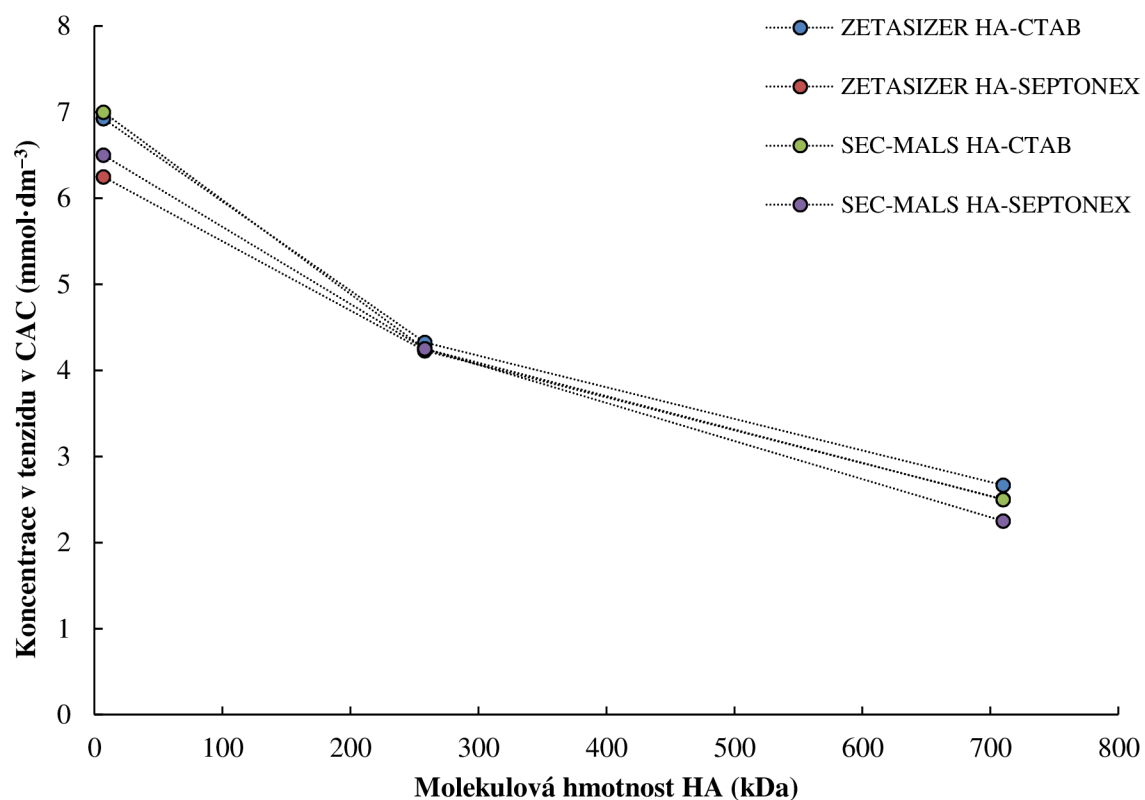
Materiál	Kritická agregační koncentrace (mmol·dm ⁻³)	
	CTAB	Septonex
LMW HA	7,00	6,50
MMW HA	4,25	4,25
HMW HA	2,50	2,25

5.5 Porovnání výsledků z použitých metod

V této kapitole jsou porovnány a diskutovány hodnoty kritické agregační koncentrace tenzidů v systémech hyaluronan-CTAB a hyaluronan-Septonex získané titračními experimenty pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS a analýzou SEC-MALS.

Pro porovnání výsledků získaných vybranými metodami rozptylu světla byly sestrojeny závislosti koncentrace tenzidu v CAC (mmol·dm⁻³) na molekulové hmotnosti hyaluronanu (kDa). Tyto závislosti jsou zobrazeny na Obrázku 22. Obě metody potvrzují, že se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu klesá CAC, to platí pro oba zkoumané systémy hyaluronan-CTAB i hyaluronan-Septonex. Lze také říci, že výsledné hodnoty CAC získané

titračními experimenty jsou v souladu s hodnotami CAC získané analýzou SEC-MALS.



Obr. 22: Závislost koncentrace tenzidu v CAC na molekulové hmotnosti HA

Pomocí vybraných metod se podařilo u všech vybraných systémů hyaluronan-tenzid stanovit CAC. Výsledné hodnoty CAC získané různými metodami rozptylu světla se shodují. Lze tedy říci, že použité techniky rozptylu světla se ukázaly jako vhodné pro charakterizaci tvorby polyelektrolytových komplexů v systému hyaluronan-tenzid.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na využití metod rozptylu světla (dynamický, elektroforetický a statický) při studiu tvorby polyelektrolytových komplexů v systému biopolymer-tenzid. Jejím cílem je využít a optimalizovat zmíněné metody pro účely charakterizace tvorby těchto komplexů.

K charakterizaci použitých materiálů byly použity metody termogravimetrické a elementární analýzy. U všech vzorků byl stanoven obsah popela a vlhkosti a obsah jednotlivých organických prvků.

Jako první byly provedeny srážecí experimenty v průhledných vialkách pro vizuální pozorování připravených systémů hyaluronan-tenzid. U systémů hyaluronan-CTAB byl počátek agregace lépe vizuálně detekován, z důvodu vytvoření dobře viditelné sraženiny, zatímco u systémů hyaluronan-Septonex byla zřetelná pouze změna zakalení a tvorba sraženiny byla odhalena až velice pozorným pozorováním. Pomocí těchto jednoduchých srážecích testů byly nalezeny koncentrační rozsahy tenzidů pro následující titrační měření.

Tvorba polyelektrolytových komplexů byla po předchozích experimentech sledována měřeními Z -průměru velikosti částic, zeta potenciálu a indexu polydisperzity pomocí titračních měření provedených na přístroji Zetasizer Nano ZS. Z naměřených hodnot zeta potenciálu bylo zjištěno, že systém po dosažení IEP přechází ze stabilního stavu do nestabilního stavu. Byly stanoveny hodnoty CAC pro jednotlivé systémy hyaluronan-tenzid; se zvyšující molekulovou hmotností hyaluronanu se snižuje CAC, to platí pro oba zkoumané systémy (hyaluronan-CTAB i hyaluronan-Septonex). Co se týče PDI, jeho hodnoty během titračních experimentů postupně rostly od počátečních 0,3–0,4 pro roztoky čistých hyaluronanů k hodnotám blízkým 1 při CAC jednotlivých systémů, což naznačuje výrazný růst a výraznou heterogenitu tvořených polyelektrolytových komplexů při CAC. Byly provedeny i titrační experimenty, kdy byl hyaluronan před měřením přefiltrován, ale filtrace hyaluronanu nemá žádný efekt na agregaci a hodnotu CAC. Ze získaných výsledků se odvíjela nastavení následující analýzy SEC-MALS.

Metodou SEC-MALS byly stanoveny přesné molekulové hmotnosti použitých vzorků hyaluronanu. Rovněž byl studován a popsán vliv přídatku obou použitých tenzidů na stanovenou molekulovou hmotnost, gyrační poloměr a tvar vznikajících komplexů před a v CAC. Při dosažení CAC již dochází k agregaci celého systému, což se projeví v pozorovaném skokovém nárůstu molekulové hmotnosti a gyračního poloměru. Výjimkou však je LMW HA; u těchto vzorků není pozorována žádná skoková změna molekulové hmotnosti během analýzy. Z tohoto lze usuzovat, že agregace systémů LMW HA-tenzid probíhá jiným způsobem než u ostatních použitých vzorků hyaluronanu. Nejspíše je to z důvodu kratšího řetězce LMW HA a jiného způsobu vázání tenzidu na tento řetězec. CAC systému LMW HA-tenzid byla určena pouze ze skokového nárůstu hodnoty gyračního poloměru. I analýzou SEC-MALS bylo potvrzeno, že se zvyšující molekulovou hmotností hyaluronanu se snižuje CAC; to platí opět pro oba zkoumané systémy hyaluronan-CTAB a hyaluronan-Septonex.

Na závěr lze říci, že výsledné hodnoty CAC získané různými metodami rozptylu světla se shodují. Použité techniky rozptylu světla se ukázaly jako vhodné pro charakterizaci tvorby polyelektrolytových komplexů v systému hyaluronan-tenzid. Výsledky této práce mohou být

využity pro další nastavení optimálních poměrů obou látek při tvorbě hydrogelových nosičových systémů na bázi hyaluronanu a kationických tenzidů a optimalizaci jejich přípravy pro účely navazujícího aplikovaného výzkumu.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006-12-8, **29**(1), 17-25 [cit. 2016-06-13]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [2] NECAS, J., et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 2008, 53.8: 397-411.
- [3] DAHIYA, Parveen a Reet KAMAL. Hyaluronic acid: A boon in periodontal therapy. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2013, **5**(5), 309- [cit. 2016-06-13]. DOI: 10.4103/1947-2714.112473. ISSN 1947-2714. Dostupné z: <http://www.najms.org/text.asp?2013/5/5/309/112473>.
- [4] SLÍVA, J.; MINÁRIK, J. Hyaluronát–nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*, 2009, 75-79.
- [5] LAURENT, Torvard C, Ulla BG LAURENT a J Robert E FRASER. The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and Cell Biology* [online]. 1996, **74**(2), A1-A7 [cit. 2016-06-13]. DOI: 10.1038/icb.1996.32. ISSN 08189641. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/icb.1996.32>.
- [6] BROWN, M. B.; JONES, Stuart A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2005, 19.3: 308-318.
- [7] LAPČÍK, Lubomír, et al. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical reviews*, 1998, 98.8: 2663-2684.
- [8] LAURENT, Torvard C.; LAURENT, U. B.; FRASER, J. R. Functions of hyaluronan. *Annals of the rheumatic diseases*, 1995, 54.5: 429.
- [9] SCOTT, John E., et al. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*, 1991, 274.3: 699-705.
- [10] LANGMAIER, F.; MLÁDEK, M.; RADIL, M. Pomocné přípravky kožedělného průmyslu. 1. vydání. Praha: SNTL/ALFA, 1985. 456 s.
- [11] BLAŽEJ, A., a kol. *Tensidy*. Bratislava: Alfa, 1977. s. 481. ISBN 63-173-77.
- [12] FARN, Richard J. *Chemistry and technology of surfactants*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006, s. 315. ISBN 9781405126960.
- [13] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana. *Chemie a technologie tenzidů II* [elektronická skripta]. [cit. 2015-03-13]. Po bezplatné registraci a přihlášení je plný text dostupný z: <http://kosmetika.ft.utb.cz/Services/Downloader.ashx?id=134&disposition=inline>
- [14] SALAGER J.-L. *SURFACTANTS, Types and Uses*. Universidad de Los Andes, Facultad de Ingenieria, Escuela de Ingenieria Quimica [online]. 2002, ver. 2 [cit. 2016-06-15]. Dostupný z: <http://www.nanoparticles.org/pdf/Salager-E300A.pdf>
- [15] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, roč. 93, s. 421–427
- [16] TADROS, Tharwat F. *Applied surfactants: principles and applications*. vydání 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, s. 634. ISBN 3-527-30629-3.

- [17] ASH, Michael; ASH, Irene. *Handbook of preservatives*. Synapse Information Resources, 2004, s. 850. ISBN 1890595667.
- [18] Cetyltrimethylammonium bromide. In: *The European Bioinformatics Institute: Part of the European Molecular Biology Laboratory* [online]. [cit. 2016-06-15]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=3567>.
- [19] Cetyltrimethylammonium bromid. In: *SIGMA—ALDRICH* [online]. [cit. 2016-09-13]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/h5882pis.pdf
- [20] AGUIAR, J., et al. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 258.1: 116-122.
- [21] Carbethopendecini bromidum: Karbethopendeciniumbromid. In: *Český lékopis 1997* [online]. [cit. 2016-09-13]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carbethopendecini_bromidum.htm
- [22] OREMUSOVÁ, J.; VITKOVÁ, Z.; HERDOVÁ, P. Influence of Adjuvances on the Drug Release from Hydrogels. *Sci Pharm*, 2010, 78: 627.
- [23] KATCHALSKY, A. Polyelectrolytes and their biological interactions. *Biophysical journal*, 1964, 4.1 Pt 2: 9.
- [24] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M. *Co je co v povrchové a koloidní chemii*. [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/
- [25] ANTONIETTI, Markus; CONRAD, Juergen; THUENEMANN, Andreas. Polyelectrolyte-surfactant complexes: a new type of solid, mesomorphous material. *Macromolecules*, 1994, 27.21: 6007-6011.
- [26] SKERJANC, J.; KOGEJ, Ksenija; VESNAVER, Gorazd. Polyelectrolyte-surfactant interactions: enthalpy of binding of dodecyl-and cetylpyridinium cations to poly (styrenesulfonate) anion. *The Journal of Physical Chemistry*, 1988, 92.22: 6382-6385.
- [27] GOSWAMI, Monojoy, et al. Surfactant-Mediated Polyelectrolyte Self-Assembly in a Polyelectrolyte–Surfactant Complex. *Macromolecules*, 2015, 48.24: 9050-9059.
- [28] ABUIN, Elsa B.; SCAIANO, J. C. Exploratory study of the effect of polyelectrolyte surfactant aggregates on photochemical behavior. *Journal of the American Chemical Society*, 1984, 106.21: 6274-6283.
- [29] TRNKA, P., ŠPERLINK, K. *Bionanotechnologie Nanobiotechnologie Nanomedicína*. Ostrava, Repronis: CZ, 2006 (7).
- [30] JAIN, Nirmesh, et al. Critical aggregation concentration in mixed solutions of anionic polyelectrolytes and cationic surfactants. *Langmuir*, 2004, 20.20: 8496-8503.
- [31] PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Study of nanoparticles formed by cationic micelles and hyaluronan. In *NANOCON 2015 Conference Proceedings*. Ostrava: TANGER Ltd, 2015. s. 404-407. ISBN: 978-80-87294-63- 5.
- [32] KRUTIŠOVÁ, T.; PEKAŘ, M. Study of Nanoparticles Formed by Negatively Charged Hyaluronan and Cationic Surfactant. In *XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, sborník příspěvků*. 2014. s. 73-77. ISBN: 978-80-210-6842- 1.
- [33] VELEBNÝ, Vladimír. Hyaluronan – Biopolymer pro tkáňové inženýrství. Edice habilitační a inaugurační spisy, sv. 412. ISSN 1213-418X.

- [34] HALASOVÁ, Tereza, et al. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011, 391.1: 25-31.
- [35] HERZOG, M. Interakce hyaluronan tenzid - dynamická tenziometrie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 30 s.
- [36] KARGEROVÁ, AndrĚa; PEKAŘ, Miloslav. High-resolution ultrasonic spectroscopy study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants. *Langmuir*, 2014, 30.40: 11866-11872.
- [37] CHIAPPISI, Leonardo, et al. From Crab Shells to Smart Systems: Chitosan-Alkylethoxy Carboxylate Complexes. *Langmuir*, 2014, 30.35: 10608-10616.
- [38] KROUSKÁ, J., et al. Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 1837-1843.
- [39] THALBERG, Kyrre; LINDMAN, Bjoern. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of physical chemistry*, 1989, 93.4: 1478-1483.
- [40] UMERŠKA, Anita, et al. Exploring the assembly process and properties of novel crosslinker-free hyaluronate-based polyelectrolyte complex nanocarriers. *International journal of pharmaceutics*, 2012, 436.1: 75-87.
- [41] YIN, Dian-shu, et al. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate research*, 2005, 340.6: 1201-1206.
- [42] KIM, Seon Jeong, et al. Thermal characteristics of polyelectrolyte complexes composed of chitosan and hyaluronic acid. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 2003, 40.8: 807-815.
- [43] Malvern Zetasizer Nano ZS. *Department of Condensed Matter Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University* [online]. 2008 [cit. 2016-10-19]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/>
- [44] WYATT, Philip J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica chimica acta*, 1993, 272.1: 1-40.
- [45] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, et al. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*, 2014, 108: 479-482.
- [46] KVÍTEK, Libor, et al. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické Listy*, 1998, 92: 431-433.
- [47] Size Determination by Dynamic Light Scattering. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2014 [cit. 2016-10-19]. Dostupné z: <http://www.wyatt.eu/index.php?id=dynamic-light-scattering>
- [48] *Zetasizer Nano Příručka pro uživatele*. 1.1 vydání. Malvern instruments Ltd., Spojené království, 2013, 250 s.
- [49] XU, Renliang. Electrophoretic light scattering. *Particle Characterization: Light Scattering Methods*, 2002, 289-343.
- [50] COSGROVE, Terence (ed.). *Colloid science: principles, methods and applications*. John Wiley & Sons, 2010.
- [51] POLČÍK, M. Sledování nanášení barviva pomocí měření zeta-potenciálu. *Chemagazín*, 4, XX, 28, 2010, 29.

- [52] Chemagazín: STABILITA SUZPENZÍ A DISPERZÍ – PROČ JSOU PARAMETRY JAKO VELIKOST ČÁSTIC, ZETA POTENCIÁL A REOLOGICKÉ VLASTNOSTI TAK DŮLEŽITÉ? [online]. 2011, vol. 21, no. 4. [cit. 2016-04-07]. ISSN 1210-7409. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_cl3.pdf
- [53] Využití disperzního analyzátoru Zetasizer Nano ZS pro charakterizaci disperzních soustav. *Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně*. [online] 2014 [Cit. 2016-11-03]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-disperzniho-analyzatoru-zetasizer-nano-zs-pro-charakterizaci-disperznich-soustav>
- [54] KVÍTEK, Libor. *Metody studia koloidních soustav* [online]. Olomouc: Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc [cit. 2016-11-124]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
- [55] XU, By Renliang. *Particle characterization: light scattering methods*. Digital print. Dordrecht [u.a.]: Kluwer, 2001. ISBN: 14-020-0357-9.
- [56] Intensity of Scattered Light and Molar Mass. WYATT Technology Europe [online]. © 2014 [cit. 2016-11-24]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?id=molar_mass
- [57] YU, Youlu; DESLAURIERS, Paul J.; ROHLFING, David C. SEC-MALS method for the determination of long-chain branching and long-chain branching distribution in polyethylene. *Polymer*, 2005, 46.14: 5165-5182.
- [58] PODZIMEK, Stepan. *Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles*. John Wiley & Sons, 2011.
- [59] Absolute Molar Mass Characterization. WYATT Technology Europe [online]. © 2014 [cit. 2016-11-26]. Dostupné z: http://www.wyatt.eu/index.php?eID=tx_nawsecuredl&u=0&file=fileadmin/applicationNotes/others/Article_absolute_molar_mass_determination.pdf&t=1480261017&hash=6d26e2fe35746030cb8b88640b13fa39
- [60] POTHECARY, M. When only a MALS detector will do....*The Analytical Scientist* [online]. 2014, č. 514 [cit. 2016-11-30]. Dostupné z: <https://theanalyticalscientist.com/issues/0514/when-only-a-mals-detector-will-do/>
- [61] HANEY, Max A. The differential viscometer. II. On-line viscosity detector for size-exclusion chromatography. *Journal of applied polymer science*, 1985, 30.7: 3037-3049.
- [62] STRIEGEL, Andre, et al. *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. John Wiley & Sons, 2009.
- [63] ViscoStar III: The next generation online differential viscometer. *WYATT Technology Europe* [online]. © 2014 [cit. 2016-12-01]. Dostupné z: <http://www.wyatt.com/products/instruments/viscostar-iii-online-differential-viscometer.html>
- [64] ROBINSON, James W.; FRAME, Eileen Skelly; FRAME II, George M. *Undergraduate instrumental analysis*. CRC Press, 2014.
- [65] FLOREA, Mircea. Using a differential refractive index detector as a pressure transducer for online viscometry in exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000, 878.1: 1-15.
- [66] BEREK, D., KUBÍN, M., MARCINKA, K., DRESSLER, M. *Gélová chromatografia*. Bratislava: VEDA, 1983, s. 310.

- [67] KROUSKÁ, J. *Interakce hyaluronanu a povrchově aktivních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012, 101 s.
- [68] OYARZUN-AMPUERO, F. A., RIVERA-RODRÍGUEZ, G. R., ALONSO, M. J., TORRES, D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **49**(4), 483-490 [cit. 2016-12-04]. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.05.008. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098713001875>
- [69] KRUTIŠOVÁ, T.; PEKAŘ, M.; HEJNÁ, J. Nanoparticles formed by self-assembly of negatively charged hyaluronan and cationic surfactant. In *NANOCON 2013 Conference Proceedings*. 1st. Ostrava: TANGER, Ltd., Keltickova 62, 710 00 Ostrava, Czech Republic, EU, 2013. s. 595-599. ISBN: 978-80-87294-47- 5.
- [70] PILGROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Stability of the complex nanoparticles of negatively charged hyaluronan and cationic surfactant. In *NANOCON 2014, Conference Proceedings*. 1st edition, 2014. Ostrava: Tanger Ltd., 2014. s. 1-5. ISBN: 978-80-87294-55- 0.
- [71] YIN, Jingbo, et al. Polyelectrolyte complexes based on chitosan and poly (L-glutamic acid). *Polymer international*, 2007, 56.9: 1122-1127.
- [72] WU, Danjun; DELAIR, Thierry. Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions. *Carbohydrate polymers*, 2015, 119: 149-158.
- [73] KAYITMAZER, A. B.; KOKSAL, A. F.; IYILIK, E. Kilic. Complex coacervation of hyaluronic acid and chitosan: effects of pH, ionic strength, charge density, chain length and the charge ratio. *Soft Matter*, 2015, 11.44: 8605-8612.
- [74] LALEVÉE, Gauthier, et al. Polyelectrolyte complexes via desalting mixtures of hyaluronic acid and chitosan—Physicochemical study and structural analysis. *Carbohydrate polymers*, 2016, 154: 86-95.
- [75] PODZIMEK, Stepan. *Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles*. John Wiley & Sons, 2011, s. 371. ISBN 978-0-470-38617-0.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
HA	kyselina hyaluronová (hyaluronic acid)
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
SEC-MALS	Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
mRNA	mediátorová kyselina ribonukleová (messenger ribonucleic acid)
PDGF	růstový faktor odvozený z krevních destiček (platelet derived growth factor)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
CD44	receptor HA glykoproteinové povahy vyskytující se na povrchu buněk
RHAMM	receptor pro HA zprostředkovávající buněčnou mobilitu (receptor for hyaluronan mediated motility)
LYVE-1	receptor vyskytující se na povrchu endotelových buněk lymfatické tkáně (lymphatic vessel endothelial HA receptor-1)
HARE	HA receptor pro endocytózu (hyaluronan acid receptor for endocytosis)
PAL	povrchově aktivní látka
CMC	kritická micelární koncentrace (critical micelle concentration)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
PE	polyelektrolyt (polyelectrolyte)
PES-C	polyelektrolyt-surfaktant komplex (polyelectrolyte-surfactant complex)
CAC	kritická agregační koncentrace (critical aggregation concentration)
NaCl	chlorid sodný (sodium chloride)
PECs	polyelektrolytové komplexy (polyelectrolyte complexes)
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
QELS	kvazielastický rozptyl světla (quasielastic light scattering)
PCS	fotonová korelační spektroskopie (photon correlation spectroscopy)
LDV	laserová dopplerova velocimetrie (laser doppler velocimetry)
dVIS	diferenční viskozimetr (differential viscometer)
dRI	diferenční refraktometr (differential refractive index detector)
¹ H NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
BKC	benzalkonium chlorid (benzalkonium chloride)
PLGA	kyselina poly(L-glutamová) (poly(lactic-co-glycolic) acid)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared spectroscopy)
HA/CH	komplex hyaluronan/chitosan (hyaluronate/chitosan complex)

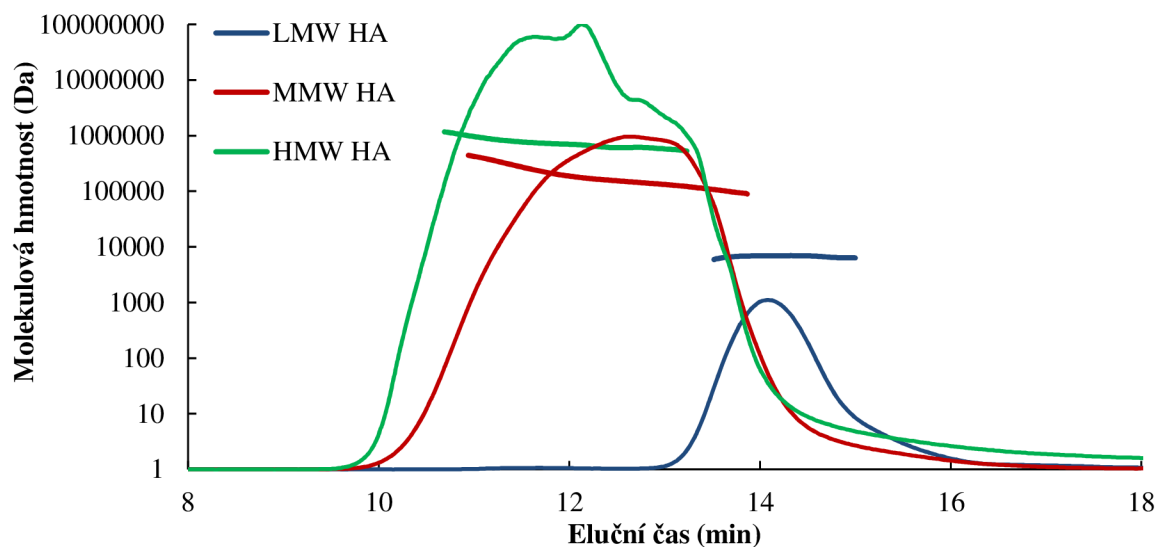
LMW	nízká molekulová hmotnost (low molecular weight)
MMW	střední molekulová hmotnost (medium molecular weight)
HMW	vysoká molekulová hmotnost (high molecular weight)
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra (ultraviolet-visible)
TGA	termogravimetrická analýza (thermogravimetric analysis)
CAC	kritická agregační koncentrace (critical aggregation concentration)
IEP	izoelektrický bod (isoelectric point)
PDI	index polydispersity (polydispersity index)

8.2 Seznam symbolů

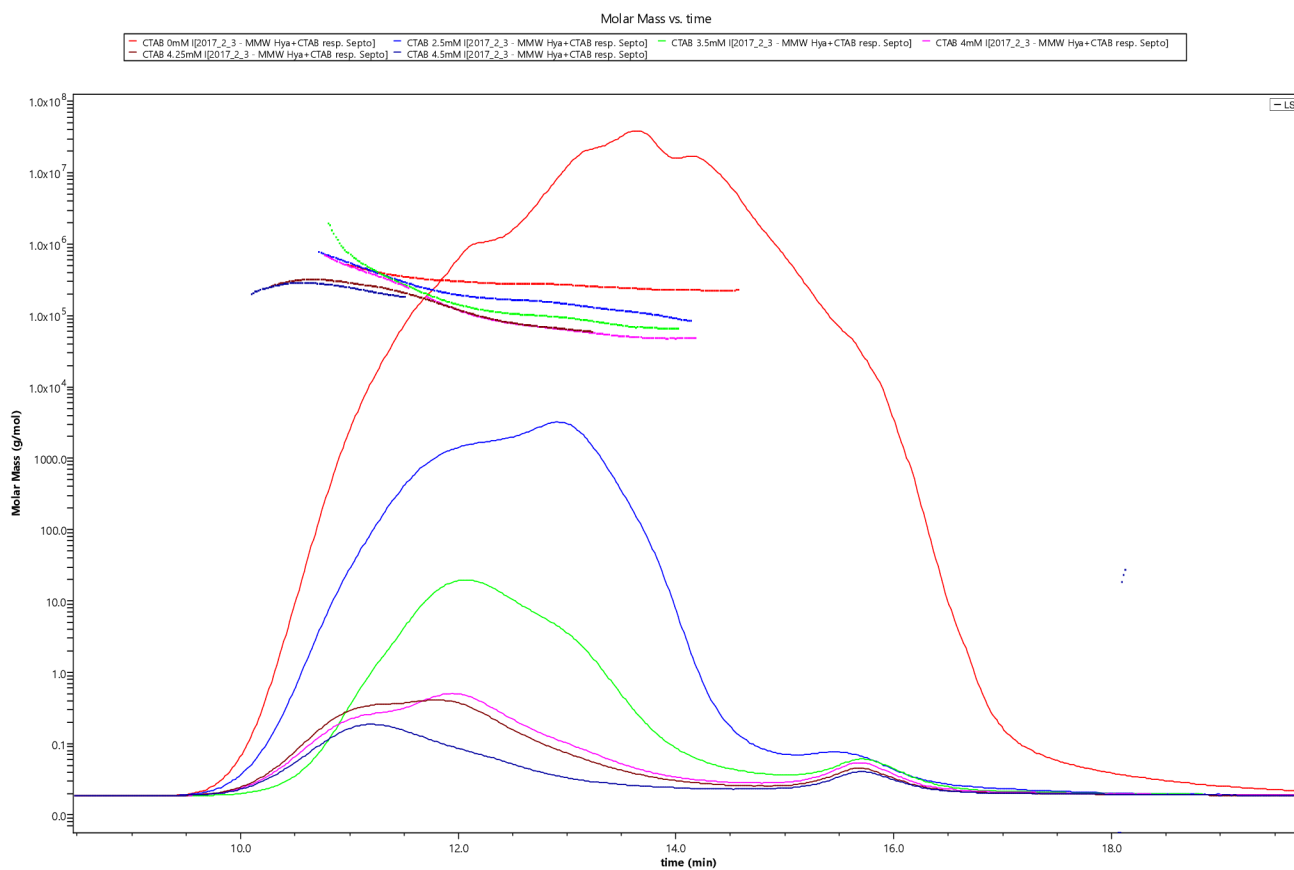
Symbol	Název veličiny
Da	dalton
g	gram
kg	kilogram
dm ³	decimetr krychlový
MDa	megadalton
mg	miligram
cm ³	centimetr krychlový
K	kelvin
°C	stupeň Celsia
α	stupeň ionizace
mmol	milimol
$g(\tau)$	autokorelační funkce
I	intenzita rozptýleného světla
t	čas
D	difúzní koeficient
T	rychlost poklesu korelace
q	velikost rozptylového faktoru
π	Ludolfovo číslo
λ_0	vlnová délka dopadajícího světla ve vakuu
n_0	index lomu disperzního prostředí
θ	úhel rozptylu
$d(H)$	hydrodynamický průměr částic
k_B	Boltzmannova konstanta
T	absolutní teplota
η	viskozita disperzního prostředí
Z	zeta potenciál
mV	milivolt
I_0	intenzita dopadajícího světla
α	polarizovatelnost částice
λ	vlnová délka
r	poloměr částice

$R(\theta)$	přebytečná intenzita rozptýleného světla
K	optická konstanta
c	koncentrace
M_w	molekulová hmotnost
$P(\theta)$	komplexní funkce úhlové závislosti na rozptýleném světle
A_2	druhý viriální koeficient
kDa	kilodalton

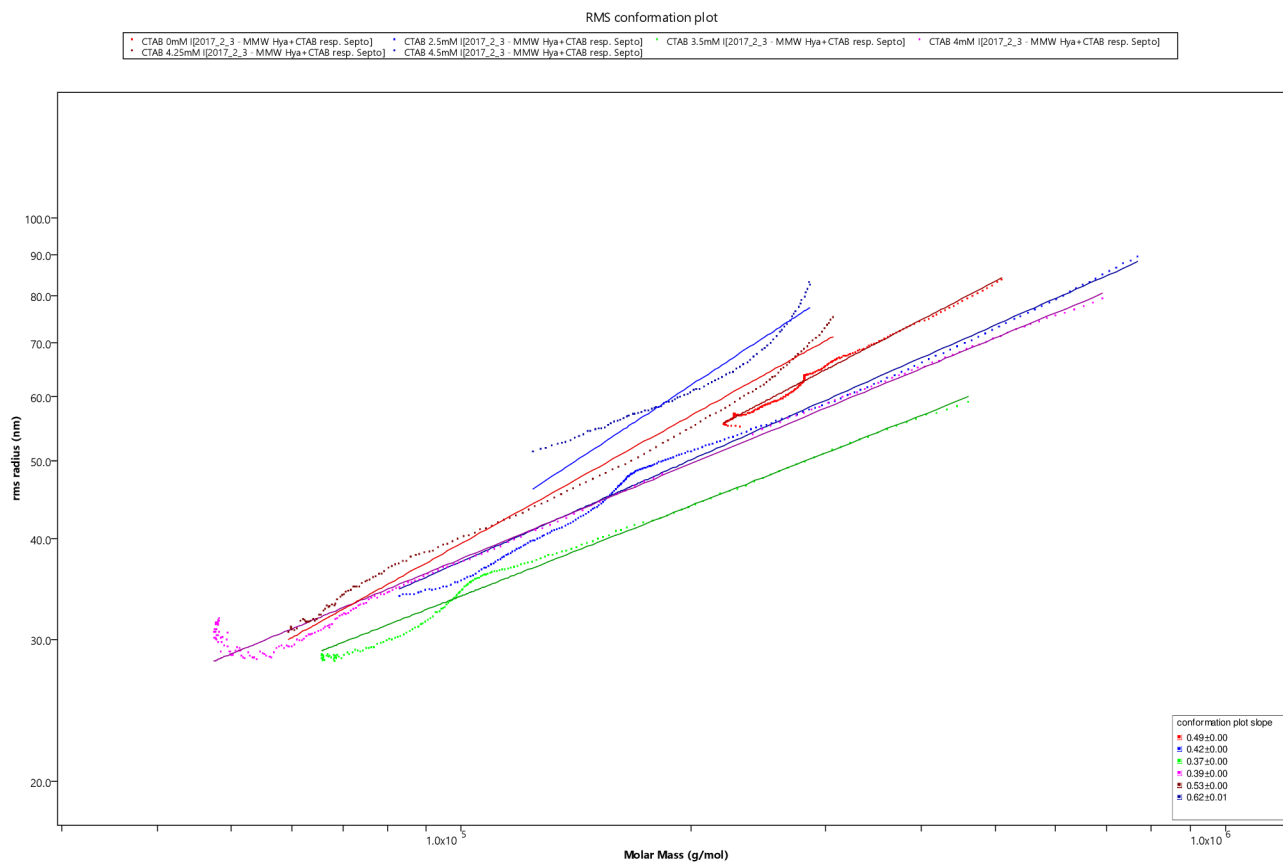
9 PŘÍLOHY



Příloha 1: SEC-MALS, Molekulová hmotnost a chromatografický signál vzorků HA



Příloha 2: SEC-MALS, Vývoj změn chromatografických signálů měřených vzorků v závislosti na koncentraci CTAB (MMW HA-CTAB)



Příloha 3: SEC-MALS, Vývoj změn konformačních diagramů měřených vzorků v závislosti na koncentraci CTAB (MMW HA-CTAB)