



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

**GELACE HYDROXYETHYLCELULÓZY A HYALURONANU
Kyselínou citronovou**

THE GELATION OF HYDROXYETHYLCELLULOSE AND HYALURONAN USING CITRIC ACID

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Martinková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

| | | |
|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | FCH-DIP0935/2015 | Akademický rok: 2015/2016 |
| Ústav: | Ústav fyzikální a spotřební chemie | |
| Student(ka): | Bc. Martina Martinková | |
| Studijní program: | Spotřební chemie (N2806) | |
| Studijní obor: | Spotřební chemie (2806T002) | |
| Vedoucí práce | Ing. Andrea Kargerová, Ph.D. | |
| Konzultanti: | prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. | |

Název diplomové práce:

Gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou

Zadání diplomové práce:

1. Seznámení se s použitými látkami
2. Seznámení se s gelací
3. Gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Martina Martinková
Student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o gelaci hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu netoxickým síťovacím činidlem – kyselinou citronovou. Nejprve byl optimalizován postup gelace samotné hydroxyethylcelulózy s kyselinou citronovou. Po získání produktů splňujících především nerozpustnost v ultračisté deionizované vodě byly připraveny roztoky obsahující směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy ve dvou různých poměrech. Dále byl připraven roztok obsahující jako polymerní složku pouze hyaluronan. Kyselina citronová byla využita v koncentracích 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru). Tyto roztoky polymerů a kyseliny citronové byly gelovány za stejných podmínek a následně srovnávány využitím analytických metod diferenční kompenzační kalorimetrie, termogravimetrické analýzy a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. Za zesítěné hydrogely s požadovanými vlastnostmi byly považovány ty, obsahující ve své struktuře hydroxyethylcelulózu, dále pak hyaluronan a hydroxyethylcelulózu v hmotnostním poměru 3 : 7.

ABSTRACT

This master's thesis deals with gelation of hydroxyethylcellulose and hyaluronan crosslinked with nontoxic crosslinking agent – citric acid. First of all, the optimization of gelation process of hydroxyethylcellulose took place. After obtaining the product insoluble in the ultrapure deionized water, a reaction mixture of hyaluronan and hydroxyethylcellulose in two different weight ratios were prepared. There was prepared solution containing only hyaluronan as the polymeric part too. Citric acid was used in concentrations of 5 %, 10 % and 20 % (w/w of polymer). These solutions of polymers and citric acid were gelated under the same conditions and the products were compared to each other using Differential Scanning Calorimetry, Thermogravimetry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. The products containing hydroxyethylcellulose and hyaluronan with hydroxyethylcellulose in weight ratio equal to 3 : 7 were considered crosslinked.

KLÍČOVÁ SLOVA

Gelace, chemické síťování, kyselina citronová, hyaluronan, hydroxyethylcelulóza

KEYWORDS

Gelation, chemical crosslinking, citric acid, hyaluronan, hydroxyethylcellulose

MARTINKOVÁ, M. *Gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 59 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Kargerová, 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 využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Na tomto místě děkuji vedoucí své diplomové práce Ing. Andrei Kargerové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady. Dík patří také prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., který byl konzultantem mé práce. Za pomoc při analýzách produktů děkuji paní Leoně Kubíkové a Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D.. V neposlední řadě děkuji rodině a přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 7 |
| 2 | Teoretická část | 8 |
| 2.1 | Hydrogely..... | 8 |
| 2.1.1 | Charakteristika hydrogelů..... | 8 |
| 2.1.2 | Dělení hydrogelů | 9 |
| 2.1.3 | Příprava hydrogelů..... | 9 |
| 2.2 | Kyselina citronová | 10 |
| 2.3 | Hydroxyethylcelulóza | 12 |
| 2.4 | Hyaluronan..... | 12 |
| 2.5 | Použité analytické metody | 14 |
| 2.5.1 | Termická analýza..... | 14 |
| 2.5.2 | Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací..... | 16 |
| 3 | Současný stav řešené problematiky | 19 |
| 3.1 | Gelace derivátů celulózy kyselinou citronovou | 19 |
| 4 | Experimentální část | 24 |
| 4.1 | Použité chemikálie | 24 |
| 4.2 | Použité přístroje | 24 |
| 4.3 | Gelace roztoků polymerů | 24 |
| 4.3.1 | Optimalizace postupu gelace hydroxyethylcelulózy kyselinou citronovou | 25 |
| 4.3.2 | Gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou..... | 26 |
| 4.4 | Analýza produktů..... | 27 |
| 4.4.1 | DSC | 27 |
| 4.4.2 | TGA | 27 |
| 4.4.3 | FTIR..... | 28 |
| 5 | Výsledky a diskuze | 29 |
| 5.1 | Optimalizace postupu gelace HEC a HYA kyselinou citronovou | 29 |
| 5.1.1 | Charakterizace výchozích látek | 29 |
| 5.1.2 | Postupy přípravy vedoucí ke vzniku nežádoucích produktů | 34 |
| 5.2 | Gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou | 35 |
| 5.2.1 | Hydroxyethylcelulóza..... | 36 |
| 5.2.2 | Směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 3 : 7..... | 40 |
| 5.2.3 | Směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 7 : 3..... | 42 |
| 5.2.4 | Hyaluronan | 44 |

| | |
|--|----|
| 5.2.5 Porovnání připravených hydrogelů | 45 |
| 6 Závěr | 49 |
| 7 Reference..... | 50 |
| 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 54 |
| 9 PŘÍLOHY | 55 |

1 ÚVOD

Hydrogely, tvořící trojrozměrnou strukturu prostupující celým disperzním prostředím, jsou ve středu pozornosti mnoha vědeckých týmů a jejich výzkum, hlavně v medicínském a farmaceutickém průmyslu, stále roste. Tyto hydrogely vykazují biokompatibilitu a biodegradabilitu. Používají se pro výrobu nosičů ve tkáňovém inženýrství, nosičů léčiv, obvazů a mnoha jiných produktů přicházejících do kontaktu s lidským organismem. Jedním z důvodů, proč jsou vhodnými látkami pro tyto aplikace, je mimo jiné jejich schopnost vázat do své struktury velké množství vody (fyziologického roztoku), což je tvoří strukturami velmi podobnými lidské tkáni.

Postup přípravy hydrogelů je zajištěn procesem zvaným gelace, který může proběhnout prostřednictvím fyzikálního a chemického síťování nebo případně botnáním xerogelu. Z hlediska chemického síťování je důležité, aby síťovací činidlo, prostřednictvím kterého jsou na sebe kovalentně nebo iontově vázány řetězce polymeru, bylo netoxické. Tuto vlastnost musí vykazovat i meziprodukty a produkty napříč celým procesem chemického síťování. Cílem této diplomové práce je využití kyseliny citronové jako nového síťovacího činidla při gelaci hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu. Ve srovnání s jinými používanými síťovadly zmíněných polymerů, je kyselina citronová netoxická a levná látka. Vyskytuje se v přírodě vázaná např. v citrusových plodech.

Důvodem výběru daných polymerů, tedy hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu, je dostupnost publikací popisujících experimenty síťování hydroxyethylcelulózy a anionického derivátu celulózy sodné soli karboxymethylcelulózy. Na základě těchto poznatků byl vybrán právě hyaluronan, jako polyanion vyskytující se v lidském organismu. Využití hyaluronanu v medicíně a farmacii je široké a možnost jeho chemického síťování, tedy zlepšení jeho mechanických vlastností, netoxickou kyselinou citronovou by ještě rozšířilo oblast jeho aplikací.

Cílem této diplomové práce je v první řadě optimalizace podmínek gelace hydroxyethylcelulózy kyselinou citronovou. Po získání postupu vhodného pro přípravu hydrogelů hydroxyethylcelulózy jsou připravovány produkty obsahující směs hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu ve dvou různých hmotnostních poměrech. Postup gelace je aplikován také na samotný hyaluronan. Získané produkty jsou analyzovány termickými metodami DSC, TG a dále pomocí FTIR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydrogely

Gely jsou koloidní disperze tuhých látek v kapalinách a vznikají procesem zvaným gelace. Z hlediska struktury se jedná o systémy tvořené trojrozměrnou sítí, jež vytváří souvislou strukturu prostupující celým disperzním prostředím. Jelikož je tedy v gelu spojitě jak disperzní prostředí, tak disperzní částice, nejsou tyto schopny se nezávisle pohybovat disperzním prostředím. Mohou vykonávat pouze vibrační pohyby, přičemž adhezní síly působící mezi nimi mohou být chemického i fyzikálního charakteru. Ačkoliv je disperzní prostředí kapalné, mají gely v důsledku jejich uspořádání mechanické vlastnosti charakteristické pro pevné skupenství.

Na základě jejich chování ve vysušeném stavu lze gely dělit na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní gely při vysoušení snižují svůj objem a vytvářejí kompaktní xerogel, který je složen pouze z disperzních částic. Jak už název napovídá, jsou schopny přejít do původního stavu opětovným navázáním disperzního prostředí procesem zvaným botnání. Vlastnosti reverzibilních gelů vykazují makromolekulární gely. Objem ireverzibilního gelu po vysoušení je téměř srovnatelný s původním objemem lyogelu, jeho struktura je ale porézní. Při opětovném styku s disperzním prostředím jsou schopny jeho malé množství navázat, nicméně přeměnu ireverzibilního gelu na xerogel je možné označit za nevratnou. Ireverzibilní gely vznikají z lyofobních solů. [1], [2]

Lyogely, tedy gely obsahující kapalné disperzní prostředí, lze klasifikovat na základě složení tohoto prostředí. Jedná se o organogely s disperzním prostředím organického původu a hydrogely, jejichž disperzním prostředím je voda. [3]

2.1.1 Charakteristika hydrogelů

Hydrogely jsou trojrozměrné hydrofilní polymerní sítě schopné do své struktury vázat větší množství vody, které je odvíjeno od složení samotného hydrogelu. Pro dosažení vysokého stupně nabotnění hydrogelu je v praxi běžné využití polymerů, které jsou ještě před samotným síťováním rozpustné ve vodě. Vznik hydrogelů, tedy jejich síťované struktury, představuje jednoduchou reakci jednoho nebo více monomerů. Kopolymerizací je možná příprava hydrogelů obsahujících kromě hydrofilních skupin v polymerní síti také ty hydrofobní. [4], [5]

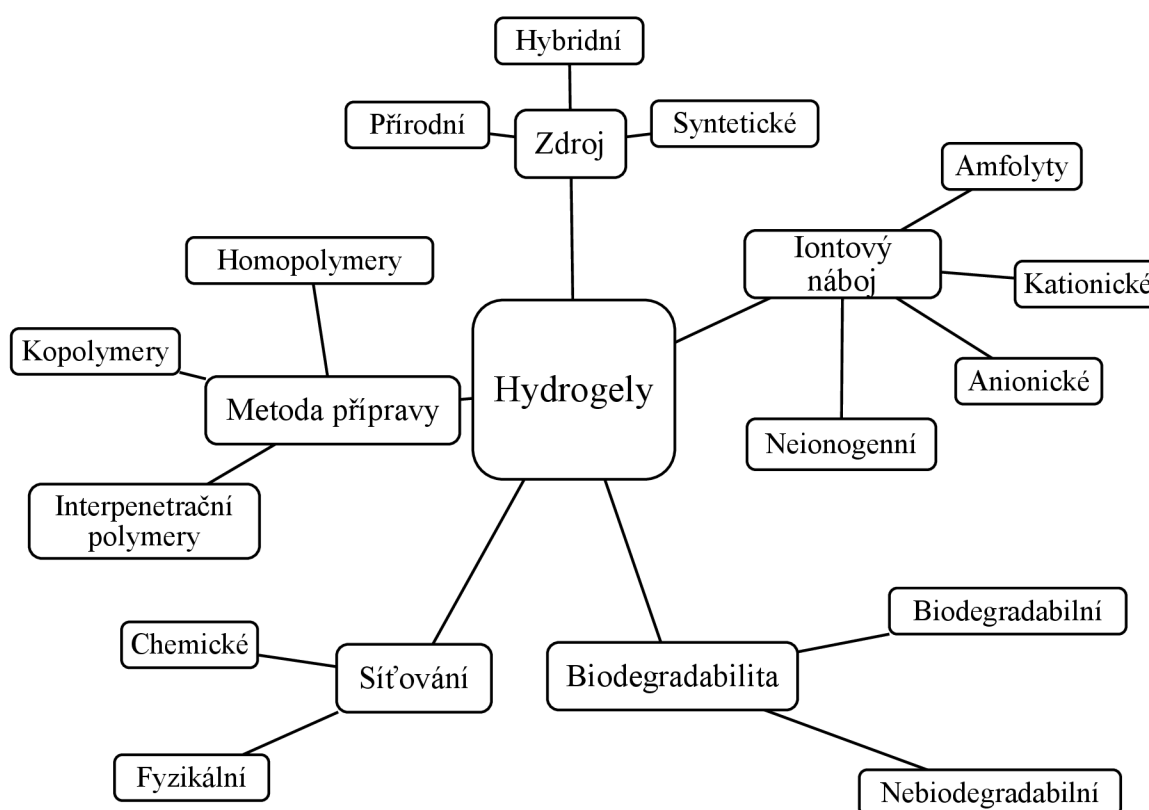
Při rovnovážném stavu ve vodném prostředí hydrogely dosáhnou své finální hydratované struktury pomocí botnací a elastických sil. Celková vázaná voda v hydrogelech je tvořena primární a sekundární vázanou vodou. Za primární vázanou vodu jsou označovány první molekuly vody absorbované do matrice suchého xerogelu hydratující polární hydrofilní skupiny polymerní sítě. Po hydrataci polárních skupin dochází k interakci molekul vody a hydrofobních skupin sítě, přičemž vzniká sekundárně vázaná voda. Dále dochází díky osmotickým silám k další absorpci vody směrem k nekonečnému zředění. Jedná se o botnání protichůdné k fyzikálním nebo kovalentním vazbám a vede k uvolnění sil tvořících elastickou síť. Tato tzv. volná voda vyplňuje volný prostor mezi makromolekulami. [6]

Hydrogely představují flexibilní materiály díky vysokému obsahu vody velmi podobné přírodním tkáním. V kombinaci s biokompatibilitou a biodegradabilitou některých z nich představují vhodné materiály pro různé aplikace v medicíně. Jsou využívány pro výrobu nosičů léčiv, nosičů v tkáňovém inženýrství, obvazů, obkladů, kontaktních čoček atd.

V zemědělství jsou hydrogely využívány při zavlažování nebo výrobě pesticidů. K dalším odvětvím průmyslu využívajícím hydrogely patří potravinářský, kosmetický a farmaceutický. Při výrobě hydrogelu jsou jeho vlastnosti upravovány podle požadavků na konkrétní účel. [4], [6], [7]

2.1.2 Dělení hydrogelů

Hydrogely je možno dělit podle různých faktorů. Jedná se např. o dělení na základě iontového náboje, zdroje použitého pro jejich přípravu, dělení dle metody jejich přípravy, způsobu síťování a biodegradability. Přehled nejběžnějších možností dělení hydrogelů je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1 Schéma možného dělení hydrogelů; upraveno dle [5]

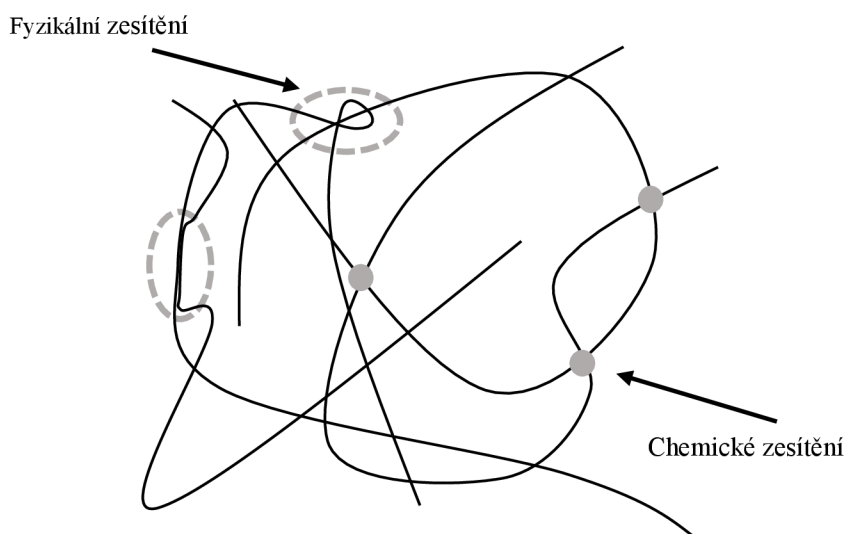
Následuje vysvětlení nejednoznačných pojmů ze schématu na Obrázek 1. Hybridní hydrogely jsou tvořeny kombinací přírodních a syntetických látek. Použitím různých směsí homopolymerů jsou získány interpenetrační hydrogely. Amfolyty neboli amfolytické hydrogely ve své struktuře nesou jak kladný, tak záporný náboj. Chemickému a fyzikálnímu síťování je věnována následující kapitola. Biologická rozložitelnost (biodegradabilita) je stěžejní vlastností pro hydrogely aplikované v medicíně. [4], [5], [6]

2.1.3 Příprava hydrogelů

K vytvoření trojrozměrné struktury gelů nebo konkrétně hydrogelů, dochází gelací, která může být uskutečněna fyzikálním nebo chemickým síťováním, případně botnáním xerogelu. Důvodem síťování polymerů je modifikace jejich vlastností a zlepšování mimo jiné jejich mechanické odolnosti a stability. Polymery využívané pro síťování obsahují chemicky aktivní

funkční skupiny v hlavním řetězci. Za snadno zesíitelné lze považovat polymery obsahující aminové ($-\text{NH}_2$), karboxylové ($-\text{COOH}$) a hydroxylové ($-\text{OH}$) funkční skupiny, které vytvářejí vazebná místa pro síťovadla. [5], [7]

Jak je možné pozorovat na obrázku 2, ve struktuře hydrogelu se může vyskytovat fyzikální nebo chemické síťování, přičemž je možná i kombinace obou druhů. Fyzikální síťování je způsobeno sekundárními vazbami, mezi které patří vodíkové můstky, elektrostatické síly, van der Waalsovy a hydrofobní interakce. Vzhledem k malé vazebné energii zmíněných interakcí nevykazují produkty síťované fyzikálně příliš dobrou mechanickou odolnost. Mezi výhody tohoto způsobu přípravy hydrogelů patří především absence síťovacího činidla, které může mít negativní vliv na vlastnosti produktu. Je využíváno pouze vlivu vnějších podmínek jako je změna teploty či pH.



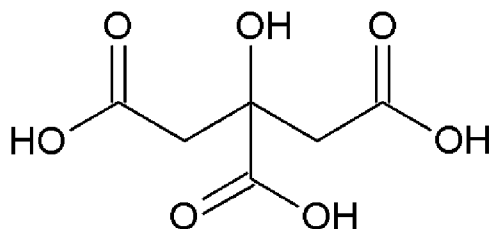
Obrázek 2 Fyzikální a chemické zesíťení; upraveno dle [5]

Chemické zesíťení je zajištěno prostřednictvím kovalentních nebo iontových vazeb. Příprava hydrogelu může probíhat buď za přídavku síťovacího činidla, prostřednictvím kterého dochází k vytváření polymerní sítě, nebo bez přítomnosti síťovadla. Ve druhém zmíněném případě dochází k přímé polymeraci funkčních skupin hlavního řetězce. Činidla pro síťovací reakce mohou být syntetická nebo přírodní a jejich použitá koncentrace a doba síťování je volena v závislosti na požadovaném stupni síťování. Využívanými síťovacími činidly jsou např. karboimidy, divinylsulfon, glyceraldehyd, chlorid vápenatý a kyseliny citronová, která byla využita v této diplomové práci. [2], [3], [8], [9], [10]

2.2 Kyselina citronová

Kyselina citronová neboli 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová kyselina je za laboratorní teploty bílou krystalickou látkou s bodem tání při $153\text{ }^\circ\text{C}$. Jak je možné pozorovat na obrázku 3, kyselina citronová ve své struktuře obsahuje tři karboxylové skupiny a jednu hydroxylovou. Jedná se o slabou organickou kyselinou nacházející se v přírodě. Tvoří složku jak rostlinných, tak živočišných organismů. Je součástí např. citrusových plodů, kde tvoří až 8 % jejich sušiny.

Právě z citrusové šťávy byla roku 1784 vědcem Carlem Wilhelmem Scheelem poprvé izolována. [11]



Obrázek 3 Strukturní vzorec kyseliny citronové

Kyselina citronová se vyskytuje ve formě monohydrátu nebo v bezvodé formě, přičemž monohydrát kyseliny ztrácí svou hydratační vodu při teplotě 70–75 °C. Rozklad, dekarboxylace kyseliny citronové probíhá nad teplotou 175 °C a při tomto ději vzniká oxid uhličitý. Kyselina citronová patří mezi chelatační činidla. Citrátový ion je tedy schopen tvořit komplexy s kationty kovů. [12], [13]

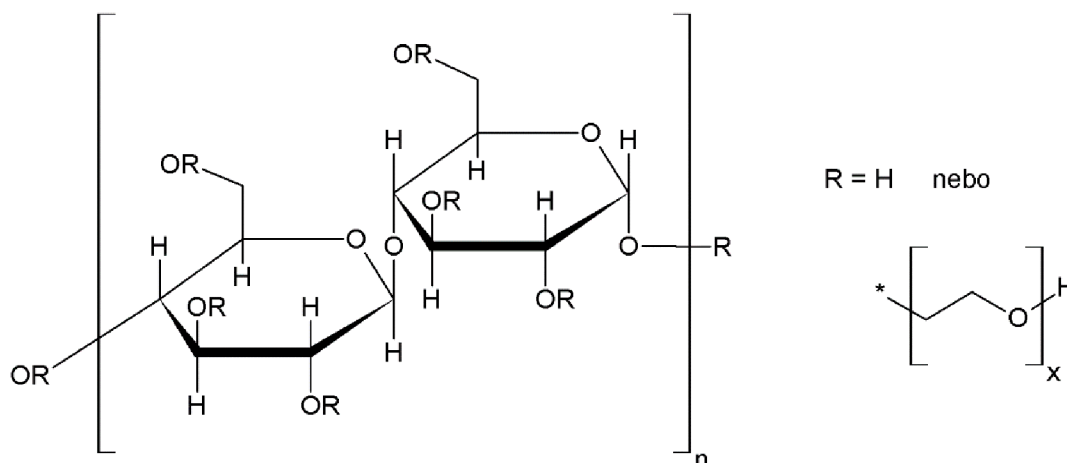
V lidském organismu má kyselina citronová a její soli velmi významné biologické funkce. Jedná se např. o její zapojení jako meziprojektu v Krebsově cyklu živých buněk, známém také jako cyklus kyseliny citronové nebo citrátový cyklus. Jedná se o složitý cyklus reakcí, kdy některé meziprojektu mohou být využity v jiných metabolických drahách a naopak produkty jiných metabolických drah jsou využívány v citrátovém cyklu. Za první reakci cyklu může být považován vznik citrátu kondenzací oxalacetátu s acetyl-CoA, reakce je katalyzována *citrátsynthasou*. Produkt je dále substrátem pro *aconitasu* a přeměněn na cis-akonitát. Následuje série dalších reakcí, kdy tou poslední je oxidace malátu na oxalacetát za vzniku NADH a H⁺, které jsou spotřebovávány v dýchacím řetězci. [9], [14]

Pro 99 % celosvětové produkce kyseliny citronové je využíváno mikrobiálních procesů. Nejčastěji se jedná o fermentační kvašení glukózového sirupu a řepné melasy pomocí kultury *Aspergillus niger*. Kyselina je z fermentačního média izolována nejprve filtrací částic dané kultury, dále přidávkem hydroxidu vápenatého a vysrážení citrátu vápenatého. Posledním krokem je přidávek kyseliny sírové pro uvolnění produktu, který je pevného skupenství v bezvodé formě nebo jako monohydrát kyseliny. Mezi hlavní faktory ovlivňující fermentaci patří druh a koncentrace zdroje uhlíku, hodnota pH, větrání a morfologie mikroorganismů použitých při procesu. [11], [13]

Kyselina citronová nachází uplatnění v různých odvětvích průmyslu. Nejčastěji je využívána v potravinářském průmyslu a nese označení E 330. Je vhodným prostředkem pro úpravu pH, působí jako antioxidant a stabilizátor pro zachování nebo posílení chutí, vůní a barev ve výrobcích z ovoce. Ve farmaceutickém průmyslu je kyselina citronová využívána také jako antioxidant např. pro zachování vitaminů. Dalším využitím jsou tablety a masti s obsahem citrátu železa, které slouží jako zdroj železa pro lidský organismus. Kyselina citronová nachází využití také v hutnictví nebo při výrobě čisticích prostředků a mýdel. [15], [16] Její význam jako síťovacího činidla při chemickém síťování polymerů je zmíněn v kapitole 3.

2.3 Hydroxyethylcelulóza

Hydroxyethylcelulóza (2-hydroxyethylether celulóza) je neionogenní derivát celulózy, jehož strukturní vzorec je uveden na obrázku 4. Jak je patrné z názvu, ve své struktuře obsahuje celulózu, na níž jsou navázány hydroxylové boční řetězce způsobující její rozpustnost ve vodě. Za laboratorní teploty se jedná o světle hnědý, krémový nebo bílý prášek, bez chuti a zápachu, s hygroskopickými vlastnostmi. V roztocích není její chování ovlivňováno přítomností kationtů. Je prakticky nerozpustná v acetonu, ethanolu, etheru, toluenu a většině dalších organických rozpouštědel.



Obrázek 4 Strukturní jednotka monomeru HEC

Prvním krokem při výrobě hydroxyethylcelulózy (HEC) je úprava celulózy hydroxidem sodným za vzniku reaktivnější alkalické celulózy. Tato poté reaguje s ethylenoxidem za vzniku HEC a dochází tak k nahrazování atomů vodíku z hydroxylových skupin celulózy hydroxyethylovými. Množství substituovaných molekul na celulózovém řetězci ethylenoxidem je možné popsat stupněm substituce (D.S.) a molární substitucí (M.S.). Stupeň substituce označuje průměrný počet hydroxylových pozic na anhydridoglukózové jednotce, která zreagovala s ethylenoxidem. Průměrný počet ethylenoxidových molekul, které zreagovaly s každou anhydridoglukózovou jednotkou je vyjadřován pomocí molární substituce.

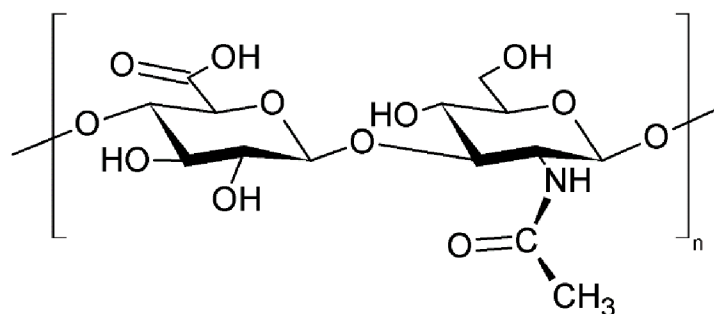
Hydroxyethylcelulóza může být využita pro výrobu transparentních roztoků s různou viskozitou. Je široce využívána jako zahušňovadlo, stabilizátor a ochranný koloid v kosmetickém průmyslu. V různých oblastech farmaceutických aplikací se vyskytuje jako součást bioadhezivních a mukoadhezivních náplastí, matric polymerů pro řízené uvolňování v pevných lékových formách nebo jako pojivo a filmtvorná látka pro potahování tablet. Při výrobě hydrogelů je schopna tvořit stabilní síť s nižší schopností absorpce. V zemědělství je hydroxyethylcelulózy využito při výrobě pesticidů nebo při obalování semen. Mezi další použití patří výroba papíru se speciální úpravou, výroba barev, elektrolytické povrchové úpravy, stavebnictví. [17], [18], [19]

2.4 Hyaluronan

Kyselina hyaluronová, označovaná také jako hyaluronan, je lineární polysacharid, přesněji mukopolysacharid přirozeně se vyskytující v lidském organismu. Patří do skupiny polysacharidů pojivové tkáně nazývané glykosaminoglykany. Jako jediná z této skupiny látek neobsahuje kovalentně vázaný peptid, není sulfatována a není tvořena v Golgiho aparátu.

Kompletní struktura hyaluronanu byla objasněna Karlem Mayerem a kol. v 50. letech 20. století charakterizací oligosacharidů získaných působením testikulární *hyaluronidasy*. [20]

Hyaluronan je složen z disacharidových jednotek D-N-acetylglucoaminu a D-glukuronové kyseliny, které jsou spojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami. Strukturální vzorec monomerní jednotky kyseliny hyaluronové je uveden na obrázku 5. Při pH 7 jsou karboxylové skupiny disociovány a molekulu hyaluronanu je možné označit jako polyanion, který ke své molekule přitahuje kationty pro zachování neutrality náboje. [20], [21], [22]



Obrázek 5 Struktura disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové

Ve fyziologickém roztoku udávají prostorovou strukturu molekuly hyaluronanu vazby disacharidové jednotky, vnitřní vodíkové vazby a interakce s rozpouštědlem. Kromě poměrně stabilních vazeb sacharidových jednotek jsou ve struktuře hyaluronanu mezi disacharidovými jednotkami vazby glykosidické, zahrnující atom kyslíku. Tento tvoří dvě vazby, navzájem ve tvaru písmene V. Substituenty na konci těchto vazeb jsou teoreticky schopné rotovat o 360° , ve skutečnosti je ale každá jednotka pootočená o 180° vůči té následující a předchozí. Sekundární strukturu molekuly tedy tvoří tzv. pásce podobný „two-fold helix“. Obě strany molekuly jsou identické, což jí umožňuje agregaci prostřednictvím specifických interakcí ve vodě a formaci sítí. I při velmi nízké aktuální hmotnosti hyaluronanu v roztoku zaujímá jeho molekula velkou doménu a tvoří strukturu rozbaleného náhodného klubka. Důsledkem této doménové struktury je ovlivňování difuze látek v roztoku. [6], [21], [23]

Hyaluronan se nachází v tělech všech obratlovců a také v kapsulách některých patogenních bakterií jako je *Streptococcus* sp. a *Pasteurella*. Ve většině tkání se jedná o složku extracelulárního matrix, přičemž v některých z nich o tu hlavní. Poměrně vysokou koncentraci hyaluronanu je možné pozorovat v kohoutích hřebíncích ($7,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), synoviální tekutině v mezibuněčné hmotě chrupavky ($3\text{--}4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), pupeční šňůře ($3 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), očním sklivci ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) a v kůži ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). [7], [24]

Mezi hlavní funkce hyaluronanu v lidském těle patří vytváření vhodného prostředí pro dělení, migraci a adhezi buněk, udržování hydratovaného okolí buněk, lubrikace tkání a jejich ochrana proti infekci. Dále se podílí na regulaci transportu tekutin v organismu, ovlivňuje difuzi makromolekulárních látek v organismu, chrání pokožku před UV zářením a efektivně váže volné radikály. Je běžně využíván jako součást doplňků stravy pro kloubní výživu, dále jako nosič léků a v kosmetice. Široké využití nachází také při oftalmologických zákrocích nebo při léčbě popálenin. [6], [7] Pro experimentální část diplomové práce byl hyaluronan vybrán díky svým výborným viskoelastickým vlastnostem a přirozenému výskytu v lidském těle. Hydrogely z něj připravené, chemicky zesítné netoxickou kyselinou citronovou, by mohly najít uplatnění v různých oblastech medicíny a farmacie.

2.5 Použité analytické metody

2.5.1 Termická analýza

Termická analýza zahrnuje skupinu experimentálních metod, při kterých jsou sledovány některé fyzikální vlastnosti studovaného systému jako dynamická funkce teploty. Mezi zmíněné vlastnosti patří hmotnost, barva, mechanické vlastnosti, tepelná kapacita, energie, vodivost a jiné. Případně mohou být tyto vlastnosti sledovány při konstantní teplotě v kontrolované atmosféře. Základním jevem důležitým pro metody termické analýzy je změna entalpie, se kterou jsou spojeny pochody jako tání, vypařování, sublimace, přeměny modifikací a chemické reakce. Každou z těchto fyzikálních a chemických změn lze charakterizovat rovnicí (1) změny Gibbsovy volné energie (ΔG), která má tvar:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1)$$

kde ΔH je změna entalpie, T je absolutní teplota a ΔS je změna entropie během děje. Každý studovaný systém se snaží dosáhnout takového stavu, aby Gibbsova volná energie odpovídala co nejnižší hodnotě. [25]

Diferenční kompenzační kalorimetrie

Diferenční kompenzační kalorimetrie, DSC z anglického Differential Scanning Calorimetry, je metoda termické analýzy založená na pozorování změn fyzikálních a chemických vlastností látek při ohřevu a chlazení. DSC je využíváno např. ve farmacii pro analýzu čistoty látek a určení teploty tání.

Princip metody je založen na udržení stejné teploty studovaného a referenčního vzorku, které jsou zahřívány současně vedle sebe. Pokud ve vzorku probíhá endotermní děj, je pro udržení nulového teplotního rozdílu do něj dodávána energie. V případě, že ve vzorku probíhá děj exotermní, je dodávána energie do referenční látky. Diferenční kompenzační kalorimetrii je možno využívat ve dvou uspořádáních: DSC s tepelným tokem (heat-flux DSC) a DSC s výkonovou kompenzací (power-compensation DSC).

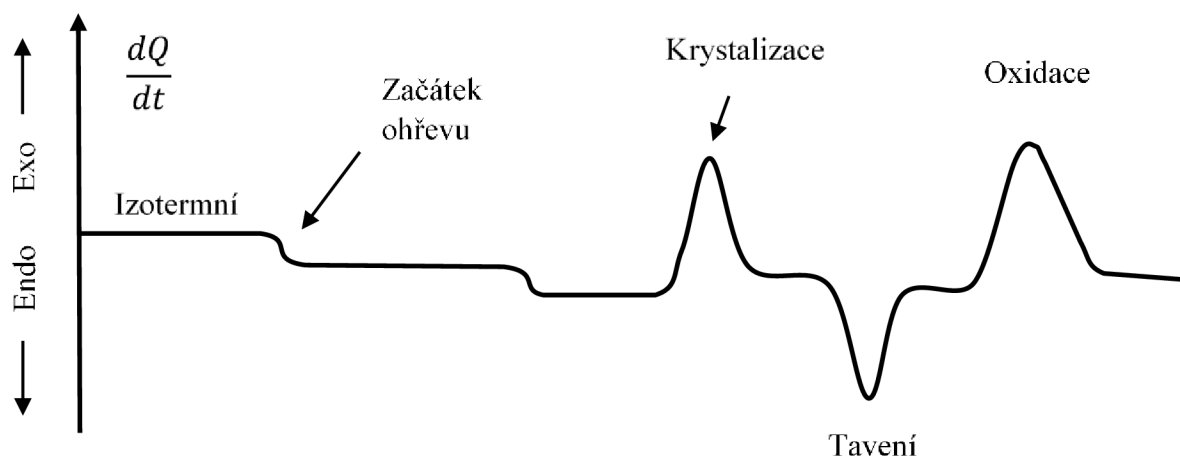
V případě DSC s tepelným tokem, která umožňuje kvantitativní měření, jsou referenční i měřený vzorek umístěny na samostatných teplotních čidlech ve společné kalorimetrické cele. Probíhá měření rozdílu teplot analyzovaného a referenčního vzorku, které jsou spojeny tepelným mostem. Rozdíl teplot je zaznamenáván jako tepelný tok. Teplota je měřena vícebodově přímo pod kelímky, ve kterých jsou umístěny vzorek a reference. V tomto uspořádání lze využívat diskový nebo cylindrický typ přístroje.

Podstatou DSC s kompenzací příkonu je zachování nulového teplotního rozdílu mezi měřeným a srovnávacím vzorkem. Jakmile se objeví změny teploty vzorku, dochází k její okamžité kompenzaci změnou příkonu měřící cely se vzorkem tak, aby trvale platil nulový teplotní rozdíl. Základem je vzájemná izolace vzorku a reference, kdy jsou tyto umístěny ve dvou oddělených měřících celách se dvěma tepelnými zdroji. Oba vzorky jsou zahřívány stejnou rychlostí. Měřenou veličinou je elektrický příkon, který je potřebný k udržení konstantní teploty obou vzorků. DSC s kompenzací příkonu umožňuje zaznamenat velmi citlivé změny teploty a je vhodná ke sledování izotermních dějů. Ze změny výkonu je počítán tepelný tok a z něj entalpické změny.

Výstupem měření je DSC záznam, kalorimetrická křivka či termogram, který vyjadřuje tepelný tok jako funkci teploty nebo času dle rovnice (2):

$$\frac{dQ}{dt} = f(t), \quad (2)$$

kde Q je tepelná energie. Z jeho průběhu je získána informace o chování zkoumaného vzorku v daném teplotním programu. [25], [26], [27] Příklad kalorimetrické křivky je uveden na obrázku 6.



Obrázek 6 Příklad kalorimetrické křivky; upraveno dle [28]

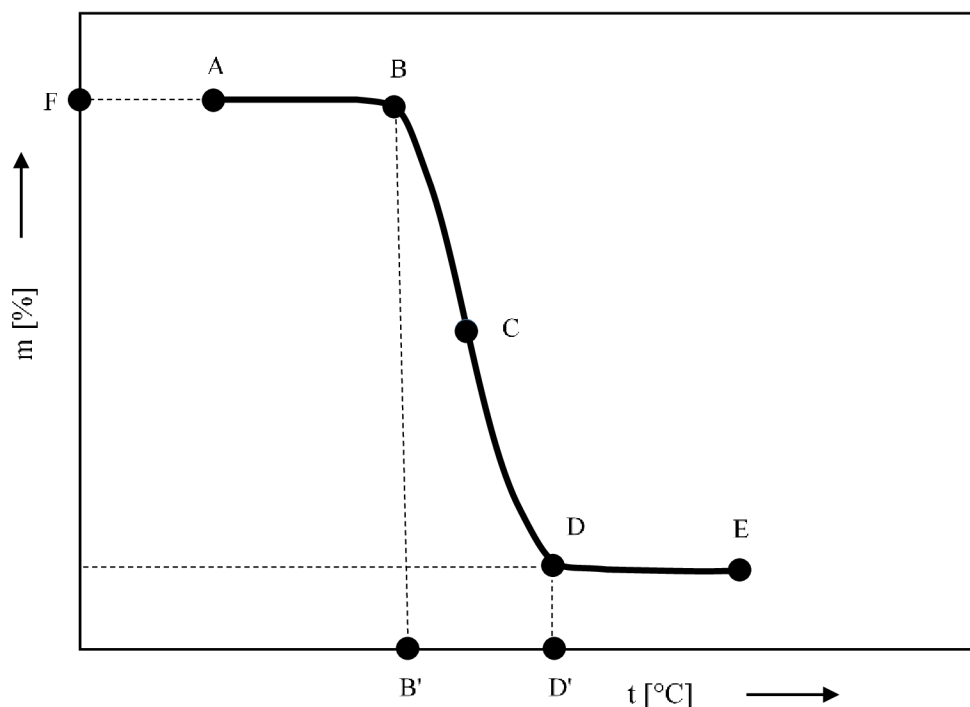
Termogravimetrická analýza

Mezi základní metody termické analýzy patří také termogravimetrická analýza (termogravimetrie – TG). Je založena na studiu změn hmotnosti probíhající v měřeném systému vlivem změny teploty. Termogravimetrie je využívána pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení např. ke sledování sušení, dehydroxylace, tepelného rozkladu, tepelné oxidace, katalýzy, studiu reakční kinetiky a reakčních mechanismů.

Mezi složky přístroje pro termogravimetrickou analýzu patří elektrická pec, analytické váhy, nosiče vzorků (sampler), zařízení pro měření a řízení teploty (termočlánek) a počítač. Vlastní experiment pro TG analýzu probíhá na termovahách. Ty jsou obvykle používány ve třech nejčastějších způsobech uspořádání vůči peci: a) vertikální se vzorkem umístěným na mechanismu termovah, b) vertikální se vzorkem zavěšeným na mechanismu termovah a c) horizontální uspořádání. V současné době se u všech zmíněných typů uspořádání využívá kompenzační princip měření hmotnosti. V tomto případě je po celou dobu experimentu vzorek v peci na stejném místě, přičemž jakákoli změna hmotnosti libovolným směrem je mechanismem termovah zaznamenána. Neprodleně je pak kompenzována pohybem opačným směrem, který vrátí vzorek do pozice, ve které se nacházel před danou hmotnostní změnou.

Analytickým výstupem termogravimetrie je termogravimetrická křivka znázorňující závislost hmotnosti na teplotě nebo čase, ze které lze odečíst teploty hmotnostních změn. Z TG křivek, pro které jsou typickými útvary zlom a plato, lze odečíst: a) oblast bez

změn – plato (oblast termické stability), b) oblast se změnami hmotnosti (úbytek nebo nárůst), c) dílčí hmotnostní úbytek a d) celkový hmotnostní úbytek.



Obrázek 7 Zlom termogravimetrické křivky; upraveno dle [29]

Zlom termogravimetrické křivky je uveden na obrázku 7, kde úsek BCD označují schod, bod B počátek schodu, bod C inflexní bod, bod D konec schodu, bod B' na vodorovné ose počáteční teplotu, bod D' na vodorovné ose konečnou teplotu, úsek BD reakční interval, úsek FG výšku schodu, úsek AB přední základní čáru a úsek DE zadní základní čáru. [27], [29], [30]

2.5.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Principem spektrometrických metod je studium vlastností elektromagnetického záření vysílaného hmotou nebo s ní interagujícího. V případě infračervené spektrometrie jsou zkoumány změny rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly způsobené absorpcí infračerveného záření vzorkem. [25]

Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým znázorněním funkční závislosti energie na vlnové délce dopadajícího záření. Energie je vyjadřována prostřednictvím transmittance nebo absorbance, které jsou vyjádřeny rovnicemi (3) a (4).

$$T = \frac{I}{I_0}, \quad (3)$$

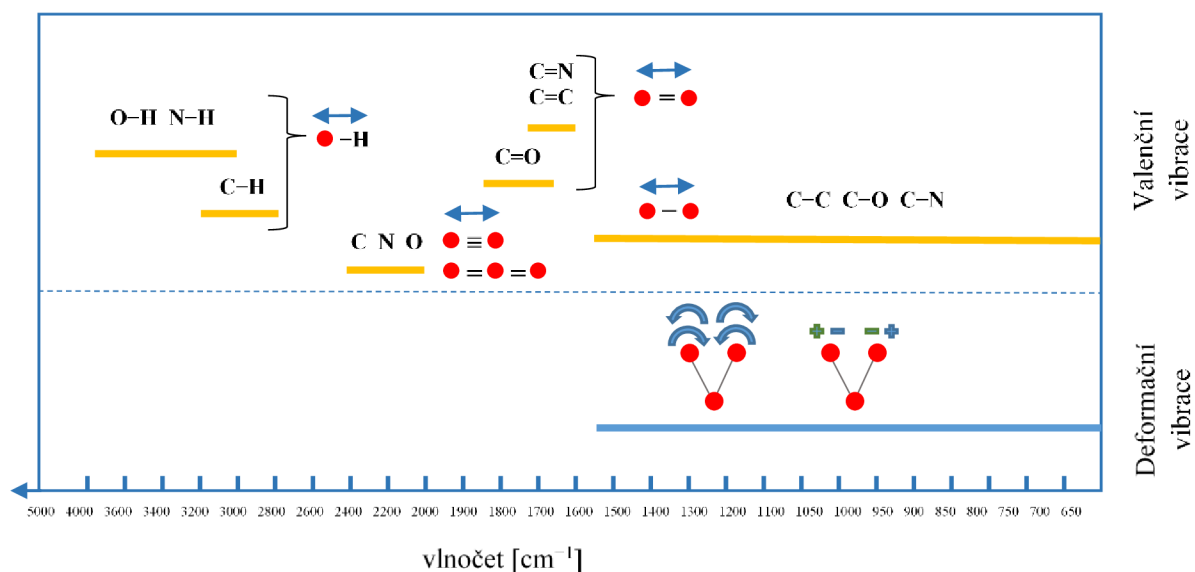
$$A = -\log T, \quad (4)$$

Transmittance (T) neboli propustnost je definována jako intenzita záření prošlého vzorkem I , k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje I_0 a je uváděna v procentech. Absorbance je definována jako záporný dekadický logaritmus transmittance, značí se písmenem A

a jedná se o bezrozměrnou veličinu. Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, tudíž je používán vlnočet. Ten je definován jako převrácená hodnota vlnové délky a jeho jednotkou je obvykle cm^{-1} (viz rovnice (5)). Uvedená hodnota závislosti energie na vlnočtu je tedy lineární.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}, \quad (5)$$

kde $\tilde{\nu}$ je vlnočet a λ vlnová délka. [25], [31]



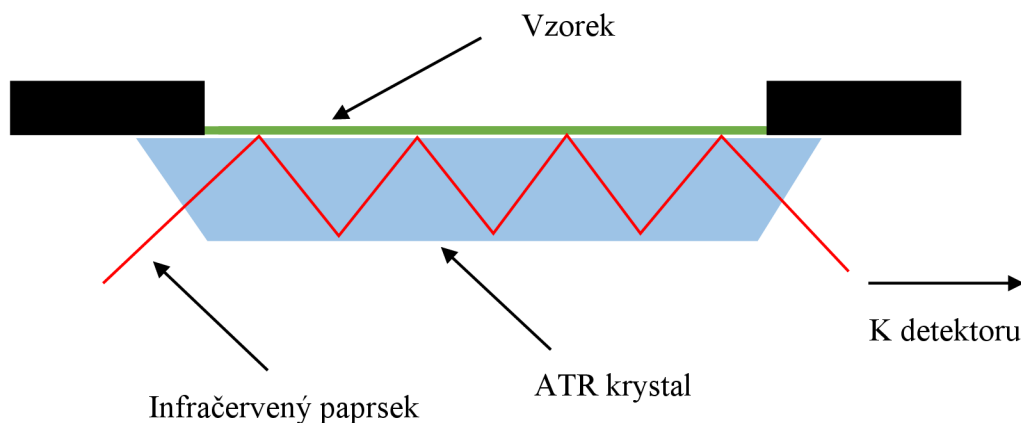
Obrázek 8 FTIR spektrum; upraveno dle [32]

Obrázek 8 prezentuje oblasti FTIR spektra pro odezvu valenčních a deformačních vibrací. Pro identifikaci funkčních skupin jako je např. $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$ a $-\text{NH}$ jsou vhodné absorpční pásy s vrcholy v intervalu $4\,000\text{--}1\,500\text{ cm}^{-1}$. Absorpční pásy s vrcholy v oblasti $1\,500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ jsou nazývány oblastí „otisku palce“ z anglického fingerprint region. V této oblasti se vyskytují odezvy deformačních vibrací molekul. V tabulce 1 jsou uvedeny charakteristické vlnočty některých vazeb pro infračervenou (IČ) spektrometrii. Neznámou analyzovanou látku je možno identifikovat pomocí digitalizovaných knihoven infračervených spekter. [31]

Tabulka 1 Charakteristické vlnočty vybraných vazeb v IČ spektrometrii; upraveno dle [25]

| Vazba | Vlnočet [cm^{-1}] | Intenzita |
|-------|------------------------------|-----------------------------|
| O–H | 3 200–3 650 | Intenzivní, široký pás |
| N–H | 3 100–3 500 | Střední intenzita |
| C–H | 2 850–3 300 | Středně silný až intenzivní |
| C=O | 1 630–1 810 | Silný |
| C–O | 1 050–1 250 | Silný |

Infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR spektrometry) jsou přístroje pracující na principu interference spektra. Na rozdíl od disperzních přístrojů měří interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Pro získání klasického spektrálního záznamu je nutné provést matematickou metodu Fourierovy transformace. Mezi výhody FTIR spektrometrů patří např. možnost měření silně absorbujících vzorků, měření s nastavci pro analýzu pevných či kapalných vzorků v odraženém světle (reflektanční infračervená spektroskopie). Toto je umožněno, tím že při měření dopadá na detektor vždy celý svazek záření.



Obrázek 9 Princip ATR spektrometru; upraveno dle [25]

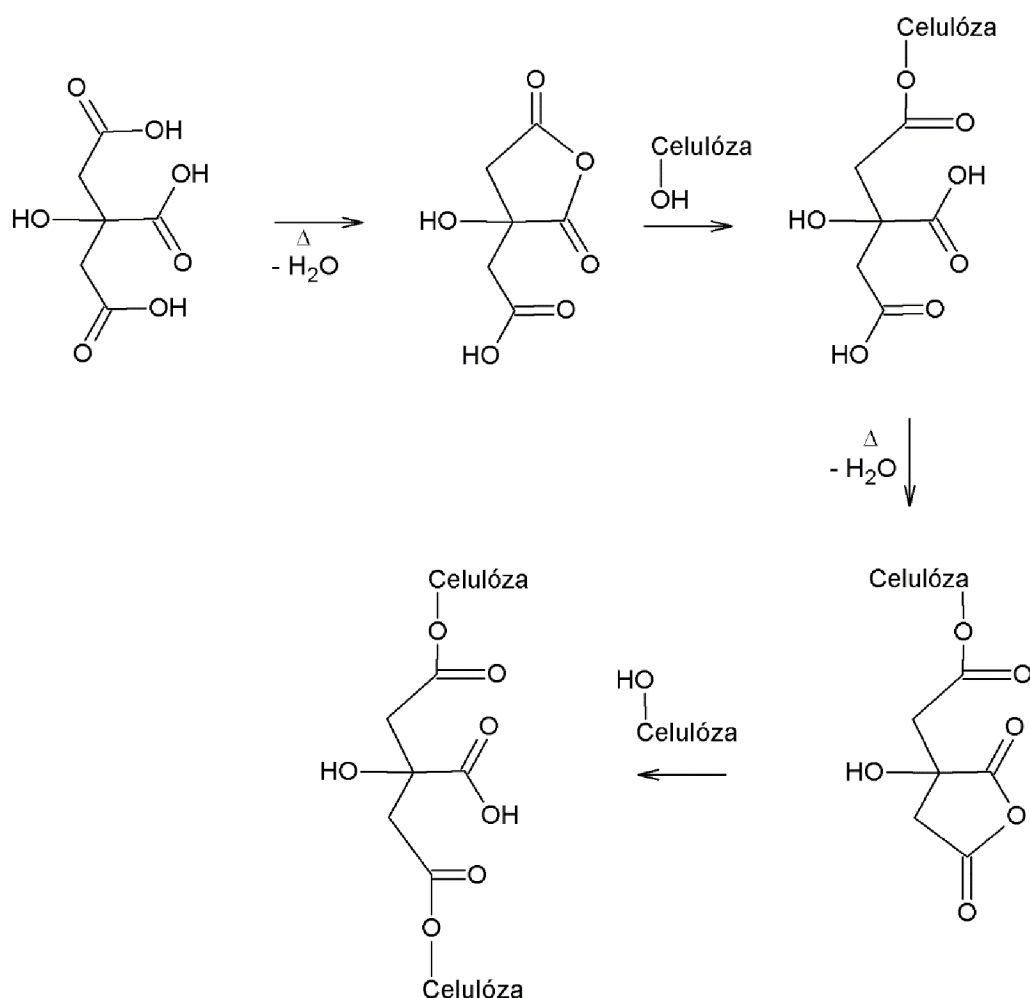
ATR neboli Attenuated Total Reflectance v překladu zeslabená úplná reflektance, je modifikací infračervené spektroskopie, při které je vyslán paprsek elektromagnetického záření ze zdroje na krystal, který je většinou planární a ve tvaru lichoběžníkového hranolu. Na povrchu krystalu je umístěn analyzovaný vzorek, který při kontaktu s paprskem způsobí jeho zeslabení (viz obrázek 9). Penetrační hloubka do povrchu vzorku je řádově v jednotkách mm, jsou tedy charakterizovány pouze velmi tenké povrchové vrstvy. Vzhledem k násobnému odrazu na fázovém rozhraní je však získáno velmi kvalitní spektrum. Postupně zeslabovaný paprsek zdroje je zaznamenán detektorem. Jedná se o účinnou metodu, která vyžaduje minimální přípravu vzorku pro analýzu. ATR analýza vzorků FTIR spektrometrií je rychlá, může být automatizována a eliminuje použití toxických rozpouštědel. [25], [31]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Gelace derivátů celulózy kyselinou citronovou

Kyselina citronová a její využití při chemickém síťování polymerů bylo již v několika publikacích popsáno a k dispozici je také návrh mechanismu vysvětlující síťovací reakci polymerů kyseliny citronové (obrázek 10). Jedná se o její použití při přípravě systémů na bázi celulózy. Mezi hlavní výhody využití kyseliny citronové patří, ve srovnání s jinými běžně využívanými činidly, především její netoxické vlastnosti a nižší cena. [9] Právě díky tomu, že kyselina citronová není toxická, by nové hydrogely získané jejím síťováním mohly najít uplatnění např. v medicíně.

Xie a kol. studovali optimální podmínky pro reakci kukuřičného škrobu s kyselinou citronovou za vzniku produktů, u kterých byla dále studována termální stabilita. Autoři popisují možný průběh reakce jako navázání cyklického anhydridu vzniklého zahříváním kyseliny a její dehydratací na škrob. Postupně je možný vznik dalšího anhydridového cyklu ve struktuře kyseliny prostřednictvím dvou dalších nereaktivních karboxylových skupin, které umožňují připevnění hydroxylové skupiny škrobu. Schéma možného průběhu síťování celulózy kyselinou citronovou je uvedeno na obrázku 10. [33]

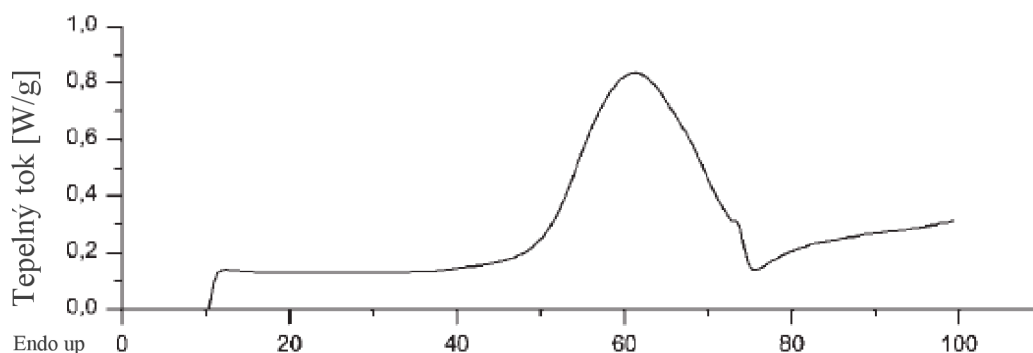


Obrázek 10 Schéma možného průběhu síťování celulózy kyselinou citronovou; upraveno dle [9][33]

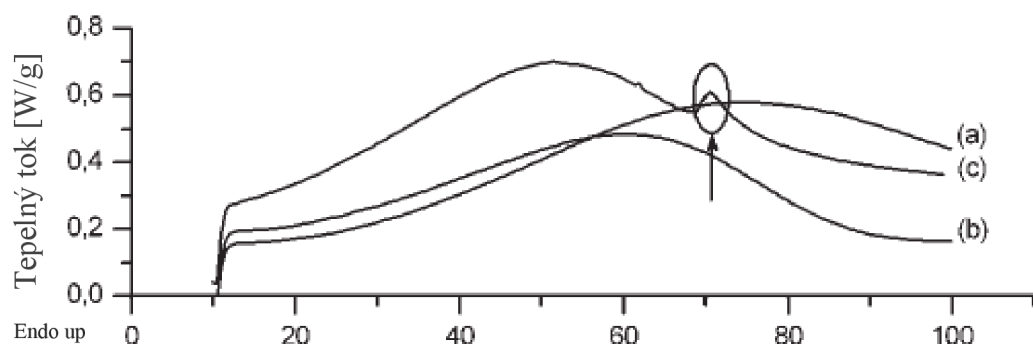
Demitri a kol. ve své práci publikovali použití kyseliny citronové jako síťovacího činidla při tvorbě superabsorbčních hydrogelů na bázi celulózy. Konkrétně byly tvořeny hydrogely z hydroxyethylcelulózy (HEC) a sodné soli karboxymethylcelulózy (NaCMC). Autoři popisují chemickou reakci jako esterifikaci, při které vzniká anhydrid kyseliny citronové schopný reakce s hydroxylovými skupinami použitých derivátů celulózy.

Roztoky polymerů a kyseliny citronové byly připraveny rozpuštěním látek za laboratorní teploty v destilované vodě. Poté byla směs vystavena 30 °C po dobu 24 hodin pro odstranění absorbované vody, která by bránila následnému chemickému síťování polymerů. Předsušený vzorek byl dále zahříván na 80 °C a ponechán 24 hodin k síťovací reakci. Během této doby byla prováděna kontrola produktů. Pro tvorbu hydrogelů byla použita kyselina citronová v koncentracích 1,75 %, 2,75 %, 3,75 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru).

Produkty, i použité látky samotné, byly charakterizovány pomocí DSC a FTIR. Pro vzniklé hydrogely byl také stanoven botnací poměr. Na základě analýz reaktantů byly optimalizovány podmínky pro přípravu hydrogelů samotných. DSC termogramy jsou označovány jako určující pro zvolení nevhodnější teploty pro průběh celého experimentu. Pík s vrcholem v oblasti okolo 60 °C na DSC záznamu čisté kyseliny citronové, dle autorů souvisí s procesem ztráty vody spojeným s dehydratací kyseliny a vedoucí k vytvoření anhydridu (viz obrázek 11). Síťovací reakce by tedy měla proběhnout při teplotě vyšší než 60 °C. Při volbě vhodné teploty je také podstatné volit takový rozsah, ve kterém jsou reaktanty stabilní. Deriváty celulózy použité při této studii vykazují stabilitu asi do 100 °C.



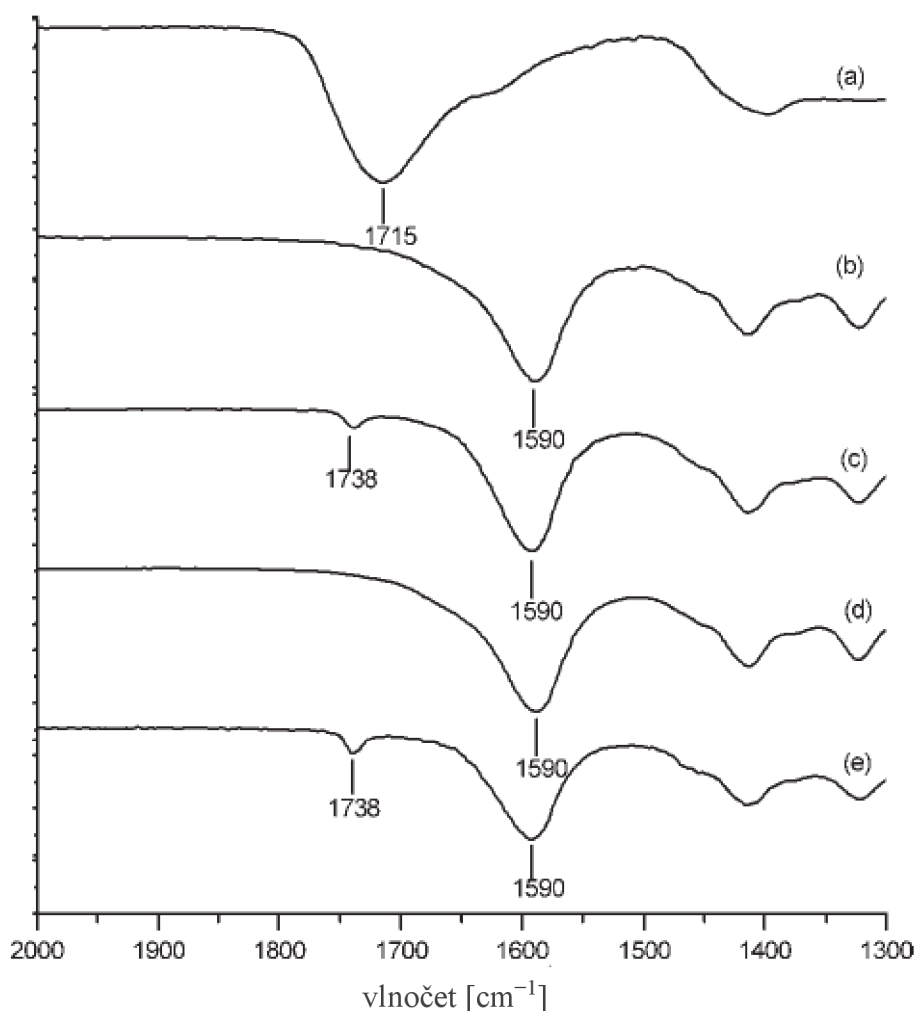
Obrázek 11 DSC záznam čisté kyseliny citronové; upraveno dle [9]



Obrázek 12 DSC záznam čisté NaCMC (a), HEC (b) a hydrogelu NaCMC a HEC v poměru 3 : 1 s obsahem 3,78 % kyseliny citronové (c); upraveno dle [9]

Stejný jev je možné pozorovat také na DSC záznamu uvedeném na obrázku 12 u křivky c, kde je dle autorů endotermický pík spojený s vypařováním vody při procesu anhydrifikace a exotermický pík spojený s esterifikací.

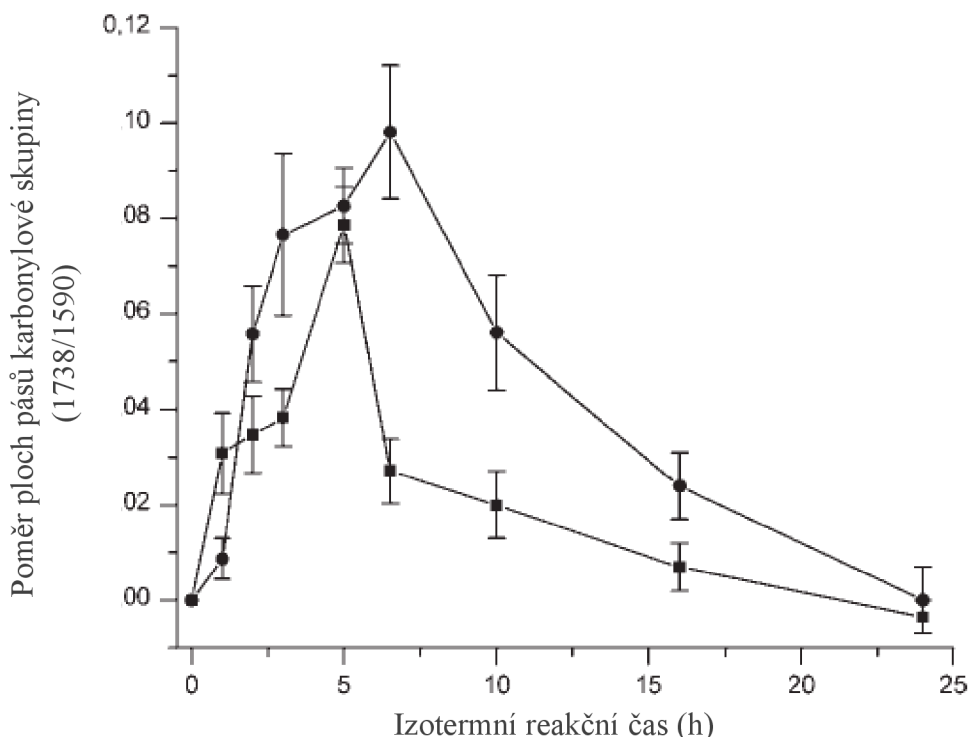
FTIR spektrum kyseliny citronové popisuje na obrázku 13 spektrum a; reakční směs NaCMC s kyselinou citronovou před zahříváním spektrum b; stejnou směs po zahřívání spektrum c; reakční směs HEC a kyseliny citronové před zahříváním spektrum d; a tuto reakční směs po zahřívání spektrum e. Absorpční pás viditelný u spektra kyseliny citronové v oblasti 1715 cm^{-1} je přisuzován karbonylové funkční skupině ve struktuře karboxylové kyseliny ($\text{C}=\text{O}$). Pás viditelný na spektrech b až e v oblasti 1590 cm^{-1} dle autorů odpovídá charakteristické odezvě celulózy. Při smíchání derivátu celulózy s kyselinou citronovou tento pás překrývá odezvu kyseliny citronové (1715 cm^{-1}). Po zahřátí směsi se objeví nový pás v oblasti 1738 cm^{-1} (křivky c a e), který dle autorů odpovídá odezvě cyklického anhydridu. Druhý absorpční pás, který je charakteristický pro odezvu anhydridů v oblasti 1828 cm^{-1} , není pozorován z důvodu své nízké intenzity.



Obrázek 13 FTIR spektra příslušných látek; upraveno dle [9]

Součástí studie bylo také zpracování závislosti poměru absorpčních pásů v oblastech 1738 cm^{-1} a 1590 cm^{-1} v závislosti na reakčním čase, kdy pásy s hodnotou 1590 cm^{-1} byly použity jako reference. Křivka se dvěma maximy v 1. a 5. hodině síťování pro NaCMC s kyselinou citronovou (CA) a s jedním maximem v 5. hodině síťování pro HEC s CA.

Průběh reakce tedy odpovídá předpokládanému reakčnímu schématu na obrázku 10. První maximum je spojeno s anhydriфикаcí zahrnující volnou kyselinu citronovou, následuje první kondenzace anhydridu s hydroxylovou skupinou celulózy. To vede k vymizení anhydridické skupiny C=O, a tedy k poklesu intenzity pásu. Poté jsou karboxylové skupiny napojené na polymer schopny znovu tvořit anhydrid vedoucí k nárůstu pásu v oblasti 1738 cm^{-1} . Druhá reakce anhydridu, zodpovědná za síťování, vede ke spotřebě nové anhydridické skupiny a následuje snížení intenzity pásu v oblasti 1738 cm^{-1} . Pozorování pouze jednoho maxima u HEC s kyselinou citronovou je vysvětleno jako překrytí procesů anhydriфикации a esterifikace (viz obrázek 14). [9]



Obrázek 14 Poměr ploch pásů karboxylové skupiny (1738/1590); upraveno dle [9]

Studie publikovaná Raucci a kol. se zabývá hydrogely na bázi celulózy zesítěnými kyselinou citronovou a jejich účinkem na osteogenní diferenciaci. Byly připravovány 2% (w/w vody) roztoky polymerů (NaCMC a HEC) v destilované vodě za přítomnosti kyseliny citronové. Ta byla přidávána o koncentraci 20 % (w/w polymeru). Vzorky byly nejprve předsušovány při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 hodin a dále pak ponechány 12 hodin k samotné síťovací reakci. Použitých 12 hodin bylo dostatečných pro získání produktů s požadovanými vlastnostmi. Jejich charakterizaci pomocí FTIR bylo dle autorů potvrzeno chemické síťování, a to zobrazením absorpčního pásu v oblasti 1723 cm^{-1} a sníženou intenzitou pásů v oblasti odpovídající hydroxylové skupině. Mimo jiné byl také prokázán vliv kyseliny citronové na zvýšení hydrofilicity a drsnosti povrchu vytvořených hydrogelů. [34]

U hydrogelů karboxymethylcelulózy byly studovány a porovnávány vlastnosti v závislosti na použitém síťovacím činidle, kterým byly kyselina citronová, maleinová a jantarová. Autoři postupovali při přípravě hydrogelu rozpuštěním NaCMC v destilované vodě a přidáním příslušné kyseliny. Po řádném rozpuštění surovin byla směs za stálého míchání zahřívána na $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Následně byla směs přemístěna do Petriho misky a ponechána

v sušárně 3 hodiny při 45 °C. Po vysušení byl vzorek promyt ethanolem. Zesítnění NaCMC kyselinou citronovou bylo potvrzeno zobrazením pásu na FTIR spektru produktu v oblasti 1700 cm⁻¹. Dle autorů byl absorpční pás zřejmě odezvou vzniku esteru. V publikaci bylo zkoumáno antimikrobiální chování hydrogelů po přidání nanočástic stříbra (AgNPs). Hydrogely síťované kyselinou citronovou vykazovaly, v porovnání s ostatními, větší uniformitu pórů, homogennější větvení vytvořených sítí a vyšší objem vody schopný do své struktury opětovně vázat. [35]

Kyselina citronová, její schopnost síťovat polymery a vlastnosti, které ovlivňuje u konečného produktu byly dále studovány např. při síťování hydroxypropylmethylcelulózy, celulózy a polyethylenglykolu, škrobu a jeho derivátů, kolagenu a glutenu. [36], [37], [38], [39], [40]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V rámci experimentální části diplomové práce byly připraveny roztoky hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu v ultračisté deionizované vodě o různých poměrech s přidavkem kyseliny citronové jako síťovacího činidla. Pro srovnání byly vytvořeny také roztoky obsahující pouze hydroxyethylcelulózu a pouze hyaluronan s kyselinou citronovou. Do gelace, jako procesu přípravy hydrogelů, lze zahrnout již smíchání výchozích látek, kde mohou při rozpouštění působit síly vedoucí k fyzikálnímu síťování. Tato diplomová práce se zabývala hlavně chemickým síťováním daných polymerů síťovacím činidlem – kyselinou citronovou. Použité reaktanty a vzniklé produkty byly charakterizovány pomocí FTIR, DSC a TG analýzy.

4.1 Použité chemikálie

Kyselina citronová bezvodá; $M = 192,13$ g/mol; číslo šarže PP/2014/06580; použití pouze pro analýzu; dodavatel Lach-Ner, s.r.o.

2-Hydroxyethylcelulóza $M \sim 250\,000$ g/mol; číslo šarže 308633-5006; použití pouze pro výzkum a vývoj; dodavatel Sigma Aldrich spol. s.r.o.

Sodium Hyaluronát 1 500–1 750 kDa; číslo šarže 214-9062; použití pouze pro technické účely; dodavatel Contipro Biotech s.r.o.

Ultračistá deionizovaná voda; přístroj PURELAB, Option R7/15; ELGA

4.2 Použité přístroje

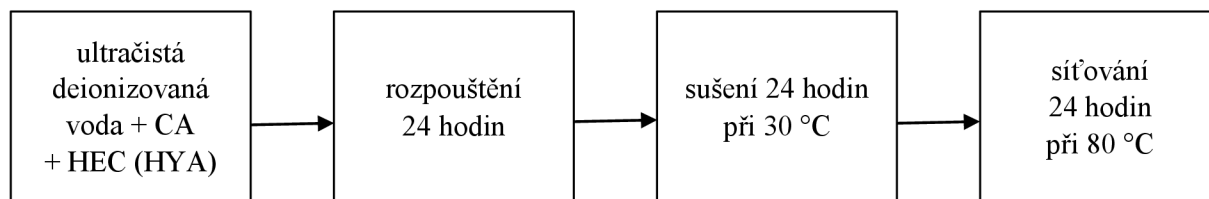
FT-IR spektrometr Nicolet iS50ATR; Thermo Fisher Scientific Inc

DSC Q2000; TA Instruments

TGA Q5000; TA Instruments

4.3 Gelace roztoků polymerů

Výchozí postup [9] přípravy roztoků polymerů pro jejich následnou gelaci spočíval ve smíchání reaktantů HEC, HYA, CA v ultračisté deionizované vodě. Roztoky polymerů byly 2% v případě HEC a 1% v případě obsahu HEC a HYA v hmotnostním poměru 2 : 1. Kyselina citronová byla přidávána v množství potřebném pro vytvoření 5%, 10% a 20% roztoků (w/w polymeru) (viz tabulka 2, sloupec A, B a C). Vzorky byly umístěny v uzavřených Petriho miskách do sušárny nejprve při 30 °C 24 hodin pro odstranění absorbované vody a následně při 80 °C 24 hodin, kdy probíhalo samotné síťování. Schéma postupu je znázorněno na obrázku 15.



Obrázek 15 Postup gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou

Navážka polymeru pro přípravu jeho 2% roztoku (w/w ultračisté deionizované vody) byla vypočtena dle rovnice (6):

$$m_p = m_v \cdot \frac{x_p}{x_v}, \quad (6)$$

kde m_p vyjadřuje hmotnost polymeru, m_v hmotnost ultračisté deionizované vody, x_p obsah polymeru v konečném roztoku vyjádřený v procentech a x_v je obsah ultračisté deionizované vody v konečném roztoku vyjádřený v procentech. Dle stejného principu byla také vypočtena navážka kyseliny citronové pro vytvoření roztoků o koncentracích 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru) (viz rovnice (7)):

$$m_{ca} = m_p \cdot \frac{x_{ca}}{x_p}, \quad (7)$$

kde m_{ca} vyjadřuje hmotnost kyseliny citronové, m_p hmotnost polymeru, x_{ca} obsah kyseliny citronové v konečném roztoku vyjádřený v procentech a x_p je obsah polymeru v konečném roztoku vyjádřený v procentech. Všechny suroviny pro přípravu daných roztoků byly navažovány s přesností na čtyři desetinná místa.

Po získání prvních produktů, které neodpovídaly předpokladům a charakteristice hydrogelů, byla nutná studie postupu přípravy a optimalizace celého procesu gelace. Jelikož bylo potřeba ověřit, zda vůbec dochází k chemickému síťování kyselinou citronovou, jak bylo zjištěno z literatury [9], [34], celý postup probíhal nejprve jen za použití hydroxyethylcelulózy. Poté následovala gelace směsi hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu v různých poměrech a gelace hyaluronanu samotného.

4.3.1 Optimalizace postupu gelace hydroxyethylcelulózy kyselinou citronovou

Vynechání předsušení, zkrácená doba síťování

Pro optimalizaci postupu gelace hydroxyethylcelulózy byla upravována doba předsušení při 30 °C a zahřívání při 80 °C pro zesítnění polymeru. V prvním případě bylo vynecháno předsušení a doba síťování ponechána na 24 hodin. Dále byl využit postup se zkrácenou dobou síťování, a to na 12 hodin. V obou případech byly zachovány koncentrace kyseliny citronové 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru) a použito uzavřených Petriho misek v kroku sušení i síťování.

Změna koncentrace kyseliny citronové

Jedna z úprav postupu spočívala ve změně množství přidané kyseliny citronové (CA) k roztokům polymerů. Připraveny byly vzorky 2% roztoků (w/w vody) hydroxyethylcelulózy v ultračisté deionizované vodě. Do zásobní lahvičky bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 0,2 g HEC, příslušné množství CA a 9,8 g ultračisté deionizované vody. Rozpouštění probíhalo v uzavřených lahvičkách na magnetickém míchadle a pro obdržení transparentního roztoku bylo potřeba asi 24 hodin. Poté byl roztok převeden na dvě Petriho misky, přičemž v každé z nich byla asi 1 cm vrstva vzorku. Roztok byl rozdělen z důvodu srovnání dvou produktů o stejném složení. CA byla přidávána v takovém množství, aby výsledná koncentrace roztoků byla 5 % (A), 10 % (B) a 20 % (C) (w/w polymeru), 5 % (E), 10 % (F) a 20 % (G)

(w/w ultračisté deionizované vody) a přídavek 0,2 g CA (D), tedy s poměrem kyseliny k polymeru 1 : 1 podle tabulky 2.

Tabulka 2 Navážky kyseliny citronové pro přípravu roztoků o dané koncentraci

| Označení vzorku | A | B | C | D | E | F | G |
|-----------------|--------|--------|------|-----|-----|---|---|
| Hmotnost CA [g] | 0,0105 | 0,0222 | 0,05 | 0,2 | 0,5 | 1 | 2 |

Uzavřené Petriho misky byly vloženy do sušárny a ponechány 24 hodin při 30 °C pro odstranění absorbované vody. Po uplynutí této doby byla teplota sušárny zvýšena na 80 °C a vzorky zde byly ponechány opět 24 hodin, tentokrát k síťovací reakci. Po předpokládaném zesítnění hydroxyethylcelulózy bylo vizuálně hodnoceno chování produktu po opětovném kontaktu s ultračistou deionizovanou vodou.

Na základě výsledků byl postup později proveden také s otevřenými Petriho miskami při sušení i síťování, kdy tyto produkty byly vizuálně porovnávány s produkty získanými postupem s otevřenými Petriho miskami. V tomto případě byly zvoleny pouze vzorky obsahující kyselinu citronovou o koncentraci 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru).

Gelace hydroxyethylcelulózy kyselinou citronovou

Srovnáním výsledků předchozích experimentů byl vytvořen finální postup pro gelaci hydroxyethylcelulózy (HEC) kyselinou citronovou, jehož produkty byly charakterizovány pomocí FTIR, DSC a TG analýz. 2% (w/w ultračisté deionizované vody) roztoky HEC v ultračisté deionizované vodě byly vytvořeny navážením 0,2 g prášku polymeru do zásobní lahvičky obsahující 9,8 g ultračisté deionizované vody s rozpuštěnou kyselinou citronovou o příslušné hmotnosti (viz tabulka 2, sloupec A, B a C). Kyselina citronová byla volena o koncentracích 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru). Suroviny byly navažovány s přesností na čtyři desetinná místa. Po dokonalém rozpuštění polymeru (asi 24 hodin) byl tento převeden do lahviček z LDPE tak, aby výška vzorku odpovídala asi 1 cm. Vzorek byl vložen do sušárny, kde probíhalo nejprve předsušení při 30 °C 24 hodin, poté byl zcela vysušený vzorek ponechán k síťování při 80 °C 24 hodin. Po 7 a 19 hodinách doby určené pro síťování kyselinou citronovou byla prováděná kontrola vzorků. V případě tohoto postupu byly lahvičky se vzorky po celou dobu sušení a síťování v sušárně otevřené. Jako reference byl stejným způsobem vytvořen vzorek filmu hydroxyethylcelulózy bez přídavku kyseliny citronové, u kterého byly provedeny stejné analýzy jako u ostatních vzorků.

4.3.2 Gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou

Jelikož hyaluronan tvoří vysoce viskózní roztoky již při jeho nízkých koncentracích, byla pro snadnější manipulaci s roztokem snížena koncentrace polymerů ze 2 % na 1 % (w/w ultračisté deionizované vody). Roztoky byly připraveny navážením 0,1 g prášku polymeru nebo směsi polymerů do zásobní lahvičky, která obsahovala příslušné množství kyseliny citronové (tabulka 3) a 9,8 g ultračisté deionizované vody. Suroviny byly navažovány s přesností na čtyři desetinná místa. Po dokonalém rozpuštění polymeru byl roztok převeden do lahviček z LDPE a vložen do sušárny, kde probíhalo nejprve předsušení při 30 °C 24 hodin, poté síťování při 80 °C 24 hodin s průběžnou kontrolou. Lahvičky se vzorky byly po celou dobu pobytu v sušárně otevřené.

Vzorky o celkové hmotnosti 10 g byly připraveny dle tabulky 3, kde sloupec A znázorňuje 5% roztoky CA (w/w polymeru), sloupec B 10% roztoky CA (w/w polymeru) a sloupec C 20% roztoky CA (w/w polymeru). Směsi polymerů tvořily v jednom případě hyaluronan a hydroxyethylcelulóza v hmotnostním poměru 3 : 7, ve druhé směsi hyaluronan a hydroxyethylcelulóza v hmotnostním poměru 7 : 3. Jako reference byly připraveny 1% roztoky (w/w ultračistě deionizované vody) obsahující čistou hydroxyethylcelulózu a 1% roztoky (w/w ultračistě deionizované vody) obsahující čistý hyaluronan, což je také znázorněno v tabulce 3.

Tabulka 3 Navážky jednotlivých reaktantů

| Označení vzorku | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A ₄ | B ₁ | B ₂ | B ₃ | B ₄ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Hmotnost HEC [g] | 0,1 | - | 0,3 | 0,7 | 0,1 | - | 0,3 | 0,7 | 0,1 | - | 0,3 | 0,7 |
| Hmotnost HYA [g] | - | 0,1 | 0,7 | 0,3 | - | 0,1 | 0,7 | 0,3 | - | 0,1 | 0,7 | 0,3 |
| Hmotnost CA [g] | 0,0058 | | | | 0,0111 | | | | 0,0250 | | | |
| Hmotnost vody [g] | 9,9 | | | | | | | | | | | |

4.4 Analýza produktů

4.4.1 DSC

DSC analýza byla měřena na přístroji DSC Q2000 společnosti TA Instruments. Vzorek byl navážen a následně vložen na pánvičku DSC vah. Bylo použito otevřené hliníkové pánvičky a inertní prostředí dusíku. Jelikož se jednalo o DSC s tepelným tokem, byla pánvička vložena na samostatné teplotní čidlo umístěné ve společné cele s referenčním vzorkem. Přístroj byl nastaven na cyklus ohřívání z laboratorní teploty 25 °C na 100 °C, izoterma 3 minuty při 100 °C (1), chlazení ze 100 °C na laboratorní teplotu 25 °C, ohřívání z laboratorní teploty 25 °C na 200 °C (2). Výstupem DSC analýzy byla DSC křivka, která byla dále manuálně zpracována v softwaru TA Universal Analysis společnosti TA Instruments.

4.4.2 TGA

Termogravimetrická analýza byla měřena na přístroji TGA Q5000 společnosti TA Instruments. Platinová pánvička byla vložena do nosiče vzorků, kde proběhlo automatické tárování vložené a srovnávací pánvičky. Vzorek byl navážen a následně vložen na pánvičku odebranou pinzetou z přístroje. Ten bylo potřeba na pánvičku pokládat tak, aby ležel rovnoměrně na jejím dně a nedotýkal se jejích okrajů. Pánvička se vzorkem byla vložena zpět do nosiče vzorků přístroje a v příslušném softwaru byly zadány potřebné údaje pro analýzu. Pro TG analýzu bylo zvoleno ohřívání vzorku z laboratorní teploty 25 °C na 200 °C a rychlost ohřívání byla stanovena na 10 °C za minutu. Po nastavení začátku měření již přístroj pracuje automaticky, přemístí pánvičku z nosiče vzorků do nitra přístroje, kde jsou umístěny termováhy a probíhá zde analýza. Po ukončení měření pánvičku přístroj opět zavede do nosiče vzorků. Před začátkem další analýzy je potřeba z pánvičky odebrat zbytek vzorku a prázdnou pánvičku ožehnout v plamenu,

poté je připravena k dalšímu měření. Výstupem TG analýzy byla termogravimetrická křivka, která byla dále manuálně zpracována v softwaru TA Universal Analysis společnosti TA Instruments.

4.4.3 FTIR

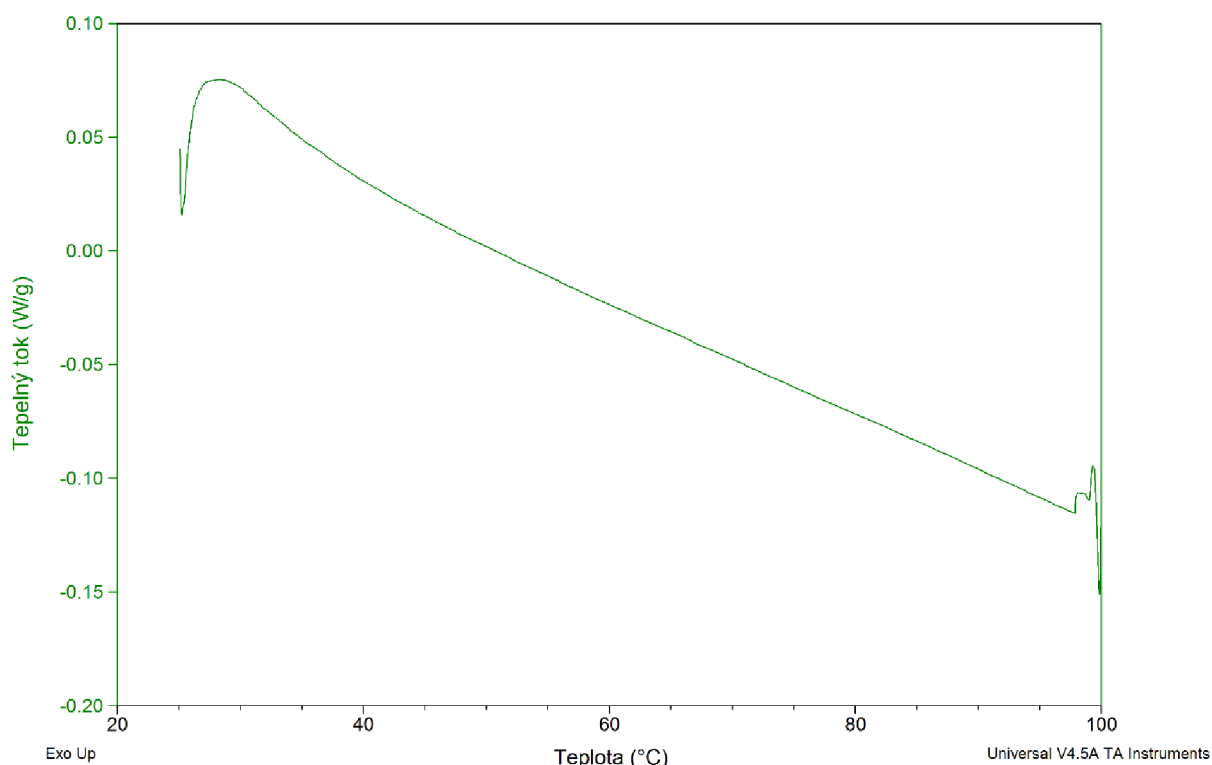
Analýza ATR byla měřena na přístroji FT-IR spektrometr Nicolet iS50 ATR společnosti Thermo Fisher Scientific Inc. Vzorek byl položen na okénko spektrometru, pod kterým je umístěn diamantový krystal a na toto místo připevněn klíčkou. U vzorků filmů bylo možné jejich přímé měření. V případě prášků výchozích látek byla nutná jejich úprava pro zajištění co nejhomogennější struktury měřeného materiálu. K tomu bylo využito achátové třecí misky s tloučkem. Měření probíhalo se spektrálním rozlišením 6 cm^{-1} , celkovým počtem akumulovaných záznamů 64 (počet skenů) a pozadím při měření byl vzduch. Získané FTIR spektrum bylo dále manuálně zpracováno v programu OMNIC a FTIR spektra dále upravena v programu OriginLab. Interpretace absorpčních pásů byla provedena na základě literatury [9], [34], [36], [41], [42]

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace postupu gelace HEC a HYA kyselinou citronovou

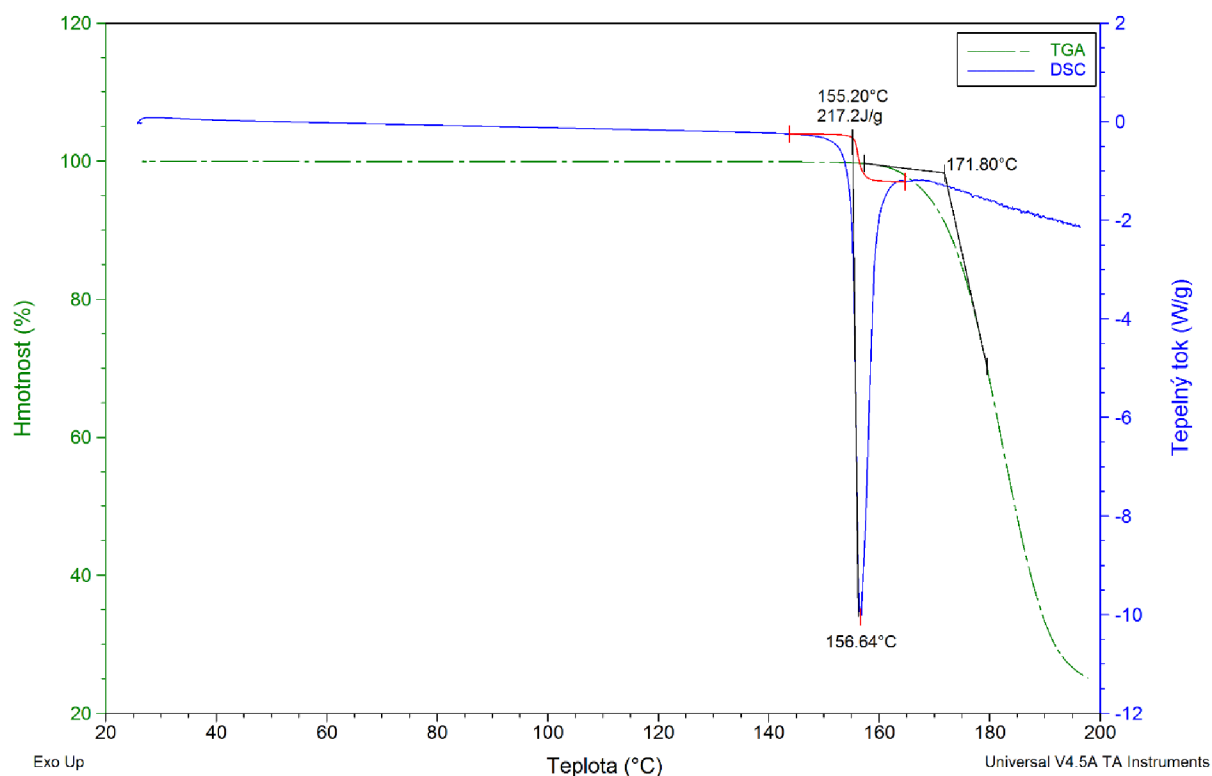
5.1.1 Charakterizace výchozích látek

Využitím termických analýz DSC a TGA se nepodařilo prokázat dehydrataci kyseliny citronové vedoucí k vytvoření jejího anhydridu při teplotě asi 60 °C uvedenou v publikaci [9]. Na obrázku 16 a 17 jsou uvedeny DSC záznamy kyseliny citronové, ve kterých není viditelná žádná změna způsobená dehydratací vzorku v oblasti okolo 60 °C. Jednou z možností vysvětlení rozdílu v naměřených DSC analýzách může být použití jiných forem kyseliny citronové. Vzhledem ke skutečnosti, že u monohydrátu kyseliny citronové dochází okolo teploty 70–75 °C k jeho přeměně na bezvodou formu kyseliny [12], mohl být ve zmíněné publikaci použit právě monohydrát kyseliny. Nejednalo by se tedy o ztrátu vody při vytváření cyklického anhydridu ve struktuře kyseliny, ale o odstranění vody tvořící monohydrát. Není však vyloučena další možnost vysvětlení rozdílnosti výsledků, např. jiná citlivost přístroje pro měření DSC záznamu.

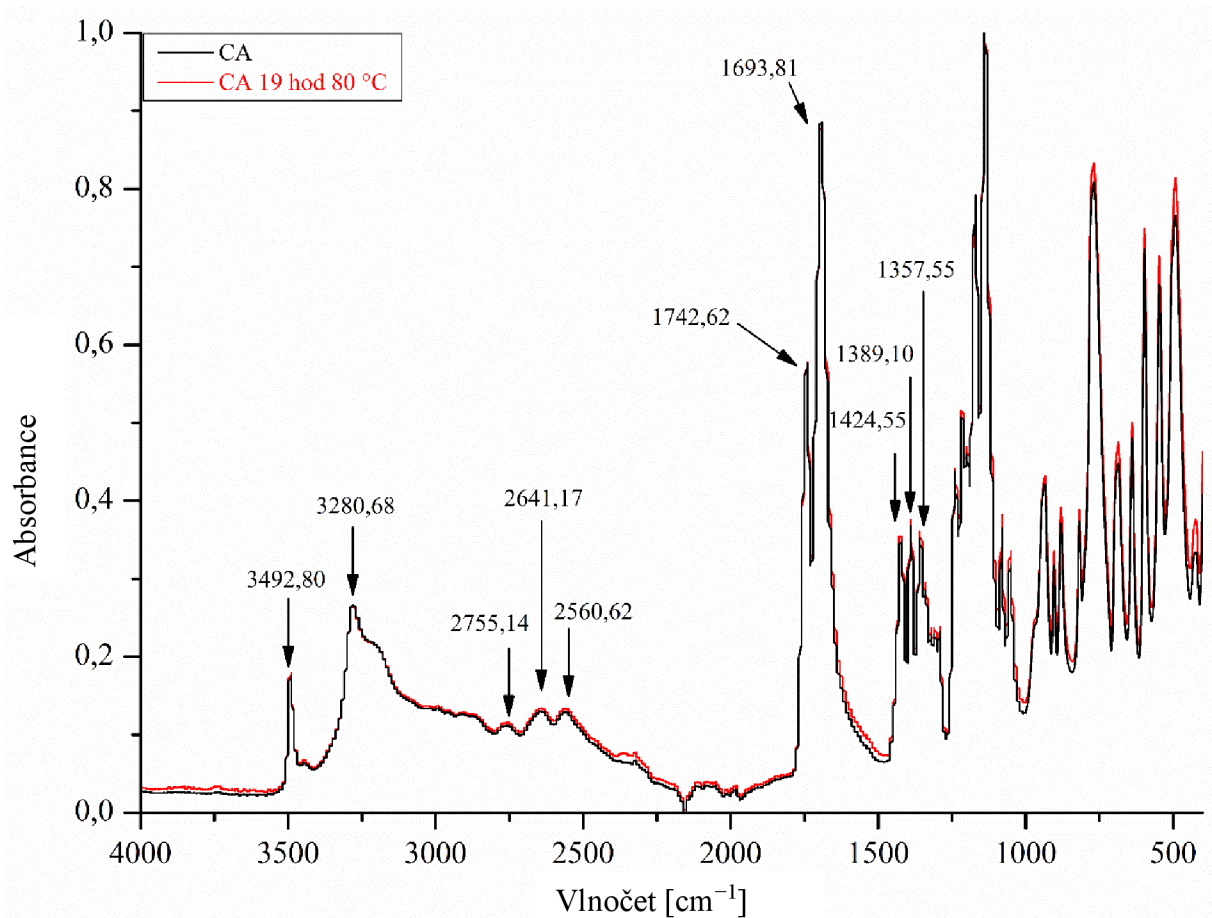


Obrázek 16 DSC záznam kyseliny citronové; 1. část cyklu (ohřev z laboratorní teploty na 100 °C, izoterma při 100 °C; krok 10 °C za minutu)

DSC záznam 2. části cyklu měření a termogravimetrická křivka kyseliny citronové jsou uvedeny na obrázku 17. Tání kyseliny citronové začíná při 155,20 °C, přičemž maximum tohoto děje bylo naměřeno při 156,64 °C. Kyselina citronová začala dle TG analýzy degradovat při 171,80 °C. Hmotnostní úbytek kyseliny při zvoleném cyklu ohřevu, tedy z laboratorní teploty na 200 °C, je 74,90 % původní hmotnosti. Průběh obou křivek je až po tání a degradaci vzorku bez viditelných změn. Dochází-li tedy k vytvoření anhydridu kyseliny citronové, na který je při gelaci navázána hydroxyethylcelulóza, nebyl tento děj prostřednictvím termických analýz čisté bezvodé kyseliny citronové přístroji zaznamenán.

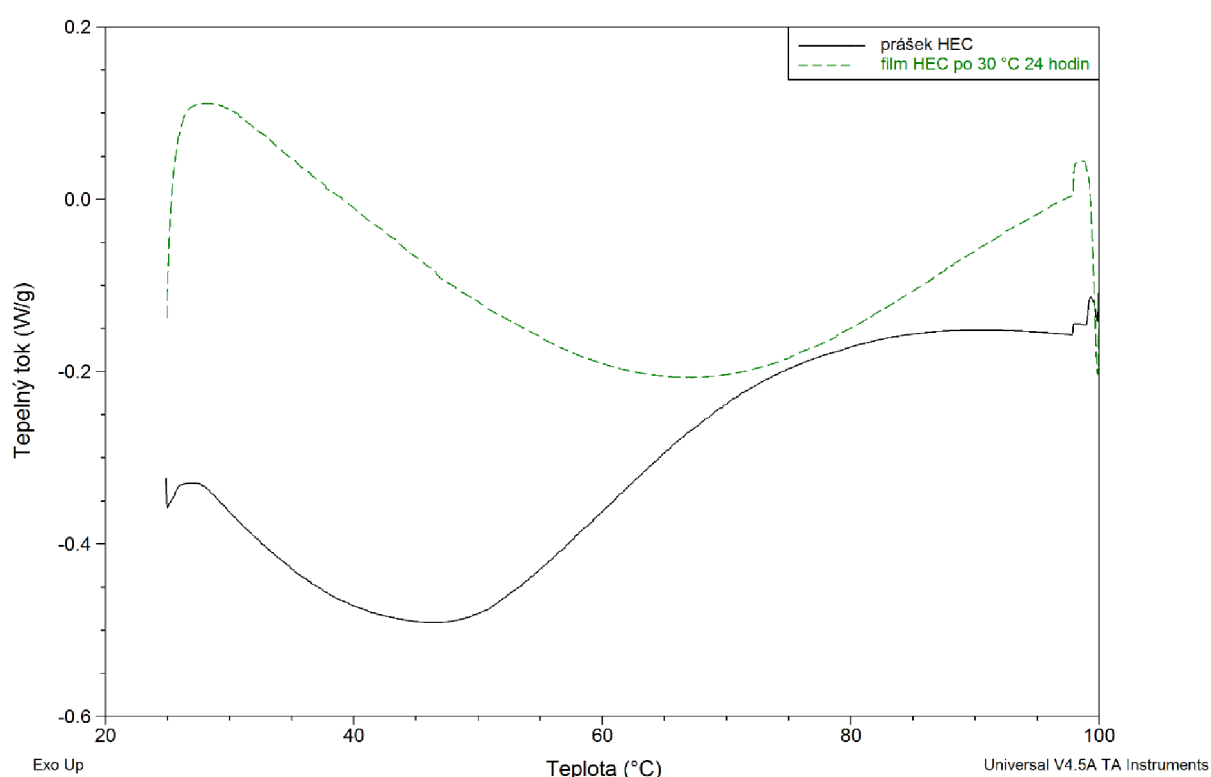


Obrázek 17 DSC a TGA křivky kyseliny citronové; 2. část cyklu měření DSC záznamu (ohřívání ze 100 °C na 200 °C; krok 10 °C za minutu)



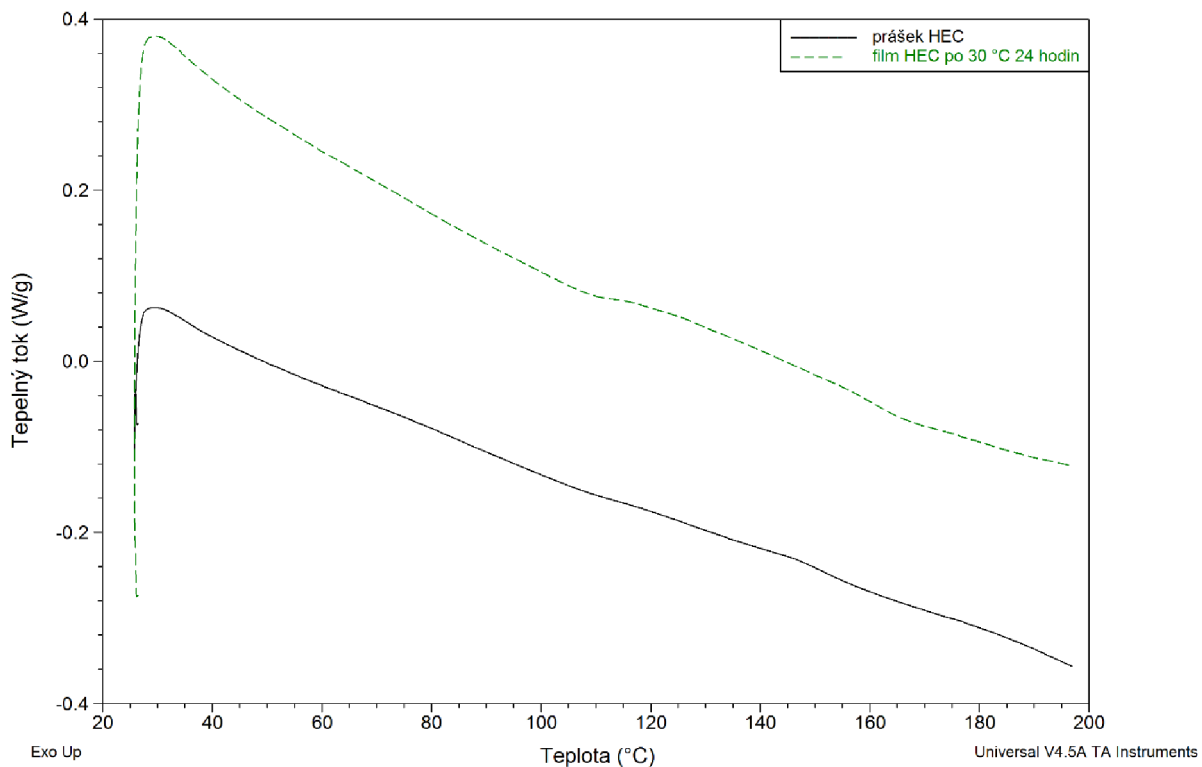
Obrázek 18 FTIR spektrum kyseliny citronové (CA)

FTIR spektrum kyseliny citronové získané pomocí ATR spektrometrie je uvedeno na obrázku 18. Pro srovnání je zde spektrum kyseliny citronové používané pro experiment a spektrum kyseliny citronové po jejím ohřevu na 80 °C po dobu 24 hodin, což odpovídá době síťovací reakci u postupu gelace polymerů kyselinou citronovou. V porovnávaných spektrech není výrazný rozdíl. Pokud je předpokladem vytvoření anhydridu kyseliny při jejím ohřevu nad 60 °C, je možné, že než bylo FTIR spektrum měřeno, mohlo u zahřívání vzorku dojít k adsorpci vlhkosti. Absorpční pásy v oblastech 3 493 cm^{-1} a 3 281 cm^{-1} odpovídají valenčním vibracím hydroxylových funkčních skupin (–OH). Pásy v oblasti 2 755 cm^{-1} , 2 641 cm^{-1} a 2 561 cm^{-1} odpovídají valenčním vibracím vazeb mezi dimery, které mohou karboxylové kyseliny tvořit v přítomnosti vlhkosti. Jedná se o slabé vodíkové interakce. Absorpční pásy v oblastech 1 743 cm^{-1} a 1 694 cm^{-1} odpovídají valenčním vibracím karboxylové funkční skupiny C=O v karboxylových kyselinách. Trojici absorpčních pásů v oblastech 1 425 cm^{-1} , 1 389 cm^{-1} a 1 358 cm^{-1} lze přiřadit vibracím C–H vazeb v alifatických –CH₂ skupinách.

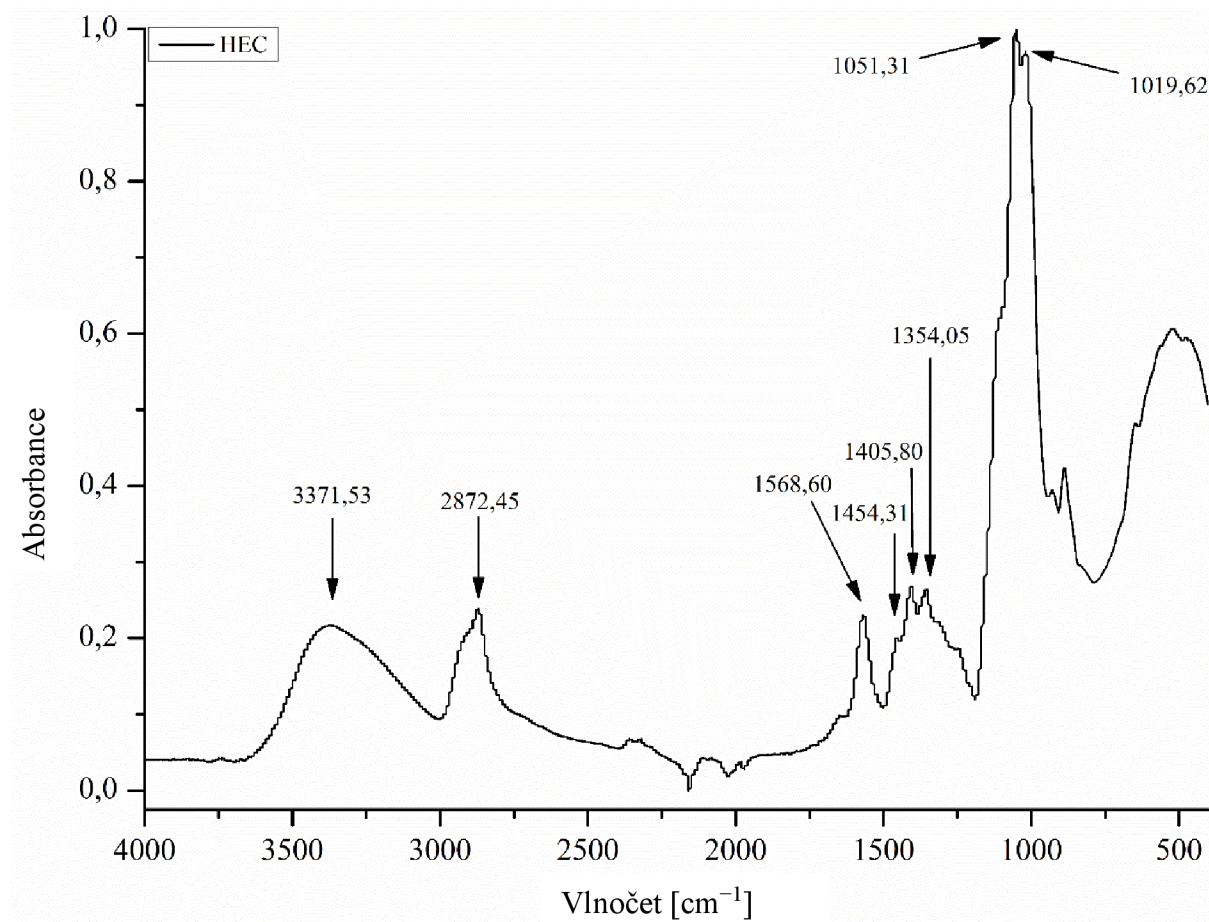


Obrázek 19 DSC záznam hydroxyethylcelulózy; 1. část cyklu měření (ohřev z laboratorní teploty na 100 °C, izoterma 3 minuty při 100 °C; krok 10 °C za minutu)

Porovnání DSC záznamů prášku hydroxyethylcelulózy využívaného pro přípravu roztoků pro gelaci a 2% roztoku (w/w ultračisté deionizované vody) hydroxyethylcelulózy vysušeného při 30 °C 24 hodin je uvedeno na obrázku 19. Jedná se o 1. část cyklu DSC analýzy (ohřev z laboratorní teploty na 100 °C a 3 minuty izoterma při 100 °C). Na záznamu je u obou forem vzorků hydroxyethylcelulózy viditelný endotermický pík, který je možné vysvětlit vypařováním adsorbované vlhkosti ze vzorků. Na DSC záznamech hydroxyethylcelulózy 2. části cyklu měření (ohřev z laboratorní teploty na 200 °C) neprobíhal ve vzorcích hydroxyethylcelulózy žádný děj způsobující větší endotermické či exotermické vychýlení křivky. DSC křivky 2. části cyklu měření jsou uvedeny na obrázku 20.



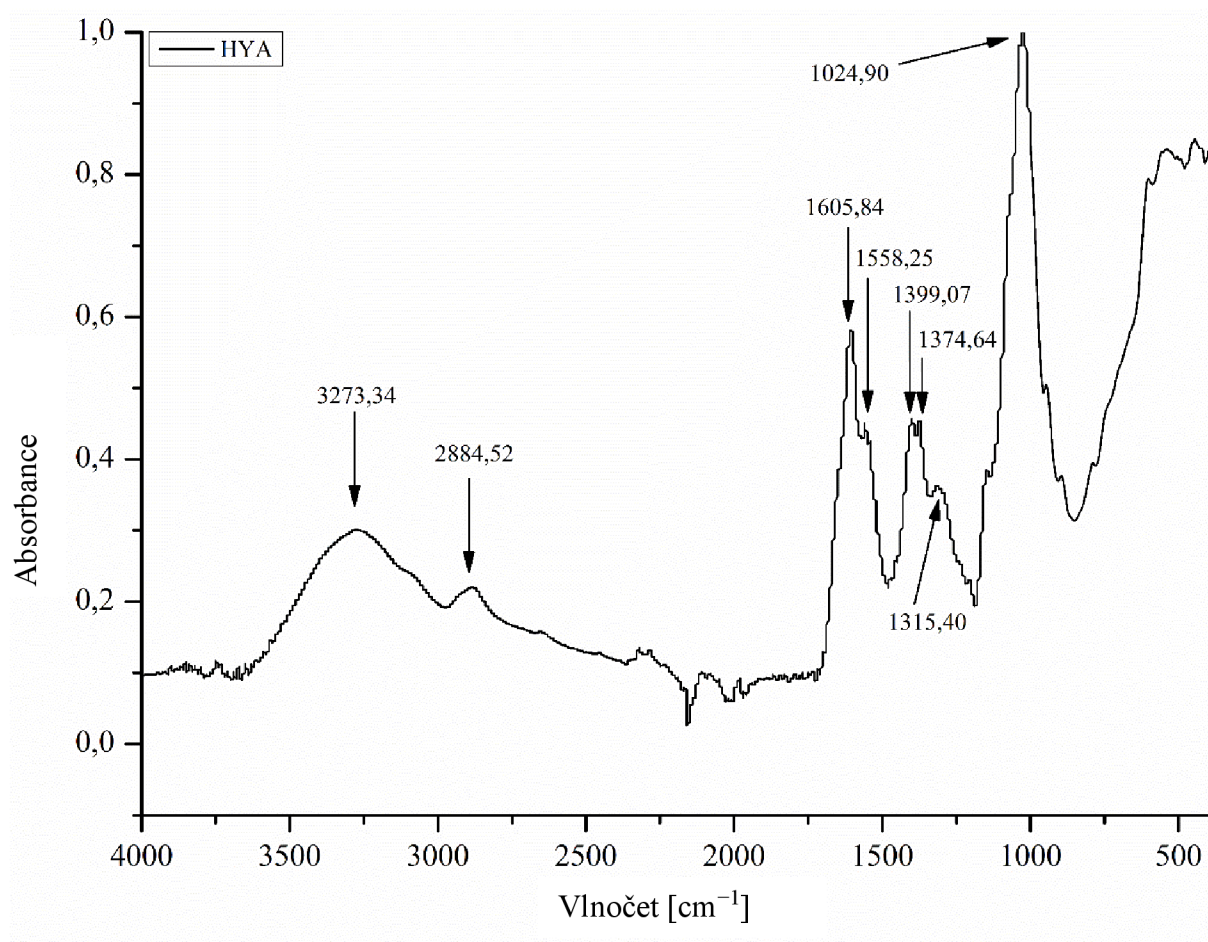
Obrázek 20 DSC záznam hydroxyethylcelulózy; 2. část cyklu měření DSC záznamu (ohřev z laboratorní teploty na 200 °C s krokem 10 °C za minutu)



Obrázek 21 FTIR spektrum hydroxyethylcelulózy (HEC)

Na FTIR spektru hydroxyethylcelulózy (viz obrázek 21) lze pozorovat absorpční pás v oblasti $3\,372\text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenčním vibracím hydroxylových funkčních skupin ($-\text{OH}$). Pás v oblasti $2\,873\text{ cm}^{-1}$ odpovídá valenčním vibracím vazeb $\text{C}-\text{H}$ v alifatických skupinách $-\text{CH}_2$. Pás v oblasti $1\,568,60\text{ cm}^{-1}$ znázorňuje typickou odezvu celulózy, která tvoří kostru struktury hydroxyethylcelulózy. Skupina absorpčních pásů v oblastech $1\,454\text{ cm}^{-1}$, $1\,406\text{ cm}^{-1}$ a $1\,355\text{ cm}^{-1}$ odpovídá vibracím $\text{C}-\text{H}$ vazeb v alifatických $-\text{CH}_2$ skupinách. Absorpční pás v oblasti $1\,051\text{ cm}^{-1}$ odpovídá odezvě primárních alkoholů a pás v oblasti $1\,020\text{ cm}^{-1}$ je zpravidla přisuzována skeletální vibraci $\text{C}-\text{C}$.

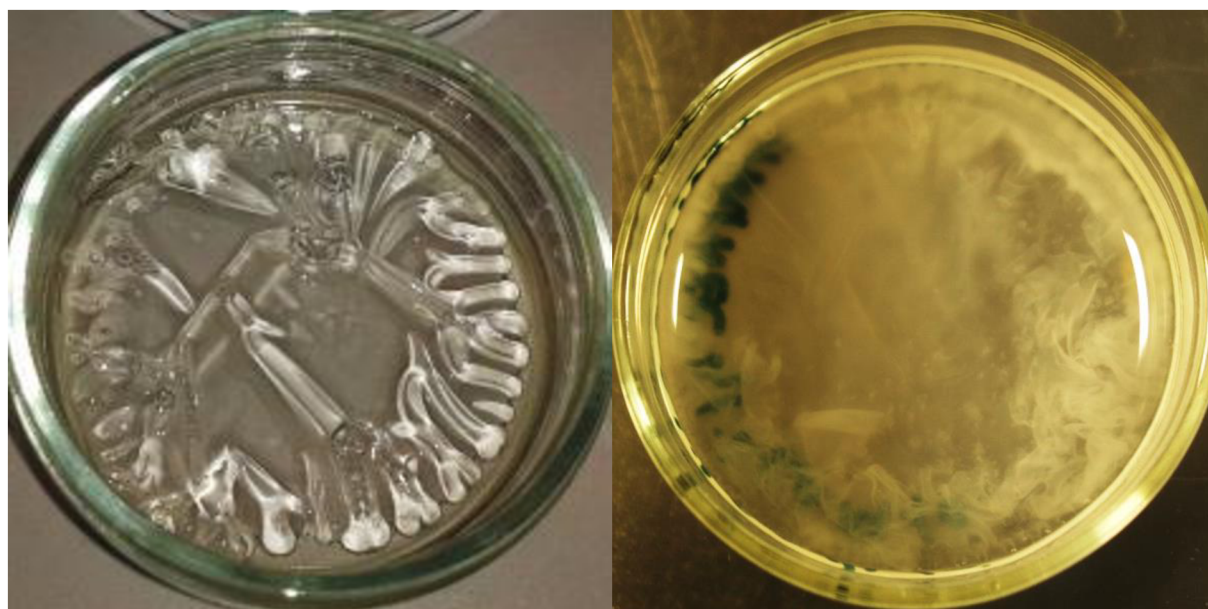
FTIR spektrum hyaluronanu je možné pozorovat na obrázku 22. Absorpční pás v oblasti $3\,273\text{ cm}^{-1}$ pravděpodobně souvisí s přítomností hydroxylových funkčních skupin ($-\text{OH}$) ve struktuře hyaluronanu. Pás v oblasti $2\,885\text{ cm}^{-1}$ může být způsoben valenčními vibracemi vazeb $\text{C}-\text{H}$ v alifatických skupinách $-\text{CH}_2$. Asymetrické valenční vibrace karboxylátového anionu ($-\text{COO}^-$) poskytují zpravidla absorpční pásy v oblastech $1\,606\text{ cm}^{-1}$ a $1\,375\text{ cm}^{-1}$. Vazbě $\text{N}-\text{H}$ v amidové funkční skupině odpovídá pás v oblasti $1\,558\text{ cm}^{-1}$. Pásky v oblastech $1\,399\text{ cm}^{-1}$ a $1\,315\text{ cm}^{-1}$ jsou zřejmě odezvou vazeb $\text{C}-\text{O}$ primárních alkoholů. Pás s vrcholem v oblasti $1\,025\text{ cm}^{-1}$ může být způsoben valenčními vibracemi vazeb $\text{C}-\text{O}-\text{C}$.



Obrázek 22 FTIR spektrum hyaluronanu (HYA)

5.1.2 Postupy přípravy vedoucí ke vzniku nežádoucích produktů

Jak již bylo zmíněno v podkapitole 4.3, použitím výchozího postupu gelace daných polymerů, byly získány produkty s nežádoucími vlastnostmi. Bylo tedy nutné zjistit vhodné podmínky gelace. Z počátku experimentu nebylo zcela jasné, jakou roli v celém procesu hraje předsušení vzorku při 30 °C a kolik vody může obsahovat vzorek při síťování (80 °C). Níže jsou uvedeny příklady produktů, které byly získány při optimalizaci postupu gelace. Jeden z produktů získaných prvními reakcemi HEC a CA je uveden na obrázku 23 vlevo. Ve všech případech, kdy předsušení při 30 °C probíhalo s uzavřenými Petriho miskami, vznikala po síťování buď vysoce viskózní kapalina (při působení 80 °C méně než 20 hodin), nebo suchý film (při působení 80 °C více než 20 hodin). Stejně tomu bylo také v případě, kdy bylo u postupu předsušení vzorku zcela vynecháno. Po přidání ultračisté deionizované vody suchý film určité množství vody zpět absorboval, nicméně produkt byl velice jemný a po určité době se zcela rozpustil (0,5–2 hodiny). V případě produktů obsahujících směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 2 : 1 se vzniklý film po přidání ultračisté deionizované vody ihned rozpadal a byl zakalen. Oproti filmu obsahujícího samotnou hydroxyethylcelulózu jevil horší mechanické vlastnosti, což je patrné z obrázku 23.



Obrázek 23 Filmy po opětovném přidání ultračisté deionizované vody; HEC vlevo, směs HYA a HEC v hmotnostním poměru 2 : 1 vpravo

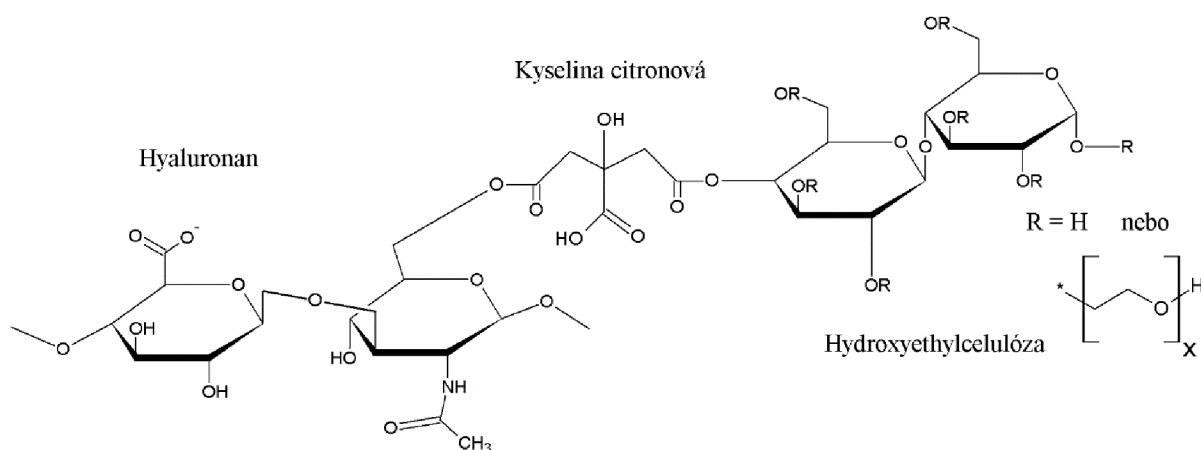
Dalším bodem, který mohl souviset s potížemi při experimentu, byla koncentrace kyseliny citronové v roztoku. Při její úpravě bylo zjištěno, že produkt, pro jehož přípravu bylo použito poměru hmotností kyseliny citronové a hydroxyethylcelulózy 1 : 1, se po opětovném přidání ultračisté deionizované vody zcela rozpadal a nebyl uniformní (obrázek 24 vlevo). Za zmínku ale stojí, že i přes toto chování se v přidání ultračisté deionizované vodě produkt nerozpustil. Na obrázku 24 vpravo je možné pozorovat vzorek na Petriho misce po gelaci, při které byla použita koncentrace kyseliny citronové 20 % (w/w ultračisté deionizované vody). Nadbytek kyseliny citronové ze vzorku vykrytalizoval, což bylo ve větší míře pozorováno také u vzorků obsahujících kyselinu citronovou o koncentracích 5 % a 10 % (w/w ultračisté deionizované vody). V dalších postupech proto byly ponechány původní koncentrace 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové.



Obrázek 24 Vzorky po gelaci obsahující nadbytek kyseliny citronové (CA); hmotnostní poměr HEC a CA 1 : 1 vlevo, 20 % CA (w/w HEC) vpravo

5.2 Gelace hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou

Schéma možného způsobu zesíťení mezi hydroxyethylcelulózou a hyaluronanem prostřednictvím kyseliny citronové je uveden na obrázku 25. Předpokladem je vytvoření anhydridu kyseliny citronové a následné navázání polymeru. Poté je ve struktuře kyseliny vytvořen další anhydrid a následuje navázání druhého polymeru. Jedná se o stejný princip zesíťení, jako je uveden ve schématu na obrázku 10.

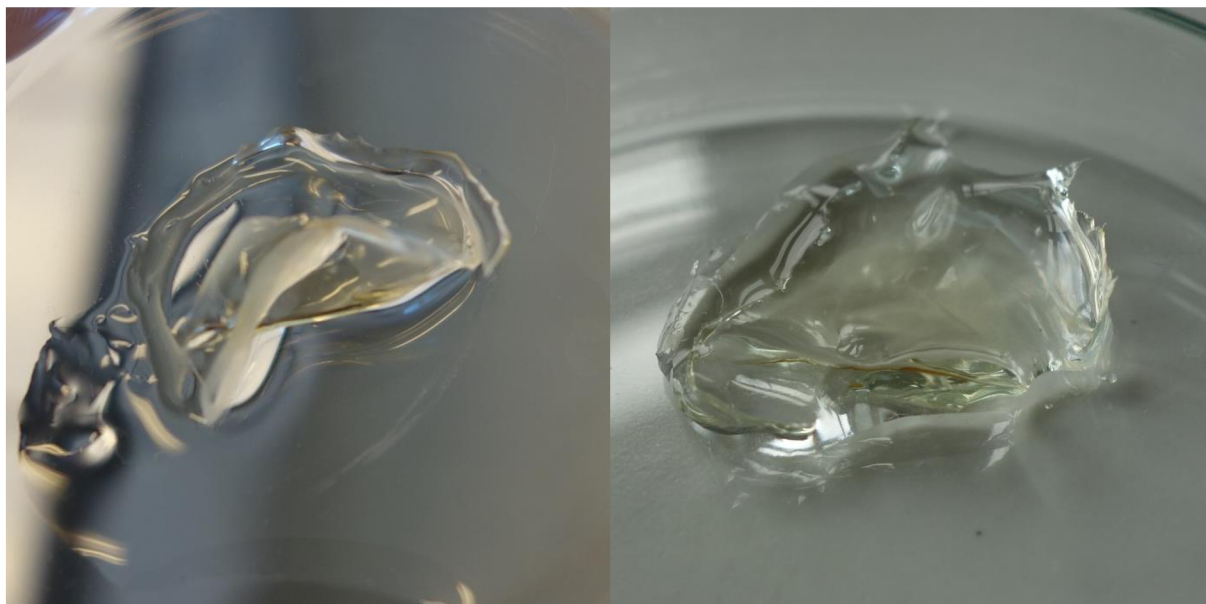


Obrázek 25 Znárodnění možného zesíťení daných polymerů kyselinou citronovou

Pokud nedošlo k úplnému vysušení vzorku při 30 °C, k síťování konečného produktu nestačilo 12 hodin, v některých nahodilých případech ani 24 hodin. Úpravou postupu gelace polymerů bylo zjištěno, že hlavním problémem, proč se nedaří získat požadované produkty, spočívá právě v kroku předsušení na 30 °C. Je nutné, aby před samotným síťováním byla ze vzorku odstraněna veškerá absorbovaná voda. Proto bylo zásadním krokem v optimalizaci postupu gelace ponechání otevřených reakčních nádob při předsušování vzorku i jeho síťování. Vzorky byly gelovány v lahvičkách z LDPE, na jejichž povrchu film neulpíval a byla s ním snadná následná manipulace, především pro potřeby použitých analýz. Využívány byly roztoky s koncentracemi kyseliny citronové 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru).

5.2.1 Hydroxyethylcelulóza

Produkty vzniklé gelací hydroxyethylcelulózy kyselinou citronovou, byly během síťování kontrolovány po 7, 19 a 24 hodinách. Produkt obsahující 5 % kyseliny citronové (w/w polymeru) po opětovném přidání ultračisté deionizované vody její část nejprve absorboval tak, že byl v kapalině viditelný film. Po krátké době (2–3 hodiny) se v ní však zcela rozpustil. Jednalo se o produkty získané po 7, 19 i 24 hodinách síťování.



Obrázek 26 Produkty po přidavku ultračisté deionizované vody; HEC s obsahem 5 % CA (w/w HEC) vlevo, HEC s obsahem 10 % CA (w/w HEC) vpravo



Obrázek 27 Produkt před a po přidavku ultračisté deionizované vody; HEC s obsahem 20 % CA (w/w HEC)

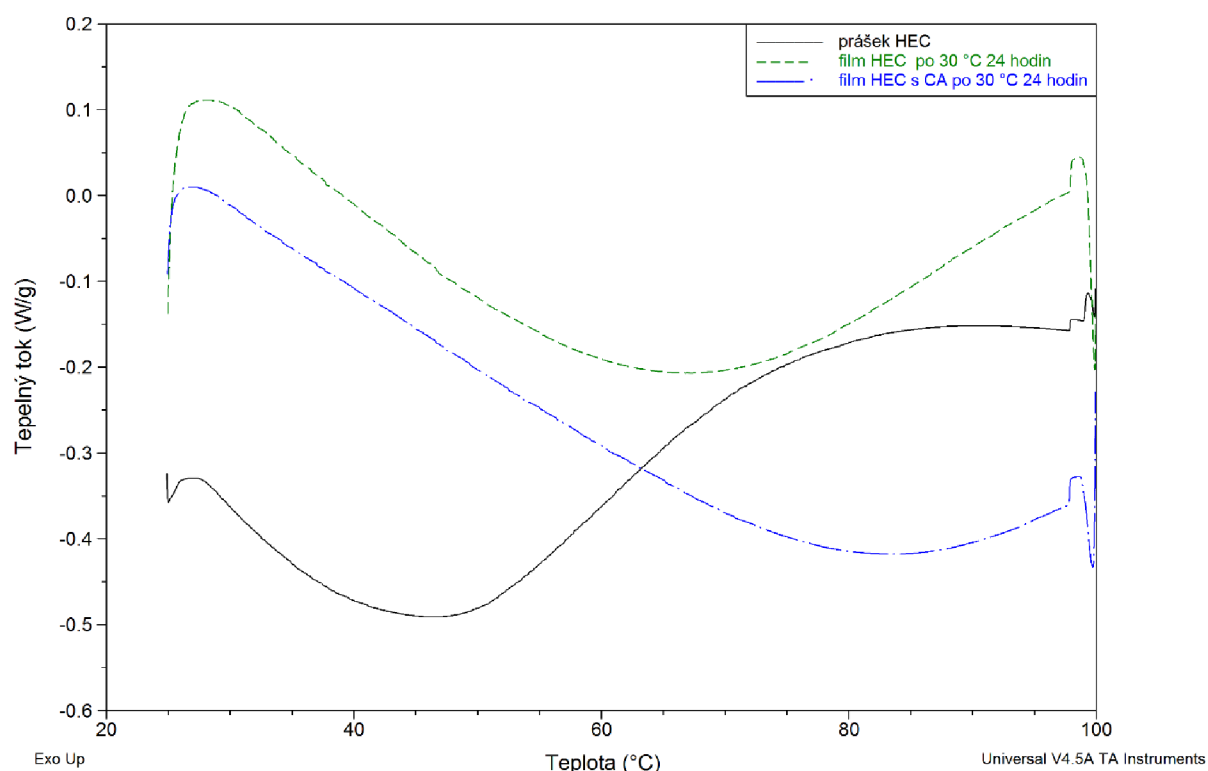
Film obsahující kyselinu citronovou o koncentraci 10 % (w/w polymeru) síťovaný 7 hodin přidanou ultračistou deionizovanou vodu nejprve absorboval, ale postupně se rozpustil. U vzorků síťovaných 19 a 24 hodin byly po 48 hodinách od opětovného přidání ultračisté deionizované vody k zesíťovanému filmu pozorovány v roztocích obrysy filmu. Po vytažení struktury z roztoku

pinzetou byl kolem filmu viskózní obal, způsobený pravděpodobně vodou absorbovanou do struktury produktu. Na obrázku 26 vlevo je film po opětovném přidání ultračisté deionizované vody obsahující 5 % (w/w HEC) kyseliny citronové a vpravo 10 % (w/w HEC) kyseliny. Fotografie jsou pořízeny pár minut po přidání ultračisté deionizované vody k filmům.

Produkt získaný gelací hydroxyethylcelulózy za použití 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové je uveden na obrázku 27. Jak je z něj patrné, produkt byl kompaktní, a to také po opětovném přidání ultračisté deionizované vody (viz obrázek 27 vpravo). Hydrogel si udržel svoji nabotnanou strukturu i po 48 hodinách. Filmy síťované 7 hodin byly vizuálně zhodnoceny jako méně odolné v porovnání s produkty síťovanými 19 a 24 hodin. Ty vykazovaly odolnost podobnou.

Roztoky připravené jako reference ke směsným roztokům (HYA a HEC), tedy 1% roztoky hydroxyethylcelulózy pro porovnání s 2% roztoky dávaly dle očekávání méně stabilní filmy. Nejpatrnější rozdíl byl sledován v případě filmu obsahujícího kyselinu citronovou o koncentraci 10 % (w/w polymeru), kdy se tyto po 48 hodinách po opětovném přidavku ultračisté deionizované vody zcela rozpustily. V roztoku nebyla viditelná žádná viskózní struktura nebo film. U vzorků získaných gelací hydroxyethylcelulózy s obsahem 5 % (w/w polymeru) kyseliny citronové se opět všechny filmy rozpustily. Produkty obsahující 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové zůstaly stabilní.

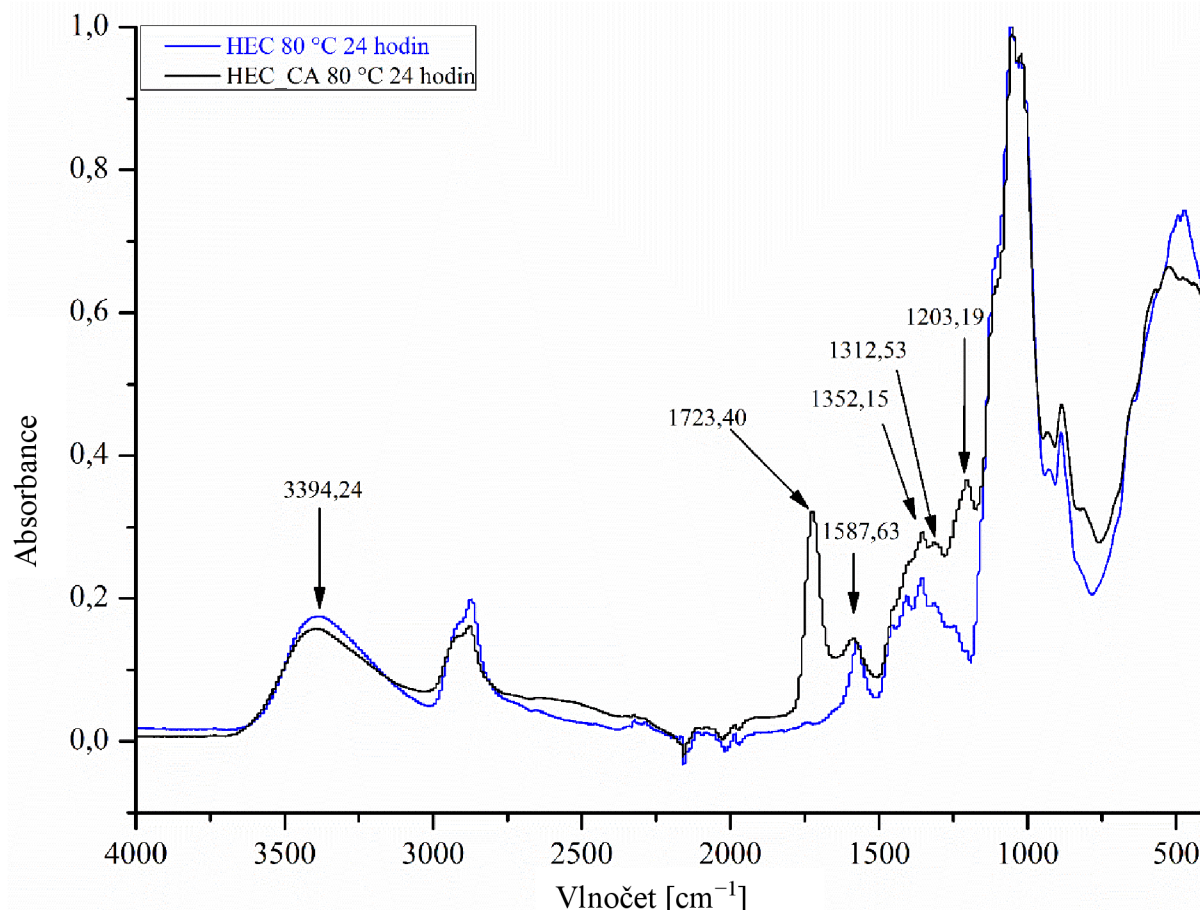
Referenční film hydroxyethylcelulózy bez obsahu kyseliny citronové připravený stejným postupem jako filmy s obsahem kyseliny, se po přidavku ultračisté deionizované vody po několika hodinách rozpustil. Je tedy patrné, že kyselina citrónová podle očekávání plní při gelaci funkci síťovadla. Film byl také použit pro porovnání DSC záznamů a FTIR spekter.



Obrázek 28 DSC záznam prášku hydroxyethylcelulózy (HEC), filmu HEC po 30 °C 24 hodin a filmu HEC a kyseliny citronové (CA) po 30 °C 24 hodin; 1. část cyklu měření

DSC záznam uvedený na obrázku 28 zahrnuje analýzu prášku hydroxyethylcelulózy, filmu získaného vysušením 2% roztoku (w/w ultračisté deionizované vody) hydroxyethylcelulózy

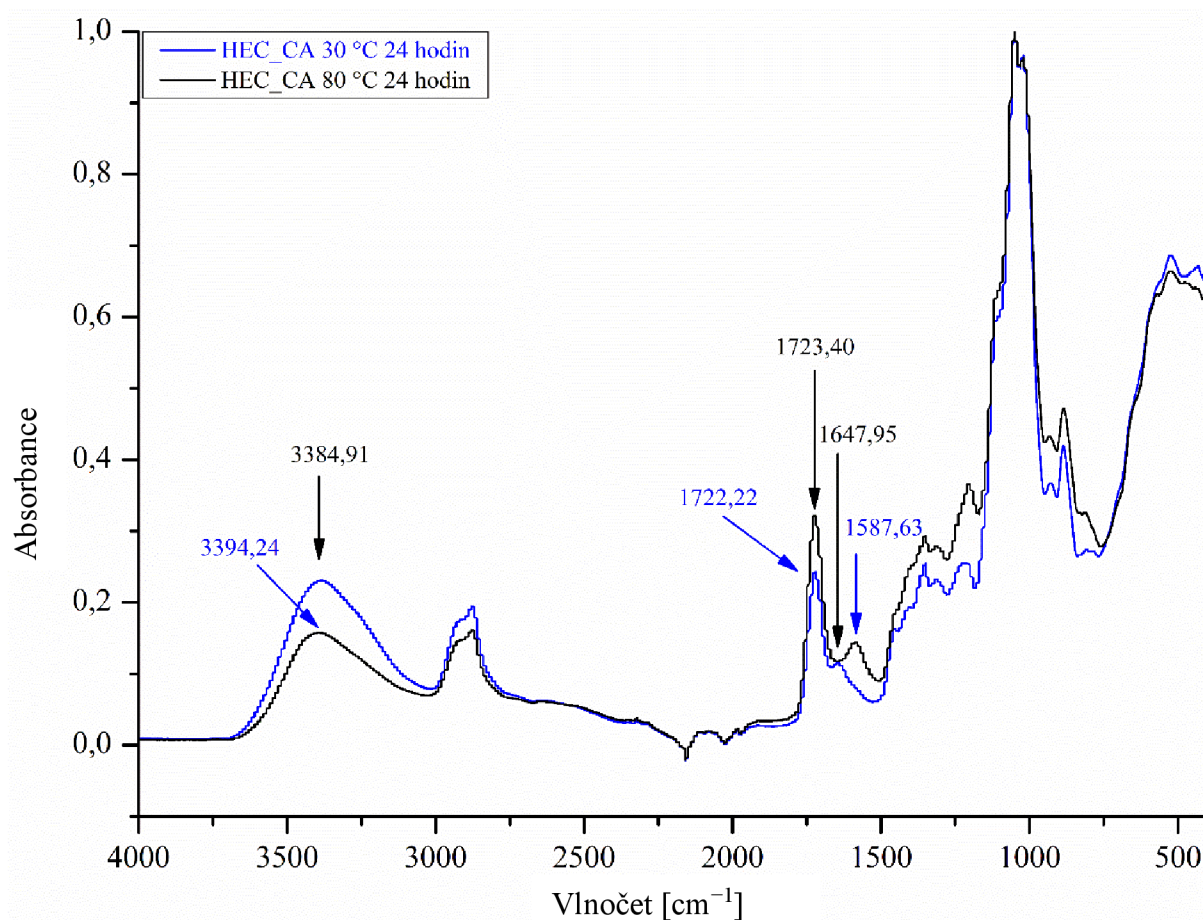
a filmu získaného vysušením 2% roztoku (w/w ultračisté deionizované vody) hydroxyethylcelulózy s obsahem 20 % (w/w HEC) kyseliny citronové. Endotermické píky viditelné na všech křivkách je možné vysvětlit vypařováním vlhkosti ze vzorků. Posun minima píků je zřejmě spojen se stupňující se složitostí systému, který vlhkost zadržuje. Nejlépe je vlhkost vypařována ze vzorku neupraveného prášku HEC, nejpomaleji pak ze vzorku, u nějž je předpokladem vznik chemicky síťované struktury kyselinou citronovou. Není vyloučena možnost odpařování vody v důsledku tvorby anhydridu kyseliny citronové. V tomto případě by ale byla očekávána odezva přístroje na následnou esterifikační reakci hydroxyethylcelulózy s kyselinou citronovou, kterou však DSC přístroj nezaznamenal.



Obrázek 29 FTIR spektrum filmu 2% roztoku (w/w vody) HEC a filmu 2% roztoku (w/w vody) HEC s obsahem 20 % (w/w HEC) kyseliny citronové; po 80 °C 24 hodin

Na obrázku 29 je uvedeno FTIR spektrum filmu získaného vysušením 2% roztoku (w/w ultračisté deionizované vody) hydroxyethylcelulózy a filmu získaného vysušením 2% roztoku (w/w ultračisté deionizované vody) hydroxyethylcelulózy s obsahem 20 % (w/w HEC) kyseliny citronové. Absorpční pás v oblasti 1 723 cm^{-1} je možné pozorovat pouze u vzorku HEC po gelaci, resp. pouze u vzorku obsahujícího kyselinu citronovou. Jedná se o pás charakteristický pro vibrace vazeb karbonylové funkční skupiny C=O v karboxylových kyselinách, také tedy ve struktuře CA. V literatuře zabývající se síťováním derivátů celulózy kyselinou citronovou [9], [34], [36], je spojováno vytvoření tohoto pásu se zesílením struktury polymeru. Z pozice pásu je zřejmé, že se z největší pravděpodobností jedná o odezvu esteru nebo karboxylové skupiny. Dalším znakem, který může být spojen se zesílením HEC kyselinou citronovou, je zesílení pásů v oblastech 1 352 cm^{-1} a 1 313 cm^{-1} odpovídající primárním

alkoholům. K zeslabení těchto páků tedy mohlo konkrétně dojít navázáním kyseliny citronové na $-OH$ skupiny primárních alkoholů vyskytujících se ve struktuře hydroxyethylcelulózy. Absorpční pás viditelný v oblasti $1\,203\text{ cm}^{-1}$ odpovídá vibracím vazeb v hydroxylových skupinách primárních alkoholů.



Obrázek 30 FTIR spektrum filmu 2% roztoku (w/w ultračisté deionizované vody) HEC s obsahem 20 % (w/w HEC) CA; po vysušení (30 °C) a po zesítnění (80 °C)

Srovnání FTIR spekter roztoku hydroxyethylcelulózy a kyseliny citronové používaného pro přípravu hydrogelů po vysušení při 30 °C 24 hodin a po síťování při 80 °C 24 hodin je uvedeno na obrázku 30. Zeslabení absorpčního páku v oblasti $3\,385\text{ cm}^{-1}$ může být dáno reakcí hydroxylových funkčních skupin HEC s kyselinou citronovou při síťování. Nicméně vzhledem k velkému počtu hydroxylových skupin v celé analyzované struktuře (hydroxylové skupiny v rámci molekul kyseliny a HEC), nemůže být zeslabení páku v této oblasti přisuzování síťování s absolutní jistotou. Pás v oblasti $1\,648\text{ cm}^{-1}$ je možnou odezvou vlhkosti vzorku a zároveň způsobuje překrytí páku charakteristického pro celulózovou kostru HEC, který je opět viditelný u vzorku síťovaného při 80 °C ($1\,588\text{ cm}^{-1}$). Může se ale také jednat o odezvu karbonylových skupin $C=O$ v karboxylových kyselinách, tedy v CA.

Kromě měření FTIR spektra (obrázek 30) byl porovnáván rozdíl mezi těmito vzorky pro ověření chemického zesítnění vizuálním hodnocením chování daného filmu po opětovném přidání ultračisté deionizované vody. Film, který byl pouze vysušen při 30 °C se po kontaktu s vodou do 30 minut zcela rozpustil. Film zesítněný při 80 °C 24 hodin po opětovném přidání ultračisté deionizované vody její část absorboval a ve zbytku vody se nerozpustil. Stejnou strukturu si zachoval i po týdenní kontrole, přičemž hodnocení probíhalo vizuálně. Z těchto

výsledků je tedy jasné, že pro zesítnění hydroxyethylcelulózy kyselinou citronovou je nutné působení zvýšené teploty, v případě experimentu v rámci této diplomové práce 80 °C.

5.2.2 Směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 3 : 7

Produkty byly kontrolovány po 7, 12, 19 a 24 hodinách síťování. Filmy obsahující 5 % (w/w polymeru) kyseliny citronové ultračistou deionizovanou vodu přidanou po síťování nejprve absorbovaly. U vzorků síťovaných 19 a 24 hodin bylo po 2 hodinách od opětovného přidání ultračisté deionizované vody pozorováno, že produkt absorboval do své struktury v porovnání s ostatními vody nejvíce (obrázek 31 vlevo). Po 24 hodinách od přidání ultračisté deionizované vody byly všechny roztoky na pohled homogenní a původní film byl zcela rozpuštěn.



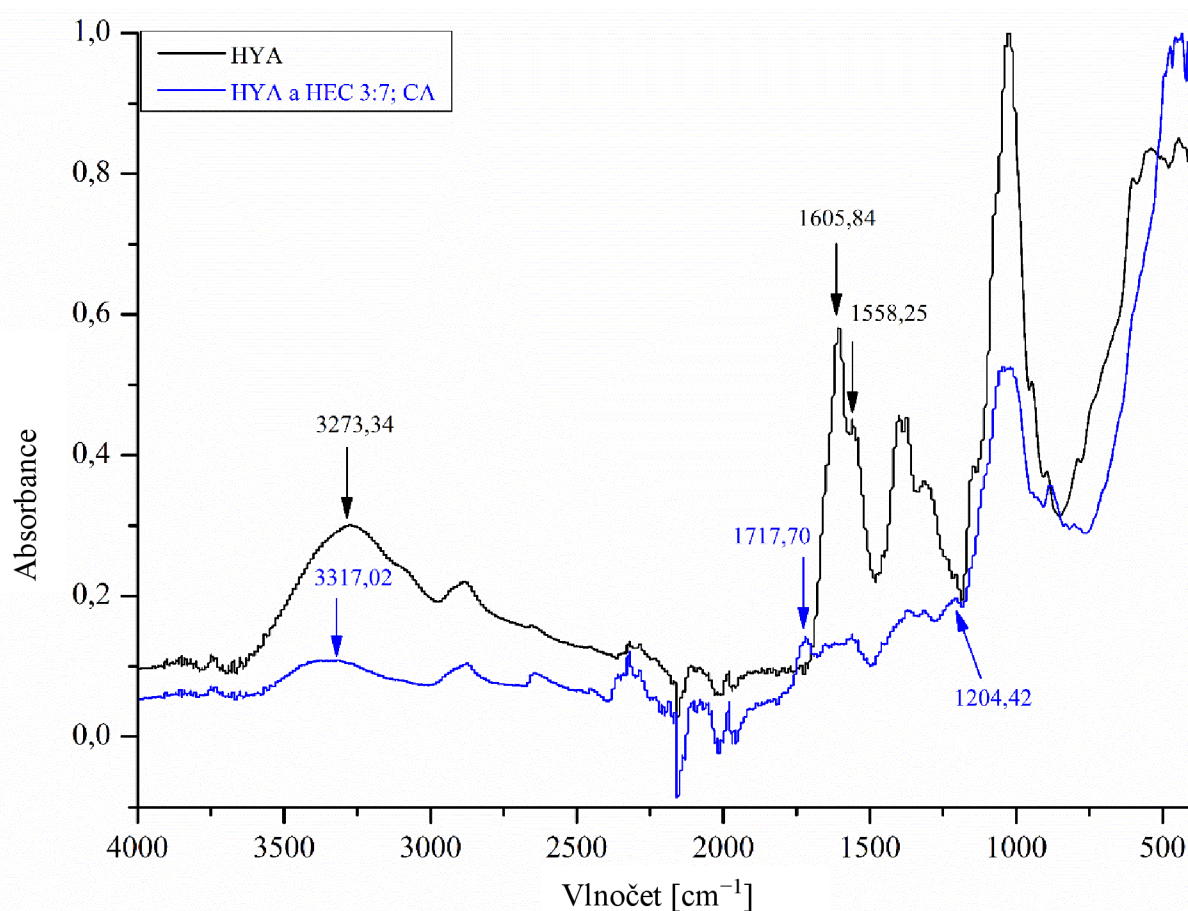
Obrázek 31 Produkty po přidání ultračisté deionizované vody; HYA a HEC v hmotnostním poměru 3 : 7 s obsahem 5 % CA (w/w směsi) vlevo, s obsahem 10 % CA (w/w směsi) vpravo



Obrázek 32 Produkt před a po přidavku ultračisté deionizované vody, HYA a HEC v hmotnostním poměru 3 : 7; koncentrace CA 20 % (w/w polymeru)

Filmy obsahující 10 % (w/w polymeru) kyseliny citronové síťované 24 hodin opět vodu nejprve absorbovaly, ale postupně se rozpadly na menší kousky, které kolem sebe tvořily viskózní obal. Rozpad filmu byl zřejmě způsoben manipulací s ním, což svědčí o jeho nedostatečné stabilitě. Film po 30 minutách od přidání ultračisté deionizované vody je uveden na obrázku 31 vpravo. Ostatní filmy obsahující stejnou koncentraci kyseliny citronové se do 48 hodin od přidání ultračisté deionizované vody zcela rozpustily.

Při síťování roztoku směsi s obsahem 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové 7 hodin byla produktem ultračistá deionizovaná voda po jejím opětovném přidání absorbována. Postupně se v roztoku vytvořila struktura, ve které byl patrný obrys filmu s viskózním obalem. V případě síťování 12, 19 a 24 hodin byly hydrogely kompaktní, i po několikadenní kontrole nebyly ve vodě rozpuštěny. Produkt získaný po síťování 12 hodin je uveden na obrázku 32 vlevo. Produkt síťovaný 12 hodin po opětovném přidavku ultračisté deionizované vody je uveden na obrázku 32 vpravo.



Obrázek 33 FTIR spektrum hyaluronanu a produktu získaného gelací směsi HYA a HEC v hmotnostním poměru 3 : 7 20% (w/w směsi) kyselinou citronovou

FTIR spektrum směsi obsahující 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové (viz obrázek 33) vykazuje poměrně malou intenzitu, což bylo způsobeno zřejmě nehomogeností vzorku (viz podkapitola 5.2.5). Pokud je ale bráno v úvahu porovnávání jednotlivých pásů v rámci jednoho spektra, je možné mezi sebou porovnat i vzorky se spektry o různých intenzitách. Pás hyaluronanu v oblasti 1606 cm⁻¹ odpovídá asymetrickým vibracím karboxylátového anionu (–COO⁻) a 1558 cm⁻¹ odpovídá amidové skupině ve struktuře hyaluronanu. Pás v oblasti 1 718 cm⁻¹ je u produktu vzhledem k pásu amidové skupiny hyaluronanu intenzivnější.

Tento pás ($1\ 718\ \text{cm}^{-1}$) značí přítomnost kyseliny citronové (CA) v produktu a může souviset s jeho chemickým zesítním. Zintenzivnění pásu v oblasti $1\ 204\ \text{cm}^{-1}$ je pravděpodobně způsobeno výskytem CA ve směsi. K zeslabení pásů v oblasti $1\ 400\text{--}1\ 300\ \text{cm}^{-1}$ a také $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$ mohlo dojít vazbou původně volných hydroxylových skupin a může se tedy jednat o zeslabení v důsledku zesítnění struktury.

5.2.3 Směs hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 7 : 3

Hydrogely připravené z 1% roztoků (w/w ultračisté deionizované vody) směsi polymerů (HYA a HEC v hmotnostním poměru 7 : 3) byly již při manipulaci po síťování velmi křehké. Po přidání ultračisté deionizované vody k suchému filmu, tento nejprve vodu absorboval a byly viditelné obrysy filmu. Manipulaci v roztoku se však film velmi snadno rozpadal.



Obrázek 34 Produkty po přidavku ultračisté deionizované vody; HYA a HEC v hmotnostním poměru 7 : 3 s obsahem 5 % CA (w/w směsi) vlevo, s obsahem 10 % CA (w/w směsi) vpravo

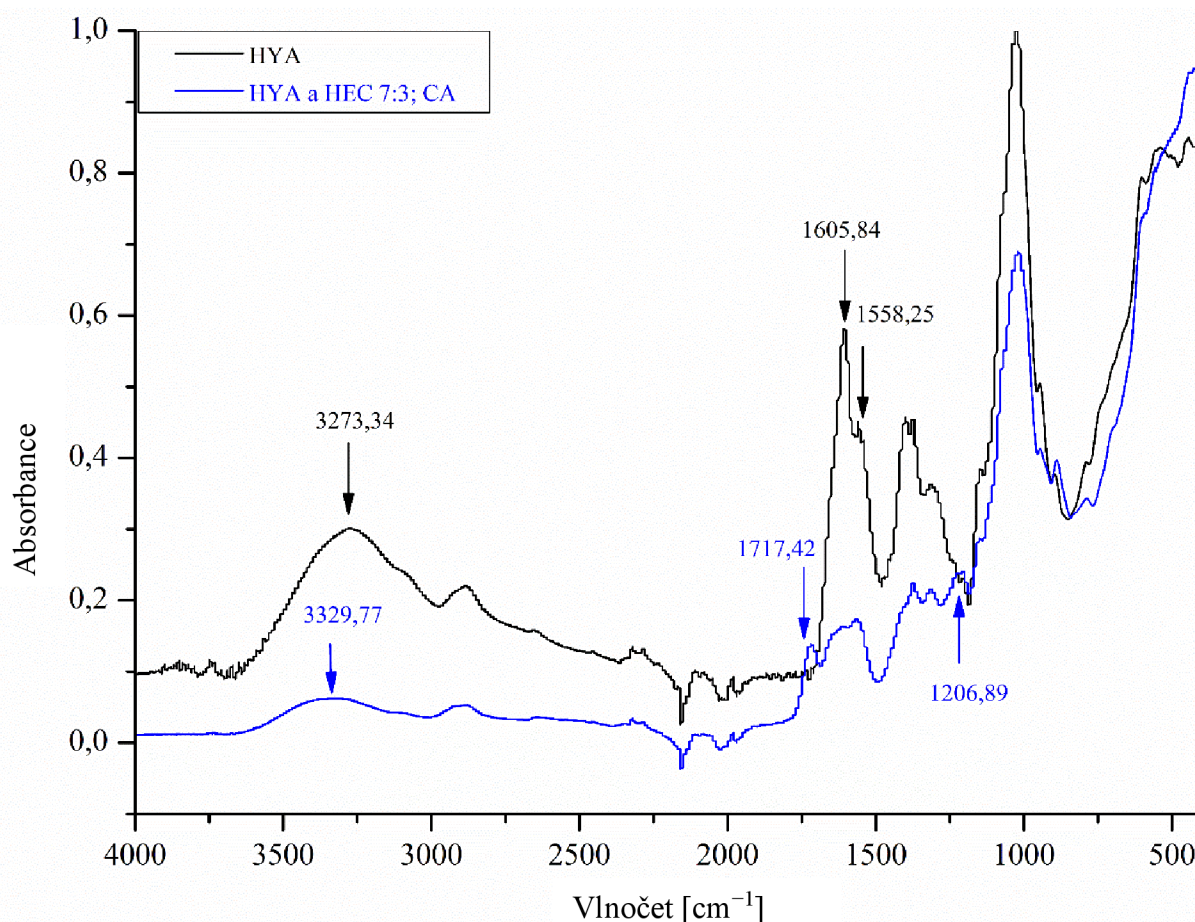


Obrázek 35 Produkty po přidavku ultračisté deionizované vody; HYA a HEC v hmotnostním poměru 7 : 3 s obsahem 20 % CA (w/w směsi)

Produkty byly kontrolovány po 7, 12, 19 a 24 hodinách síťování. Filmy obsahující 5 % a 10 % (w/w polymeru) kyseliny citronové přidanou ultračistou deionizovanou vodu absorbovaly (viz obrázek 34). Po 2 hodinách od přidání vody byla v roztoku viditelná viskózní struktura, po 24 hodinách byl roztok na pohled homogenní a film zcela rozpuštěn.

Při síťování hydroxyethylcelulózy s obsahem 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové filmy přidanou ultračistou deionizovanou vodu absorbovaly. Produkt síťovaný 7 hodin se ve vodě postupně rozpustil. Produkty síťované 12, 19 a 24 hodin se sice zcela nerozpustily, ale v roztoku tvořily pouze viskózní strukturu vázanou na kousky filmu a ne kompaktní film s absorbovanou vodou (viz obrázek 35).

FTIR spektrum směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 7 : 3 na obrázku 36, je opět méně intenzivní. Vysvětlením je pravděpodobně nehomogenost povrchu vzorku (viz podkapitola 5.2.5). Obecně je vysvětlení porovnávání rozdílů spekter vůči samotnému hyaluronanu stejné jako v případě vzorku obsahujícího hyaluronan a hydroxyethylcelulózu v hmotnostním poměru 3 : 7 (viz podkapitola 5.2.2). Jedná se především o větší intenzitu absorpčního pásu v oblasti $1\ 717\ \text{cm}^{-1}$, který je odezvou výskytu kyseliny citronové ve struktuře vzorku a je možná jeho souvislost se zesílením struktury polymerní směsi. Pás v oblasti $1\ 207\ \text{cm}^{-1}$ souvisí zřejmě s vibracemi hydroxylových skupin primárních alkoholů ve struktuře kyseliny citronové. K zeslabení pásů v oblastech kolem $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 300\ \text{cm}^{-1}$ a také $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$ mohlo dojít vazbou původně volných hydroxylových skupin.



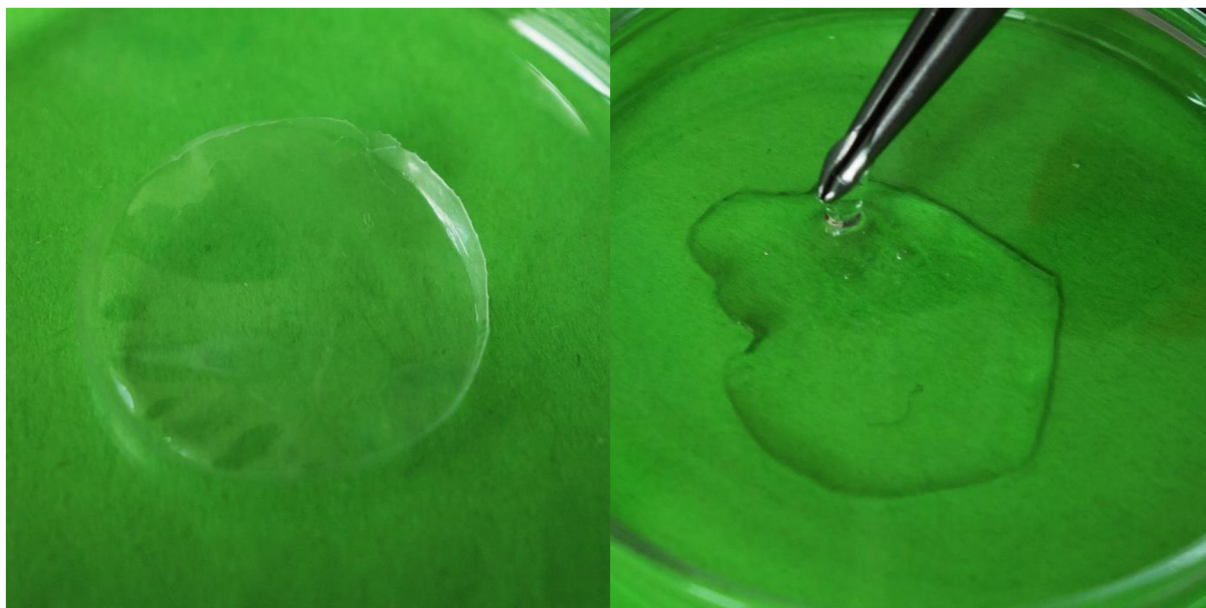
Obrázek 36 FTIR spektrum hyaluronanu a produktu získaného gelací směsi HYA a HEC v hmotnostním poměru 7 : 3 s obsahem 20 % (w/w směsi) CA

5.2.4 Hyaluronan

Při pokusu o gelaci samotného hyaluronanu kyselinou citronovou se nepodařilo makromolekuly tohoto biopolymeru zesíťovat, neboť produkt se po opětovném přidání vody okamžitě rozpustil. Důvodem může být elektrostatické odpuzování makromolekul hyaluronanu a velké množství možných reakčních center v jeho struktuře. V roztoku nebyla pozorována viskóznější struktura s absorbovanou vodou, která by držela pohromadě, jako tomu bylo v předchozích případech. Filmy uvedené na obrázcích 37 vlevo a 38 vlevo získané jako produkty reakce byly velice jemné. Po přidání ultračisté deionizované vody se v ní okamžitě rozpustily. Stalo se tak u vzorků obsahující všechny tři koncentrace kyseliny citronové po 7, 12, 19 i 24 hodinách ohřevu na 80 °C.

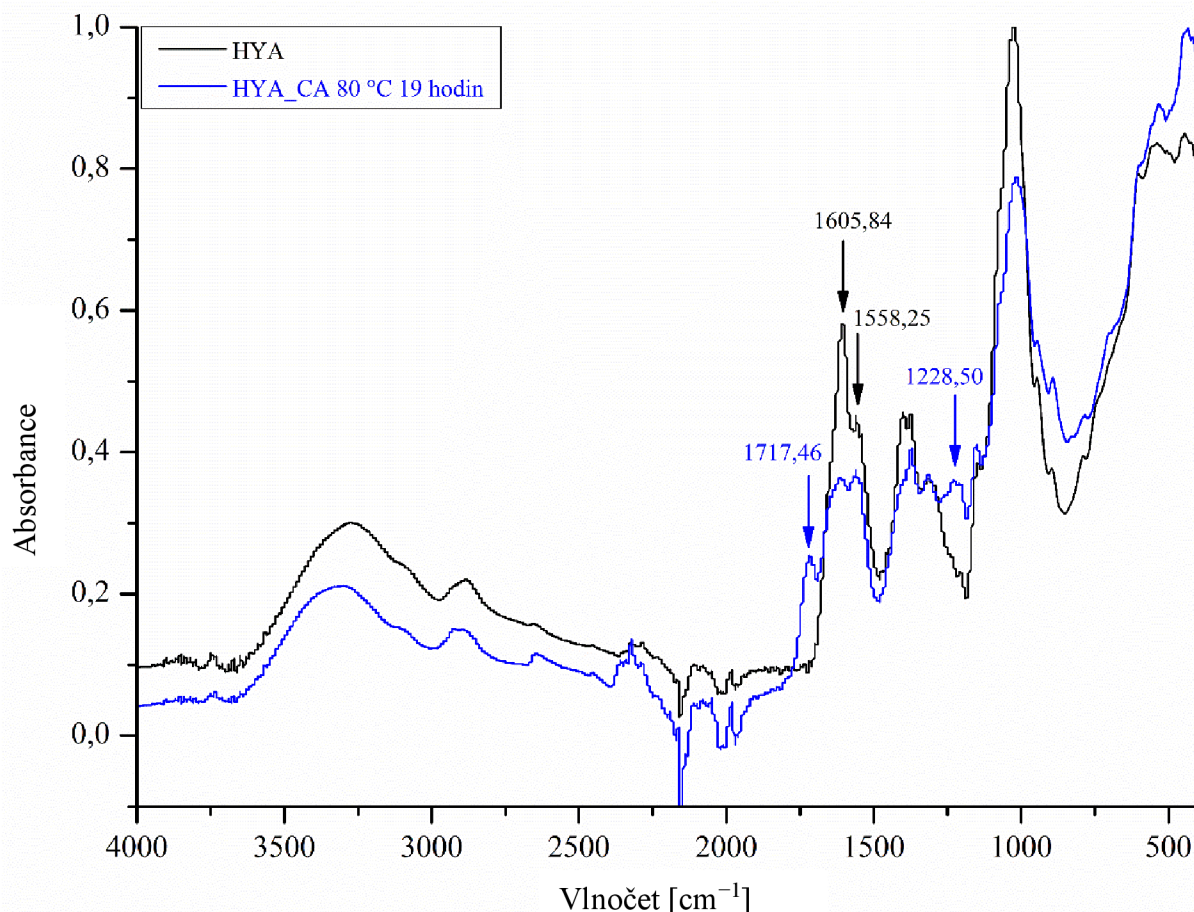


Obrázek 37 Produkt před a po přidání ultračisté deionizované vody; HYA s obsahem 5 % (w/w HYA) CA



Obrázek 38 Produkt před a po přidání ultračisté deionizované vody; HYA s obsahem 20 % (w/w HYA) CA

Při srovnání FTIR spektra neupraveného hyaluronanu a směsi hyaluronanu a kyseliny citronové vystavené nejprve 30 °C a poté 80 °C jsou nejvýraznější rozdíly v zobrazení absorpčních pásů v oblastech 1718 cm⁻¹ a 1229 cm⁻¹. Ty je možné stejně jako u směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy přiřadit odezvě přítomnosti kyseliny citronové ve vzorku (viz obrázek 39).



Obrázek 39 FTIR spektrum hyaluronanu a hyaluronanu s kyselinou citronovou po zahřívání na 80 °C

5.2.5 Porovnání připravených hydrogelů

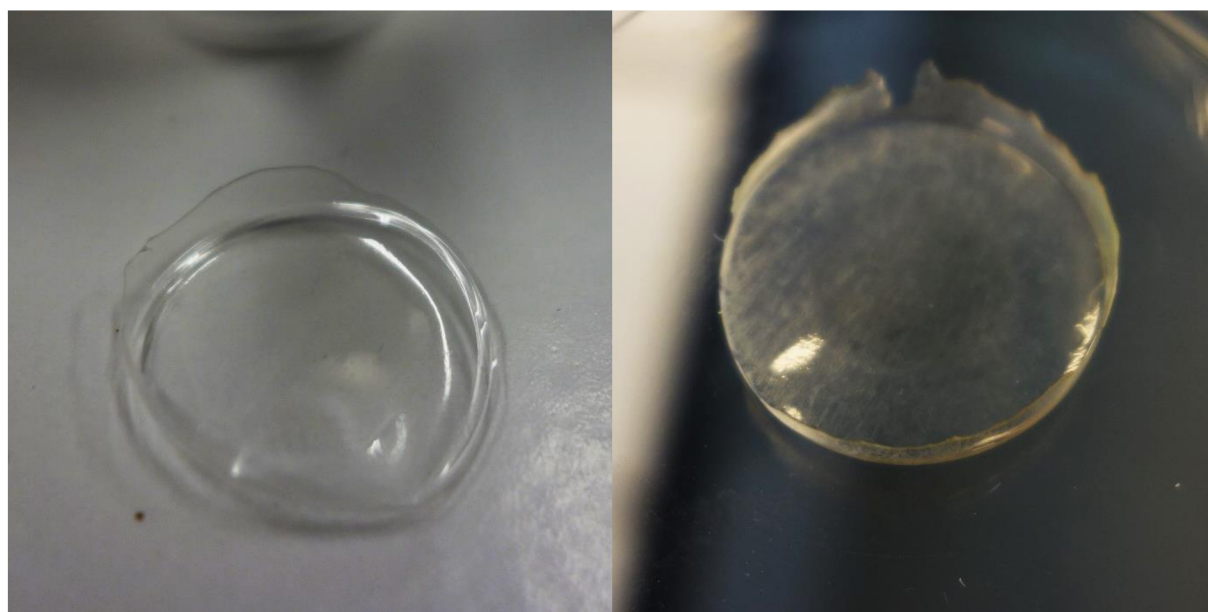
Po přidání ultračisté deionizované vody k produktům bylo možné pozorovat, jak ji absorbují a tím zvrásňují svůj povrch. Některé si udržely strukturu kompaktní, jiné se postupně rozpadly a další se zcela rozpustily. U produktu získaného z hyaluronanu a kyseliny citronové nebylo pozorováno ani absorbování ultračisté deionizované vody do struktury filmu. Ten se okamžitě rozpustil.

Vzorky, po jejichž gelaci kyselinou citronovou vznikaly kompaktní, nerozpustné hydrogely byly tvořeny buď samotnou hydroxyethylcelulózou nebo směsí složenou z hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 3 : 7. Vždy se jednalo o produkty obsahující 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové. Přičemž doba síťování, za kterou vznikl nerozpustný film byla u hydroxyethylcelulózy nejméně 7 hodin, u směšného produktu nejméně 12 hodin. U vzorku hydroxyethylcelulózy obsahující 10 % (w/w HEC) kyseliny citronové zůstal po přidání ultračisté deionizované vody také nerozpustný film, měl však na pohled jinou strukturu. V roztoku bylo možné pozorovat film, který byl obalen viskózní strukturou. Roztoky obsahující hyaluronan a hydroxyethylcelulózu v hmotnostním poměru 7 : 3 a 20 % kyseliny

citronové se nerozpustily, ale film se rozpadl a v roztoku byly pozorovány kousky filmu s viskózním obalem. Struktury zmíněné v tomto odstavci nezměnily svoji konečnou podobu ani po dvou týdnech od přidání ultračisté deionizované vody k zesítnému polymeru.

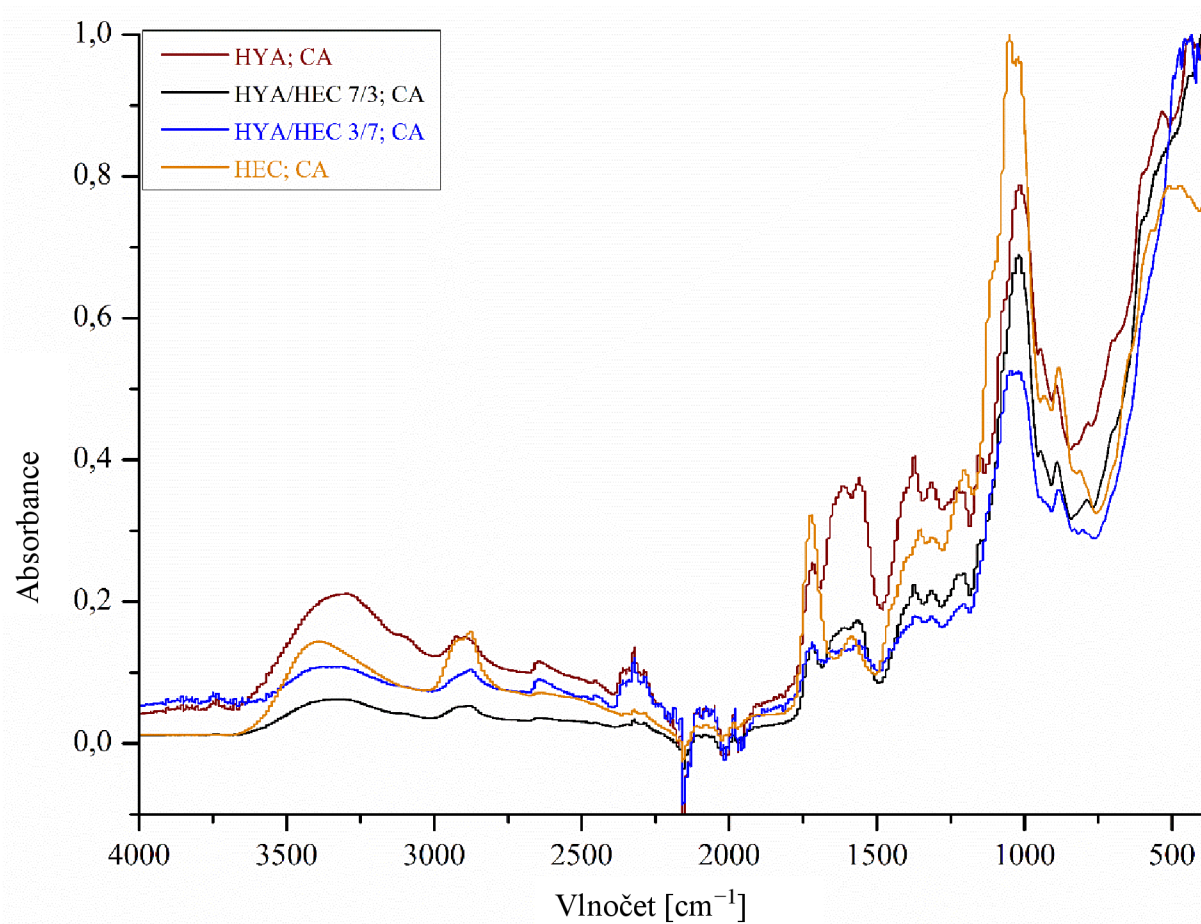
Vzorky s obsahem nižších koncentrací kyseliny citronové se rozpadly a částečně nebo úplně se rozpustily. Je však možné konstatovat, že čím menší koncentraci kyseliny vzorky obsahovaly, tím více ultračisté deionizované vody do své struktury absorbovaly.

Z hlediska vizuálního zhodnocení byly nejkompaktnější filmy tvořené samotnou hydroxyethylcelulózou. Dále se pak filmy zjemňovaly a stávaly křehčími v řadě s rostoucím obsahem hyaluronanu ve své struktuře. Se zvyšujícím se obsahem hydroxyethylcelulózy ve vzorku se měnila barva produktu z bílé na nažloutlou, což je zřejmě dáno barvou výchozí látky – prášku hydroxyethylcelulózy. Na obrázku 40 vlevo je zobrazen film obsahující jako polymer pouze hyaluronan a vpravo film obsahující směs hyaluronanu s hydroxyethylcelulózou.

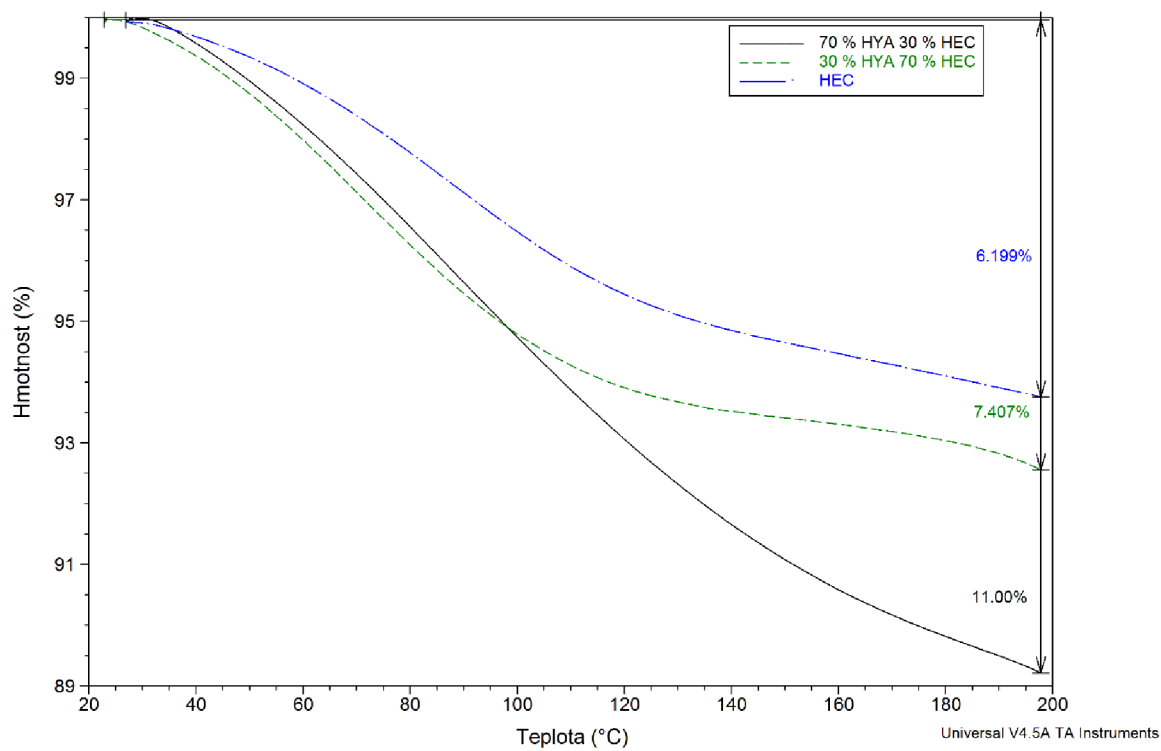


Obrázek 40 Produkt s obsahem hyaluronanu vlevo, s obsahem hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu vpravo

Obrázek 41 znázorňuje FTIR spektra produktů. Na všech spektrech je možné pozorovat absorpční pás v oblasti $1\ 724\text{--}1\ 717\ \text{cm}^{-1}$. Ten s největší pravděpodobností souvisí s výskytem kyseliny citronové ve struktuře produktu a chemickým zesítním použitých polymerů. Čím byl tento pás intenzivnější v porovnání s pásy v oblasti $1\ 650\text{--}1\ 590\ \text{cm}^{-1}$, tím vznikal kompaktnější a stabilnější produkt. Přičemž absorpční pás v oblasti asi $1\ 570\ \text{cm}^{-1}$ je zřejmě způsoben odezvou celulózové struktury hydroxyethylcelulózy a karboxylové skupiny kyseliny citronové. Pás v oblasti $1\ 550\text{--}1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ může být odezvou struktury hyaluronanu, konkrétně amidové a karboxylové skupiny. Společným znakem produktů, které se po gelaci nerozpustily v ultračisté deionizované vodě vůbec nebo částečně, je absorpční pás v oblasti $1\ 205\ \text{cm}^{-1}$. U produktu získaného gelací samotného hyaluronanu je tento pás posunut do oblasti $1\ 229\ \text{cm}^{-1}$. Absorpční pásy jsou zřejmě jen odezvou nadbytku kyseliny citronové v produktu.



Obrázek 41 FTIR spektra produktů; vždy s obsahem 20 % (w/w polymeru) CA



Obrázek 42 Termogravimetrické křivky produktů

TG analýza filmů připravených ze směsí A₁, A₃ a A₄ tabulky 3 po jejich vysušení při 30 °C je uvedena na obrázku 42. S rostoucím obsahem hyaluronanu se zvyšuje podíl ztráty hmotnosti, což může souviset s velkou hygroskopičností hyaluronanu a tedy odstraňováním vlhkosti ze vzorku. Při vyšších teplotách se může jednat také o začínající degradaci produktů. Celkový úbytek hmotnosti při zvoleném cyklu analýzy byl v případě filmu složeného z hydroxyethylcelulózy a kyseliny citronové (A₁) 6,199 %, u filmu obsahujícím směs hyaluronan hydroxyethylcelulóza v hmotnostním poměru 3 : 7 a kyselinu citronovou (A₃) 7,407 % a u filmu obsahujícím směs hyaluronan hydroxyethylcelulóza v hmotnostním poměru 7 : 3 a kyselinu citronovou (A₄) 11 %.



Obrázek 43 Nehomogenní struktura produktu

Jak bylo zmíněno v podkapitole 5.1.2, nadbytek kyseliny citronové při gelaci z produktu krystalizuje. Toto bylo v menší míře pozorováno i v případě využití konečného postupu se zvolenými koncentracemi 5 %, 10 % a 20 % (w/w polymeru) kyseliny (viz obrázek 43). Filmy nebyly homogenní, což působilo problém především při měření FTIR spekter. Pro další studii hydrogelů je proto doporučeno nadbytek kyseliny citronové z filmu odstranit (vymytí vodou) a až poté produkt analyzovat. Dalším doporučením je zaměřit studii na použití nejvhodnější koncentrace kyseliny pro gelaci daných polymerů tak, aby docházelo k vykrystalování co nejmenšího množství kyseliny z produktu. Vhodná koncentrace bude zřejmě ležet v rozmezí od 10 % a 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové v roztoku. U filmů hydroxyethylcelulózy a směsi hyaluronanu a hydroxyethylcelulózy v hmotnostním poměru 3 : 7 s obsahem 10 % (w/w polymeru) CA, si totiž filmy udržely v roztoku určitou strukturu a nerozpustily se. I když se nejednalo o kompaktní a zcela stabilní produkty, určitý náznak zesítnění struktury byl pozorován. Filmy obsahující 20 % (w/w polymeru) kyseliny citronové tvořily po přidání ultračisté deionizované vody kompaktní hydrogely. Proto je předpoklad nejvhodnější koncentrace kyseliny citronové v tomto rozmezí.

I když u produktů získaných konečným postupem gelace nebyla studována detailněji závislost zesítnění na reakčním čase, lze z jejich vizuálního hodnocení konstatovat, že všechny produkty síťované 12 hodin byly dostatečně stabilní. S ohledem na možné nežádoucí modifikace produktu, není zřejmě nutné, aby produkty byly ohřívány vystavovány déle než tuto dobu.

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byly představeny výchozí látky, hydrogel jako očekávaný produkt a obecný proces jeho přípravy – gelace. Dále byly shrnuty poznatky o dané problematice z dostupných publikací. Jednalo se především o použité pracovní postupy a návrhy možného způsobu zesítení polymerů kyselinou citronovou. V rámci experimentální části diplomové práce byl optimalizován postup gelace hydroxyethylcelulózy. Ze získaných výsledků byl vypracován postup konečný, následně využitý pro gelaci hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu ve dvou různých poměrech a hyaluronanu samotného.

Produkt byl považován za zesítený v případě, kdy se po opětovném přidání ultračisté deionizované vody v ní nerozpustil. Z hlediska FTIR analýzy má zřejmě souvislost se zesítením struktury a vytvořením esteru absorpční pás v oblasti $1\ 724\text{--}1\ 717\ \text{cm}^{-1}$. Čím byl tento pás intenzivnější v porovnání s pásem v oblasti $1\ 550\text{--}1\ 650\ \text{cm}^{-1}$, tím kompaktnější a stabilnější produkt byl získán. Absorpční pás v oblasti $1\ 570\ \text{cm}^{-1}$ je zřejmě způsoben odezvou celulózové struktury hydroxyethylcelulózy a karboxylové skupiny kyseliny citronové. Pás v oblasti $1\ 550\text{--}1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ může být odezvou struktury hyaluronanu, konkrétně amidové a karboxylové skupiny. Prostřednictvím DSC a TG analýz se nepodařilo prokázat zesítení makromolekul polymerů.

Na základě těchto poznatků byly za chemicky zesítené hydrogely označeny ty obsahující jako polymer samotnou hydroxyethylcelulózu a hydrogely obsahující polymery hyaluronan a hydroxyethylcelulózu v hmotnostním poměru 3 : 7. V obou případech se jednalo o látky, k jejichž zesítení bylo využito kyseliny citronové o koncentraci 20 % (w/w polymeru). Ačkoli se tato koncentrace zdála ze všech zvolených nejvhodnější, problémem bylo krystalizování nadbytku kyseliny citronové z produktu. To činilo povrch filmu nehomogenním a působilo tak problém při FTIR analýze.

Postup gelace, podle kterého byly připraveny chemicky síťované hydrogely daných polymerů kyselinou citronovou, je následující: 2% (w/w ultračisté deionizované vody) roztok polymeru obsahující 20 % (w/w polymeru) bezvodé kyseliny citronové je převeden do lahvičky z LDPE tak, aby vytvořil vrstvu asi 1 cm. Vzorek je ponechán k úplnému vysušení při 30 °C 24 hodin. Zcela vysušený vzorek je poté ponechán k samotné síťovací reakci, a to při 80 °C 12 hodin.

V případě další studie je doporučeno detailněji prostudovat průběh síťování směsi hydroxyethylcelulózy a hyaluronanu kyselinou citronovou, zejména nejvhodnější teplotu a dobu gelace. Dále je doporučeno věnovat pozornost reologickým vlastnostem hydrogelů získaných postupy této diplomové práce.

7 REFERENCE

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002, 192 s. ISBN 80-708-0475-0.
- [2] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998, 198 s. ISBN 80-708-0331-2.
- [3] ROHRER, Patrik. *Hydrogely na bázi biodegradabilních polymerů* [online]. Zlín, 2013 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/30342/rohrer_2014_dp.pdf?sequence=1. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
- [4] AHMED, Enas Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121 [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [5] SAARAI, Amarjargal. *Hydrogels for biomedical applications* [online]. Zlín, 2012 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/23006/saarai_2012_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Doctoral Thesis. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Prof. Ing. Petr Sába, CSc.
- [6] MRAVEC, Filip. *Přednášky k předmětu Biopolymery*. Brno: Vysoké učení technické Brno, Fakulta chemická, 2015.
- [7] KLUČÁKOVÁ, Martina. *Přednášky k předmětu Koloidní transportní systémy*. Brno: Vysoké učení technické Brno, Fakulta chemická, 2015.
- [8] SANNINO, A., S. PAPPADÀ, M. MADAGHIELE, A. MAFFEZZOLI, L. AMBROSIO a L. NICOLAIS Crosslinking of cellulose derivatives and hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Polymer* [online]. 2005, **46**(25), 11206-11212 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.10.048. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003238610501517X>
- [9] DEMITRI, Christian, Roberta DEL SOLE, Francesca SCALERA, Alessandro SANNINO, Giuseppe VASAPOLLO, Alfonso MAFFEZZOLI, Luigi AMBROSIO a Luigi NICOLAIS. Novel superabsorbent cellulose-based hydrogels crosslinked with citric acid. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2008, **110**(4), 2453-2460 [cit. 2016-03-03]. DOI: 10.1002/app.28660. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.28660>
- [10] DAS, NILIMANKA. *PREPARATION METHODS AND PROPERTIES OF HYDROGEL: A REVIEW* [online]. 2013, **5**(3) [cit. 2016-04-17]. ISSN 0975-1491. Dostupné z: <http://www.ijppsjournal.com/Vol5Issue3/7124.pdf>
- [11] BELÉN, Max, José SALGADO, Noelia RODRIGUÉZ, Sandra CORTÉZ, Attilio CONVERTI a José DOMÍNGUEZ. BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF CITRIC ACID. In: *Brazilian Journal of Microbiology (2010) 41* [online]. 2010 [cit. 2016-04-26]. ISSN 1517-8382.

- [12] APELBLAT, Alexander. Properties of Citric Acid and Its Solutions. In: *Citric Acid* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2014, s. 13 [cit. 2016-04-23]. DOI: 10.1007/978-3-319-11233-6_2. ISBN 978-3-319-11232-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-11233-6_2
- [13] PETŘIVALSKÝ, Marek. *Biotechnologie: 5. Biotechnologické výroby organických látek* [online]. In: . Katedra biochemie PřF UP, b.r., s. 29 [cit. 2016-04-26]. DOI: CZ.1.07/2.2.00/28.0171. Dostupné z: http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/btc/Prezentace%2002-05_Fermentation_organic.pdf
- [14] KOUTNÝ, Marek. *Přednášky k předmětu Biochemie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2012.
- [15] WINKLEROVÁ, Daniela. *STANOVISKO K POUŽÍVÁNÍ KYSELINY CITRONOVÉ (E 330)* [online]. In: . Státní zdravotní ústav, Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti, Oddělení pro bezpečnost speciálních druhů potravin a mikrobiologii PBU, b.r. [cit. 2016-04-26].
- [16] INGR, Ivo. *Základy konzervace potravin*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999, 119 s. ISBN 80-715-7396-5.
- [17] DOLEŽALOVÁ, Julie. *Hodnocení celulos a kukuřičného škrobu pomocí creep testu* [online]. Hradec Králové, 2010 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/150001693/?lang=cs>. Rigorózní práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE. Vedoucí práce Milan Řehula.
- [18] MATUŠŮ, Jakub. *Vliv mikro a makrostrukturních změn na tokové vlastnosti roztoků polysacharidů* [online]. Zlín, 2011 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/16176/mat%C5%AF%C5%A1%C5%AF_2011_bp.pdf?sequence=1. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Petr Smolka.
- [19] NOVÁK, Libor. *Chování polysacharidů na fázovém rozhraní kapalina/plyn* [online]. Zlín, 2011 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/17633/nov%C3%A1k_2011_bp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Antonín Minařík.
- [20] STEINBÜCHEL, A a M HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, c2003, 10 v. in 11. ISBN 3527302301X-.
- [21] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* [online]. 2008, , 397-411 [cit. 2016-04-30]. ISSN 397-411.
- [22] HASCALL, Vincent a Torvard LAURENT Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2016-04-30]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [23] SCOTT, John Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions: Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online]. 1998 [cit. 2016-04-30]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>

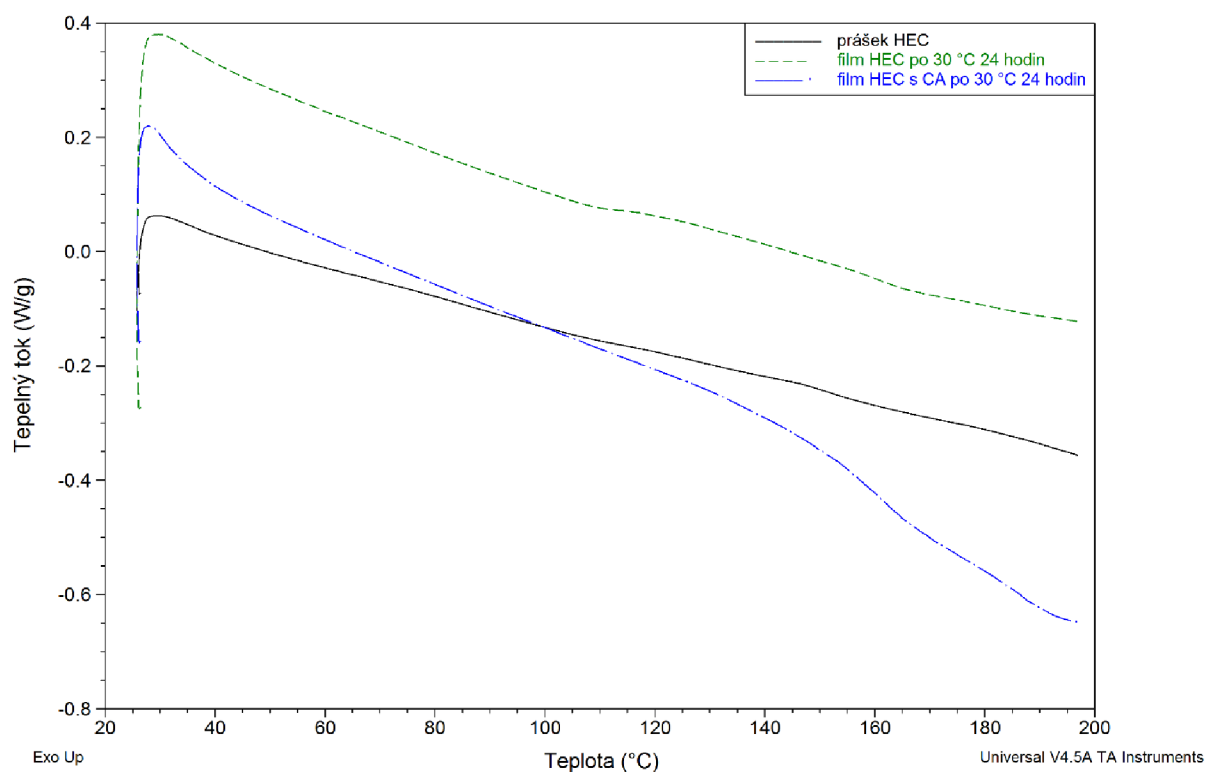
- [24] ČOŽÍKOVÁ, Dagmar. *Analýza radioaktivně značené hyaluronové kyseliny a jejích metabolitů v biologickém materiálu*. [online]. Hradec Králové, 2012 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/140016684/?lang=cs>. Disertační práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE. Vedoucí práce Alice Lázníčková.
- [25] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Přednášky k předmětu Instrumentální a strukturní analýza*. Brno: Vysoké učení technické Brno, Fakulta chemická, 2015.
- [26] ZERNEROVÁ, Alena. *DSC analýza léčiv* [online]. Hradec Králové, 2006 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/120021554/?lang=en>. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce RNDr. Marie Musilová, CSc.
- [27] HATAKEYAMA, T. a F. QUINN *Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer science* [online]. 2nd ed. New York: Wiley, c1999, viii, 180 p. [cit. 2016-05-03]. ISBN 04-719-8362-4. Dostupné z: http://dspace.elib.ntt.edu.vn/dspace/bitstream/123456789/4446/1/ThermalAnalysis%20Fundamentals%20and%20ApplicationstoPolymerScience_KINGDWARF.pdf
- [28] GALLAGHER, Patrick, Michael BROWN a Richard KEMP *Handbook of thermal analysis and calorimetry* [online]. New York: Elsevier, 1998-2003, 4 v. [cit. 2016-05-01]. ISBN 04-448-2088-4. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=33_3DBLGzMYC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [29] KLOUŽKOVÁ, A., P. ZEMENOVÁ, J. KLOUŽEK a W. PABST *Termická analýza* [online]. In: . VŠCHT PRAHA, 2012, s. 66 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://tresen.vscht.cz/sil/sites/default/files/Termick%C3%A1%20anal%C3%BDza.pdf>
- [30] ŠEBESTA, Petr. *STANOVENÍ PODÍLU VLHKOSTI V ELEKTROIZOLAČNÍCH MATERIÁLECH* [online]. Brno, 2014 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=88412. Bakalářská práce. Vysoké učení technické Brno. Vedoucí práce Martin Frk.
- [31] Infračervená spektroskopie. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. b.r. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>
- [32] IR Spectroscopy. *TutorVista* [online]. b.r. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/ir-spectroscopy.html>
- [33] XIE, Xueju a Qiang LIU. Development and Physicochemical Characterization of New Resistant Citrate Starch from Different Corn Starches. *Starch - Stärke* [online]. 2004, **56**(8), 364-370 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1002/star.200300261. ISSN 0038-9056. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/star.200300261>
- [34] RAUCCI, M., M. ALVAREZ-PEREZ, C. DEMITRI, D. GIUGLIANO, V. DE BENEDICTIS, A. SANNINO a L. AMBROSIO Effect of citric acid crosslinking cellulose-based hydrogels on osteogenic differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2015, **103**(6), 2045-2056 [cit. 2016-05-03]. DOI: 10.1002/jbm.a.35343. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.35343>

- [35] ABOU-YOUSEF, Hussein a Samir KAMEL. High efficiency antimicrobial cellulose-based nanocomposite hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1002/app.42327. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.42327>
- [36] COMA, V., I. SEBTI, P. PARDON, P.H. PICHAVANT a A. DESCHAMPS Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers* 51 (2003) 265–271 [online]. Elsevier, 2002 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Octavio_Diez_Sales/publication/259334189_Film_s_chitosano/links/0046352b0d5458077c000000.pdf
- [37] DE CUADRO, Pamela, Tiina BELT, Katri KONTTURI, Mehedi REZA, Eero KONTTURI, Tapani VUORINEN a Mark HUGHES. Cross-linking of cellulose and poly(ethylene glycol) with citric acid. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2015, **90**, 21-24 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2015.03.007. ISSN 13815148. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514815000358>
- [38] REDDY, Narendra a Yiqi YANG. Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry* [online]. 2010, **118**(3), 702-711 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.050. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609007067>
- [39] ZHAO, Xuan, Yang LIU, Weichang LI, Kai LONG, Lin WANG, Sa LIU, Yingjun WANG a Li REN. Collagen based film with well epithelial and stromal regeneration as corneal repair materials: Improving mechanical property by crosslinking with citric acid. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2015, **55**, 201-208 [cit. 2016-04-30]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.05.030. ISSN 09284931. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115300874>
- [40] CHIOU, Bor-Sen, Haani JAFRI, Trung CAO, George ROBERTSON, Kay GREGORSKI, Syed IMAM, Greg GLENN a William ORTS *Modification of wheat gluten with citric acid to produce superabsorbent materials* [online]. 2013 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1002/APP.39044. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.39044>
- [41] *Infrared Spectral Interpretation: Knowledge Base*. USA: Thermo Fisher Scientific, 2009.
- [42] COATES, John. Interpretation of Infrared Spectra. A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000.

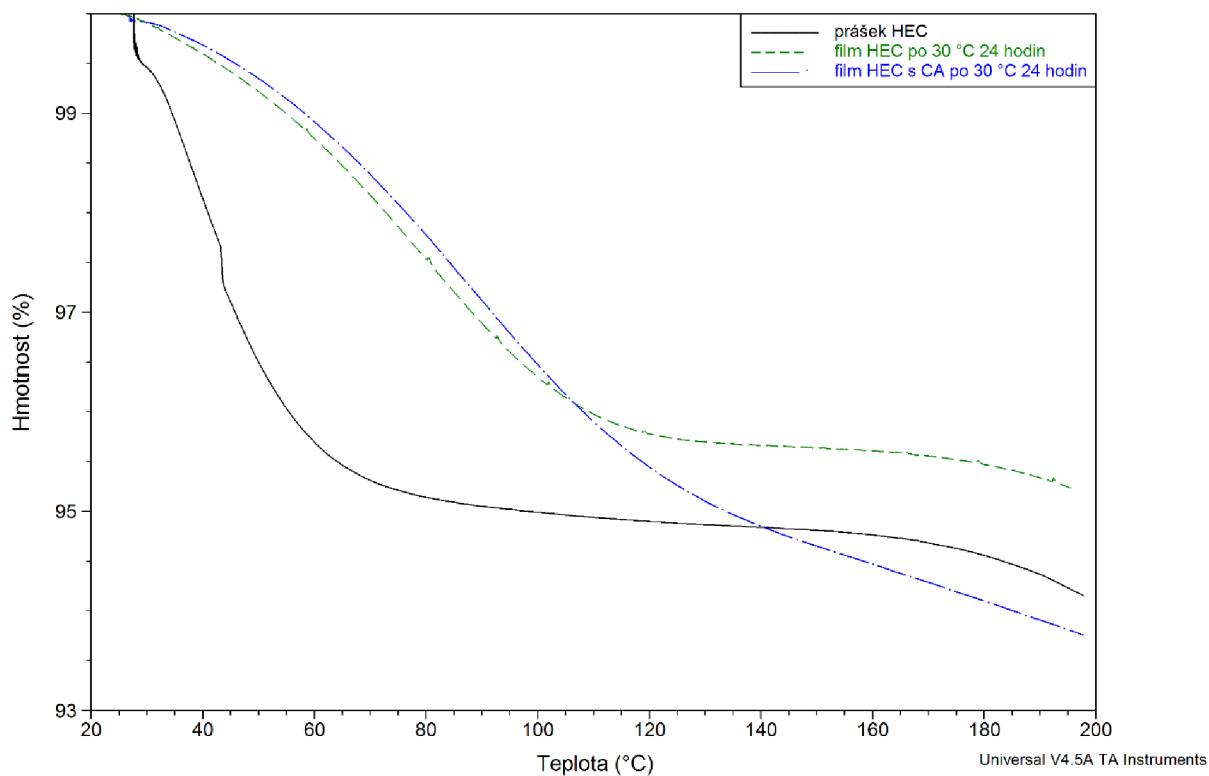
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|---------------|---|
| DSC | Differential Scanning Calorimetry |
| TGA | Termogravimetrická analýza |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| acetyl-CoA | Acetyl koenzym A |
| NADH | Redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu |
| CA | Citric acid |
| HEC | Hydroxyethylcelulóza |
| HYA | Hyluronan |
| D.S. | Degree of substitution |
| M.S. | Molar substitution |
| UV | Ultraviolet |
| ΔG | Změna volné Gibbsovy energie |
| ΔH | Změna entalpie |
| T | Absolutní teplota |
| ΔS | Změna entropie |
| Q | Tepelná energie |
| f | Funkce |
| t | Čas |
| m | Hmotnost |
| T | Transmittance |
| I | Intenzita záření prošlého vzorkem |
| I_0 | Intenzita záření vstupujícího do vzorku |
| A | Absorbance |
| $\tilde{\nu}$ | Vlnočet |
| λ | Vlnová délka |
| IČ | Infračervené záření |
| ATR | Attenuated Total Reflectance |
| NaCMC | Sodná sůl karboxymethylcelulózy |
| AgPNs | Nanočástice stříbra |
| M | Molární hmotnost |
| m_p | Hmotnost polymeru |
| m_v | Hmotnost ultračisté deionizované vody |
| m_{ca} | Hmotnost kyseliny citronové |
| x_p | Obsah polymeru vyjádřený v procentech |
| x_v | Obsah ultračisté deionizované vody vyjádřený v procentech |
| x_{ca} | Obsah kyseliny citronové vyjádřený v procentech |
| LDPE | Low Density Polyethylen |
| w/w | Hmotnostní poměr |

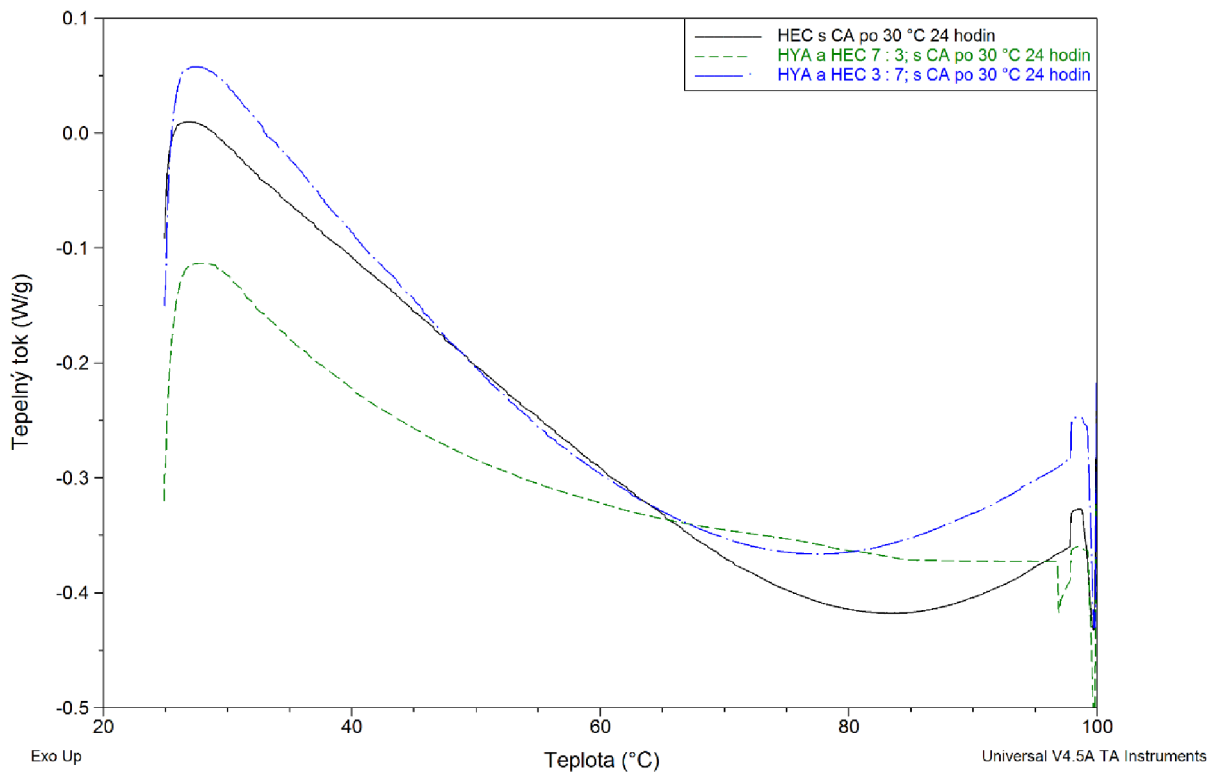
9 PŘÍLOHY



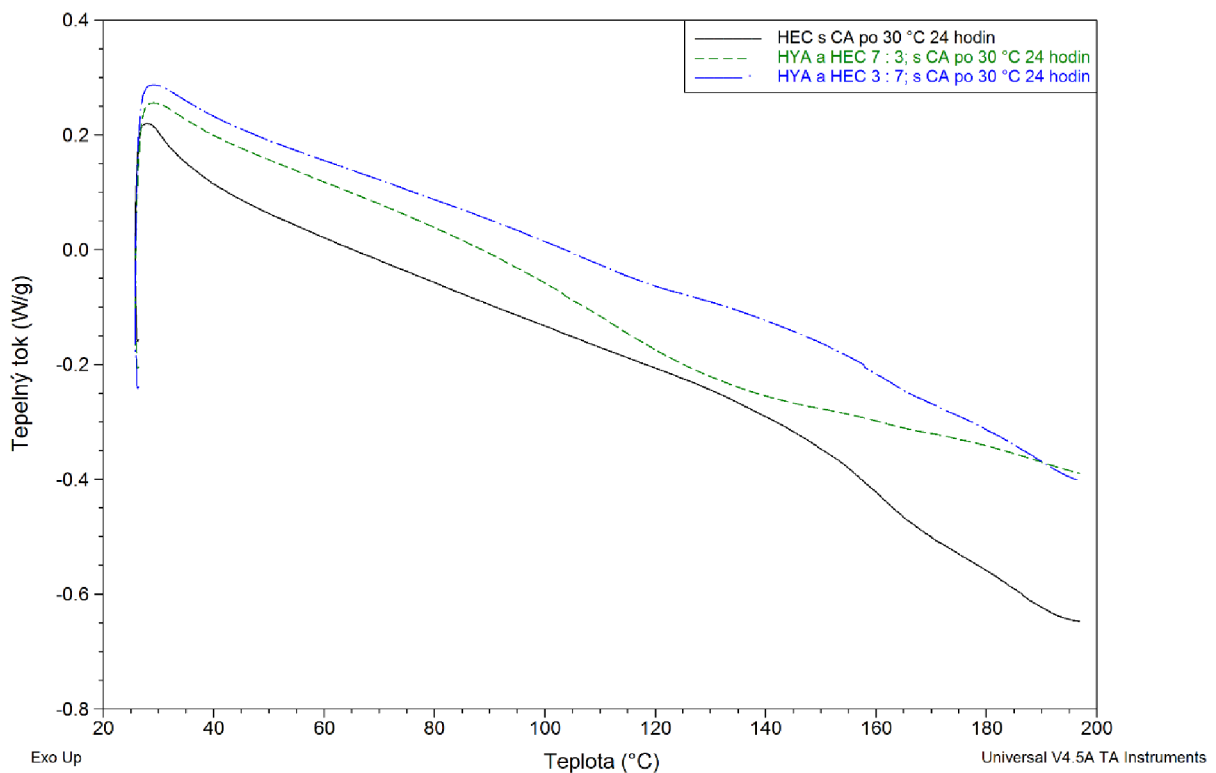
Obrázek 44 DSC záznam prášku hydroxyethylcelulózy (HEC), filmu HEC po 30 °C 24 hodin a filmu HEC a kyseliny citronové (CA) po 30 °C 24 hodin; 2. částí cyklu měření



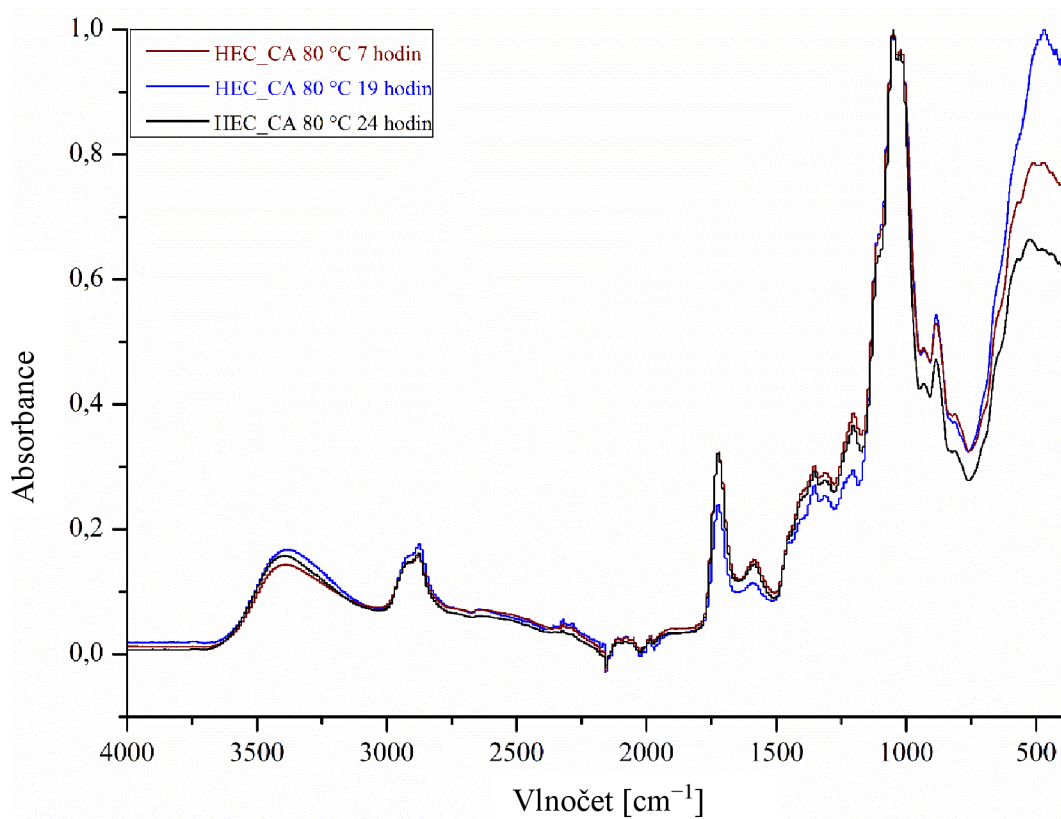
Obrázek 45 Termogravimetrická křivka prášku hydroxyethylcelulózy (HEC), filmu HEC po 30 °C 24 hodin a filmu HEC a kyseliny citronové (CA) po 30 °C 24 hodin



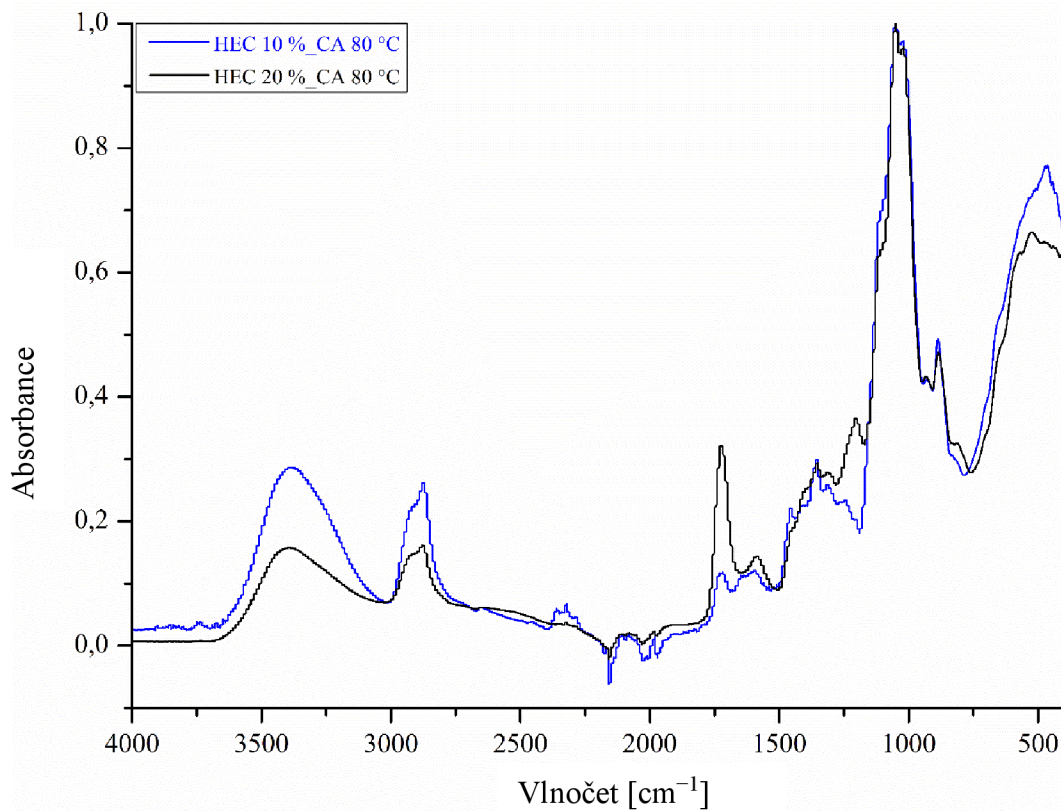
Obrázek 46 DSC záznam filmu HEC a CA, filmu HYA a HEC v hmotnostním poměru 7 : 3 s CA, filmu HYA a HEC v hmotnostním poměru 3 : 7 s CA po 30 °C 24 hodin; 1. části cyklu měření



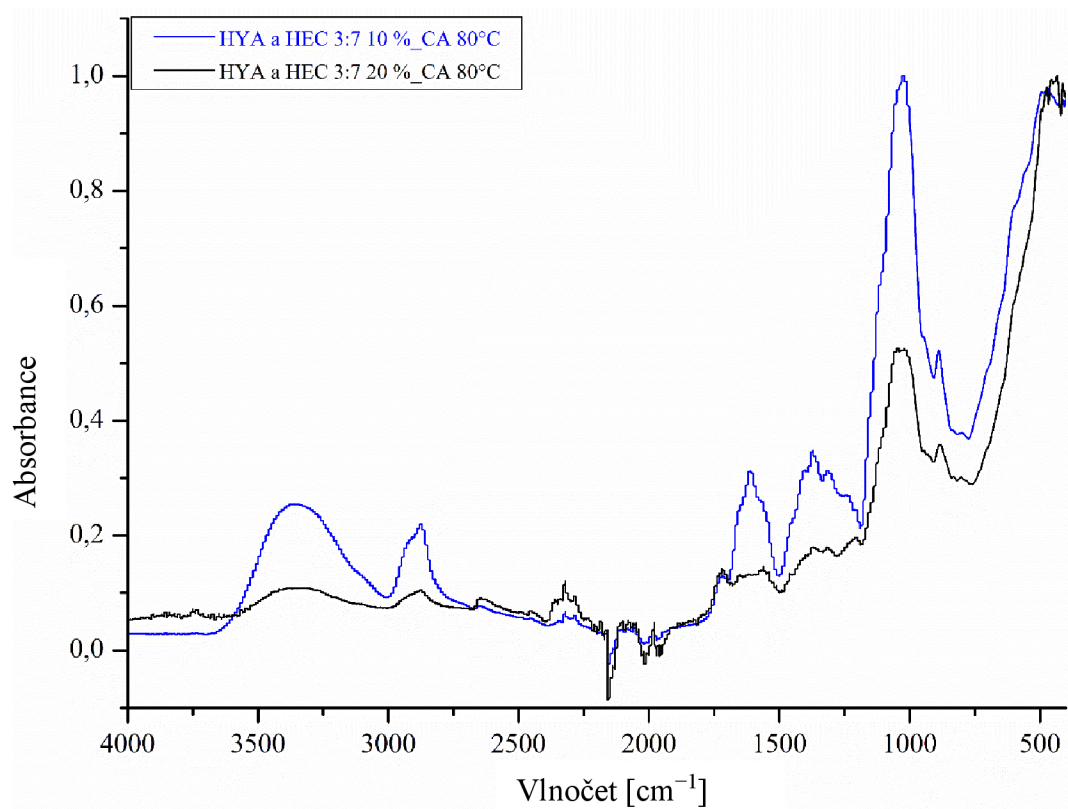
Obrázek 47 DSC záznam filmu HEC a CA, filmu HYA a HEC v hotnostním. poměru 7 : 3 s CA, filmu HYA a HEC v hmotnostním poměru 3 : 7 s CA po 30 °C 24 hodin; 2. části cyklu měření



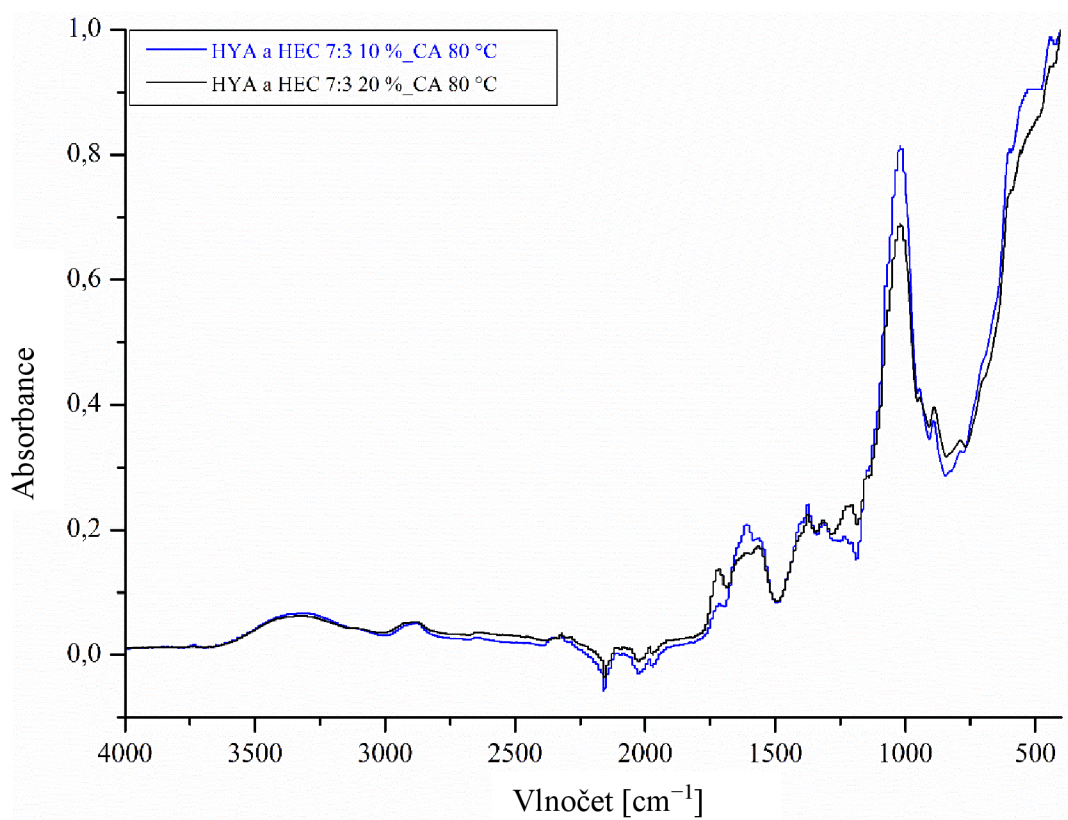
Obrázek 48 Srovnání časů síťování u filmu hydroxyethylcelulózy s obsahem 20 % (w/w HEC) kyseliny citronové



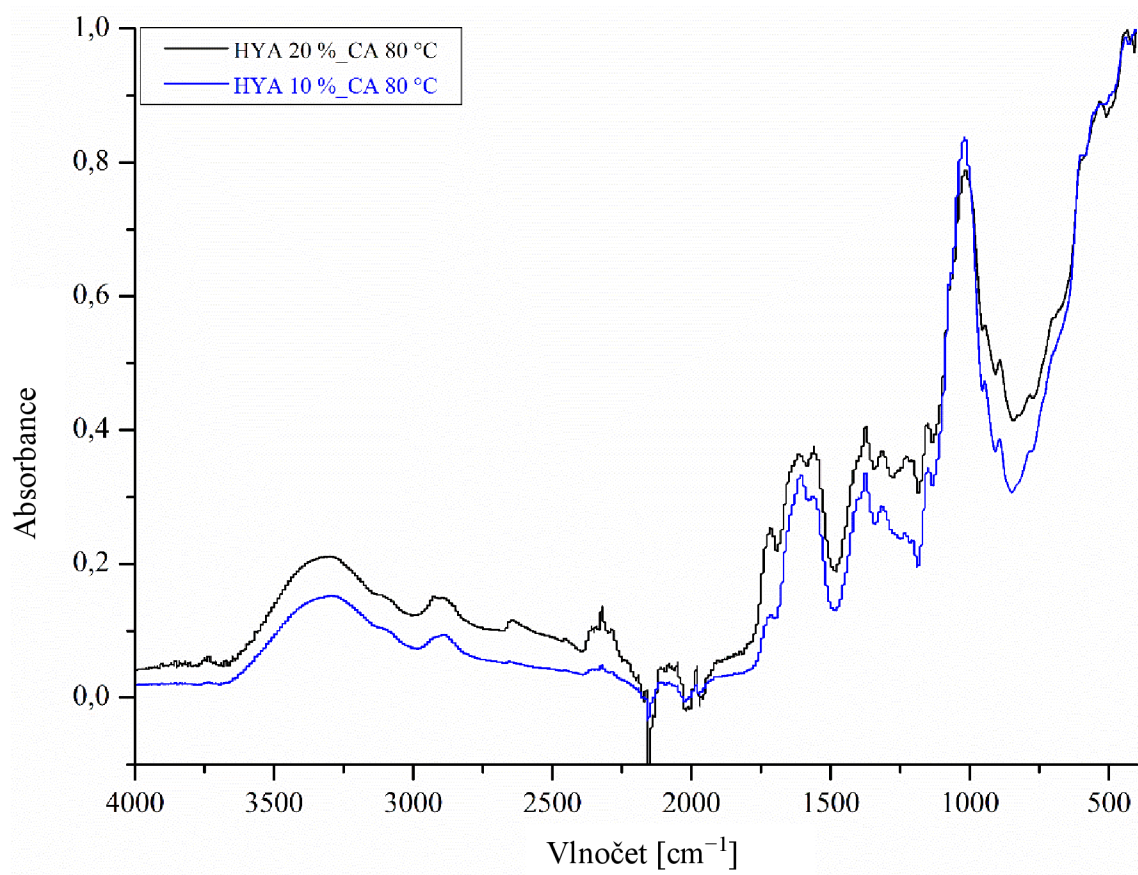
Obrázek 49 FTIR spektrum filmu hydroxyethylcelulózy s obsahem 10 % a 20 % (w/w HEC) kyseliny citronové



Obrázek 50 FTIR spektrum směsi HYA a HEC (3 : 7) s obsahem 10 % a 20 % (w/w směsi) CA



Obrázek 51 FTIR spektrum směsi HYA a HEC (7 : 3) s obsahem 10 % a 20 % (w/w směsi) CA



Obrázek 52 FTIR spektrum HYA s obsahem 10 % a 20 % (w/w HYA) kyseliny citronové